

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Etablierung serumfreier Assay Ready KeratinoSens Zellen für den Einsatz

im ARE-Nrf2-Assay gemäß OECD TG 442D

im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Nik Reinhard

Matrikel Nr.: XXXXXXXXXX

Hamburg, den 23.01.2026

Gutachter: Prof. Dr. Julien Béthune (HAW Hamburg)

Gutachter: Lukas Focke (acCELLerate GmbH)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma acCELLerate GmbH

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob serumfrei kultivierte und kryokonservierte KeratinoSens SF Zellen für den Einsatz im Assay Ready Format im KeratinoSens™ Assay gemäß OECD TG 442D geeignet sind. Der Schwerpunkt der Arbeit lag dabei auf der Optimierung der Kryokonservierung sowie der funktionellen Bewertung der Zellen im Assay Ready Format. Hierzu wurden unterschiedliche serumfreie Einfriermedien untersucht und mit einem serumhaltigen Kontrollmedium verglichen. Die kryokonservierten Zellen wurde direkt nach dem Auftauen im KeratinoSens™ Assay getestet, um den Einfluss der Referenzsubstanzen gemäß OECD TG 442D zu bewerten. Nicht sensibilisierende Substanzen konnten als negativ eingestuft werden. Bei den sensibilisierenden Referenzsubstanzen zeigte sich trotz teilweise erhöhter Zytotoxizität überwiegend eine Guideline konforme Induktion, sodass vier von sechs Referenzsubstanzen als positiv eingestuft wurden. Dadurch konnten die KeratinoSens SF Zellen im Assay Ready Format die Anforderungen der technischen Überprüfung nicht vollständig erfüllen.

Ergänzend wurde die Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen bei vier unterschiedlichen Konzentrationen des Serumersatzproduktes im Bereich von 0,5-2 mL/L untersucht, um optimale Bedingungen hinsichtlich der Wachstumsraten und Zellviabilitäten zu bestimmen. Dabei wurde eine Arbeitskonzentration von 1 mL/L SimPlaceX festgelegt. Die Ergebnisse der Langzeitkultivierung zeigten, dass die Zellen unter serumfreien Bedingungen über längere Zeiträume kultiviert werden konnten ohne deutliche Einbrüche der Wachstumsarten und Zellviabilität zu beobachten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die serumfrei kultivierten und kryokonservierten Zellen im Assay Ready Format eine grundsätzliche Funktionalität aufweisen. Gleichzeitig zeigen sie jedoch eine erhöhte zelluläre Belastung, sodass weiterer Optimierungsbedarf besteht, um die Anforderungen der technischen Überprüfung gemäß OECD TG 442D vollständig zu erfüllen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	8
1.1 Historischer Hintergrund der <i>in vitro</i> Toxikologie	8
1.2 Zellkulturtechnik und die Rolle von fetalem Rinderserum (FBS)	9
1.3 Serumersatzprodukte als Alternative zu FBS	11
1.4 Bedeutung von oxidativem und elektrophilen Stress in der Hautsensibilisierung...	11
1.5 Der Nrf2-Signalweg als molekulare Grundlage <i>in vitro</i> basierter Sensibilisierungstests	12
1.6 Nrf2-vermittelte Stressantworten in Hautzellen und ihre Messung im KeratinoSens™ Assay	13
1.7 Zielsetzung	15
2 Ergebnisse	16
2.1 Optimierung der serumfreien Kultivierungsbedingungen.....	16
2.2 Einfluss der Langzeitkultivierung auf das Wachstum und die Viabilität der KeratinoSens SF	18
2.3 Kryooptimierung	20
2.4 Validierung der Referenzsubstanzen im serumfreien KeratinoSens™ Assay	21
3 Diskussion	35
3.1 Optimierung der serumfreien Kultivierungsbedingungen.....	35
3.2 Einfluss der Langzeitkultivierung auf das Wachstum und die Viabilität der KeratinoSens SF	36
3.3 Kryooptimierung	36
3.4 Validierung von Referenzsubstanzen im serumfreien KeratinoSens™ Assay	37

3.5	Fazit und Ausblick.....	39
4	Material	40
4.1	Mess- und Kultivierungsgeräte	40
4.2	Experimentelle Verbrauchsmaterialien	41
4.3	Zelllinie	42
4.4	Zellkulturreagenzien für Handhabung und Kryokonservierung	43
4.5	Zellkulturmedien und -zusätze zur Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen	43
4.6	Serumfreie Medienzusammensetzung.....	44
4.7	Testsubstanzen des KeratinoSens™ Assays	44
5	Methoden.....	45
5.1	Kryooptimierung	45
5.2	Auftauen von Zellen.....	47
5.3	Zählung/ Vitalitätsbestimmung	48
5.4	Passagieren adhärent wachsender Zellen	48
5.5	Einfrierprozess	50
5.6	KeratinoSens™ Assays	51
6	Danksagung	58
7	Literaturverzeichnis.....	59
8	Eidesstaatliche Erklärung	63

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Nrf2-Keap1-ARE-Signalwegs unter basalen und stressinduzierten Bedingungen [17].	12
Abbildung 2: Der Nrf2-ARE-Signalweg und sein reporterbasierter Nachweises im KeratinoSens™ Assay [21].	14
Abbildung 3: MTT-Viabilitätsassay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität vitaler Zellen.	15
Abbildung 4: Wachstumsrate der KeratinoSens SF Zellen in Abhängigkeit von der SimPlaceX Konzentration.	16
Abbildung 5: Viabilität von KeratinoSens SF Zellen in Abhängigkeit von der SimPlaceX Konzentration.	17
Abbildung 6: Wachstumskinetik serumfrei kultivierter KeratinoSens SF Zellen über mehrere Kultivierungstage.	18
Abbildung 7: Zellviabilität serumfrei kultivierter KeratinoSens SF Zellen über mehrere Kultivierungstage.	19
Abbildung 8: Vergleich der Zellviabilität serumfrei kultivierter KeratinoSens SF Zellen nach Kryokonservierung in verschiedenen Einfriermedien.	20
Abbildung 9: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Salicylsäure im KeratinoSens™ Assay.	22
Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Milchsäure im KeratinoSens™ Assay.	23
Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Glycerol im KeratinoSens™ Assay.	24
Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Isopropanol im KeratinoSens™ Assay.	25
Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit EGDMA im KeratinoSens™ Assay.	26
Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Zimtalkohol im KeratinoSens™ Assay.	27
Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit 2-MBT im KeratinoSens™ Assay.	28
Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Metol im KeratinoSens™ Assay.	29

Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit MDBGN im KeratinoSens™ Assay.	30
Abbildung 18: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit DNCB im KeratinoSens™ Assay.	31

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der EC _{1,5} - und IC ₅₀ -Werte der untersuchten Referenzsubstanzen unter Einbezug der OECD TG 442D Richtwerte, der im Assay Ready Format ermittelten Messwerte sowie ergänzender hausinterner KeratinoSens™-Referenzmessung.	32
Tabelle 2: Übersicht der für den KeratinoSens™ Assay eingesetzten Mess- und Kultivierungsgeräte.	40
Tabelle 3: Übersicht der für den KeratinoSens™ Assay verwendeten experimentellen Verbrauchsmaterialien.	41
Tabelle 4: Übersicht der kultivierten KeratinoSens SF Zelllinie, serumfrei kultiviert und für den Assay verwendet.	42
Tabelle 5: Zellkulturreagenzien für die Handhabung und Kryokonservierung.	43
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze zur Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen.	43
Tabelle 7: Medienzusammensetzung des serumfreien Kulturmediums für KeratinoSens SF Zellen.	44
Tabelle 8: Testsubstanzen zur Klassifizierung nach OECD TG 442D im KeratinoSens™ Assay.	44
Tabelle 9 Belegungsschema der 96-Well-Platte für die Vitalitätsmessung mittels Resazurin-Assay. Proben aus Vial A (Kontrolle im FBS-haltigen Medium), Vial B (serumfreies Medium) und Vial C (hausinternes Einfriermedium) wurden jeweils in Duplikaten in die entsprechenden Wells (B2–B4/B5–B7, C2–C4/C5–C7 und D2–D4/D5–D7) ausgesät.	46
Tabelle 10: Aussaatdichten der KeratinoSens SF Zellen.	49
Tabelle 11: Die Wells A12–C12 enthalten die erste Testsubstanz, während die Wells D12–F12 die zweite Testsubstanz enthalten; diese Wells bilden jeweils den Ausgangspunkt der entsprechenden Verdünnungsreihen. Die Positivkontrolle EGDMA ist ebenfalls als Verdünnungsreihe angelegt, beginnend in den Wells G6, G11 und H11, und dient als Referenzsubstanz. Die Solvent Control (SC) sowie die Blanks enthalten ausschließlich das Lösungsmittel DMSO. Sämtliche Testsubstanzen und Kontrollen wurden in Triplikaten pipettiert.	53
Tabelle 12: Referenzsubstanzen des KeratinoSens™ Assays gemäß OECD TG 442D	56

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
L	Liter
cm ²	Quadratcentimeter
h	Stunde
min	Minute
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DPBS	Dulbecco-phosphatgepufferte Salzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fetales Rinderserum
wp	Well-Platte
96 wp	Zellkulturplatte mit 96 Wells
ARE	Antioxidatives Response-Element
Nrf2	Nuklearer Faktor erythroid-2-verwandter Faktor
Keap1	Kelch-ähnliches ECH-assoziiertes Protein 1
EGDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
DNCB	Dinitrochlorbenzol
MDBGN	Methyldibromoglutaronitril

2-MBT	2-Mercaptobenzothiazol
G418	Geneticin
LLNA	Lokaler Lymphknoten-Assay
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

1 Einleitung

1.1 Historischer Hintergrund der *in vitro* Toxikologie

In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts stützte sich die toxikologische Sicherheitsbewertung überwiegend auf *in vivo*-Untersuchungen, also Experimente am lebenden Organismus. Tierversuche bildeten hierbei die etablierte Standardmethode der wissenschaftlichen Forschung. Aufgrund ihrer Fähigkeit, komplexe biologische Reaktionen auf Ebene des Gesamtorganismus abzubilden, galten sie über Jahrzehnte hinweg als Goldstandard. Mit der Entdeckung der HeLa-Zellen Anfang der 1950er-Jahre erfolgte jedoch ein bedeutender wissenschaftlicher Wendepunkt [1]. Die Etablierung der ersten dauerhaft teilungsfähigen humanen Zelllinie ermöglichte erstmals eine langfristige Zellkultivierung. Dies stellte einen wesentlichen Fortschritt dar, da die bis dahin verfügbaren Zellkulturtechniken auf mortalen Zellen basierten, die nur kurze Lebenszyklen aufwiesen und zentrale Anforderungen wie Reproduzierbarkeit kaum erfüllten. Mit der zunehmenden Verbreitung und Relevanz von *in vitro* Kulturen stieg auch der Bedarf an essenziellen Zellkulturkomponenten, insbesondere an fötalem Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS) [2]. Dieses stellt damals wie heute einen der wichtigsten Zusatzstoffe der Zellkulturtechnik Säugetierzellen dar und repräsentiert zugleich eine der letzten direkten Verbindungen zwischen *in vitro* Methoden und der Nutzung von Tiermaterialien in der modernen Forschung. Aufbauend auf der Kultivierung immortalisierter Zellen, die aus Gewebeproben gewonnen wurden, gelang in den 1980er-Jahren der Durchbruch der gentechnischen Immortalisierung gesunder menschlicher Zellen [3]. Dadurch wurden *in vitro* Kulturen zunehmend zu einem verlässlichen, reproduzierbaren und ethisch vertretbaren Forschungswerkzeug. Diese Fortschritte bildeten die Grundlage für die Entwicklung moderner, mechanistisch orientierter Testmethoden.

Parallel zur wissenschaftlichen Kritik an Tierversuchen wuchs in den 1980er und 1990er Jahren auch der regulatorische Druck, tierfreie Alternativen zu entwickeln. Bereits 1993 trat die EU - Kosmetikrichtlinie 76/768/EWG mit ersten Einschränkungen für Tierversuche in Kraft, die später mehrfach verschärft wurde [4]. Einen entscheidenden Wendepunkt stellte die Einführung der EU-Kosmetikverordnung (EG) Nr. 1223/2009 dar, die seit 2013 ein vollständiges Vermarktungsverbot für kosmetische Produkte vorsieht, die an Tieren getestet wurden, unabhängig davon, ob die Tests innerhalb oder außerhalb der EU durchgeführt wurden [5].

Diese regulatorischen Änderungen machten deutlich, dass validierte *in vitro* Methoden zur Sicherheitsbewertung dringend benötigt wurden.

Einen wesentlichen Beitrag zur Entwicklung tierfreier Teststrategien leistete der Schweizer Duft- und Kosmetikhersteller Givaudan, der zu den ersten Unternehmen gehörte, die aktiv an der Etablierung solcher Methoden arbeiteten. Bereits 2006 begann Givaudan mit der Entwicklung des KeratinoSens™ Assays, eines zellbasierten Verfahrens, das die Aktivierung des Nrf2-ARE-Signalwegs in HaCaT-Zellen misst und damit einen zentralen frühen molekularen Mechanismus der Hautsensibilisierung erfasst [6]. Der KeratinoSens™ Assay baut konzeptionell auf dem Lokalem Lymphknoten Assay (LLNA) auf, der 1999 als OECD Test Guideline 429 international standardisiert wurde und lange Zeit, als eines der wichtigsten *in vivo* Verfahren zur Identifizierung hautsensibilisierender Substanzen galt. Beim LLNA wird die Testsubstanz über 72 Stunden auf die Ohren von Mäusen appliziert, woraufhin die Proliferation von T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten gemessen wird [7]. Eine erhöhte DNA-Synthese, detektiert über markierte Nukleotide wie BrdU oder radioaktives Thymin, weist auf eine sensibilisierende Wirkung hin. Trotz seiner methodischen Relevanz zeigt der LLNA zugleich die Grenzen klassischer *in vivo* Ansätze auf, insbesondere im Hinblick auf ethische Fragestellungen sowie die begrenzte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen. Ungeachtet dessen werden LLNA-Daten bis heute häufig als Referenz für die Gefährdungseinstufung von Testsubstanzen herangezogen [7]. Durch die Aufnahme des KeratinoSens™ Assays in die OECD Test Guideline 442D im Jahr 2015 gilt diese *in vitro* Testmethode als anerkannte, tierversuchsfreie Alternative zum LLNA. [8]. Damit stellt er einen zentralen Bestandteil moderner Teststrategien dar und ist insbesondere für die kosmetische Sicherheitsbewertung von hoher Relevanz.

Da der KeratinoSens Assay wie alle *in vitro* Verfahren auf der Kultivierung vitaler und funktioneller Zellen beruht, rückt im Folgenden zunächst die verwendete Zellkulturtechnik in den Fokus.

1.2 Zellkulturtechnik und die Role von fetalem Rinderserum (FBS)

Kultivierte Zelllinien weisen gewebespezifische Anforderungen an die Zellkulturbedingungen auf, weshalb die Zusammensetzung des Kulturmediums entscheidend für den Erhalt zelltypischer Eigenschaften ist [9]. Das Basalmedium bildet dabei die Grundlage und besteht aus standardisierten Nährlösungen, die die grundlegenden physiologisch notwendigen Komponenten für das Überleben und die Proliferation von Zellen *in vitro* bereitstellen.

Dazu gehören essenzielle Nährstoffe wie Aminosäuren, Salze, Vitamine, Glukose und Pufferstoffe sowie häufig weitere metabolische Vorstufen [2]. Zur Optimierung der Kulturbedingungen werden je nach Zelllinie Supplements ergänzt. Dazu zählen unter anderem L-Glutamin, Natriumpyruvat, 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES) (zur Stabilisierung des pH-Werts), Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA), β -Mercaptoethanol, Insulin oder weitere wachstumsfördernde Zusätze. Die Auswahl der Supplemente richtet sich dabei nach den spezifischen metabolischen und physiologischen Anforderungen der jeweiligen Zelllinie [2]. In der Zellkulturtechnik stellt FBS neben den zellspezifischen Kultivierungskomponenten das zentrale Supplement dar. FBS wurde in den 1950er Jahren entdeckt und ist seit den 1960er Jahren fest in der Zellkultur etabliert [2]. Es handelt sich um das Blut von Rinderföten, das unmittelbar nach der Schlachtung trächtiger Muttertiere durch Herzpunktion gewonnen wird, um das Risiko mikrobieller Kontamination zu minimieren [10]. Bis heute gilt FBS als nahezu unverzichtbare Komponente für zahlreiche Zellkulturanwendungen. Das Serum enthält eine Vielzahl bioaktiver Moleküle, darunter Wachstumsfaktoren, Hormone, Zytokine sowie Adhäsions- und Transportproteine, die essenziell für Proliferation, Überleben, Adhäsion und Differenzierung von Zellen sind [2]. Darüber hinaus weist FBS einen vergleichsweise geringen Anteil an Antikörpern und immunaktiven Proteinen auf, wodurch unerwünschte Zellreaktionen reduziert und eine breite Einsetzbarkeit in unterschiedlichen Zelllinien ermöglicht wird [11].

Trotz dieser Vorteile ist der Einsatz von FBS mit erheblichen wissenschaftlichen und ethischen Herausforderungen verbunden. Aus wissenschaftlicher Sicht problematisch ist insbesondere die weiterhin undefinierte Zusammensetzung des Serums. Zwar ist bekannt, welche Komponenten grundsätzlich enthalten sein müssen, jedoch lassen sich deren exakte Konzentrationen und Relationen nicht eindeutig bestimmen. Hinzu kommt eine ausgeprägte Chargenvariabilität. Unterschiede in der Konzentration bioaktiver Substanzen können die Standardisierung und Reproduzierbarkeit experimenteller Ergebnisse erheblich beeinträchtigen.

Zudem handelt es sich bei FBS um eine komplexe Mischung zahlreicher, teilweise unbekannter Moleküle, was unerwünschte Wechselwirkungen begünstigen und die Vergleichbarkeit zwischen Studien weiter einschränken kann [2]. Aus ethischer Perspektive wird insbesondere die Gewinnung durch Herzpunktion lebender Föten kritisiert, ein Verfahren, das vor allem im Zusammenhang mit der Massentierhaltung zunehmend in Frage gestellt wird. Gleichzeitig erschwert die unzureichend definierte Zusammensetzung von FBS die Entwicklung valider Serumersatzprodukte und treibt die Suche nach definierten Alternativen voran.

1.3 Serumersatzprodukte als Alternative zu FBS

Die Suche nach Alternativen begann bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts. In den 1970er- und 1980er-Jahren erfolgte die erste schrittweise Validierung solcher Ersatzprodukte [12]. Systematisch und klinisch relevant wurde das Thema mit der Entwicklung von humanem *Plättchen Lysats* sowie chemisch definierten Medien in den 2000er Jahren [13]. Gerade chemisch definierte Medien gewinnen zunehmend an Bedeutung, da sie eine hohe Reproduzierbarkeit und Standardisierung experimenteller Ergebnisse ermöglichen und somit die Vergleichbarkeit zwischen Studien deutlich verbessern [2]. Vor diesem Hintergrund stellt das Supplement SimPlaceX, entwickelt von der Firma Scinora, die sich auf serumfreie Kultivierungsverfahren spezialisiert hat, eine moderne, definierte Alternative zu FBS dar. SimPlaceX wurde uns im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um ein definiertes Proteingemisch, das unter anderem Transportproteine (z. B. Transferrin, Serumalbumin, Transthyretin, Apolipoprotein B-100), Adhäsionsfaktoren (Fibronectin, Vitronectin, Laminin-Varianten 511, 411 und 211) sowie Proteaseinhibitoren (Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-2-Makroglobulin, Plasminogenaktivator-Inhibitoren) enthält. Darüber hinaus umfasst es Spurenelemente, geringe Mengen rekombinanter Wachstumsfaktoren (z. B. EGF, VEGF), essenzielle Cofaktoren (Vitamine) sowie Hormone wie Insulin [14]. Die rekombinanten Wachstumsfaktoren werden mithilfe kontinuierlich proliferierender Hepatozyten-Zelllinien hergestellt. SimPlaceX liegt in lyophilisierter Form vor und wird in einem definierten Volumen, in unserem Fall 1 mL, im jeweiligen Basalmedium resuspendiert.

