Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Screening serumfreier und serumhaltiger Einfriermedien hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Funktionalität von THP-1 Zellen im Assay Ready Cell Format

Bachelorarbeit

Im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Björn Schorle

Matrikelnummer: [redacted]

Hamburg

am 30. September 2026

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

Gutachter: M. Sc. Lukas Focke (acCELLerate GmbH)

Diese Arbeit wurde im Labor der acCELLerate GmbH in Hamburg erstellt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst bei den Geschäftsführern Dr. Alexander Loa und Dr. Oliver Wehmeier für die Möglichkeit bedanken, meine Bachelorarbeit bei der acCELLerate GmbH zu schreiben.

Mein Dank gilt außerdem Prof. Dr. Julien Béthune, der diese Arbeit als Erstgutachter betreut und mich dazu inspiriert hat, tiefer in Richtung Zellkultur und Molekularbiologie zu gehen.

Ein großes Dankeschön geht an das gesamte Team der Forschung und Entwicklung. Besonders hervorheben möchte ich Viktoria Patzelt, meine Betreuerin im Labor, die mir bei jeder Frage und jedem Problem zur Seite stand und mich hervorragend unterstützt hat. Des Weiteren danke ich Sophie Liebaum und Johannes Peterle, die mich herzlich im Team aufgenommen haben, mir jederzeit weitergeholfen haben und dafür gesorgt haben, dass ich eine großartige Zeit hatte. Ein besonderer Dank geht auch an Lukas Focke und Felix Hackstein für die Betreuung dieser Arbeit auf Seiten der acCELLerate GmbH. Von euch beiden durfte ich in dieser Zeit sehr viel lernen, aber vor allem habt ihr mir vom ersten Tag an das Gefühl gegeben, dazuzugehören und nicht nur ein Student zu sein, der in einem halben Jahr wieder weg ist. Außerdem möchte ich mich bei meinen Studienkollegen Andrés Almeida und Diana Zeinetdinova bedanken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden Jan-Ole und Morzal. Ihr beide habt mein gesamtes Bachelorstudium zu einer unvergesslichen Zeit gemacht, meinen Unialltag unendlich bereichert und mich auch durch unsere Lerngruppe zu besseren Leistungen getrieben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir dabei nie das Gefühl gegeben haben, schnell fertig werden zu müssen. Ich konnte mich euretwegen voll und ganz auf das Studium konzentrieren und wusste immer, dass ich eure volle Unterstützung habe.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung II

Abkürzungsverzeichnis V

Abbildungsverzeichnis VII

Tabellenverzeichnis VIII

1 Zusammenfassung 1

2 Einleitung 2

2.1 THP-1 Zellen als Modell 2

2.2 Oberflächenmarker und Kontrollsubstanzen 4

2.3 Assay Ready Cells 6

2.4 Kryokonservierung 7

2.5 Einfriermedien 9

2.6 Beurteilung der Funktionalität 10

2.7 Zielsetzung 12

3 Ergebnisse 13

3.1 Viability Check 13

3.1.1 Vergleich der Zellquellen 13

3.1.2 Vergleich der Einfriermedien 14

3.2 Reactivity Check 15

4 Diskussion 20

4.1 Auswahl der Zellquelle 20

4.2 Vorauswahl der Einfriermedien 21

4.3 Responsivität gegenüber DNCB 22

4.4 Responsivität gegenüber $NiSO_4$ 23

4.5 Negativkontrolle Milchsäure 24

4.6 Basalniveau der unbehandelten Kontrollen 25

4.7 Eignung der Einfriermedien im ARC-Format 28

4.8 Serumhaltige und serumfreie Einfriermedien 28
4.9 Einschränkungen 30
4.10 Fazit und Ausblick 31
5 Materialien und Methoden 33
5.1 Materialien 33
5.1.1 Verbrauchsmaterialien 33
5.1.2 Zellen 34
5.1.3 Medien und Puffer 34
5.1.4 Antikörper 37
5.1.5 Weitere Reagenzien 37
5.1.6 Geräte 38
5.2 Zellkultivierung 39
5.2.1 Zellzählung und Vitalitätsmessung mittels CASYvivo 39
5.2.2 Auftauen von Zellen für die Zellexpansion 39
5.2.3 Passagieren und expandieren von Zellen 40
5.2.4 Zellernte und Einfrieren 41
5.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität 44
5.4 Reactivity Check 45
5.5 Datenauswertung 47
6 Literaturverzeichnis 49
Anhang IX