Die Weiterentwicklung der Zellkulturtechnik sowie der Einsatz validierter Serumersatzprodukte ermöglichen die Etablierung serumfreier *in vitro* Sensibilisierungstests, die gezielt zelluläre Stressantworten messen. Aufbauend darauf werden im Folgenden die relevanten molekularen Signalwege und ihre Bedeutung für moderne *in vitro* Testsysteme beschrieben.

1.4 Bedeutung von oxidativem und elektrophilen Stress in der Hautsensibilisierung

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) sowie elektrophile Substanzen sind zentrale Mediatoren zellulärer Stressreaktionen und spielen eine wesentliche Rolle bei der Hautsensibilisierung. Oxidativer bzw. elektrophiler Stress entsteht in Zellen durch ein Ungleichgewicht zwischen Stressfaktoren und den antioxidativen Schutzmechanismen [15].

Dabei sind ROS/RNS und Elektrophile nicht per se schädlich, sondern erst ihr Überwiegen gegenüber den antioxidativen Schutzsystemen, was zu unspezifischer Proteinoxidation, Lipidperoxidation, DNA-Oxidation sowie zu kovalenten Modifikationen von Proteinen und deren funktionellen Gruppen führen kann. Darüber hinaus können bei der Detoxifikation von ROS/ RNS reaktive Zwischenprodukte entstehen, die selbst elektrophile Eigenschaften besitzen. Elektrophile Substanzen sind elektronenarme Moleküle, welche aufgrund ihrer Elektronenaffinität bevorzugt kovalente Bindungen mit nukleophilen Gruppen eingehen [16].

1.5 Der Nrf2-Signalweg als molekulare Grundlage *in vitro* basierter Sensibilisierungstests

Unter basalen Bedingungen liegt Nrf2 im Zytoplasma in inaktiver Form vor. Dabei ist Nrf2 über spezifische Protein-Protein-Interaktionen an das zytoplasmatische Sensorprotein Kelch like ECH associated protein 1 (Keap1) gebunden. Dies führt zu einer kontinuierlichen Ubiquitinierung von Nrf2 und dessen anschließendem proteasomalen Abbau (Abbildung 1).

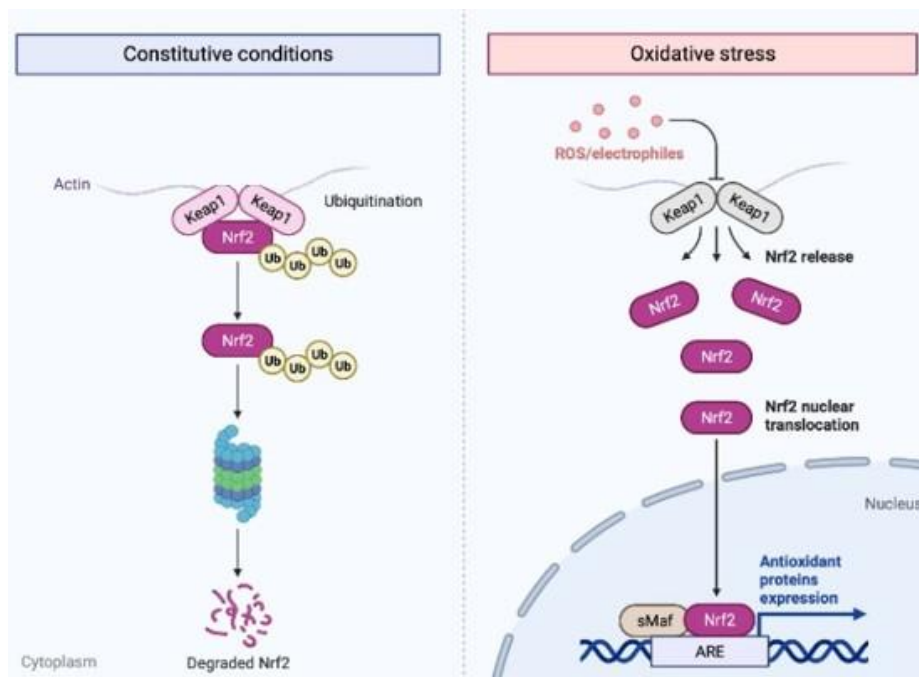


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Nrf2-Keap1-ARE-Signalwegs unter basalen und stressinduzierten Bedingungen [17].

Links ist der Basalzustand der Zelle dargestellt, in dem Nrf2 kontinuierlich durch den Keap1-vermittelten proteasomalen Abbau reguliert wird. Rechts ist der aktivierte Zustand des Nrf2-Keap1-ARE-Signalwegs in Gegenwart oxidativer bzw. elektrophiler Substanzen gezeigt. Infolge der Aktivierung kommt es zur Freisetzung von Nrf2 und dessen Verlagerung in den Zellkern, was schließlich zur ARE-abhängigen Genexpression führt.

Diese Regulation stellt eine posttranslationale Regulation dar, da die Aktivität von Nrf2 primär über die Stabilität des Keap1-Nrf2-Komplexes und nicht über eine veränderte Genexpression gesteuert wird. Unter Bedingungen oxidativen Stresses oder in Gegenwart elektrophiler Substanzen kommt es zu kovalenten Modifikationen von Keap1, wodurch die Keap1-vermittelte Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau von Nrf2 verhindert werden. Das Nrf2 akkumuliert im Zytosol, wandert in den Zellkern und bildet dort Heterodimere mit sMaf-Proteinen. Der Nrf2-sMaf-Komplex bindet an ARE-Sequenzen (Antioxidant Response Element) in den Promotorregionen seiner Zielgene und rekrutiert notwendige Cofaktoren, wodurch die Bindungsaffinität der RNA-Polymerase II erhöht wird und die Transkription Nrf2-abhängiger Gene initiiert wird. Somit stellt der Keap1-Nrf2-ARE-Signalweg die zelluläre Antwort auf oxidativen und elektrophilen Stress dar [18]. Neben der potenziellen Modifikation von Keap1 können elektrophile Substanzen kovalente Addukte mit weiteren zelleigenen Proteinen bilden. Diese stabilen Proteinmodifikationen können zur Entstehung antigener Determinanten führen, die vom Immunsystem als fremd erkannt werden und eine Immunantwort auslösen. Elektrophile Substanzen sind somit, im Gegensatz zu ROS/RNS, direkt an der Auslösung hautsensibilisierender immunologischer Reaktionen beteiligt [19]. Dies bildet die molekulare Grundlage für *in vitro* Testsysteme wie den KeratinoSens™ Assay.

1.6 Nrf2-vermittelte Stressantworten in Hautzellen und ihre Messung im KeratinoSens™ Assay

Beim KeratinoSens™ Assay wird eine immortalisierte humane HaCaT Keratinozytenlinie verwendet, die ein stabil integriertes Firefly Luciferase Reportergen unter der Kontrolle des ARE-Signalwegs des AKR1C2-Gens trägt. Das Antioxidant Response Element (ARE) ist ein cis-regulatorisches Element in der 5' Promotorregion zahlreicher Phase-II-Detoxifikationsgene. Bei Aktivierung des Nrf2-abhängigen Signalwegs kommt es zur verstärkten Expression endogener Phase-II-Detoxifikationsenzyme sowie des exogen integrierten Luciferase Reportergens. Die exprimierte Firefly Luciferase katalysiert die Oxidation von D-Luciferin in Gegenwart von ATP und molekularem Sauerstoff, wobei Oxyluciferin in einem angeregten Zustand entsteht. Beim Übergang in den energetisch stabileren Grundzustand wird Licht im sichtbaren Spektralbereich emittiert. Die Aktivierung des Signalwegs lässt sich indirekt über die Luciferase-Reporteraktivität bestimmen, da die emittierte Lichtintensität proportional zur Menge der exprimierten Luciferase ist und somit die Nrf2-abhängige Transkriptionsaktivität widerspiegelt (Abbildung 2) [20].

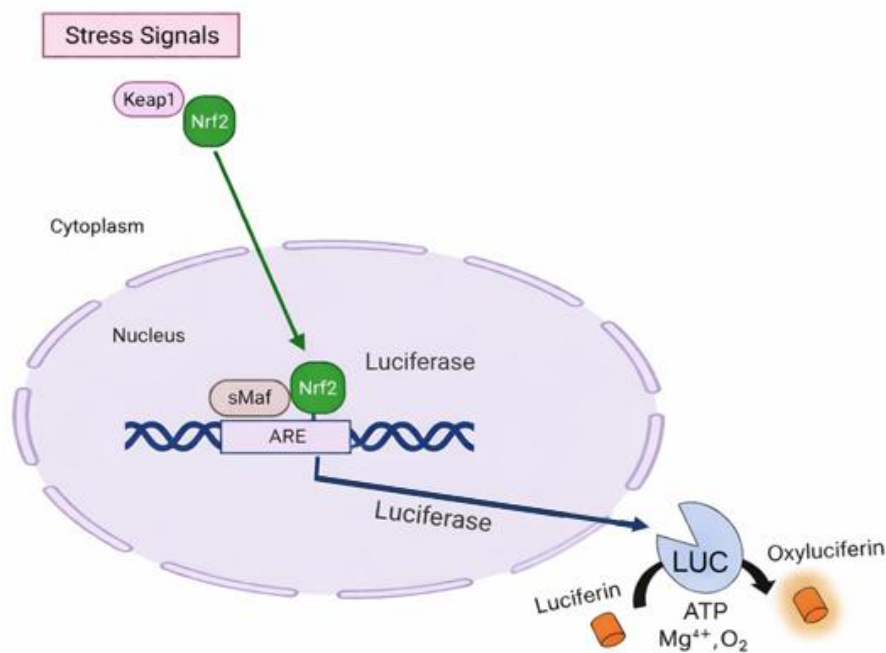


Abbildung 2: Der Nrf2-ARE-Signalweg und sein reporterbasierter Nachweises im KeratinoSens™ Assay [21].

Reporterbasierter Nachweis der Nrf2-Aktivierung im KeratinoSens™ Assay. Oxidative oder elektrophile Stresssignale aktivieren den Nrf2-Keap1-ARE-Signalweg und führen zur Translokation von Nrf2 in den Zellkern. Die Bindung von Nrf2 an die ARE-Sequenzen induziert die Expression des eingebrachten Firefly-Luciferase-Reportergens. In Anwesenheit von D-Luciferin katalysiert die Luciferase die Bildung von Oxyluciferin unter Emission von Lumineszenz, die als Maß für die Nrf2-vermittelte Stressantwort dient.

Parallel zur Messung der Reporteraktivität wird die Zellviabilität mittels des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assays (MTT-Assay) überprüft. Dabei wird das Tetrazoliumsalz MTT von metabolisch aktiven Zellen zu violetter Formazan reduziert, wie in Abbildung 3 zu entnehmen ist. Die Absorptionsintensität des gebildeten Formazans dient als Maß für die metabolische Aktivität und Lebensfähigkeit der Zellen und ermöglicht die Kontrolle potenzieller zytotoxischer Effekte der Testsubstanzen [22].

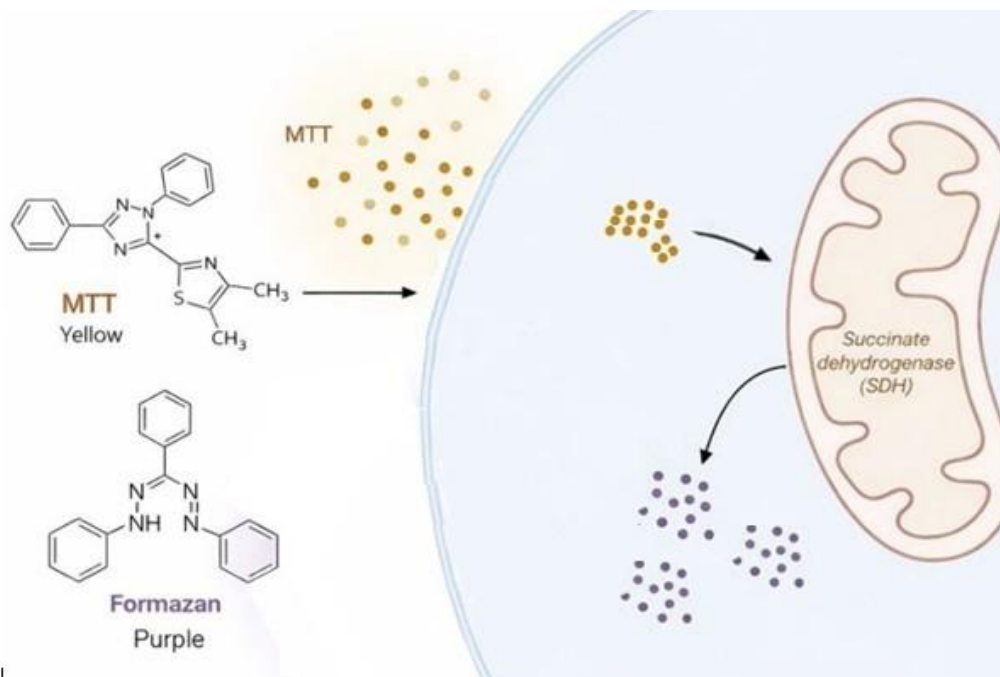


Abbildung 3: MTT-Viabilitätsassay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität vitaler Zellen.

Metabolisch aktive Zellen reduzieren MTT (gelbe Punkte) intrazellulär zu Formazan (lila Punkte), dass in der Zelle akkumuliert und nach der Zellyse photometrisch gemessen wird [23,24,25].

1.7 Zielsetzung

In vitro Testmethoden wie der KeratinoSens™ Assay sind aus der modernen Toxikologie kaum wegzudenken. Sie stellen validierte Alternativen zu klassischen Tierversuchen dar und weisen aufgrund ihrer chemisch definierten Zusammensetzung eine erhöhte Reproduzierbarkeit auf. Dennoch kommt bei der Kultivierung der für den Assay verwendeten Zellen weiterhin FBS zum Einsatz, welches einen der letzten verbleibenden Berührungspunkte zwischen *in vitro* und *in vivo* Versuchen darstellt. Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, welchen Einfluss eine serumfreie Kultivierung sowie eine serumfreie Kryokonservierung von Zellen auf deren Funktionalität in einem Hautsensibilisierungsassay wie dem KeratinoSens™ Assay gemäß OECD TG 442D haben. Dabei werden die Zellen im Assay Ready Format getestet, sodass die Zellen unmittelbar nach dem Auftauen direkt im Assays eingesetzt werden. Ergänzend wurden Titrationsexperimente des Serumersatzproduktes SimPlaceX sowie eine anschließende Langzeitkultivierung der KeratinoSens SF Zellen durchgeführt. Diese Untersuchungen dienen dazu, Rückschlüsse auf die Stabilität, Reproduzierbarkeit und mögliche Langzeiteffekte serumfrei kultivierter Zellen zu ziehen.

2 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Kryooptimierung dargestellt. Verglichen wurden drei Einfriermedien. Ein serumhaltiges Referenzmedium, ein serumfreies hausinternes Einfriermedium sowie ein serumfreies Einfriermedium mit dem Serumersatzprodukt SimPlaceX. Die Bewertung erfolgte anhand der metabolischen Aktivität der Zellen nach dem Auftauen. Die Fluoreszenz wird als relativer Fluoreszenzwert (RFU) angegeben.

2.1 Optimierung der serumfreien Kultivierungsbedingungen

Da für die serumfreie Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen ein Serumersatz erforderlich ist, wurde im nächsten Schritt die optimale Konzentration von SimPlaceX zur Kultivierung der Zellen bestimmt. Ziel dieser Untersuchung war es, eine Konzentration zu finden, die ein stabiles Zellwachstum gewährleistet und gleichzeitig die Zellviabilität erhält. Hierzu wurden KeratinoSens SF Zellen über mehrere Passagen in vier unterschiedlichen SimPlaceX Konzentrationen (0,5-2 mL/L) kultiviert, um Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten und die Zellviabilität schließen zu können.

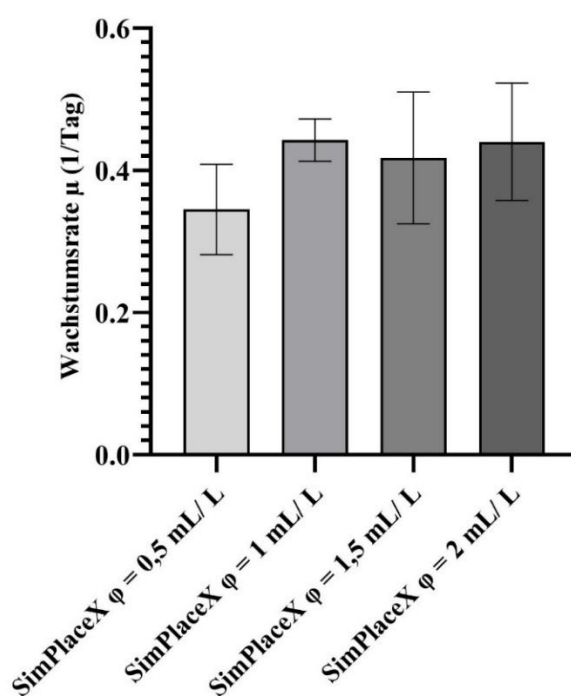


Abbildung 4: Wachstumsrate der KeratinoSens SF Zellen in Abhängigkeit von der SimPlaceX Konzentration.

KeratinoSens SF Zellen wurden über vier Passagen bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 % mit vier unterschiedlichen Konzentrationen des Serumersatzprodukts SimPlaceX kultiviert. Dargestellt ist die Wachstumsrate μ (1/Tag) in Abhängigkeit von der Konzentration des Serumersatzprodukts SimPlaceX ($\varphi = 0,5$ -2 mL/L). Die Daten sind als Mittelwerte mit zugehörigen Fehlerbalken ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts, SEM) angegeben.

Abbildung 4 zeigt die Wachstumsrate der KeratinoSens SF Zellen nach der Kultivierung in unterschiedlichen Konzentrationen von SimPlaceX. Die niedrigste Wachstumsrate wurde bei der geringsten Konzentration beobachtet und betrug 0,35 1/Tag. Mit steigender SimPlaceX Konzentration nahm die Wachstumsrate zu und erreichte bei $\varphi = 1 \text{ mL/L}$ einen Wert von 0,44 1/Tag. Bei höheren Konzentrationen ($\varphi = 1,5 \text{ mL/L}$ und $\varphi = 2 \text{ mL/L}$) blieben die Wachstumsraten auf einem vergleichbaren Niveau. Die Fehlerbalken weisen insbesondere bei höheren Konzentrationen auf eine größere Streuung der Messwerte hin.

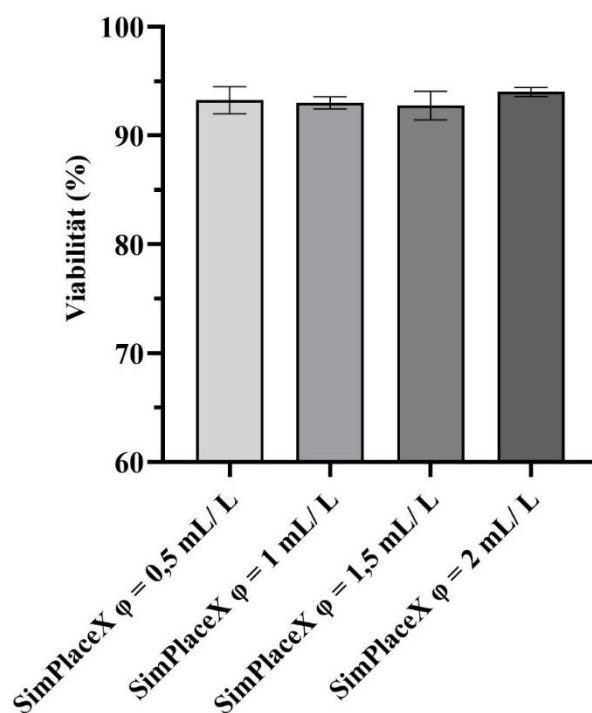


Abbildung 5: Viabilität von KeratinoSens SF Zellen in Abhängigkeit von der SimPlaceX Konzentration.

KeratinoSens SF Zellen wurden über vier Passagen bei 37 °C und einer CO₂-Atmosphäre von 5 % mit vier unterschiedlichen Konzentrationen des Serumersatzprodukts SimPlaceX kultiviert. Dargestellt ist die Viabilität in Abhängigkeit von der Konzentration des Serumersatzprodukts SimPlaceX ($\varphi = 0,5\text{-}2 \text{ mL/L}$). Die Daten sind als Mittelwerte mit zugehörigen Fehlerbalken ($\pm$ Standardfehler des Mittelwerts, SEM) angegeben.

Abbildung 5 zeigt die Viabilität (%) der KeratinoSens SF Zellen nach der Kultivierung in unterschiedlichen Konzentrationen von SimPlaceX. Über den gesamten Konzentrationsbereich des Serumersatzprodukts SimPlaceX ($\varphi = 0,5\text{-}2 \text{ mL/L}$) zeigten sich keine ausgeprägten Schwankungen der Viabilität. Über alle untersuchten Konzentrationen hinweg lag die Viabilität auf einem hohen Niveau von über 90 %. Die Fehlerbalken weisen insgesamt nur geringe Schwankungen der Messwerte auf. Zusammenfassend zeigten die KeratinoSens SF Zellen über alle untersuchten SimPlaceX Konzentrationen hinweg eine vergleichbar hohe Zellviabilität, sodass keine nachteiligen Effekte auf die Zellvitalität festgestellt wurden.

Unterschiede zwischen den Konzentrationen des Serumersatzprodukts zeigten sich primär in den Wachstumsraten, wobei ab einer Konzentration von $\varphi = 1 \text{ mL/L}$ ein stabiles Zellwachstum zu beobachten war.

2.2 Einfluss der Langzeitkultivierung auf das Wachstum und die Viabilität der KeratinoSens SF

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Langzeitkultivierung der KeratinoSens SF Zellen mit dem Serumersatzprodukt SimPlaceX dargestellt. Neben geeigneten Kultivierungs- und Kryokonservierungsbedingungen wurde das Verhalten der Zellen über mehrere Passagen hinweg untersucht. Hierzu wurden die Zellen über insgesamt 18 Passagen hinweg mit SimPlaceX bei einer Volumenkonzentration von $\varphi = 1 \text{ mL/L}$ kultiviert. Untersucht wurde, inwieweit die Anzahl der Kultivierungstage beziehungsweise der durchlaufenen Passagen einen Einfluss auf die Wachstumsrate und die Viabilität der Zellen hat.

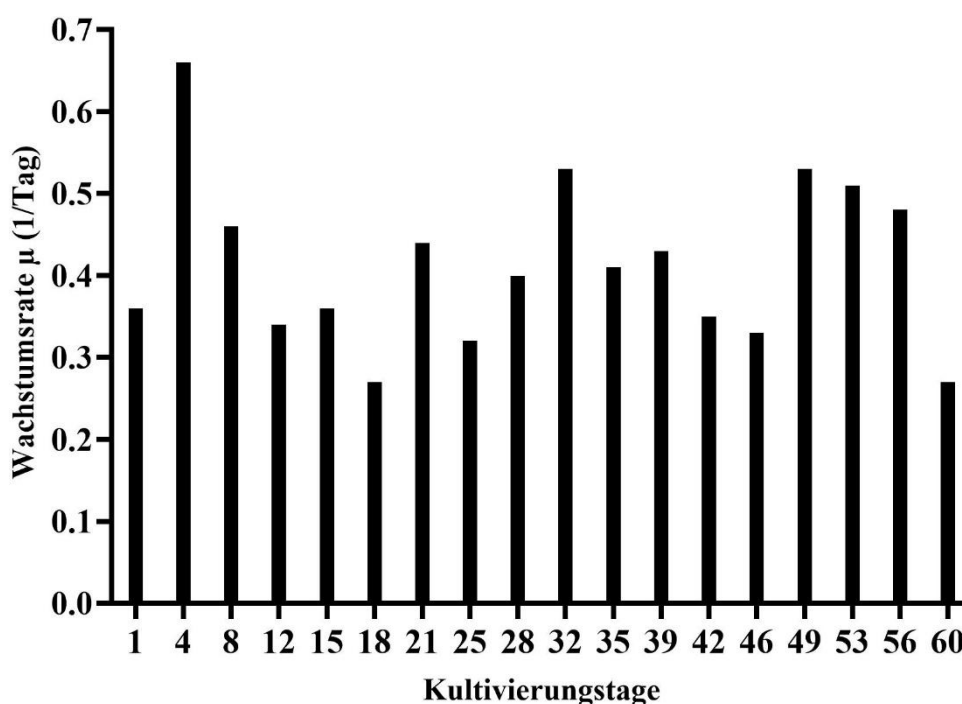


Abbildung 6: Wachstumskinetik serumfrei kultivierter KeratinoSens SF Zellen über mehrere Kultivierungstage.

Wachstumskinetik der serumfrei kultivierten KeratinoSens SF Zellen über mehrere Passagen bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ im Basalmedium DMEM/Ham's F12 in Anwesenheit von SimPlaceX ($\varphi = 1 \text{ mL/L}$). Dargestellt ist die Wachstumsrate μ (1/Tag) in Abhängigkeit von den Kultivierungstagen.

Abbildung 6 zeigt die Wachstumskinetik der KeratinoSens SF Zellen während der Langzeitkultivierung über 18 Passagen hinweg. Über den gesamten Kultivierungszeitraum schwankte die Wachstumsrate um den im Rahmen der SimPlaceX Titration bei einer Konzentration von $\varphi = 1 \text{ mL/L}$ ermittelten Referenzwert mit einer durchschnittlichen Wachstumsrate von $\mu = 0,42 \text{ 1/Tag}$ und betrug durchschnittlich $\mu = 0,41 \text{ 1/Tag}$. Die beobachteten Einbrüche der Wachstumsrate an den Kultivierungstagen 18, 25 und 46 gingen mit einer reduzierten Zellviabilität einher.

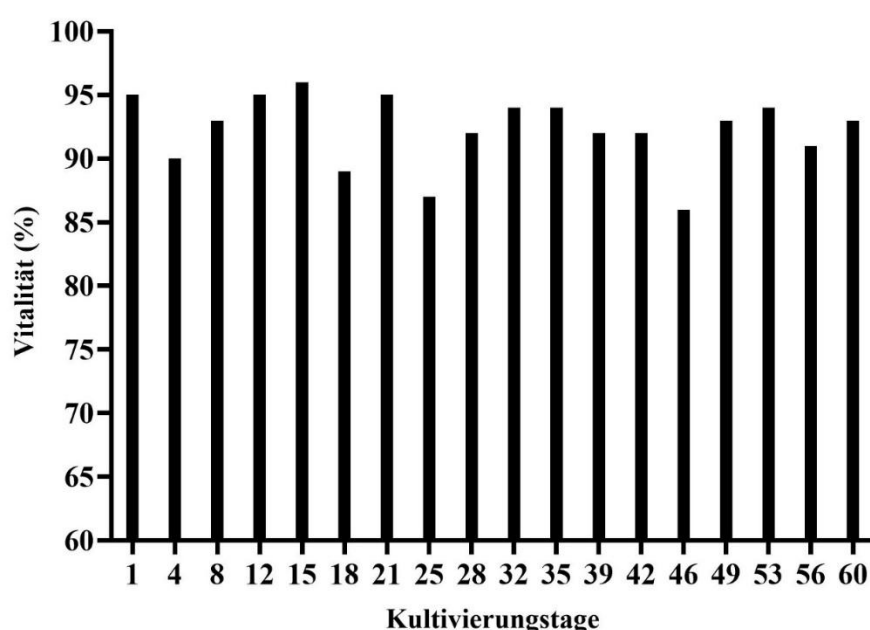


Abbildung 7: Zellviabilität serumfrei kultivierter KeratinoSens SF Zellen über mehrere Kultivierungstage.

Die Zellviabilität der serumfrei kultivierten KeratinoSens SF Zellen über mehrere Passagen bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ im Basalmedium DMEM/Ham's F12 in Anwesenheit von SimPlaceX ($\varphi = 1 \text{ mL/L}$). Dargestellt ist die Viabilität (%) in Abhängigkeit von den Kultivierungstagen.

Abbildung 7 zeigt die Viabilität (%) der KeratinoSens SF Zellen während der Langzeitkultivierung über 18 Passagen hinweg. Über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg schwankte die Viabilität zwischen etwa 86 % und 96 %, wobei sich eine durchschnittliche Viabilität von 92 % ergab. Insgesamt zeigte sich, dass die Langzeitkultivierung der KeratinoSens SF Zellen bei einer Serumersatzkonzentration von $\varphi = 1 \text{ mL/L}$ keinen negativen Einfluss auf die Wachstumskinetik hatte.

Über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg wurde keine kontinuierliche Abnahme der Zellviabilität mit zunehmender Kultivierungsdauer festgestellt. Auch in späteren Kultivierungsphasen wiesen die Zellen weiterhin eine hohe Viabilität auf.

2.3 Kryooptimierung

Um reproduzierbare Assay Ready Zellen zu erhalten, ist ein kontrollierter und gleichmäßiger Einfrierprozess der Zellen erforderlich. Serumhaltige Einfriermedien gelten gemäß der OECD TG 442D als Standard für die Kryokonservierung von Zellen im KeratinoSens™ Assay und dienen als etablierte Referenz. Das beschriebene Protokoll sieht dabei den Einsatz eines Einfriermediums mit 20 % FBS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) vor [8]. Da der Assay in der vorliegenden Arbeit serumfrei etabliert werden sollte, wurde von diesem Protokoll abgewichen und im Vorfeld eine Optimierung der Kryokonservierung durchgeführt. Als Referenz wurde ein etabliertes, serumhaltiges Einfriermedium mit 10 % FBS und 5 % DMSO als Benchmark herangezogen und mit zwei alternativen, serumfreien Kryomedien verglichen, um deren metabolische Aktivität nach der Kryokonservierung zu bestimmen.

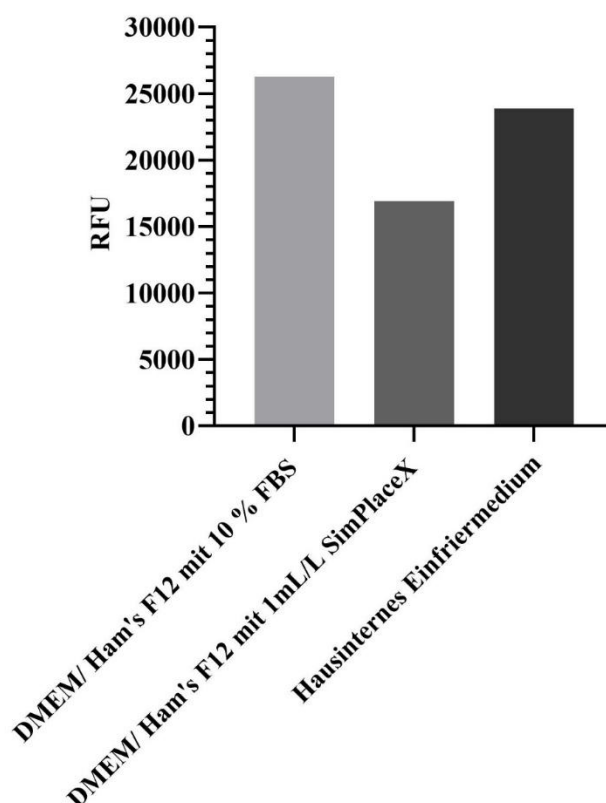


Abbildung 8: Vergleich der Zellviabilität serumfrei kultivierter KeratinoSens SF Zellen nach Kryokonservierung in verschiedenen Einfriermedien.

Graphische Darstellung der Zellviabilität serumfrei kultivierter KeratinoSens SF Zellen nach Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (-196 °C). Verglichen wurden drei Einfriermedien, die jeweils 5 % DMSO enthielten: DMEM/Ham's F-12 mit 10 % FBS als Kontrolle (hellgrauer Graph), DMEM/Ham's F-12 ergänzt mit 1 mL/ L des Serumersatzprodukts SimPlaceX (grauer Graph) sowie ein hausintern entwickeltes Einfriermedium (dunkelgrauer Graph). Nach dem Auftauen wurden die Zellen für 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels Resazurin Assay bestimmt, indem 20 µL Resazurin Working Solution pro Well zugegeben und die 96-Well-Platte für weitere 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert wurde. Die gemessene Fluoreszenz (RFU) diente als Maß für die metabolische Aktivität der Zellen.

Abbildung 8 zeigt die relative Fluoreszenzaktivität der kryokonservierten KeratinoSens™ SF Zellen, bestimmt mittels eines Resazurin basierten Assays. Das FBS haltige Referenzmedium diente dabei als Benchmark und wird hier auf 100 % normiert (linke Säule). Im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle zeigten beide serumfreien Einfriermedien eine reduzierte metabolische Aktivität. Die geringste Aktivität wurde beim Einfriermedium mit dem Serumersatzprodukt SimPlaceX ($\varphi = 1 \text{ mL/L}$) beobachtet, das eine Abweichung von 36 % gegenüber der Referenz aufwies (mittlere Säule). Das hausinterne serumfreie Einfriermedium zeigte hingegen lediglich eine Abweichung von 9 % und wies damit eine vergleichsweise nahe metabolische Aktivität dem FBS gegenüber auf (rechte Säule).

Zusammenfassend zeigt sich, dass das hausinterne serumfreie Einfriermedium im Verhältnis zur FBS haltigen Referenz die höchste metabolische Aktivität aufweist, während das Einfriermedium mit dem Serumersatzprodukt SimPlaceX eine deutlich reduzierte Zellaktivität zeigt.

2.4 Validierung der Referenzsubstanzen im serumfreien KeratinoSens™ Assay

Im KeratinoSens™ Assay wird der Einfluss von Referenzsubstanzen mit unterschiedlich starkem Hautsensibilisierungspotenzial auf die zu testenden Zellen untersucht. Gemäß OECD TG442D werden diese Substanzen in positive und negative Referenzsubstanzen eingeteilt: Die positiven Kontrollen (Zimtalkohol, EGDMA, 2-MBT, Metol, MDBGN, DNCB) sind echte Elektrophile, die den ARE-Signalweg eindeutig aktivieren, während die negativen Kontrollen (Isopropanol, Glycerol, Salicylsäure, Milchsäure) nicht oder nur sehr schwach elektrophil sind. Letztere können minimalen elektrophilen Stress ausüben, der jedoch keine relevante ARE-Aktivierung bewirkt. Substanzen werden im KeratinoSens™ Assay als sensibilisierend eingestuft, wenn sie in unabhängigen Experimenten eine statistisch signifikante Induktion der Luciferase-Aktivität oberhalb des definierten Schwellenwertes aufweisen. Dabei muss eine 1,5 fache Induktion zum Basalzustand der Zelle gemessen werden, während gleichzeitig die zelluläre Toxizität nicht unter den Schwellenwert von 70 % fallen darf [8].

Alle Messungen wurden Guideline konform in unabhängigen Doppelbestimmungen durchgeführt, und die Ergebnisse wurden zur besseren Übersicht gemittelt.

2.4.1 Salicylsäure

Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Induktion nach Applikation der Salicylsäure. Die Induktionswerte lagen relativ konstant zwischen einer 0,8- und 1,1-fachen Induktion und blieben zu allen Messpunkten deutlich unterhalb des definierten Schwellenwertes (gestrichelte Linie). Die Zellviabilität zeigte über den gesamten Konzentrationsbereich einen weitgehend stabilen Verlauf ohne ausgeprägte zytotoxische Effekte. Die Viabilitätswerte lagen überwiegend zwischen etwa 80 % und 100 % und unterschritten zu keiner Zeit den Akzeptanzgrenzwert von 70 %.

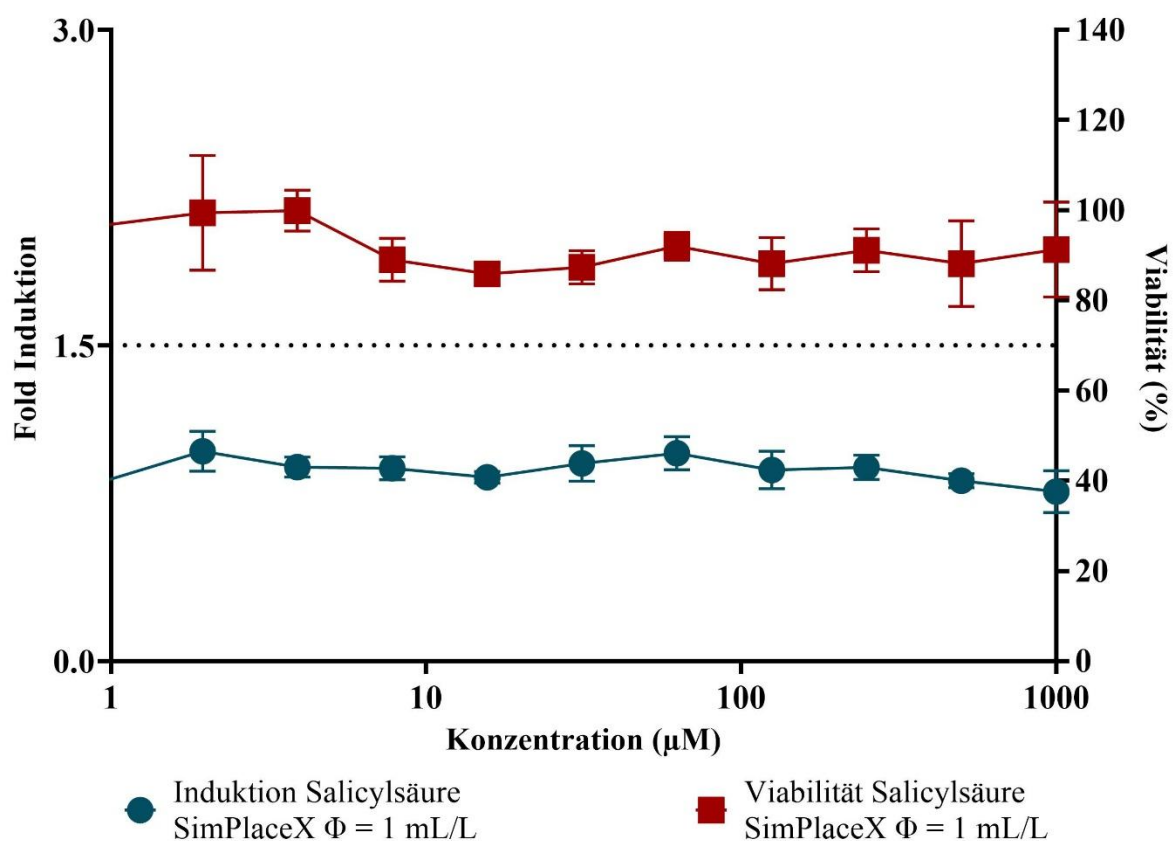


Abbildung 9: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Salicylsäure im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit Salicylsäure im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit Salicylsäure in Konzentrationen von 0,98-1000 µM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($EC_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.1 Milchsäure

Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Induktion nach Applikation der Milchsäure. Die Induktionswerte blieben relativ konstant und lagen zwischen einer 0,7- und 1,2-fachen Induktion, wodurch alle Messpunkte unterhalb des definierten Schwellenwerts (gestrichelte Linie) lagen. Die Zellviabilität betrug im Konzentrationsbereich von 1,95 bis 62,5 μM im Mittel etwa 97 %. Bei höheren Konzentrationen kam es zu einer Zunahme der Zellviabilität auf bis zu 130 %.