Abkürzungsverzeichnis

FcR	Fc-Rezeptor
Ag	Antigen
MHC	*Major histocompatibility complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex)
CD	*Cluster of Differentiation* (Unterscheidungsgruppen)
ARC	*Assay Ready Cells*
DB-ALM	*Database Service on Alternative Methods to animal experimentation*
CRF	*Controlled Rate Freezer*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
PI	Propidiumiodid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
c	*Cells* (Zellen)
x g	x-fache Erdbeschleunigung
rpm	*revolutions per minute* (Umdrehungen pro Minute)
Q1	Zellquelle 1
Q2	Zellquelle 2
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
FBS	*Fetal Bovine Serum* (fetales Rinderserum)
FBS HI	*Fetal Bovine Serum Sera Low (heat inactivated)*
DMSO	Dimethylsulfoxid
insta	instaFREEZE + 5 % DMSO
KM5	Kulturmedium + 5 % DMSO

KM10	Kulturmedium + 10 % DMSO
FBS5	FBS HI + 5 % DMSO
FBS10	FBS HI + 10 % DMSO
CS5	CryoStor CS5 mit 5 % DMSO
CS10	CryoStor CS10 mit 10 % DMSO
DPBS	*Dulbecco's phosphate-buffered saline*
BSA	Bovines Serumalbumin
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
DNCB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
$NiSO_4$	Nickelsulfat
LA	Milchsäure (*Lactic Acid*)
MC	*Medium Control* (Medienkontrolle)
SC	*Solvent Control* (Lösungsmittelkontrolle)
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
RFI	Relative Fluoreszenzintensität
CV75	Konzentration, bei der die Vitalität der Zellen bei 75 % liegt
PBMC	*Peripheral Blood Mononuclear Cell* (periphere mononukleäre Blutzellen)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung dendritischer Zellen durch Haptene 3

Abbildung 2: Strukturformel 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB) 5

Abbildung 3: Strukturformel Nickelsulfat-Hexahydrat 5

Abbildung 4: Strukturformel Milchsäure (LA) 6

Abbildung 5: Verhalten einer Zelle beim Einfrieren in Abhängigkeit von der Kühlrate 8

Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers 11

Abbildung 7: Vergleich der MC- und SC-Vitalitäten der THP-1 Quellen 1 und 2 13

Abbildung 8: Vergleich der Vitalitäten der verschiedenen Einfriermedien von THP-1 Quelle 2 14

Abbildung 9: Vergleich der RFI für CD54 und CD86 der verschiedenen Einfriermedien von THP-1 Quelle 2 16

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vitalitäten der Isotypkontrollen der verschiedenen Einfriermedien von THP-1 Quelle 2 17

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien 33

Tabelle 3: Verwendete Zellen 34

Tabelle 4: Verwendetes Medium zur Kultivierung der THP-1 Zellen (Quelle 1)..... 34

Tabelle 5: Verwendetes Medium zur Kultivierung der THP-1 Zellen (Quelle 2)..... 35

Tabelle 6: Abkürzung, Name und Zusammensetzung der verwendeten serumhaltigen Einfriermedien zur Kryokonservierung der Zellen 35

Tabelle 7: Verwendetes serumfreies Medium zur Kryokonservierung der Zellen 35

Tabelle 8: Zusammensetzung *Assay Buffer* 36

Tabelle 9: Zusammensetzung *Assay Medium* 36

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für den *Reactivity Check*..... 37