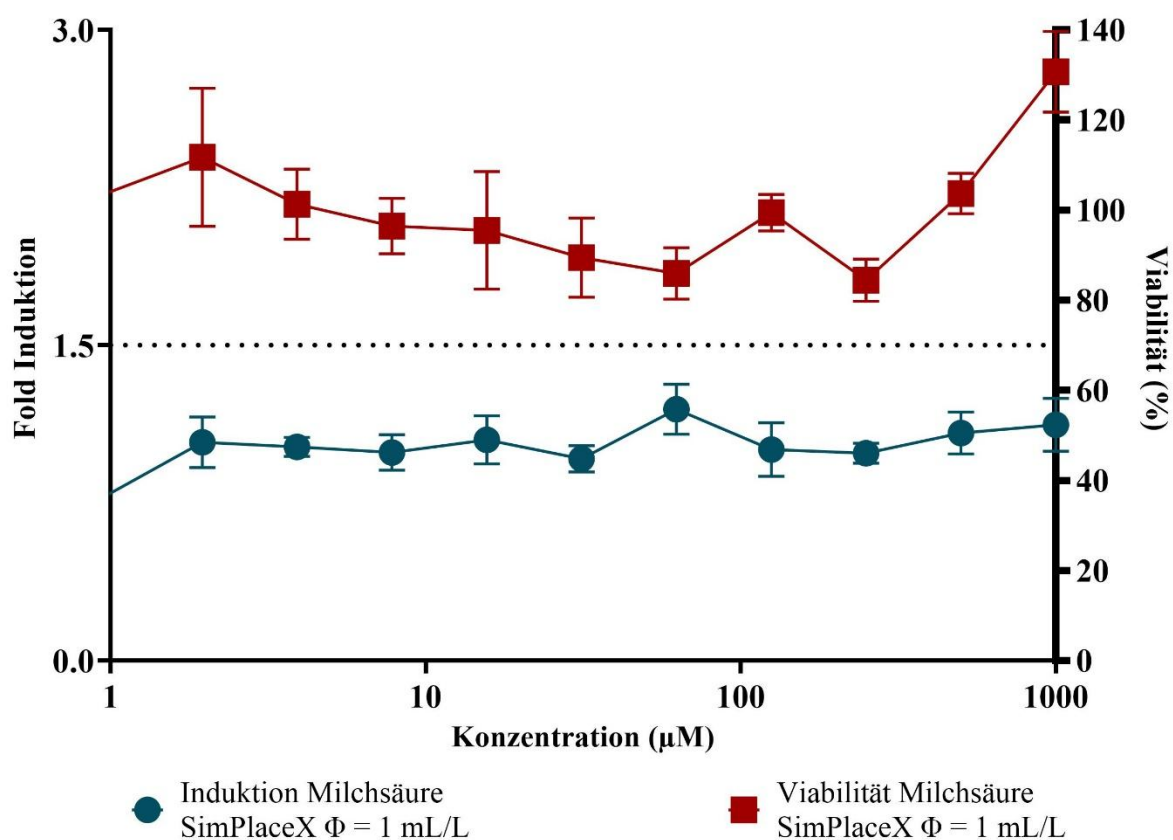


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Milchsäure im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit Milchsäure im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit Milchsäure in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($\text{EC}_{1.5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.2 Glycerol

Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Induktion nach Applikation von Glycerol. Die Induktionswerte lagen relativ konstant im Bereich von etwa 0,9- bis 1,2-fachen Induktion und blieben zu allen Messpunkten deutlich unterhalb des definierten Schwellenwertes (gestrichelte Linie). Die Zellviabilität blieb über den gesamten Konzentrationsbereich oberhalb des erforderlichen Schwellenwertes, nahm bis zu einer Konzentration von 250 μM leicht ab und stieg bei höheren Konzentrationen wieder geringfügig an. Bei den Konzentrationen von 250 μM und 500 μM lagen die Viabilitätswerte jedoch nahe am Grenzbereich.

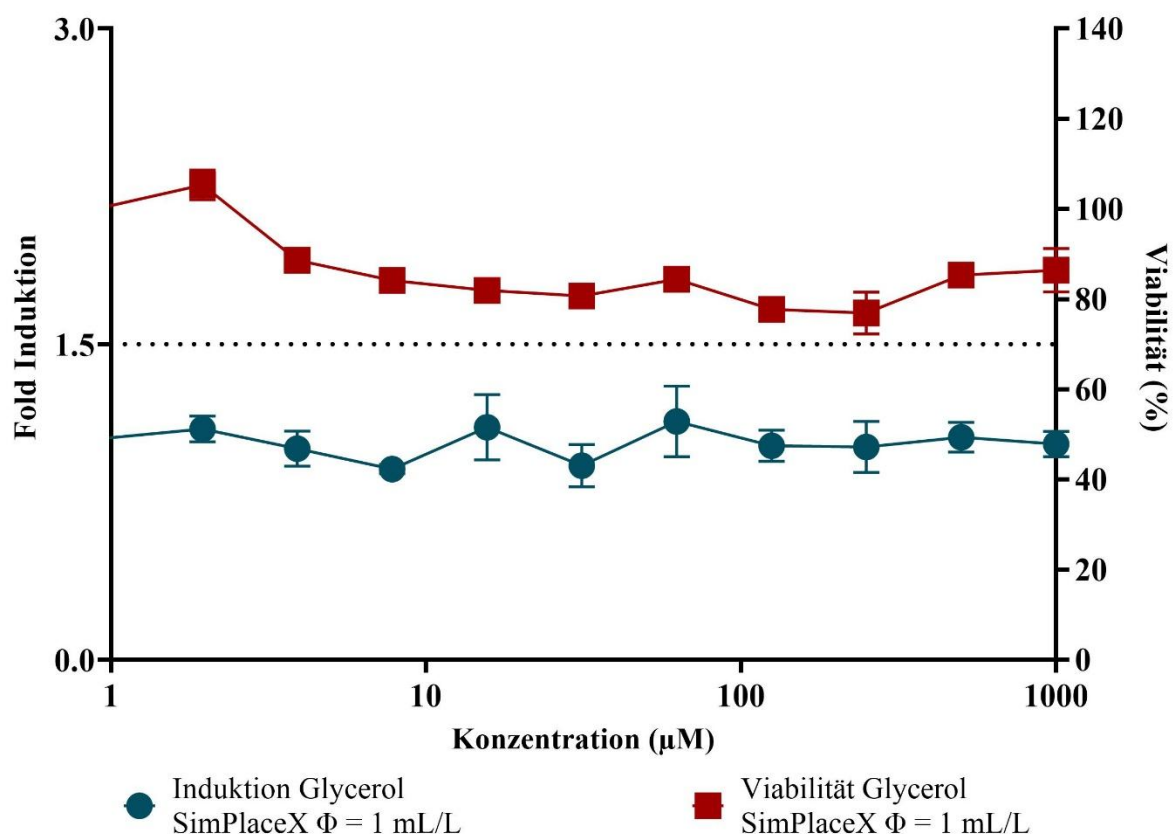


Abbildung 11: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Glycerol im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit Glycerol im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit Glycerol in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($EC_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.3 Isopropanol

Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Anstieg der Induktion nach Applikation von Isopropanol. Die Induktionswerte lagen relativ konstant im Bereich einer 0,8- bis 1,1-fachen Induktion und blieben zu allen Messpunkten deutlich unterhalb des definierten Schwellenwertes (gestrichelte Linie). Die Zellviabilität lag über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg oberhalb des geforderten Schwellenwertes von 70 %. Bei niedrigeren Konzentrationen war eine tendenziell höhere Zellviabilität zu beobachten.

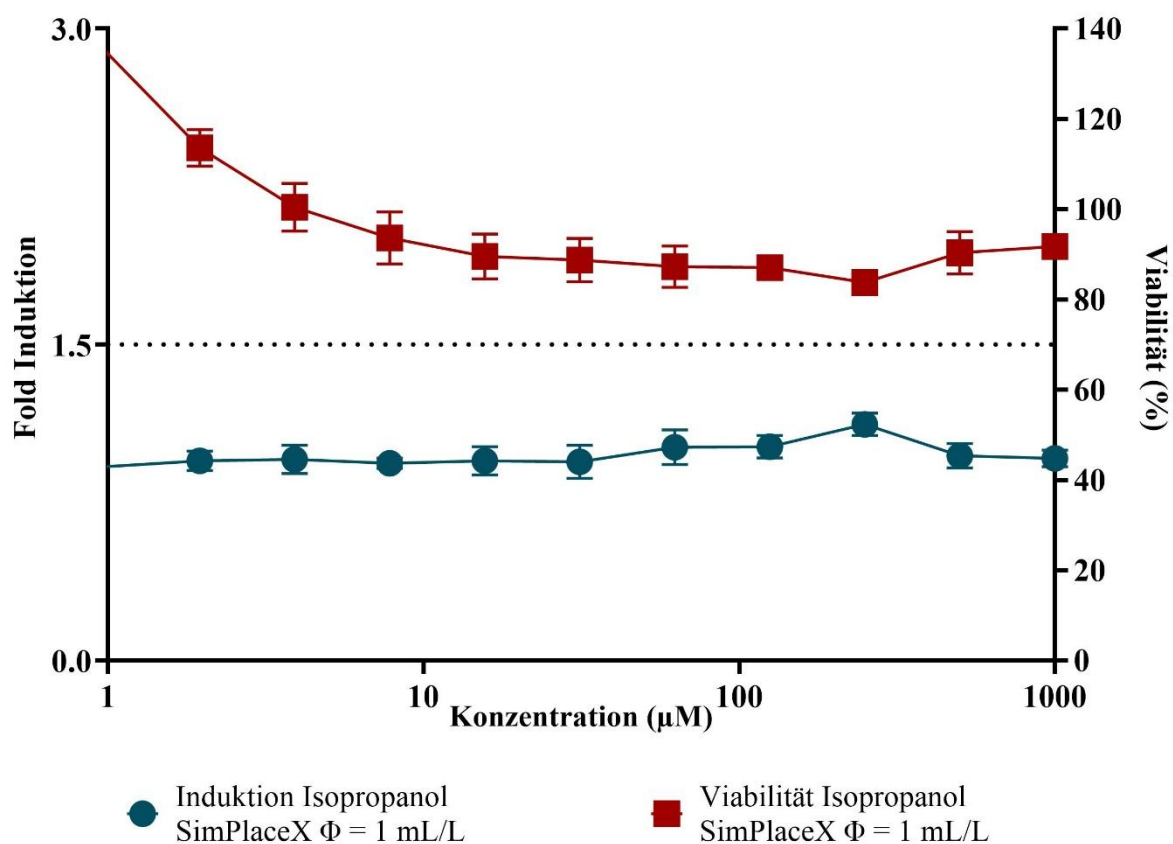


Abbildung 12: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Isopropanol im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit Isopropanol im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit Isopropanol in Konzentrationen von 0,98-1000 µM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($EC_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.4 EGDMA

Im Konzentrationsbereich von 1,95 bis 31,25 μM kam es zu einer 1,13- bis 1,36-fachen Induktion gegenüber dem Basalzustand und lag unterhalb des definierten Schwellenwertes (gestrichelte Linie). Ab einer Konzentration von 62,5 μM zeigte sich ein deutlicher, steiler Anstieg der Induktionskurve, wobei an diesem Messpunkt eine etwa 2,6-fache Induktion beobachtet wurde. Die Zellviabilität nahm mit steigender EGDMA Konzentration kontinuierlich ab und unterschritt ab 125 μM den definierten Schwellenwert von 70 %. Beim weiteren Anstieg der Konzentration sank die Zellviabilität nahezu vollständig gegen null.

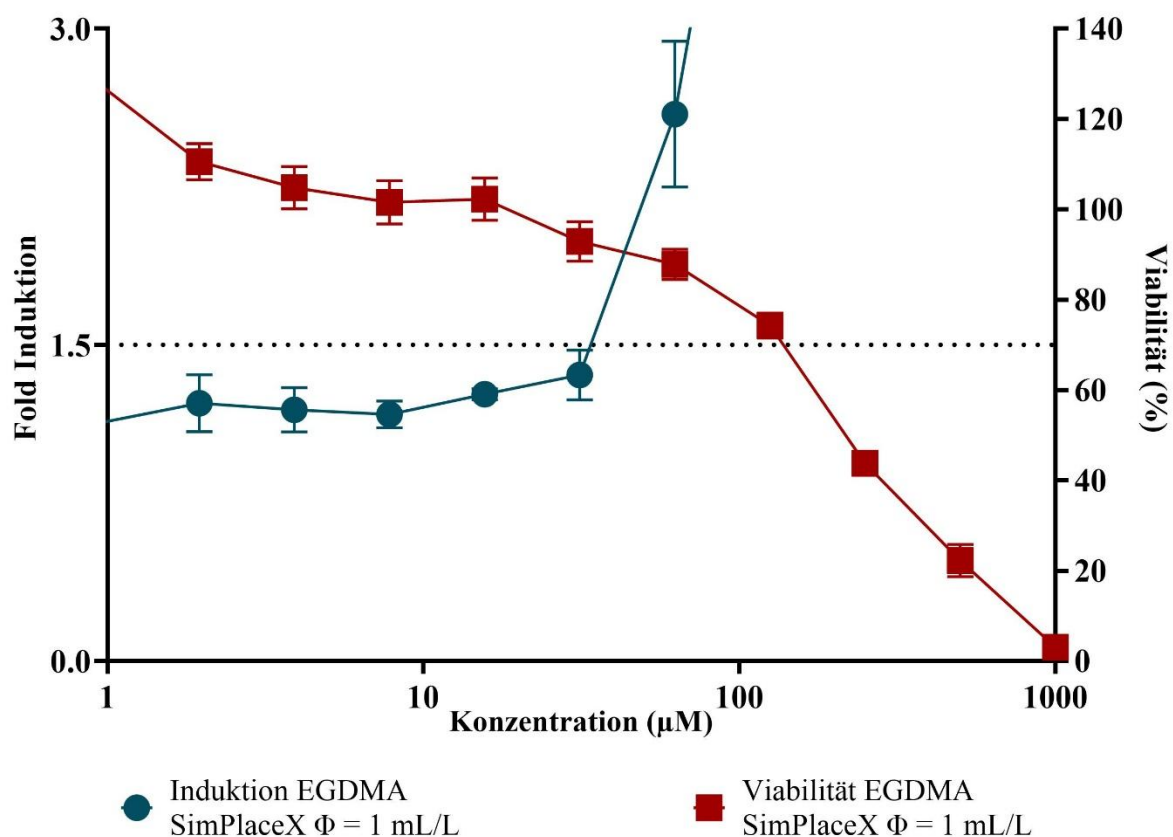


Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit EGDMA im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit EGDMA im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit EGDMA in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($EC_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.5 Zimtalkohol

Im Konzentrationsbereich bis 125 μM lag die Induktion im Bereich einer 0,85- bis 1,14-fachen Induktion gegenüber dem Basalzustand und damit unterhalb des definierten Schwellenwertes (gestrichelte Linie). Bei einer Konzentration von 250 μM zeigte sich ein kurzfristiger Anstieg der Induktionskurve in den Grenzbereich mit einer etwa 1,4-fachen Induktion. Bei höheren Konzentrationen traten zytotoxische Effekte auf, die mit einem Abfall der gemessenen Induktion einhergingen. Die Zellviabilität zeigte einen weitgehend parallelen Verlauf zu den Induktionswerten. Im Konzentrationsbereich bis 125 μM blieb die Viabilität oberhalb des definierten Schwellenwertes. Ab einer Konzentration von 125 μM unterschritt die Zellviabilität den Schwellenwert und sank bei 1000 μM nahezu vollständig gegen null.

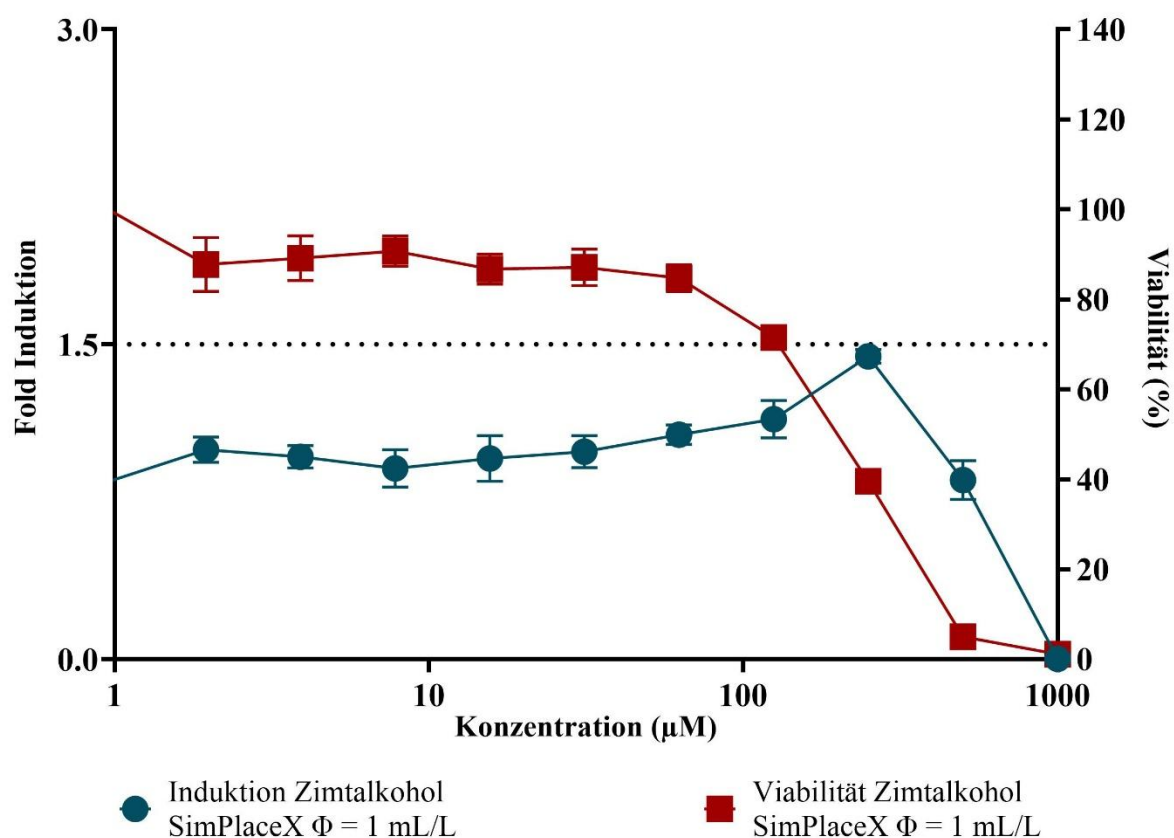


Abbildung 14: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Zimtalkohol im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit Zimtalkohol im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit Zimtalkohol in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($\text{EC}_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.6 2-MBT

Bei Konzentration bis ca. 1,95 μM lagen der Induktionswerte unterhalb des definierten Schwellenwertes (gestrichelte Linie). Im Konzentrationsbereichen von 3,9 bis 62,5 μM überschritten die gemessenen Induktionen den dargestellten Messbereich und nahmen bei höheren Konzentrationen deutlich ab. Ab Konzentrationen von etwa 150 μM fiel der Graph unter den Schwellenwert und näherte sich bei steigender Konzentration schließlich null an. Die Zellviabilität lag bei 1,95 μM oberhalb des definierten Schwellenwertes von 70 %. Mit steigender Konzentration nahm die Viabilität ab und unterschritt den Schwellenwert. Bei einer Konzentration von 125 μM zeigte sich ein kurzzeitiges Plateau, bevor die Zellviabilität bei weiteren Konzentrationserhöhungen nahezu vollständig gegen null abfiel.