Tabelle 11: Weitere Reagenzien 37

Tabelle 12: Verwendete Geräte..... 38

Tabelle 13: Aussaatdichten nach dem Auftauen 40

Tabelle 14: Aussaatdichten der THP-1 Zellen 40

Tabelle 15: Minimal- und Maximalvolumen der Zellkulturflaschen..... 41

Tabelle 16: Einfrierläufe der THP-1 Zellen (Quelle 1)..... 43

Tabelle 17: Einfrierläufe der THP-1 Zellen (Quelle 2)..... 43

Tabelle 18: Ansatz der Kontrollsubstanzen 46

1 Zusammenfassung

Assay Ready Cells werden nach dem Auftauen ohne weitere Kultivierung direkt in *Assays* eingesetzt. Für THP-1 Zellen, die unter anderem in Hautsensibilisierungstests verwendet werden, sieht das Protokoll Nr. 158 der *Database Service on Alternative Methods to animal experimentation* (DB-ALM) dagegen eine Kulturphase nach dem Auftauen vor. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich serumhaltige und serumfreie Einfriermedien auf die Funktionalität von THP-1 Zellen im *Assay Ready Cell* Format auswirken.

Sieben Einfriermedien auf Basis von Kulturmedium, fetalem Rinderserum (FBS), instaFREEZE und CryoStor, jeweils mit 5 % oder 10 % Dimethylsulfoxid, wurden in einem *Viability Check* mit Propidiumiodid durchflusszytometrisch verglichen. Fünf davon wurden anschließend in *Reactivity Checks* geprüft, in denen Zellen mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB), Nickelsulfat ($NiSO_4$) und Milchsäure behandelt und die relativen Fluoreszenzintensitäten der Oberflächenmarker CD54 und CD86 (CD: *Cluster of Differentiation)* bestimmt wurden. Beide Versuche erfolgten 24 h nach der Aussaat ohne vorherige Kulturphase.

Vier der fünf Einfriermedien erreichten nach Behandlung mit DNCB für beide Oberflächenmarker die Orientierungswerte des Protokolls. Die Negativkontrolle blieb bei allen Medien negativ. Nach Behandlung mit $NiSO_4$ erreichten nur zwei Medien den Orientierungswert für CD86, was vermutlich an der fest vorgegebenen Konzentration lag. Die beiden Medien aus reinem FBS schnitten in der Vitalität am schlechtesten ab. Über beide Versuche hinweg lieferte das serumfreie instaFREEZE das beste Ergebnis. Ob ein Einfriermedium Serum enthielt, war für die Funktionalität der Zellen nicht entscheidend.

THP-1 Zellen lassen sich demnach ohne eine Kulturphase nach dem Auftauen im *Assay Ready Cell* Format einsetzen. Auf Serum im Einfriermedium kann verzichtet werden.

2 Einleitung

Chemikalien und kosmetische Inhaltsstoffe müssen vor ihrem Einsatz auf gesundheitliche Risiken geprüft werden. Dazu gehört auch ihre Eigenschaft, bei Hautkontakt eine Hautsensibilisierung auszulösen, die bei erneutem Kontakt zu einer allergischen Reaktion führen kann [1]. Die Prüfung dieser Chemikalien und Kosmetika beschränkte sich lange Zeit auf Tierversuche. Tierversuche sind mit Leid und der Tötung der Versuchstiere verbunden, weshalb der Einsatz dieser Versuche zunehmend kritisch gesehen wird. Diese zunehmende Kritik schlägt sich im 3R-Prinzip und der Gesetzgebung nieder. Das 3R-Prinzip geht auf Russell und Burch [2] zurück und umfasst Replacement, Reduction und Refinement, also den Ersatz von Tierversuchen durch alternative Methoden, die Verringerung der Zahl eingesetzter Tiere und die Minderung von Leid bei unvermeidbaren Versuchen. Seit 2013 verbietet die EU-Kosmetikverordnung, an Tieren getestete Kosmetika auf den europäischen Markt zu bringen [3]. Auch die REACH-Verordnung (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) fordert, Tierversuche auf ein Minimum zu beschränken [4]. Neben den ethischen und rechtlichen Gründen gibt es auch fachliche Gründe, die für alternative Methoden sprechen. Ergebnisse aus Tierversuchen lassen sich nur bedingt auf den Menschen übertragen, da sich die Physiologie und das Immunsystem zwischen den Spezies unterscheiden [5]. Aus diesen Gründen wurden *in-vitro*-Tests entwickelt, mit denen die Überprüfung auf hautsensibilisierende Wirkung von Tierversuchen auf zellbasierte *Bioassays* verlagert wird. Solche zellbasierten *Assays* benötigen eine große Menge an Zellen, deren Eigenschaften über einzelne Versuche hinweg vergleichbar bleiben müssen.