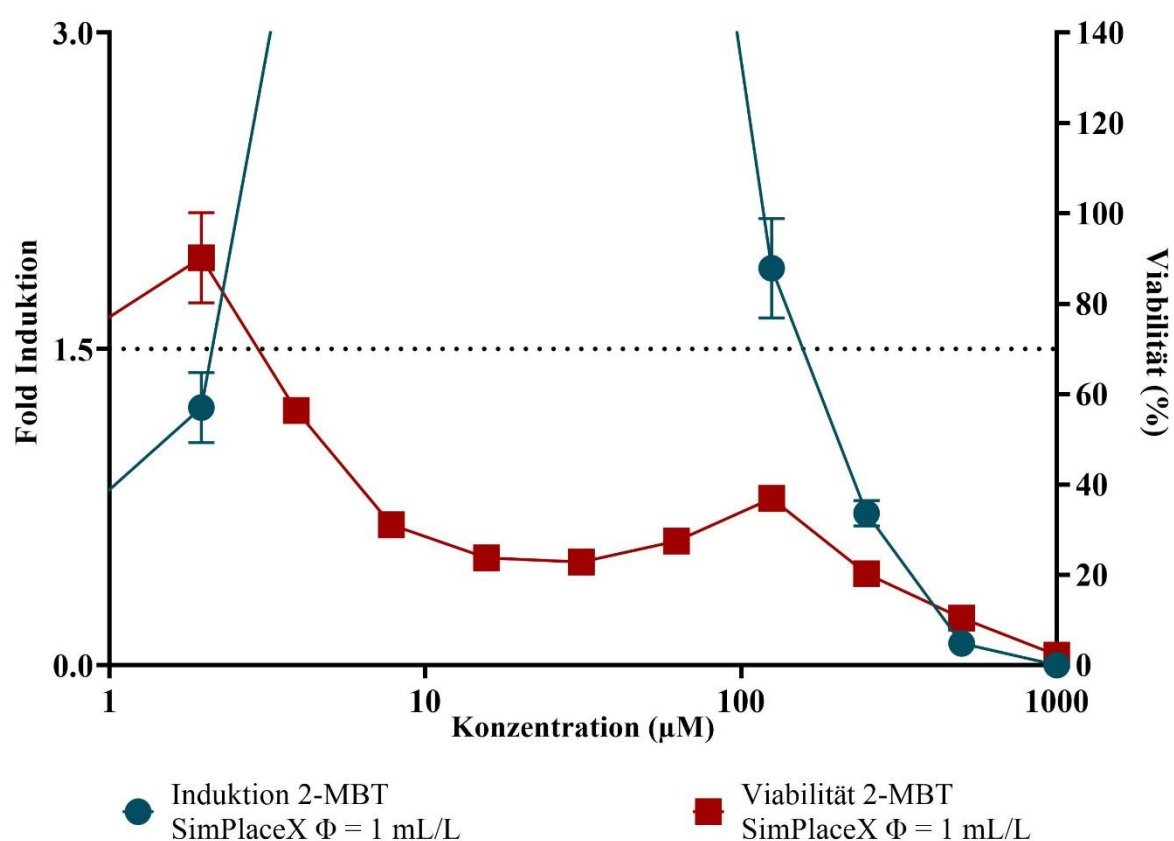


Abbildung 15: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit 2-MBT im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit 2-MBT im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit 2-MBT in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($\text{EC}_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.7 Metol

Bei niedrigen Konzentrationen von Metol bis ca. 2 μM verläuft die Induktion unterhalb des definierten Schwellenwerts (gestrichelte Linie). Bei höheren Konzentrationen bis ca. 30 μM lagen die Induktionswerte oberhalb des dargestellten Messbereichs. Ab einer Konzentration von ca. 31,25 μM sank der Induktionswert abrupt auf nahezu null, und blieb bei höheren Konzentrationen auf diesem Niveau. Die Zellviabilität nahm bereits bei einer Anfangskonzentration von 1,95 μM von 124 % Viabilität auf 1,3 % bei 31,25 μM ab.

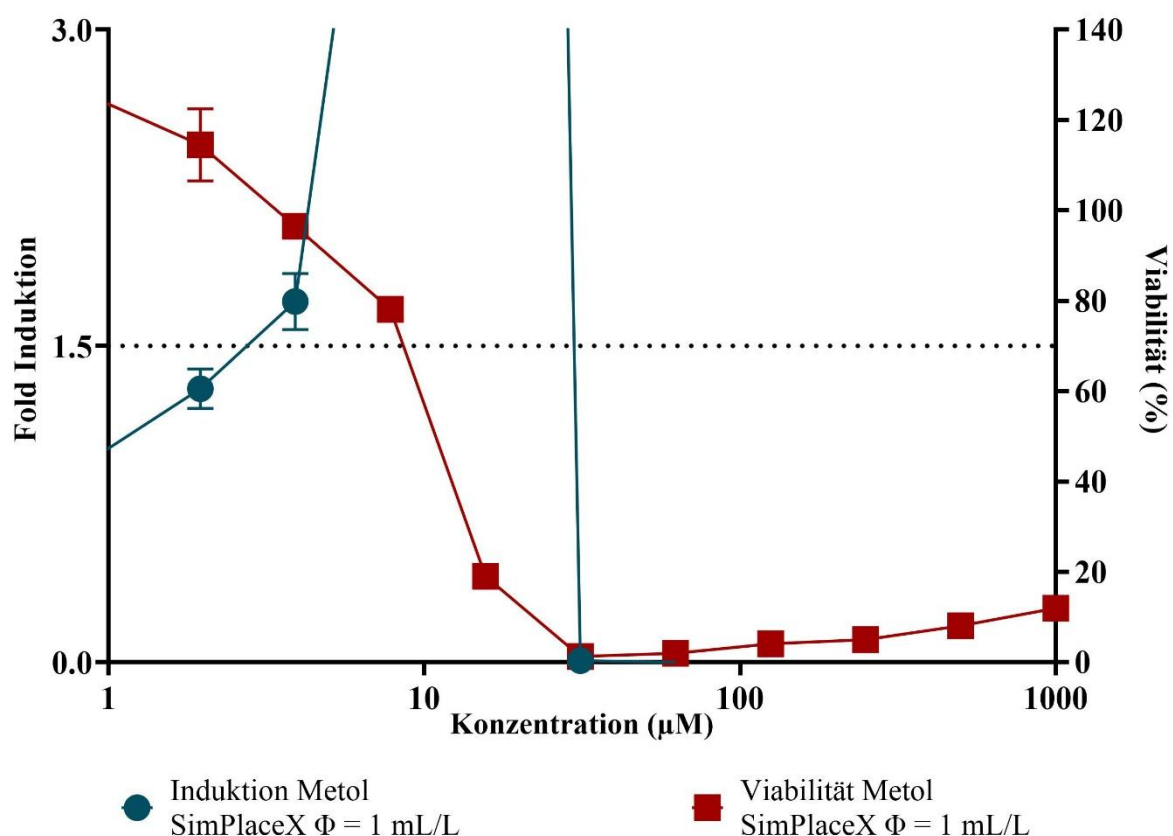


Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit Metol im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit Metol im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit Metol in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($\text{EC}_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.8 MDBGN

Bei Konzentrationen bis ungefähr 5 μM lagen die Induktion und Zellviabilität im Guideline konformen Messbereich (gestrichelte Linie). Bei steigenden Konzentrationen sanken sowohl die Induktion als auch die Zellviabilität gegen null.

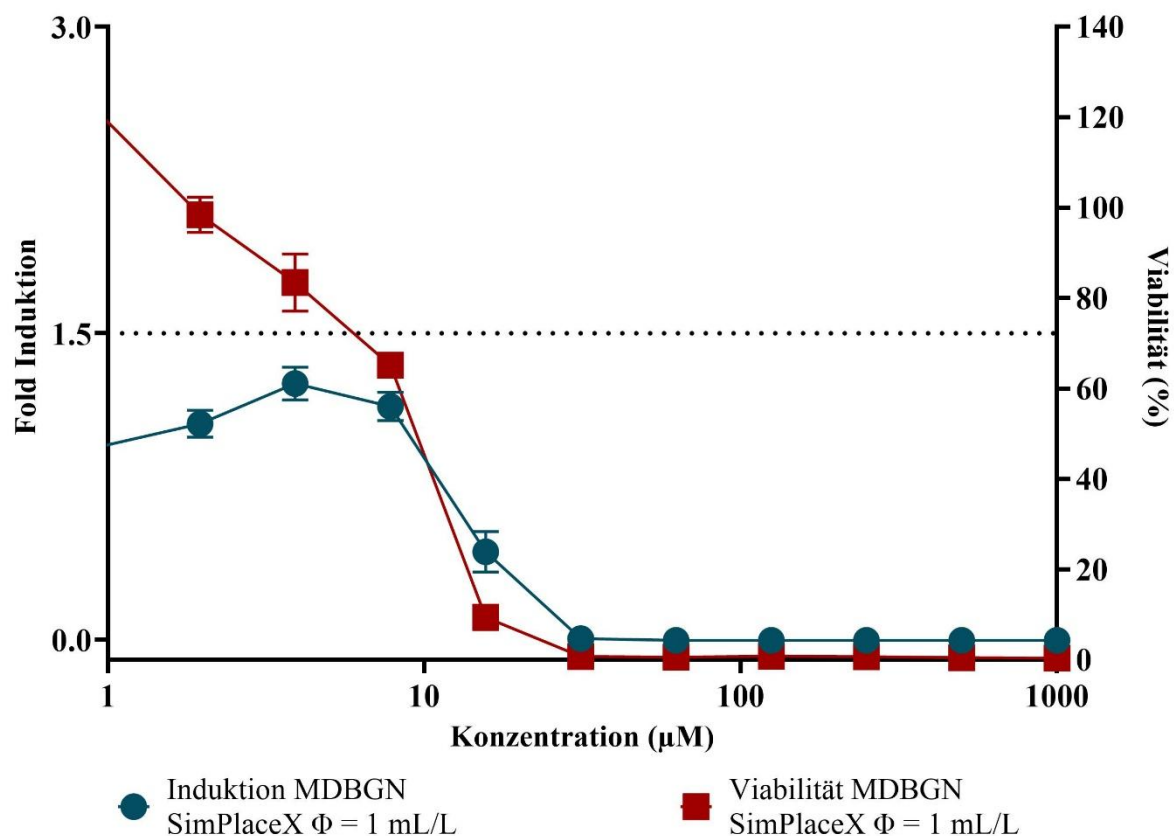


Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit MDBGN im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit MDBGN im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit MDBGN in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($EC_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.9 DNCB

Bei Konzentrationen bis ca. 2 μM befand sich die Induktion knapp unterhalb des Schwellenwertes (gestrichelte Linie) und wies parallel eine Zellviabilität von 99 % auf. Kurz darauf überschreitet die Induktion den Schwellenwert und verließ den dargestellten Messbereich bei Konzentrationen von 5-8 μM . Ab Konzentration von 8 μM zeigten sowohl die Induktion als auch die Zellviabilität einen deutlichen Abfall, wodurch keine weiteren validen Messpunkte bestimmt werden konnten.

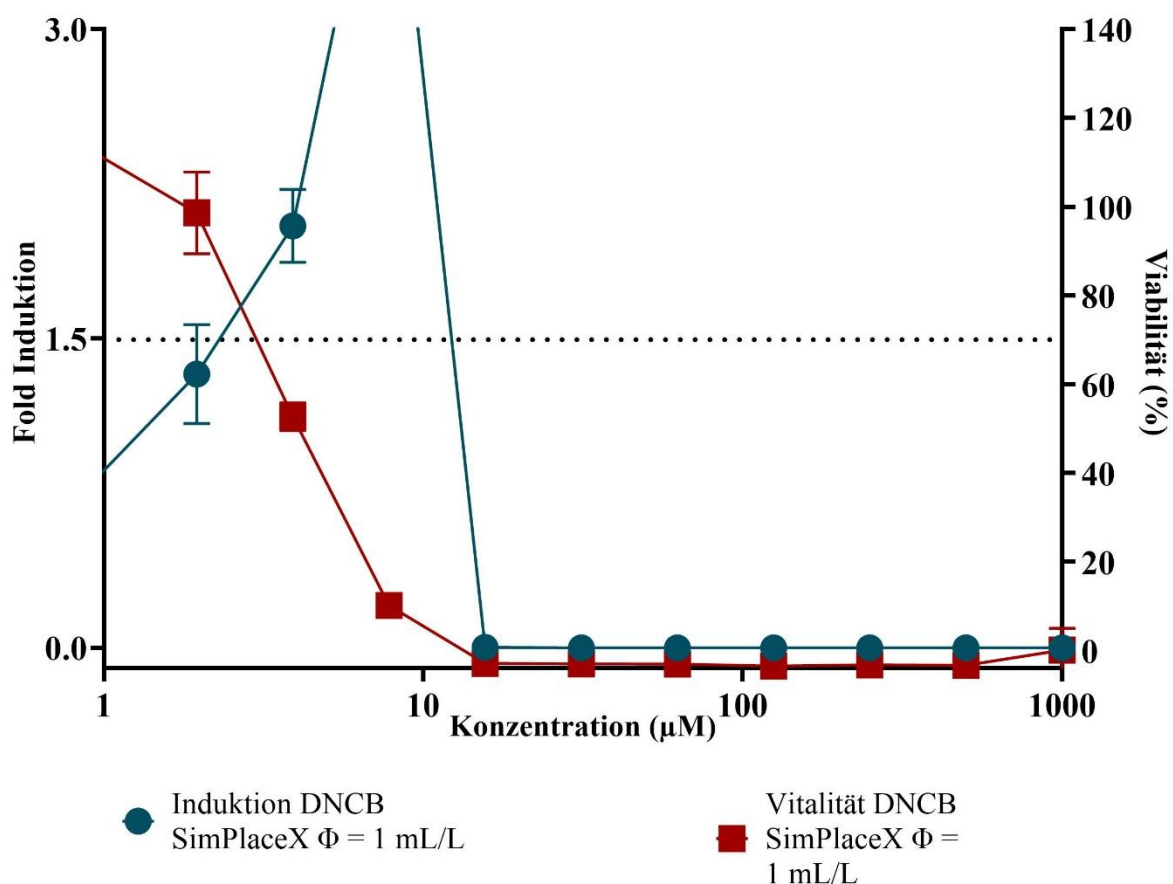


Abbildung 18: Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach der Behandlung mit DNCB im KeratinoSens™ Assay.

Dosis-Wirkungs-Kurve der Zellviabilität und der Nrf2 induzierten Luciferase Aktivität nach Behandlung mit DNCB im KeratinoSens™ Assay. Serumfreie Zellen wurden zunächst mit 1 mL/L SimPlaceX kultiviert und anschließend kryokonserviert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen im Assay Ready Format mit DNCB in Konzentrationen von 0,98-1000 μM behandelt. Die Zellviabilität wurde mittels MTT Assay bestimmt. Die Fold Induktion der Luciferase Aktivität (Y1, blau) sowie die Zellviabilität (Y2, rot) sind gegen die jeweilige Substanzkonzentration aufgetragen. Die gestrichelte Linie markiert den Schwellenwert ($\text{EC}_{1,5}$ für die Luciferase-Aktivität und 70 % Zellviabilität) zur Substanzvalidierung.

2.4.10 Vergleich der $EC_{1,5}$ und IC_{50} Werte der Referenzsubstanzen gemäß OECD 442D

Im Folgenden sind die im serumfreien KeratinoSens™ Assay ermittelten $EC_{1,5}$ - und IC_{50} -Werte der untersuchten Referenzsubstanzen dargestellt. Die $EC_{1,5}$ -Werte wurden ausschließlich aus Konzentrationsbereichen berechnet, in denen eine 1,5-fache Induktion bei einer Zellviabilität von mindestens 70 % gemessen wurde. Alle Messwerte außerhalb dieses Bereiches werden als nicht Guideline konforme Aktivierungen der Luciferase eingestuft. Der IC_{50} -Wert dient hingegen der Bestimmung der Zytotoxizität und wird aus dem gesamten geprüften Konzentrationsbereich einschließlich zytotoxischer Konzentrationen berechnet. Beide Parameter bilden damit die Grundlage für die Bewertung der Sensibilisierungseigenschaften der Testsubstanzen. Die farblich markierten Spalten beziehen sich ausschließlich auf die im Assay Ready Format bestimmten Messwerte. Grün markierte Felder kennzeichnen eine Übereinstimmung der experimentell bestimmten $EC_{1,5}$ - bzw. IC_{50} -Werte mit den in der OECD TG 442D definierten Referenzbereichen, während rot markierte Felder Abweichungen von diesen Richtwerten anzeigen [8].

Tabelle 1: Darstellung der $EC_{1,5}$ - und IC_{50} -Werte der untersuchten Referenzsubstanzen unter Einbezug der OECD TG 442D Richtwerte, der im Assay Ready Format ermittelten Messwerte sowie ergänzender hausinterner KeratinoSens™ Referenzmessung.

Referenz- substanzen	LLNA- Einstufung	$EC_{1,5}$ (μ M) OECD 442D Richtwert	$EC_{1,5}$ (μ M) Assay ready	$EC_{1,5}$ (μ M) Referenz ¹	IC_{50} (μ M) OECD 442D Richtwert	IC_{50} (μ M) Assay ready	IC_{50} (μ M) Referenz ¹
Salicylsäure	Nicht sensibilisierend	>1000	>2000	>2000	>1000	>2000	>2000
Milchsäure	Nicht sensibilisierend	>1000	>2000	>2000	>1000	>2000	>2000
Glycerol	Nicht sensibilisierend	>1000	>2000	>2000	>1000	>2000	>2000
Isopropanol	Nicht sensibilisierend	>1000	>2000	>2000	>1000	>2000	>2000
EGDMA	Schwach sensibilisierend	5-125	33,2	34,2	> 500	235,2	489,3

Referenz- substanzen	LLNA- Einstufung	EC1.5 (µM) OECD 442D Richtwert	EC1.5 (µM) Assay ready	EC1.5 (µM) Referenz ¹	IC50 (µM) OECD 442D Richtwert	IC50 (µM) Assay ready	IC50 (µM) Referenz ¹
Zimtalkohol	Schwach sensibilisierend	25 - 175	n. A.	912,68	> 1000	206,2	1297,3
2-MBT	Moderat sensibilisierend	25 - 250	2,7	35,6	>500	4,9	469,4
Metol	Stark sensibilisierend	<12,5	2,9	1	20-200	11,54	6,5
MDBGN	Stark sensibilisierend	<20	n. A.	7,4	20-100	9,9	15,3
DNCB	Sehr stark sensibilisierend	< 12.5	2,1	1,0	5 - 20	4,5	3

Referenz¹: Ergänzend sind Historische Daten aus KeratinoSens™ Assays aufgeführt, bei denen die Funktionalität der Zellen direkt aus der serumfreien Kultur bestimmt wurde. Diese Daten dienen ausschließlich der Einordnung und dem Vergleich der im Assay Ready Format bestimmten Ergebnisse.

Im Folgenden beziehen sich alle Angaben auf Konzentrations- und Wertebereichen bei der Bewertung der untersuchten Testsubstanzen auf, die in der OECD TG 442D validierten Bereiche. Für die nicht sensibilisierenden Testsubstanzen Salicylsäure, Milchsäure, Glycerol und Isopropanol lagen die EC_{1,5}- und IC₅₀-Werte innerhalb des Guideline konformen Referenzbereiches und entsprachen den jeweiligen Dosis-Wirkungs-Kurven der Graphen welche in den Abbildung 9Abbildung 10Abbildung 11Abbildung 12 dargestellt wurden.

Bei Glycerol und Isopropanol wurde im Konzentrationsbereich von 125-250 µM eine verringerte Zellviabilität beobachtet, die jedoch weiterhin oberhalb des festgelegten Schwellenwertes von 70 % lag. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass keine veränderte Funktionalität der Zellen vorlag und somit keine erhöhte Sensibilisierungsantwort gegenüber den untersuchten Substanzen gezeigt wurde. Somit konnten alle vier nicht sensibilisierenden Substanzen als negativ eingestuft werden.