2.1 THP-1 Zellen als Modell

Die Hautsensibilisierung läuft in zwei Phasen ab: die Induktionsphase und die Elicitationsphase, in der es bei erneutem Kontakt zur sichtbaren allergischen Reaktion kommt. In der Induktionsphase dringen kleine, chemisch reaktive Moleküle (sogenannte Haptene) in die Haut ein und binden dort kovalent an körpereigene Proteine. Langerhans-Zellen, die dendritischen Zellen der Epidermis, nehmen diese Komplexe auf, reifen dabei heran und wandern in die drainierenden Lymphknoten, wo sie das Antigen naiven T-Zellen präsentieren und deren Proliferation auslösen [6], [7]. Kennzeichnend für diese Reifung ist die Hochregulation von Molekülen des

Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) der Klasse II sowie costimulatorischer Oberflächenmoleküle wie CD86 und CD54 [6]. Die Aktivierung dendritischer Zellen lässt sich damit anhand messbarer Oberflächenmarker erfassen. Diese Eigenschaft wird in zellbasierten Testverfahren genutzt, um die Induktionsphase *in vitro* nachzustellen.

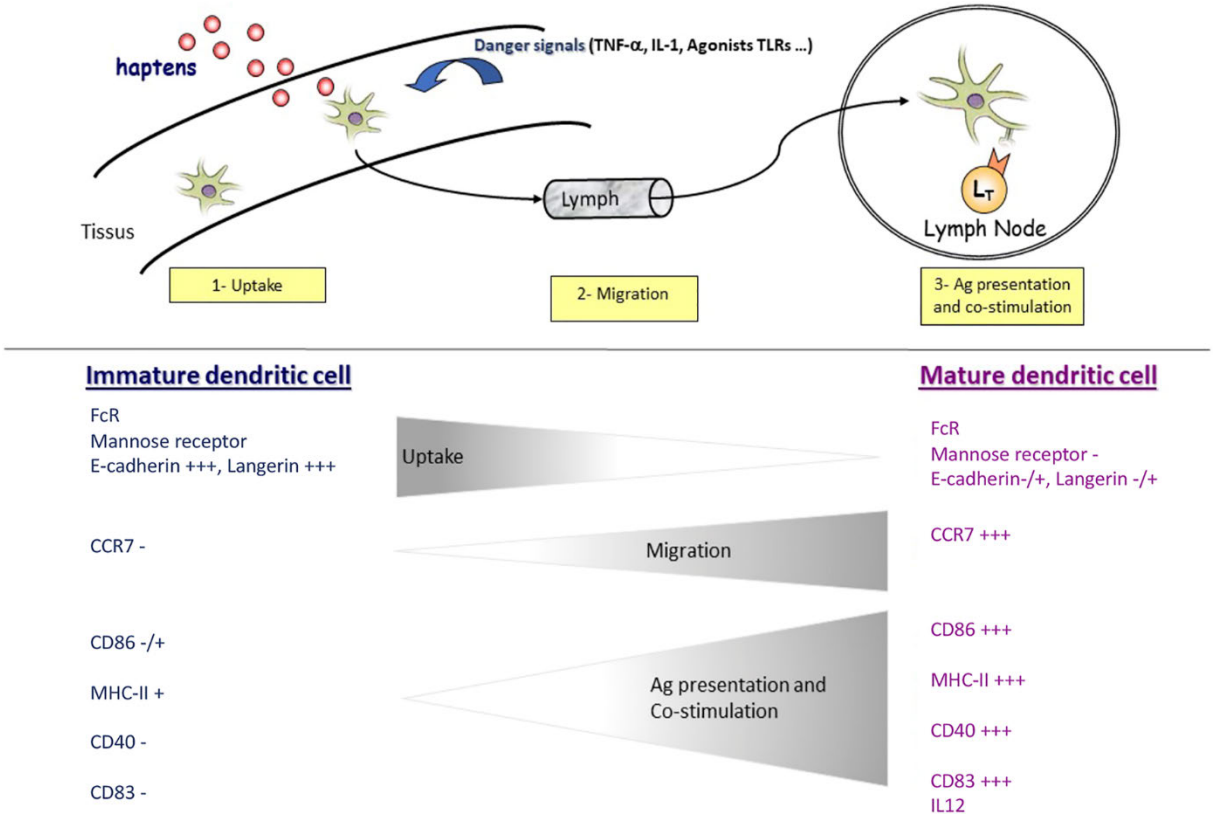

Abbildung 1: Aktivierung dendritischer Zellen durch Haptene
Oben ist der Weg der Zelle dargestellt: Aufnahme des Haptens im Gewebe (1), Wanderung über die Lymphe (2) sowie Antigenpräsentation und Costimulation gegenüber einem T-Lymphozyten (L_T) im Lymphknoten (3). Ausgelöst wird die Reifung durch das Hapten zusammen mit Gefahrensignalen. Unten sind die zugehörigen Veränderungen der Oberflächenmoleküle gegenübergestellt. Die Keile geben die Richtung der Änderung an, die Zeichen von „-“ bis „+++“ die Stärke der Expression. Die Aufnahmefähigkeit nimmt ab, während Wanderung, Antigenpräsentation und Costimulation zunehmen. Für diese Arbeit ist die Zunahme von CD86 maßgeblich. Ag: Antigen, FcR: Fc-Rezeptor, MHC-II: Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II. Bildquelle: Hardonnière *et al.* [7], lizenziert unter *Creative Commons Attribution License.*