Bei der schwach sensibilisierenden Testsubstanz EGDMA lag der $EC_{1,5}$ -Wert von 33,2 μM innerhalb des definierten Referenzbereichs. Der IC_{50} -Wert lag mit 206 μM jedoch deutlich unterhalb des angegebenen Richtwerts, was auf eine erhöhte Zytotoxizität hinweist. Diese ausgeprägte Zytotoxizität könnte im Zusammenhang mit einem erhöhten zellulären Stressniveau der Zellen stehen. Trotz der erhöhten Zytotoxizität konnte für EGDMA eine Guideline konforme Induktion nachgewiesen werden und ist gemäß OECD TG 442D als positiv einzustufen. Für Zimtalkohol konnten bei Konzentrationen von ca. 0,98 bis etwa 125 μM keine 1,5-fache Induktion beobachtet werden. Die Dosis-Wirkungs-Kurve verlief in diesem Bereich vergleichbar mit den nicht sensibilisierenden Substanzen. Bei höheren Konzentrationen überwogen die zytotoxischen Effekte, sodass die Zellviabilität unter den Schwellenwert von 70 % fiel (Abbildung 14). Dies wurde durch den IC_{50} -Wert bestätigt, der deutlich unterhalb des definierten Richtwerts mit 206,2 μM lag. Somit überlagerten die zytotoxischen Effekte die Funktionalität des Assays, wodurch für Zimtalkohol kein $EC_{1,5}$ -Wert bestimmt werden konnte und somit als nicht bewertbar eingestuft wurde. Die als moderat sensibilisierend eingestufte Testsubstanz 2-MBT zeigte im serumfreien KeratinoSens™ Assay eine Aktivierung der Luciferaseaktivität innerhalb der Guideline konformen Konzentrationsbereichs. Der $EC_{1,5}$ -Wert von 2,7 μM lag deutlich unterhalb des in der Guideline definierten Referenzbereichs von 25-250 μM . Zudem lag der IC_{50} -Wert der Zellen mit 4,9 μM ebenfalls deutlich unterhalb des angegebenen Grenzwertes, wodurch die steigende Induktion bei höheren Konzentrationen vermutlich auf einen verstärkten zytotoxischen Effekt zurückzuführen war (Abbildung 15). Dennoch war die Substanz aufgrund der nachgewiesenen Guideline konformen Induktion als positiv einzustufen. Die Referenzsubstanz Metol zeigte ein stark sensibilisierendes Potenzial. Der $EC_{1,5}$ -Wert lag mit 2,9 μM und der IC_{50} -Wert mit 11,54 μM deutlich unterhalb des Referenzbereichs der Testsubstanz. Bei höheren Konzentrationen nahm die Zellviabilität deutlich ab, was auf eine verstärkte zytotoxische Wirkung der Substanz schließen ließ (Abbildung 16). Dennoch kam es zu einer Guideline konformen Bestimmung des $EC_{1,5}$ -Wertes, wodurch Metol als positiv einzustufen war. MDBGN zeigte im serumfreien KeratinoSens™ Assay bei niedrigen Konzentrationen eine biologisch messbare Induktion, welche jedoch unterhalb des relevanten Schwellenwerts lag. Ab einer Konzentration von etwa 5 μM nahm die Zellviabilität deutlich ab, sodass zytotoxische Effekte zunehmend die Funktionalität des Assays überlagerten, was der IC_{50} -Wert von 9,9 μM bestätigt. Infolgedessen konnte keine 1,5-fache Induktion innerhalb der Guideline konformen Konzentrationsbereichs nachgewiesen werden (Abbildung 17). Entsprechend ist MDBGN gemäß OECD TG 442D als nicht bewertbar einzustufen.

Die sehr stark sensibilisierende Referenzsubstanz DNCB erfüllte im serumfreien KeratinoSens™ Assay die Kriterien für eine Guideline konforme Bestimmung des EC_{1,5}-Werts. Bei höheren Konzentrationen trat eine deutliche Abnahme der Zellviabilität auf, was die zunehmende Zytotoxizität bei steigender Konzentration bestätigte (Abbildung 18). Somit konnte DNCB als positiv eingestuft werden.

3 Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zur Optimierung der Kryokonservierung sowie zum Einsatz der KeratinoSens SF Zellen im Assay Ready Format diskutiert. Darüber hinaus wurden mittels einer Titration des Serumersatzproduktes Rückschlüsse auf eine mögliche Optimierung der serumfreien Kultivierungsbedingungen sowie der anschließenden Langzeitkultivierung der Zellen gezogen.

3.1 Optimierung der serumfreien Kultivierungsbedingungen

Bei der Titration des Serumersatzproduktes zeigte sich, dass die Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen im Konzentrationsbereich von 0,5-2 mL/L keine deutlichen Unterschiede in der Zellviabilität aufwiesen (Abbildung 5). Auch die ermittelten Wachstumsraten unterschieden sich bei einer Volumenkonzentration von 1 mL/L nur geringfügig voneinander (Abbildung 4). Dieses Ergebnis bestätigt die in der Literatur beschriebene Plateaueffekte bei der Verwendung von Serumersatzprodukten in der Zellkultur. Dabei weisen Zellen häufig nur innerhalb eines begrenzten Konzentrationsbereichs eines Serumersatzproduktes optimale Bedingungen für die Zellproliferation auf. Dies ist vermutlich auf ein Überangebot an essenziellen Wachstumsfaktoren und Nährstoffen in den Serumersatzprodukten zurückzuführen, die ab einer bestimmten Konzentration nicht mehr limitierend wirken. Dieser Zusammenhang könnte auch erklären, weshalb bei einer Verdopplung der SimPlaceX Konzentrationen von 1 mL/L auf 2 mL/L kein signifikant erhöhtes Zellwachstum zu beobachtet war [26]. Demzufolge ist davon auszugehen, dass eine weitere Erhöhung der SimPlaceX Konzentration unter den verwendeten Bedingungen keinen zusätzlichen Nutzen für die Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen bietet.

3.2 Einfluss der Langzeitkultivierung auf das Wachstum und die Viabilität der KeratinoSens SF

Für die Langzeitkultivierung der KeratinoSens SF Zellen wurde die zuvor bestimmte Arbeitskonzentration von 1 mL/L verwendet. Über den gesamten Kultivierungszeitraum von 18 Passagen zeigten sich stabile Wachstumsraten, welche die Ergebnisse der SimPlaceX Titration bestätigen (Abbildung 6). Die Zellviabilität blieb kontinuierlich über 90 % und zeigte, dass die zunehmende Kultivierungsdauer keinen negativen Effekt auf die Viabilität hatte (Abbildung 7). Während der Kultivierung kam es zum Auftreten vereinzelter Ausreißer der Wachstumsraten und der zugehörigen Viabilitäten, welche jedoch scheinbar keinen Einfluss auf die weitere Zellproliferation hatten. Ähnliche Schwankungen werden in Studien zur Langzeitkultivierung von Zellen unter serumfreien Bedingungen beobachtet und lassen sich vermutlich durch adaptive zelluläre Prozesse oder passagenabhängige Effekte erklären [26]. Für eine vollständige Bewertung möglicher Langzeitauswirkungen der Funktionalität der Zellen sind weiterführende Funktionalitätsassays erforderlich. So könnte bestimmt werden, ob trotz der stabilen Wachstumsraten und Zellviabilitäten, Veränderungen der Signalantwort auf zellulären Stress im Assay Format zu beobachten sind.

3.3 Kryooptimierung

Die Ergebnisse der Kryooptimierung zeigten, dass die höchste metabolische Aktivität der Zellen bei dem serumhaltigen Einfriermedium bestimmt werden konnte (10 % FBS). Knapp darunter lag das hausinterne Einfriermedium, welches eine vergleichsweise gute Kryoprotektionsfunktion aufwies. Das Einfriermedium, welches aus dem serumfreien Kulturmedium mit 5 % DMSO bestand, zeigte hingegen eine deutlich reduzierte Zellaktivität. Die höhere metabolische Aktivität in Anwesenheit von FBS bestätigt die schützende Wirkung der enthaltenen Serumproteine während des Gefrier- und Auftauprozesses. Die von Baust & Gao (2009) veröffentlichte Arbeit bestätigt diese Beobachtungen, da sie beschreibt, dass serumfreie Kryokonservierung mit einer eingeschränkten Funktionalität der Zellen verbunden sein kann und sich Zellen im KeratinoSens™ Assay empfindlicher verhalten können [27]. Somit hat die Wahl des Einfriermediums einen erheblichen Einfluss auf die metabolische Aktivität der KeratinoSens SF Zellen nach dem Kryoprozess. Für die Kryokonservierung der serumfreien Assay Ready Zellen wurde das hausinterne Einfriermedium verwendet. Dieses zeigte unter serumfreien Bedingungen die höchste metabolische Aktivität der Zellen.

Ein serumhaltiges Einfriermedium wurde bewusst nicht eingesetzt, da das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung eines vollständig serumfreien Assay Ready Formats war.

3.4 Validierung von Referenzsubstanzen im serumfreien KeratinoSens™ Assay

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde die Funktionalität serumfrei kultivierter und kryokonservierter KeratinoSens SF Zellen im KeratinoSens™ Assay untersucht. Die Zellen wurden dabei im Assay Ready Format getestet, somit wurden Sie unmittelbar nach dem Auftauen direkt im Assay eingesetzt, um ihre Funktionalität direkt nach der Kryokonservierung zu beurteilen. Historische Daten von KeratinoSens™ Assays zeigen, dass serumfrei kultivierte Zellen in der Solvent Control erhöhte Induktionswerte im Basalzustand als im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle aufweisen. In der Studie von Yang et al. (2016) wurde gezeigt, dass FBS und Albumine (Hauptbestandteil) eine schützende und puffernde Wirkung gegenüber oxidativem und elektrophile Stress besitzen. Durch die Reduktion der ROS /RNS und Elektrophile können zytotoxische Effekte verringert werden, sodass das Fehlen der Serumbestandteile während der Kultivierung und Konservierung zu einem erhöhten zellulären Grundstress führen kann [28]. Durch die Zugabe der Testsubstanzen steigt der zelluläre Stress wodurch zu erwarten ist, dass die Zellen im Assay Ready Format ebenfalls empfindlicher reagieren werden.

Zusammenfassend konnte bei allen Testsubstanzen ein erhöhter zellulären Grundstress anhand der Induktionswerte der Solvent Controls beobachtet werden. Gemäß OECD TG 442D konnten trotz dessen die als nicht sensibilisierenden Testsubstanzen im serumfreien KeratinoSens™ Assay als negativ eingestuft werden. Die als sensibilisierend eingestuften Testsubstanzen zeigten im Assay Ready Format hingegen bereits bei niedrigeren Konzentrationen eine erhöhte zytotoxische Wirkung, welche sich in niedrigen IC_{50} -Werten widerspiegeln. Trotz des erhöhten zellulären Stresszustandes konnten für EGDMA, Metol und DNCB hier Induktionen bestimmt werden, die innerhalb des Referenzbereichs der Guideline lagen. 2-MBT zeigte allerdings eine erhöhte Toxizität wodurch der $EC_{1,5}$ -Wert weit unterhalb des Referenzwertes lag. Trotz der niedrigen IC_{50} -Werte konnten Guideline konforme $EC_{1,5}$ -Werte bestimmt werden, sodass EGDMA, Metol, DNCB und 2-MBT gemäß OECD TG 442D als positiv einzustufen waren. Bei Zimtalkohol und MDBGN überwogen hingegen die zytotoxischen Effekte der Substanzen die Funktionalität des Assays, sodass keine Guideline konformen Bestimmungen der $EC_{1,5}$ -Werte möglich waren und diese Substanzen als nicht bewertbar eingestuft werden.

Für Substanzen, deren Bewertung aufgrund ausgeprägter Zytotoxizitäten nicht möglich war, sieht die OECD TG 442D eine erneute Prüfung mit angepassten Konzentrationsbereichen vor. Dabei soll untersucht werden, ob unter serumfreien Bedingungen eine Guideline konforme Induktion gemessen werden kann oder ob die starke Zytotoxizität die Bestimmung des $EC_{1,5}$ -Werts dauerhaft verhindert [8]. Durch diese kontinuierlich erhöhten Zytotoxizitäten und teils nicht bestimmbareren $EC_{1,5}$ -Werten konnten die Vorgaben der OECD TG 442D zu den technischen Überprüfungen der Testsubstanzen im serumfreien Assay Ready Format nicht vollständig erfüllt werden. Dieser erhöhte zelluläre Stress war bei allen untersuchten Substanzen zu beobachten und ist darauf zurückzuführen, dass FBS nicht nur wachstumsfördernde Eigenschaften besitzt, sondern auch eine schützende Wirkung gegenüber durch ROS/RNS oder Elektrophile ausgelöstem Stress aufweist [28].

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den in Tabelle 1 dargestellten Referenzdaten des KeratinoSens™ Assays, zeigt sich, dass sich die nicht sensibilisierenden Substanzen in beiden Versuchsansätzen vergleichbar verhielten. Die Testsubstanzen mit sensibilisierendem Potenzial wiesen im Assay Ready Format hingegen ein erhöhtes zelluläres Stressniveau im Vergleich zu den Referenzmessungen auf. Der zytotoxische Einfluss der Testsubstanzen war, somit im Assay Ready Format mit Ausnahme von DNCB stärker als im KeratinoSens™ Assay der Referenzmessungen. Daraus lässt sich schließen, dass die im Assay Ready Format verwendeten Zellen infolge des Kryoprozesses einem erhöhten zellulären Stress ausgesetzt sind und dadurch empfindlicher auf zusätzliche Belastungen reagieren. Dieses Verhalten wird in der Literatur bestätigt, wonach kryokonservierte Zellen unmittelbar nach dem Auftauen einen erhöhten zellulären Stress aufweisen, der mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber weiteren Stressoren einhergehen kann [27].

3.5 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine serumfreie Kultivierung und Kryokonservierung von KeratinoSens SF Zellen für den Einsatz im Assay Ready Format gemäß OECD TG 442D geeignet ist. Die nicht sensibilisierende Testsubstanzen Salicylsäure, Milchsäure, Glycerol und Isopropanol konnten als negativ eingestuft werden. Für die sensibilisierenden Referenzsubstanzen zeigte sich, dass trotz einer erhöhten Zytotoxizität eine überwiegende Guideline konforme Induktion erzielt werden konnte, sodass vier von sechs sensibilisierenden Substanzen als positiv eingestuft wurden. Somit konnten die Zellen im Assay Ready Format die technische Überprüfung nicht vollständig erfüllen. Zukünftige Arbeiten sollten sich auf die weitere Optimierung der serumfreien Kultivierungs- und Kryokonservierungsbedingungen konzentrieren, um die zelluläre Stressresistenz zu verbessern. Insbesondere die Anpassung der Kryokonservierung sowie die Optimierung der Erholungsphase nach dem Auftauen könnten dazu beitragen, zytotoxische Effekte zu reduzieren. Darüber hinaus stellt die Verkürzung der Inkubationszeiten der Testsubstanzen einen möglichen Ansatz dar, um toxischen Effekten entgegenzuwirken und die Assay Ready konforme Bewertung weiter zu verbessern.

Die durchgeführte Titration des Serumersatzprodukts ermöglichte eine erfolgreiche Bestimmung einer geeigneten Konzentration für die serumfreie Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen. Dabei konnten stabile Wachstumsraten und Viabilitäten innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs erzielt werden. Zukünftig könnte überprüft werden, inwiefern eine weitere Feinabstimmung der Serumersatzkonzentration, zu einer weiteren Verbesserung der Zellstabilität und Assay Performance führen könnte.

Im Rahmen der Langzeitkultivierung zeigte sich, dass die KeratinoSens SF Zellen unter serumfreien Bedingungen über mehrere Passagen hinweg stabile Wachstumsraten und eine hohe Zellviabilität aufwiesen. Die erfolgreiche Konzentrationsbestimmung des Serumersatzprodukts bildete dabei eine wesentliche Grundlage für die Langzeitkultur. Für die abschließende Bewertung der Zellen für den Einsatz im KeratinoSens™ Assay sollten jedoch zusätzliche Funktionalitätsassay am Ende einer Langzeitkultivierung durchgeführt werden, um die Einflüsse der Kultivierung auf die Funktionalität im Assay zu bestimmen.

4 Material

4.1 Mess- und Kultivierungsgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Mess- und Kultivierungsgeräte für die Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen sowie für die Durchführung des KeratinoSens™ Assays sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Übersicht der für den KeratinoSens™ Assay eingesetzten Mess- und Kultivierungsgeräte.

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Mikroskop	Nikon ECLIPSE TS100	Nikon
Mikroskop Kamera	MikroCam II 12 MP	Bresser GmbH
Zellzähler	CytoDirect	Mettler-Toledo
Inkubator	Steri-Cycle-i250	Thermo Fisher Scientific
Sterile Sicherheitswerkbank	Herasafe KS 12	Thermo Fisher Scientific
Zentrifuge	Mega Star 1.6R	Thermo Fisher Science
Wasserbad	WNE 14	Memmert GmbH + Co KG
Stickstofftank	Chronos	Messer
Analysenwaage	Sartorius CP124 S	Sartorius AG
Kühlschrank	Siemens Electronic	Siemens Aktiengesellschaft
Gefrierschrank		
-20 °C	TKSS400H	GGM Gastro International
-80 °C	- 80°C, TSX Series	Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten Lesegerät	Safinre 2	Tecan Trading AG
Mikrotiterplatten Schüttler	Tritramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Inkubator (37 °C, 5 % CO ₂)	Thermo Steri-Cycle	Thermo Fisher Scientific
Einfriergefäß	Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific
Desktop-Thermodrucker	GK420T	Zebra Technologies Corporation
Pipetierhilfe	Pipetboy acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH
Elektronische Mehrkanalpipette		Eppendorf SE
5-100 µL	Xplorer®	

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
50-1200 µL	Xplorer®	
Mechanische Luftpolster Pipette		Eppendorfer SE
10-100 µL	Research® Plus	
20-200 µL	Research® Plus	
100-1000 µL	Research® Plus	

4.2 Experimentelle Verbrauchsmaterialien

Die für die Arbeit der Mess- und Kultivierungsgeräte benötigten Verbrauchsmaterialien zur Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen sowie zur Durchführung des KeratinoSens™ Assays sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht der für den KeratinoSens™ Assay verwendeten experimentellen Verbrauchsmaterialien.

Materialien	Katalognummer	Hersteller
Zellkulturflaschen		Sarsteadt AG & Co. KG
T25	83.3910	
T75	83.3910	
T175	83.3910	
Zellkulturplatten		Sarsteadt AG & Co. KG
96 well (transparent)	83.3924.300	
96 well (weiß)	82.1581.110	
Zentrifugenröhrchen		VWR International GmbH
15 mL	62.554.502	
50 mL	62.547.255	
Mikroreaktionsgefäße		Sarsteadt AG & Co. KG
2 ml	72.695.500	
Mikroreaktionsgefäße (lichtundurchlässig)		Sarsteadt AG & Co. KG
1,5 mL	72.695.001	
Kryovial		Thermo Fisher Scientific
1,8 mL	368632	

Materialien	Katalognummer	Hersteller
Filterpipettenspitzen transparent, Biosphere® plus		Sarsteadt AG & Co. KG
100 µL	70.3030.255	
200 µL	70.3030.215	
1200 µL	70.3070.255	
Serologische Pipetten		Sarsteadt AG & Co. KG
1 mL	86.1251.025	
2 mL	86.1252.025	
5 mL	86.1687.010	
10 mL	86.1688.010	
25 mL	86.1685.020	
50 mL	86.1256.001	

4.3 Zelllinie

Für die Kultivierung der für den KeratinoSens Assay benötigten Zellen wurden kryokonservierte Zellen aufgetaut, die zuvor auf die serumfrei kultivierte Variante KeratinoSens SF umgestellt worden waren.

Tabelle 4: Übersicht der kultivierten KeratinoSens SF Zelllinie, serumfrei kultiviert und für den Assay verwendet.

Zelllinie	Interne Lotnummer	Zell-ID
KeratinoSens SF	83-250909FEH01	1700

4.4 Zellkulturreagenzien für Handhabung und Kryokonservierung

Die für die Handhabung und Kryokonservierung der Zellen verwendeten Zellkulturreagenzien sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zellkulturreagenzien für die Handhabung und Kryokonservierung.

Chemikalien	Hersteller	Kat. Nr.
Accutase	Corning	25-058-CI
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Capricorn	ME061-01
instaFREEZE	acCELLerate	ME258-10
Streptomycin/ Penicillin	PAN Biotech	P06-07100
FBS	PAN Biotech	P30-5500

4.5 Zellkulturmedien und -zusätze zur Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen

In diesem Abschnitt sind die für die Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze einschließlich Herstellerangaben und Katalognummern aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien und -zusätze zur Kultivierung der KeratinoSens SF Zellen.

Medien/ Zusätze	Hersteller	Kat. Nr.
DMEM/ Ham's F12 (Phenolrot)	Capricorn	DMEM-12-HXA
SimPlaceX	Scinora	108104-1L
L-Glutamin	Capricorn	GLN-B
G418	Capricorn	G418-Q
Sodium Pyruvat	Sigma-Aldrich	S8636

4.6 Serumfreie Medienzusammensetzung

Die Zusammensetzung des serumfreien Kulturmediums für die KeratinoSens SF Zellen sowie die jeweiligen Endkonzentrationen der Zusätze sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Medienzusammensetzung des serumfreien Kulturmediums für KeratinoSens SF Zellen

Basalmedium	Zusätze	Konzentration
DMEM Ham's F12	SimPlaceX	1 mL/L
	L-Glutamin	4 mM
	G418	0,5 mg/ mL
	Sodium Pyruvat	1 mM

4.7 Testsubstanzen des KeratinoSens™ Assays

Die in dieser Arbeit eingesetzten Testsubstanzen sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Ihr theoretischer Hintergrund und die Funktion im KeratinoSens™ Assay werden im Methodenteil näher erläutert.

Tabelle 8: Testsubstanzen zur Klassifizierung nach OECD TG 442D im KeratinoSens™ Assay.

Testsubstanzen	Hersteller	Kat. Nr.:
Salicylsäure	Sigma-Aldrich	247588
Milchsäure	Sigma-Aldrich	W261106-1KG-K
Glycerol	PAN Biotech	P04-93100
Isopropanol	Capricorn	GLN-B
Ethylenglykoldimethylacrylat (EGDMA)	Capricorn	G418-Q
Zimtalkohol	Sigma-Aldrich	108197
2-Mercaptobenzothiazol (2-MBT)	Proteintech	HZ-1326
4-Methylaminopheolsulfat (Metol)	Proteintech	HZ-1100
Methyldibromoglutaronitrile (MDBGN)	Proteintech	HZ-1285
Dinitrochlorbenzol (DNCB)	Sigma-Aldrich	138630-100G

5 Methoden

In diesem Kapitel werden die experimentellen Methoden beschrieben, die für die Kultivierung und Kryokonservierung der KeratinoSens SF Zellen eingesetzt wurden. Darüber hinaus wird die Klassifizierung der im KeratinoSens™ Assays verwendeten Testsubstanzen sowie deren Anwendung im Assay erläutert.

5.1 Kryooptimierung

Einer der wichtigsten Schritte in der Produktion und Lagerung von Zellen ist der Einfrierprozess. Obwohl jede Zelllinie spezifische Anforderungen an ihr Kultivierungsmilieu stellt, kann der Einfrierprozess von Säugetierzellen grundsätzlich generalisiert beschrieben werden [29]. Aufgrund der Umstellung der KeratinoSens-Zellen auf die serumfreie Variante KeratinoSens SF wurde eine erneute Validierung verschiedener Einfrierbedingungen durchgeführt.

Hierbei wurden ein hausinterne Einfriermedium sowie das serumfreie Kulturmedium im Vergleich zu einem FBS haltigen Kontrollmedium als potenzielle Einfriermedien untersucht. Für eine optimale Kryoprotektion befanden sich die Zellen während des Einfrierprozesses in der exponentiellen Wachstumsphase. Für jede Einfrierbedingung wurden die Zellen auf eine Dichte von $> 4 \times 10^6$ Zellen expandiert. Bevor die Zellen im Einfriermedium resuspendiert werden, wird DMSO in einer Konzentration von 5 % (v/v) hinzugeben, welches als Kryoprotektika die Eiskristallbildung im intra- und extrazellulären Raum unterbinden soll [30]. Anschließend wurde die Zellsuspension auf drei 15 mL Röhrchen verteilt, zentrifugiert und der Überstand vorsichtig über dem Zellpellet entfernt. Das Zellpellet wurde anschließend in 4 mL Einfriermedium resuspendiert. Für jede Bedingung wurden anschließend drei Kryovials mit jeweils 1 mL Zellsuspension aliquotiert. Zum Einfrieren kam ein Mr. Frosty zum Einsatz, der zunächst in einem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefrierschrank gelagert wurde, bevor die Proben in den Flüssigstickstofftank überführt wurden. Mr. Frosty ist ein Isopropanol basiertes Einfriergefäß, das ein Temperaturprofil von etwa $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute erzeugt, was in den meisten Fällen optimal für Säugetierzellen ist [28]. Um den Einfluss der unterschiedlichen Einfrierbedingungen auf die Zellviabilität zu beurteilen, wurde im Anschluss ein Resazurin basierter Vitalitäts-Assay durchgeführt.

Vorbereitung des Vitalitäts-Assays

Im nächsten Schritt erfolgt die Vorbereitung des Vitalitäts-Assays. Hierfür wird das zellspezifische Assay Medium (Tabelle 7) mit 10 mM HEPES sowie 1 % Penicillin/Streptomycin supplementiert, um unerwünschten pH-Schwankungen und mikrobiellen Kontaminationen vorzubeugen.

Assay - Tag 1

In die 5 mL Eppendorf Tubes werden zunächst jeweils 3 mL des Assay Mediums vorgelegt. Anschließend werden zwei Kryovials im Wasserbad bei 37 °C für 3 min aufgetaut. Danach werden 2 mL Kulturmedium mit einer serologischen Pipette aufgenommen, um die Zellsuspension zu entnehmen. Dabei verbleibt etwa 1 mL in der Pipette, um das Kryovial auszuspülen. Dieser Schritt wird für alle Proben identisch durchgeführt. Nach mehrmaligem vorsichtigem Invertieren der 5 mL Tubes wird jeweils 1 mL der Zellsuspension in 1,5 mL Eppendorf Tubes überführt und bei $300 \times g$ zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet kann nahezu transparent erscheinen, weshalb beim Entfernen des Überstandes besonders sorgfältig gearbeitet werden muss. Das Pellet wird anschließend durch leichtes Abklopfen des Röhrchens auf der Arbeitsfläche gelockert, um eine gleichmäßige Resuspension zu ermöglichen.

Jedes Pellet wird in 1.200 µL des serumfreien Kulturmediums resuspendiert. Davon werden jeweils dreimal 100 µL in drei Wells der 96-Well-Platte überführt. Die verbleibenden Wells werden mit 100 µL DPBS aufgefüllt. Die Inkubation erfolgt über 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre.

Tabelle 9 Belegungsschema der 96-Well-Platte für die Vitalitätsmessung mittels Resazurin-Assay. Proben aus Vial A (Kontrolle im FBS-haltigen Medium), Vial B (serumfreies Medium) und Vial C (hausinternes Einfriermedium) wurden jeweils in Duplikaten in die entsprechenden Wells (B2–B4/B5–B7, C2–C4/C5–C7 und D2–D4/D5–D7) ausgesät.

Platten Layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		A1			A2							
C		B1			B2							
D		C1			C2							
E												
F												
G												
H												

Assay - Tag 2

Am folgenden Tag werden 20 μL der Resazurin Working Solution zu den inkubierten Zellen gegeben, woraufhin die 96 Wellplatte erneut für 4 h bei 37 °C und 5 % CO_2 Atmosphäre inkubiert wird. Nach Abschluss der Inkubation wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Dieses Signal ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen und dient somit als Maß für deren Vitalität [29].

5.2 Auftauen von Zellen

Das Auftauen kryokonservierter Zellen stellt einen kritischen Schritt in der Zellkultur dar, da es maßgeblich die Zellvitalität sowie das anschließende Proliferationsverhalten beeinflussen kann. Um Zellstress und Schädigungen zu minimieren, ist eine standardisierte, zeiteffiziente und dennoch schonende Durchführung erforderlich [30]. Nach der Entnahme aus dem flüssigstickstoffbasierten Kryolager wurden die Kryovials bis zur Verarbeitung auf Trockeneis gelagert, um ein unkontrolliertes Auftauen zu vermeiden. Dies ist insbesondere aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften von DMSO im Einfriermedium relevant. DMSO vermindert die Eiskristallbildung, während der Kryokonservierung im intra- und extrazellulären Raum der Zellen, muss jedoch nach dem Auftauen rasch entfernt werden, um zelluläre Schäden von Organellen und der Membran zu verhindern [31]. Das Auftauen erfolgte mit einem Schwimmer in einem 37 °C warmen Wasserbad, wobei die Dauer abhängig vom Volumen des Kryovials ist. 2 Minuten bei einem 1 mL Vial und 3 Minuten bei einem 1,8 mL Vial. Parallel dazu wurden in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen 9 mL (1 mL Vial) oder 8 mL (1,8 mL Vial) Medium vorgelegt. Nach dem Auftauen wurden ca. 4 mL Medium entnommen, mit der aufgetauten Zellsuspension in der Pipettenspitze vorsichtig vermischt und anschließend vollständig in das Zentrifugenröhrchen überführt. Das Kryovial wurde mit 1 mL Medium gespült, um verbliebene Zellen aufzunehmen, und die Zellsuspension ebenfalls in das Röhrchen gegeben. Zur Entfernung des DMSO wurde die Zellsuspension zentrifugiert, wobei die Zentrifugationsparameter ($300 \times g$ á 3min) zelllinienspezifisch angepasst wurden, um mechanische Belastungen zu minimieren. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und Viabilität mithilfe des CytoDirect Systems (Mettler-Toledo), welche im folgenden Kapitel beschrieben wird. Der gesamte Prozess wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und möglichst zügig abgeschlossen, um eine maximale Zellvitalität und Kultivierungsfähigkeit sicherzustellen.

5.3 Zählung/ Vitalitätsbestimmung

Die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung der kultivierten Zellen erfolgte mit dem CytoDirect System. Das Messprinzip basiert auf der digitalen holografischen Mikroskopie, bei der optische Eigenschaften der Probe, insbesondere der Brechungsindex, quantitativ erfasst werden. Wenn Licht durch ein Medium tritt, wird es im Vergleich zum Vakuum phasenverschoben. Diese Phasenverschiebung entsteht, weil die elektromagnetische Welle mit den Molekülen des Mediums interagieren. Die Teilchen werden angeregt, beginnen zu schwingen und emittieren die Lichtwelle mit einer Verzögerung. Die Summe dieser mikroskopischen Verzögerungen bestimmt den Brechungsindex des Materials. Im CytoDirect-System wird Licht von einer kohärenten Quelle durch die Probenkammer geleitet. Dabei werden zwei Messungen durchgeführt, eine Referenzmessung, bei der das Licht ausschließlich durch zellfreie Bereiche des Mediums läuft (Referenzstrahl), und eine Objektmessung, bei der der Strahl Bereiche mit Zellen durchdringt (Objektstrahl). Die Zellbestandteile wie Zytoplasma, Zellorganellen und Membranen besitzen jeweils unterschiedliche Brechungsindizes und bewirken dadurch eine lokale Phasenverschiebung des durch die Zelle hindurchtretenden Lichts. Treffen der Referenzstrahl und der Objektstrahl anschließend auf den Detektor, entsteht ein Interferenzmuster, das als Hologramm aufgezeichnet wird. Auf Grundlage dieser Informationen kann das aufgezeichnete Hologramm rechnergestützt rekonstruiert werden, wodurch eine quantitative Auswertung der Zellmorphologie ermöglicht wird. Dies bildet die Basis für die automatische Zellzählung sowie die Bestimmung der Zellviabilität [32].

Für die Messung wurden 20 μL Zellsuspension in die Einweg-Messkammer pipettiert, sodass sich ein gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm bildete. Die Zellkonzentration wurde auf den vom Hersteller empfohlenen Bereich von 10^4 bis 10^7 Zellen/ mL eingestellt.

5.4 Passagieren adhärent wachsender Zellen

Der Prozess des Passagierens adhärenter Zellen begann mit dem vollständigen Entfernen des verbrauchten Kulturmediums, gefolgt von einem Waschschrift mit sterilem, calcium- und magnesiumfreiem DPBS, um Zellreste zu entfernen, die die Aktivität des Ablöseenzyms beeinträchtigen könnten. Anschließend wurde der Waschpuffer vollständig entfernt, und der Zellrasen gleichmäßig mit dem enzymatischen Zellschmelzmittel Accutase bedeckt. Die Inkubation erfolgte in drei Schritten: zunächst über 15 Minuten, anschließend zweimal für jeweils 10 Minuten bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 % CO_2 -Atmosphäre.

Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Suspension aus Zellen und Ablösereagenz in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Abschluss der Ablösung wurde das Kulturgefäß mit zellspezifischem Kulturmedium gespült und mikroskopisch überprüft, ob der Ablöseprozess vollständig abgeschlossen war. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei zelllinienspezifisch angepassten Parametern (300 x g á 3 min). Der Überstand wurde verworfen, und das resultierende Zellpellet in frischem Medium resuspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl, Zellvitalität und Proliferationskapazität wurden 20 µL der resuspendierten Zellsuspension entnommen und mit dem automatisierten Zellanalysesystem CytoDirect ausgewertet, wie in beschrieben.

Im Folgenden sind die als Standardwerte verwendeten Aussaatdichten der serumfrei kultivierten KeratinoSens SF Zellen dargestellt, die auf hausinternen Vorversuchen basieren. Daran anschließend wird die Berechnung der erforderlichen Zellzahlen sowie der Arbeitsvolumina für eine korrekte Aussaat der Zellen beschrieben.

Tabelle 10: Aussaatdichten der KeratinoSens SF Zellen.

Kultivierungstage	Aussaatdichte in c/cm^2
3	2×10^4
4	$1,2 \times 10^4$

Berechnung der erforderlichen Zellzahl und des Aussaatvolumens:

Jede Zelllinie besitzt spezifische Aussaatdichten, die die Zelldichte auf dem Boden des Kulturgefäßes bei der Aussaat widerspiegeln. Diese Dichten sind entscheidend, um ein optimales Zellwachstum zu gewährleisten. Auf diese Weise wird verhindert, dass die Zellen während der Kultivierung zu dicht wachsen und infolgedessen beispielsweise durch Kontaktinhibition ihre exponentielle Wachstumsphase verlassen.

Zur Berechnung des benötigten Volumens der Zellsuspension wird zunächst die Konzentration der lebenden Zellen mithilfe des CytoDirect Systems bestimmt:

$$c_{\text{Lebende Zellen}} = x \frac{c}{mL}$$

Die für die Aussaat erforderliche Zellzahl ergibt sich aus der Aussaatdichte (Tabelle 9) multipliziert mit der Kultivierungsfläche:

$$n_{\text{Gesamtanzahl ausgesähter Zellen}} = c_{\text{Aussatdichte für 3 Tage}} \frac{c}{\text{cm}^2} \times A_{\text{Kultivierungsfläche}} \text{ cm}^2$$

Das benötigte Volumen der Zellsuspension berechnet sich anschließend durch Division der Gesamtzellzahl durch die Konzentration der lebenden Zellen:

$$v_{\text{Resuspenidierte Zellen}} = \frac{n_{\text{Gesamtanzahl ausgesähter Zellen}} \frac{c}{\text{mL}}}{c_{\text{Lebende Zellen}} \frac{c}{\text{mL}}}$$

Jedes Kulturgefäß besitzt ein definiertes absolutes Kultivierungsvolumen. Bevor dieses vollständig in das Gefäß eingebracht wird, muss das Volumen der Zellsuspension hiervon abgezogen werden:

$$v_{\text{Kultivierungsvolumen}} = v_{\text{Kultivierungsvolumen, absolut}} - v_{\text{Resuspenidierte Zellen}}$$

Basierend auf der ermittelten Zellzahl und dem jeweiligen Zellbedarf wurde ein geeignetes Kulturgefäß (T25, T75, T175 oder CellSTACK) ausgewählt, in das eine definierte Anzahl an Zellen ausgesät wurde. Anschließend wurde das entsprechende Volumen des Kulturmediums in das Kulturgefäß vorgelegt und die berechnete Menge der Zellsuspension hinzugegeben, um eine gleichmäßige Aussaat zu gewährleisten. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

Zur Voruntersuchung wurden die Zellen in vier unterschiedlichen SimPlaceX Konzentrationen (0,5–2 mL/L) kultiviert. Für die nachfolgenden Experimente wurde eine Konzentration von 1 mL/L als Arbeitskonzentration festgelegt.

5.5 Einfrierprozess

Zunächst wurden die kultivierten Zellen, wie in Kapitel 48 beschrieben, vom Kulturgefäß abgelöst und anschließend zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet im Einfriermedium resuspendiert, und die Zellzahl wurde mithilfe des Cytodirect Systems, wie in Kapitel 5.3 erläutert, bestimmt. Auf Grundlage der gewünschten Zellzahl pro Kryovial (5 × 10⁶ Zellen/Vial) sowie des erforderlichen Gesamtvolumens (1,8 mL/Vial) wurde die benötigte Menge an Einfriermedium und Zellsuspension berechnet.

Um eine zellschädigende Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses zu vermeiden, wurde dem hausinternen Einfriermedium zusätzlich 5 % (v/v) DMSO zugesetzt. Die Zugabe von DMSO erfolgte vor der Resuspension der Zellen, da die Mischung von DMSO mit dem Medium eine exotherme Reaktion verursacht, welche potenziell zellschädigend sein kann. Nach der Homogenisierung der Zellsuspension wurden die Proben aliquotiert und in vorbereitete Kryovials überführt. Der Einfrierprozess erfolgte kontrolliert unter Verwendung eines passiven Gefrierhilfesystems (Mr. Frosty), das eine definierte Abkühlrate von etwa $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro Minute gewährleistet. Hierbei wurden die Zellproben zunächst bei Raumtemperatur in das Gefriersystem eingesetzt und anschließend in einem $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Gefrierschrank abgekühlt. Nach Erreichen von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Proben zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ überführt.

5.6 KeratinoSens™ Assays

Im Folgenden wird das KeratinoSens™ Assays beschrieben, dass in zwei Versuchsreihen unterteilt werden kann. Hierfür werden über einen Zeitraum von vier Tagen zwei 96-Well-Platten mit KeratinoSens SF Zellen kultiviert und mit den Testsubstanzen inkubiert, um Rückschlüsse auf den durch elektrophile Testsubstanzen induzierten oxidativen Stress zu ziehen. Um auszuschließen, dass die gemessene Induktion durch Alterungsprozesse oder andere unspezifische Effekte verursacht wird, wird parallel ein Zytotoxizitäts Assay durchgeführt.

Die gemäß OECD TG 442D eingesetzten Referenzsubstanzen zur Klassifizierung potenziell hautsensibilisierender Stoffe wurden Guideline konform in 1 M Stocklösungen angesetzt. Anschließend erfolgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:5 mit dem jeweils geeigneten Lösungsmittel, um 200 mM Working Solutions zu erhalten [8]. Diese Working Solutions wurden in geeignete Volumina aliquotiert, in lichtgeschützte Mikroreaktionsgefäße überführt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert. Parallel dazu wurden MTT-Lösungen (5 mg/mL in DPBS) für den späteren Assay aliquotiert und ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die beiden Versuchsreihen unterscheiden sich grundlegend am vierten Assay Tag, daher ist die nachfolgende Beschreibung der ersten drei Assay Tage für beide Versuchsreihen repräsentativ.

Assay - Tag 1

Zunächst wird ein Kryovial, wie in Kapitel 5.2 beschrieben, im serumfreien Kulturmedium aufgetaut. Die Zellsuspension wird anschließend mit Kulturmedium verdünnt, sodass nach dem Aussäen von 125 µL pro Well eine Endkonzentration von 1×10^4 Zellen pro Well erreicht wird. Für die MTT-Messung wird eine transparente 96-Well-Platte verwendet, da hierbei die Absorption bei 570 nm gemessen wird.

Für das Luciferase Reportergen Assay kommt eine weiße 96-Well-Platte zum Einsatz, um das Lumineszenz Signal durch Reflexion der weißen Oberfläche zu verstärken.

Berechnung der Zellkonzentration

Die benötigte Zellkonzentration pro Well wird wie folgt berechnet:

$$c_{\text{Zellen pro Well}} = \frac{1 \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{well}}}{0,125 \frac{\text{mL}}{\text{well}}} = 8 \times 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$$

Die Zellkonzentration der verwendeten Zellsuspension beträgt:

$$c_{\text{Zellsuspension}} = x \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$$

Der Verdünnungsfaktor (VF) der Zellsuspension zum Kulturmedium ergibt sich aus:

$$\text{VF} = \frac{c_{\text{Zellsuspension}}}{c_{\text{Zellen pro Well}}}$$

Das für die Aussaat benötigte Gesamtvolumen ergibt sich aus dem Volumen pro Well, multipliziert mit der Anzahl der Wells beider 96-Well-Platten, zuzüglich eines Pipettierüberschusses:

$$v_{\text{gesamt aussaat}} = 0,125 \text{ mL} \times 2 \times 96 \text{ well's} = 24 \text{ mL} + 10 \% \text{ Pipettierüberschuss}$$

Das benötigte Volumen der Zellsuspension für die Aussaat wird aus dem Gesamtvolumen der Aussaat und dem Verdünnungsfaktor berechnet:

$$v_{\text{Zellsuspension}} = \frac{v_{\text{Gesamt Aussaatvolumen}}}{\text{VF}}$$

Der verbleibende Anteil wird als Kulturmedium hinzugefügt:

$$v_{\text{Kulturmedium}} = v_{\text{Gesamt Aussaatvolumen}} - v_{\text{Zellsuspension}}$$

Beide Volumina werden in einem Reservoir zusammengemischt. Mit einer 8 Kanal Multipipette erfolgt anschließend die Aussaat der Zellen auf die beiden 96-Well-Platten. Dabei wird die Suspension leicht geschwenkt, um eine gleichmäßige Zellverteilung zu gewährleisten und Sedimentation zu vermeiden.

Die Platten werden danach für 24 Stunden bei 37 °C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre kultiviert.

Assay - Tag 2

Die aus den Working Solutions hergestellten Testkonzentrationen wurden gemäß einem festgelegten Verdünnungsschema angesetzt. Tabelle 11 zeigt das verwendete Belegungsschema der 96-Well-Platte einschließlich der eingesetzten Konzentrationsreihen und der entsprechenden Kontrollen.

Tabelle 11: Die Wells A12-C12 enthalten die erste Testsubstanz, während die Wells D12-F12 die zweite Testsubstanz enthalten; diese Wells bilden jeweils den Ausgangspunkt der entsprechenden Verdünnungsreihen. Die Positivkontrolle EGDMA ist ebenfalls als Verdünnungsreihe angelegt, beginnend in den Wells G6, G11 und H11, und dient als Referenzsubstanz. Die Solvent Control (SC) sowie die Blanks enthalten ausschließlich das Lösungsmittel DMSO. Sämtliche Testsubstanzen und Kontrollen wurden in Triplikaten pipettiert.

Platten layout	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
B	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
C	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
D	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
E	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
F	0,977	1,953	3,906	7,813	15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000	2000
G	blank	15,6	31,25	62,5	125	250	15,6	31,25	62,5	125	250	blank
H	SC	SC	SC	SC	SC	SC	15,6	31,25	62,5	125	250	blank

Zunächst werden 100 µL DMSO in alle Wells pipettiert, die nicht als Startpunkt einer Verdünnungsreihe dienen (Wells A12-F12 sowie G6, G11 und H11). Die Wells G1, G12 und H12 dienen als Blanks und enthalten ebenfalls ausschließlich DMSO.

Im nächsten Schritt werden 200 µL der Working Solution der ersten Testsubstanz in die Wells A12-C12 und 200 µL der Working Solution der zweiten Testsubstanz in die Wells D12-F12 pipettiert. Für die Positivkontrolle (EGDMA) werden 200 µL in die Wells G6, G11 und H11 pipettiert. Diese bilden den Startpunkt der jeweiligen Verdünnungsreihe.

Anschließend erfolgt die Verdünnung der Testsubstanzen und Kontrollen durch Übertragung von jeweils 100 µL von rechts nach links im Verhältnis 1:2.

Dabei wird die Multikanal Pipette in den P/M-Modus (Pipette and Mix) gestellt. Die Lösung wird siebenmal mit einem Mischvolumen von 100 µL durchmischt, um eine möglichst homogene Lösung zu gewährleisten. Entsprechend dem finalen Plattenschema des Assays werden die Testsubstanzen über zwei Verdünnungsstufen von der 100× Master Plate auf die 4× Master Plate verdünnt. Hierbei werden 10 µL der 100× Master Plate auf eine leere 96-Well-Platte übertragen und mit 240 µL Kulturmedium verdünnt. Der P/M-Modus der Multikanal-Pipette wird verwendet, wobei das Volumen siebenmal mit 200 µL durchmischt wird, um eine homogene Lösung zu gewährleisten.

Im letzten Schritt wird zunächst der Überstand der beiden Kulturplatten entfernt. Anschließend werden 150 µL Kulturmedium vorgelegt, und 50 µL der 4× Master Plate auf die Kultivierungsplatten pipettiert, um eine 1:4 Verdünnung zu erzeugen. Danach werden die Platten abgedunkelt und kurz auf einen Plattenschüttler gestellt, bevor die 48 stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre beginnt.

Assay - Tag 4

Lumineszenzmessung der Nrf2/ARE-Signalwegaktivierung

Nach der Inkubation wird der Überstand der Zellen entfernt und jedes Well mit 125 µL DPBS gewaschen. Anschließend werden in einem Reservoir DPBS und ONE-Glo™ (Promega) im Verhältnis 1:2 gemischt und 100 µL der Lösung in jedes Well pipettiert. Das ONE-Glo™ Reagenz liefert D-Luciferin und enthält die für die Luciferase Reaktion erforderlichen Cofaktoren, einschließlich Magnesium. Die 96-Well-Platte wird anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wird das Lumineszenz Signal mithilfe des Tecan Safire 2 gemessen und als Maß für die Aktivierung des Nrf2-ARE-Signalwegs ausgewertet.

Zytotoxische Absorptionsmessung mittels MTT

Zunächst werden 2,7 mL MTT-Lösung mit 20 mL Kulturmedium in einem Reservoir zusammengemischt. Anschließend wird der Überstand der 96-Well-Platte entfernt, und 200 µL der MTT-Lösung in jedes Well pipettiert. Die Platte wird mit sealing tape abgedeckt und für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ Atmosphäre inkubiert. Nach der Inkubation wird der Überstand erneut entfernt und 50 µL Isopropanol pro Well zugegeben.

Die Platte wird anschließend 30 Minuten im Dunkeln auf einem Plattenschüttler inkubiert, wobei sich das gebildete Formazan löst und homogenisiert. Anschließend wird die Absorption bei 570 nm gemessen, um die zytotoxische Wirkung der Testsubstanzen zu beurteilen.

Bestimmung von $EC_{1,5}$ - und IC_{50} -Werte gemäß OECD TG 442D

Zur Klassifizierung der eingesetzten Testsubstanzen nach OECD TG 442D werden die $EC_{1,5}$ -Werte und die IC_{50} -Werte anhand einer linearen Interpolation der gemessenen Signalwegaktivierung und Zellviabilität bestimmt. Um eine Substanz als positiv bewerten zu können müssen die folgenden vier Kriterien erfüllt sein [8]:

- Die Induktion der Luciferaseaktivität beträgt mindestens das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrolle und ist statistisch signifikant.
- Die Zellviabilität liegt bei der Konzentration, bei der die 1,5-fache Induktion erreicht wird ($EC_{1,5}$), bei mindestens 70 %.
- Der $EC_{1,5}$ Wert liegt bei maximal 1000 μ M (bzw. ≤ 200 μ g/mL bei Substanzen ohne definierte molare Masse).
- Es ist ein klarer dosisabhängiger Verlauf der Luciferaseinduktion erkennbar, alternativ kann auch ein biphasischer Dosis-Wirkungs-Verlauf vorliegen.
- Die Ergebnisse sind in mindestens zwei von drei unabhängigen Wiederholungen reproduzierbar.

Der $EC_{1,5}$ -Wert der Induktion wird anhand der folgenden Formel berechnet.

$$EC_{1,5} = (c_{1,5 \max} - c_{1,5 \min}) \times \left(\frac{1,5 - I_{1,5 \min}}{I_{1,5 \max} - I_{1,5 \min}} \right) + c_{1,5 \min}$$

Mit:

$EC_{1,5}$ = Konzentration der Testsubstanz mit 1,5 facher Nrf2 – ARE – Signalwegaktivierung

IC_{50} = Konzentration der Testsubstanz mit 50 % Reduktion der Zellviabilität

$c_{1,5 \min}$ = niedrigste Konzentration der Testsubstanz mit einer $> 1,5$ fachen Induktion

$c_{1,5 \max}$ = höchste Konzentration der Testsubstanz mit einer $< 1,5$ fachen Induktion

$I_{1,5 \min}$ = mittlerer Induktionswert bei der niedrigsten Konzentration mit einer $> 1,5$ fachen Induktion

$I_{1,5 \max}$ = mittlerer Induktionswert bei der höchsten Konzentration mit einer $< 1,5$ fachen Induktion

Der IC_{50} -Wert wird anhand der folgenden Formel berechnet.

$$IC_{50} = (c_{v \max} - c_{v \min}) \times \left(\frac{(100 - 50) - V_{\min}}{V_{\max} - V_{\min}} \right) + c_{v \min}$$

Mit:

$c_{v \min}$ = niedrigste getestete Konzentration mit > 50 % Reduktion der Zellviabilität

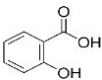
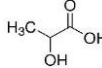
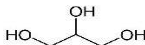
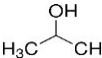
$c_{v \max}$ = höchste getestete Konzentration mit < 50 % Reduktion der Zellviabilität

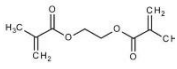
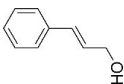
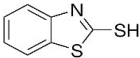
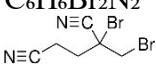
$V_{\min}$ = Zellviabilität bei $c_{v \min}$ in %

$V_{\max}$ = Zellviabilität bei $c_{v \max}$ in %

Zuletzt sind die im KeratinoSens™ Assay definierten Referenzsubstanzen aufgeführt. Die geprüften Substanzen sowie deren bekannte zytotoxische Eigenschaften und Sensibilisierungspotenziale sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 12: Referenzsubstanzen des KeratinoSens™ Assays gemäß OECD TG 442D

Referenzsubstanzen	Formel	Kurzbeschreibung	Zytotoxizität	Sensibilisierungspotential
Salicylsäure	$C_7H_6O_3$ 	Salicylsäure ist eine aromatische Hydroxycarbonsäure, die in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt wird.	Kann Hautreizungen verursachen, weist jedoch kein relevantes Hautsensibilisierungspotenzial auf.	Nicht sensibilisierend
Milchsäure	$C_3H_6O_3$ 	Milchsäure ist eine organische Hydroxycarbonsäure mit vielfältigen Anwendungen in Lebensmitteln und Kosmetika	Kann bei direktem Hautkontakt reizend wirken, zeigt jedoch kein Hautsensibilisierungspotenzial.	Nicht sensibilisierend
Glycerol	$C_3H_8O_3$ 	Glycerol ist ein dreiwertiger Alkohol, der als Feuchthaltemittel in pharmazeutischen und kosmetischen Formulierungen verwendet wird	Gilt als hautverträglich und zeigt kein bekanntes Hautsensibilisierungspotenzial.	Nicht sensibilisierend
Isopropanol	C_3H_8O 	Isopropanol ist ein niedrigmolekularer Alkoholverbindung, die als Lösungsmittel und in Desinfektionsmitteln genutzt wird.	Kann hautreizend wirken, gilt jedoch nicht als Hautsensibilisator.	Nicht sensibilisierend

Referenz-substanzen	Formel	Kurzbeschreibung	Zytotoxizität	Sensibilisierungspotential
EGDMA	$C_{10}H_{14}O_4$ 	EGDMA ist ein bifunktionaler Wirkstoff, der in der Polymer- und Kunststoffherstellung verwendet wird.	Kann Hautreizungen verursachen und weist ein ausgeprägtes Hautsensibilisierungspotenzial auf.	Schwach sensibilisierend
Zimtalkohol	$C_9H_{10}O$ 	Zimtalkohol ist ein aromatischer Alkohol, der als Duftstoff in Parfüms und Kosmetika vorkommt.	Kann allergische Hautreaktionen auslösen und gilt als schwacher Hautsensibilisator.	Schwach sensibilisierend
2-MBT	$C_7H_5NS_2$ 	2-MBT ist eine heteroaromatische Schwefelverbindung, die bei der Herstellung von Gummiartikeln als Vulkanisationsbeschleuniger und Alterungsschutzmittel verwendet wird (36).	Kann bei Hautkontakt zu Sensibilisierung und allergischen Reaktionen führen (36).	Moderat sensibilisierend
Metol	$C_{14}H_{20}N_2O$ S 	Metol ist ein aromatisches Amin-Derivat, das unter anderem in Farbstoff- und Analytik Anwendungen vorkommt.	Kann Hautreizungen verursachen und weist ein potenzielles Hautsensibilisierungspotenzial auf.	Stark sensibilisierend
MDBGN	$C_6H_6Br_2N_2$ 	MDBGN ist eine halogenierte organische Verbindung, die früher als Konservierungsmittel verwendet wurde.	Kann zu Hautreizungen und allergischen Reaktionen führen (37).	Stark sensibilisierend
DNCB	$C_6H_3ClN_2O_4$ 	DNCB ist eine nitrierte aromatische Verbindung, die häufig als Referenzsensibilisator in experimentellen Modellen eingesetzt wird.	Kann starke allergische Hautreaktionen hervorrufen und gilt als potenter Hautsensibilisator	Sehr stark sensibilisierend

6 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Bachelorarbeit sowohl emotional als auch fachlich unterstützt haben und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt der acCELLerate GmbH sowie den Geschäftsführern Dr. Alexander Loa und Dr. Oliver Wehmeier für die Möglichkeit, meine Bachelorarbeit in ihrem Unternehmen durchführen zu dürfen. Insbesondere danke ich Lukas Focke für die Betreuung meiner Bachelorarbeit sowie für die hilfreichen Ratschläge, die zur erfolgreichen Beendigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. Julien Béthune, der diese Arbeit als Erstgutachter von Seiten der HAW Hamburg betreut hat.

Einen besonderen Dank möchte ich an Felix Hackstein richten, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und ein Arbeitsumfeld geschaffen hat, in dem es in Ordnung ist, aus den eigenen Fehlern zu lernen und nicht an diesen bemessen zu werden. Ich danke dir herzlich für unsere gemeinsame Zeit!

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ohne euren Halt und eure Unterstützung wären die letzten Jahre nicht möglich gewesen.

Die letzten Worte dieser Danksagung möchte ich meinem Vater Reiner Reinhard widmen, der diese Arbeit leider nicht mehr lesen konnte. Es gab einige Momente in meinem Studium, in denen ich daran gezweifelt habe, dass ich dieses absolvieren werde. Er ermutigte mich stets, nie aufzugeben und trotz mancher perspektivlosen Zeiten den Kopf stets oben zu behalten. Danke Papa, für alles! (1964–2023)

7 Literaturverzeichnis

- [1] Gey G, Coffman W, Kubicek M. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 1952;12:264–265.
- [2] Yao, T.; Asayama, Y. (2017). *Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues*. *Reproductive Medicine and Biology*, 16, 99–117.
- [3] Wright, W. E.; Shay, J. W. (2001). *Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: The essential role of counting*. *Nature*, 312, 651–654.
- [4] Council of the European Communities (1976). *Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products* (amended 1993)
- [5] European Parliament and Council (2009). *Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products*. Official Journal of the European Union.
- [6] European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM). *Validation status of the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation*.
- [7] OECD Emter, R.; Ellis, G.; Natsch, A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(3), 281–290.
- [8] OECD (2010). *Test No. 429: Skin Sensitisation – Local Lymph Node Assay (LLNA)*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.
- [8] OECD (2024). *Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing, Paris.
- [9] Freshney, R. I. (2021). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (8th ed.). Wiley-Blackwell.
- [10] Schlatter, J. et al. (2001). *Collection of fetal bovine serum by cardiac puncture: Ethical and biological considerations*.
- [10] Kim, J. et al. (2022). *Low γ -globulin levels and reduced immunoproteins in serum*. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources*, 42(5), 775–784.

- [11] van der Valk, J. et al. (2010). *Serum-free cell culture: Past, present and future*. Toxicology in Vitro, 24(4), 1053–1064.
- [12] van der Valk, J. et al. (2010). *Serum-free cell culture: Past, present and future*. Toxicology in Vitro, 24(4), 1053–1064.
- [13] Burnouf, T.; Strunk, D.; Koh, M. B. C.; Schallmoser, K. (2016). *Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?* ALTEX, 33(4), 327–359.
- [14] Scinora GmbH (2024). *SimplaceX® data sheet*.
- [15] Sies, H. (2015). *Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biology, 4, 180–183.
- [16] Liebler, D. C.; Guengerich, F. P. (2005). *Elucidating the mechanisms of chemical toxicity and carcinogenesis*. Nature Reviews Drug Discovery, 4(5), 410–420.
- [17] Keap1–Nrf2 Pathway | BioRender Science Templates. Verfügbar unter: <https://www.biorender.com/template/keap1-nrf2-pathway> (Zugriff 30.01.25, 14:37 Uhr)
- [18] Kensler, T. W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. (2007). *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 47, 89–116.
- [19] Kimber, I. et al. (2012). *Skin sensitization: the role of reactive chemicals in the induction of allergic contact dermatitis*. Toxicological Sciences, 125, 309–319.
- [20] Natsch, A.; Emter, R. (2016). *Nrf2 activation as a key event triggered by skin sensitizers: The development of the stable KeratinoSens reporter gene assay*. Alternative Laboratory Animals, 44(5), 443–451.

- [21] Wei, Z.; Zhao, J.; Zhang, L.; Xia, M. (2022). *Cell-based assays to identify modulators of the Nrf2/ARE pathway*. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 2474, S. 59–69. Springer. [zitiert 10.01.2026, 10:08 Uhr]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9438791/>
- [22] Mosmann, T. (1983). *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63.
- [23] Merck (Sigma-Aldrich), Produktseite MTT, Art.-Nr. M4759. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/93145?srsId=AfmBOorUHWNVHnO3EvKkms0wDNSqbUzON25A21rtZofSf2uZi39nM3Rc> (Zugriff: 10.01.2026, 15:38 Uhr).
- [24] Merck KGaA (Sigma-Aldrich). (o. J.). *Formazan*. Verfügbar unter: <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/93145?srsId=AfmBOopyBCyogmi-oszr3qlGj0HGMc6s25ZBC3YSUIdrFmWzkelSqD-t> (Zugriff: 10.01.2026, 14:14 Uhr)
- [25] MTT-Assay-principle | BioRender Science Templates. Verfügbar unter: <https://www.biorender.com/template/mtt-assay-principle> (Zugriff 06.01.25, 18:25 Uhr)
- [26] van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., *et al.* (2010). *Optimization of chemically defined cell culture media—Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods*.
- [27] Baust, J. G., Gao, D., & Baust, J. M. (2009). *Cryopreservation: An emerging paradigm change*. *Organogenesis*, 5(3), 90–96.
- [28] Zhang, Y., Xu, Y.-Y., Sun, W.-J., *et al.* (2016). *FBS or BSA inhibits EGCG-induced cell death through covalent binding and the reduction of intracellular ROS production*. *Food & Function*, 7, 4146–4156.
- [29] Jaiswal, S., Jamieson, S., Pang, E., & *et al.* (2022). *Cryopreservation: A review article*. *Cureus*, 14(11), e31444.
- [30] Hubel, A. (1997). *Parameters of cell freezing: Implications for the cryopreservation of stem cells*. *Transfusion Medicine Reviews*, 11(3), 224–233.
- [31] Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *Mr. Frosty™ freezing container*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5100-0001>

- [32] Rampersad, S. N. (2012). *Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays*. *Sensors*, 12(9), 12347–12360.
- [33] González-Hernández, Y., Fischer, R., & Merten, O.-W. (2007). *Cryopreservation of mammalian cells: A comparative study of different freezing media*. *ALTEX*, 24(2), 110–116.
- [34] Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. R., & Cordeiro, M. F. (2014). *Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO*. *FASEB Journal*, 28(3), 1317–1330.
- [35] Mettler-Toledo. (2025). *CytoDirect™ cell counter – Operating principles and specifications*. Mettler-Toledo GmbH. <https://www.mt.com/cytodirect>

8 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit eigenständig und nur mit Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Wörtlich oder im Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe von Quellen kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht oder einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort und Datum:

Hamburg, 23.01.2026

Unterschrift: _____

Nik Reinhard