Für solche Tests wurden zunächst primäre dendritische Zellen eingesetzt, die aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts oder aus CD34-positiven hämatopoetischen Vorläuferzellen des Nabelschnurbluts gewonnen wurden. Nachteile dieser Zellen sind eine starke Variabilität zwischen Spendern, begrenzte Verfügbarkeit humanen Blutes und der Aufwand der Differenzierung [6]. Diese Zellen sind für die Routinearbeit in standardisierten Tests ungeeignet, da sich die Ergebnisse zwischen unterschiedlichen

Chargen und Laboren nicht zuverlässig vergleichen lassen. Aus diesem Grund wurden humane Zelllinien wie THP-1, U937, KG-1 und MUTZ-3 als Surrogat für dendritische Zellen geprüft [6]. THP-1 gehört zu den am häufigsten verwendeten dieser Linien [8] und wurde auch in dieser Arbeit eingesetzt. Es handelt sich um eine humane monozytäre Leukämie-Zelllinie, die 1980 aus dem peripheren Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen wurde [9]. Die Zelllinie wächst in Suspension, ist nicht auf Zytokinzusätze angewiesen (im Gegensatz zu MUTZ-3 [10]) und reagiert bereits im undifferenzierten Zustand auf sensibilisierende Chemikalien [8].

2.2 Oberflächenmarker und Kontrollsubstanzen

Wie in 2.1 erwähnt, ist die Reifung der dendritischen Zellen an der Hochregulation von Oberflächenmolekülen erkennbar. Nach Exposition mit sensibilisierenden Substanzen findet die Expression von CD54 und CD86 auf THP-1 Zellen vermehrt statt [8]. CD54 (auch als ICAM-1 bekannt) ist ein Adhäsionsprotein. Es bindet hauptsächlich an LFA-1 auf Leukozyten und stabilisiert den Zell-Zell-Kontakt zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle so lange, dass die für die Aktivierung nötigen Signale übertragen werden können [11]. CD86 (auch B7-2 genannt) ist ein costimulatorisches Molekül, welches auf antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen exprimiert wird. Es bindet an CD28, welches wiederum auf T-Zellen exprimiert wird. Diese Bindung liefert das zweite Signal, welches eine T-Zelle zur Aktivierung benötigt. Das erste Signal ist die Erkennung des über MHC präsentierten Antigens durch den T-Zell-Rezeptor [11]. Die beiden Oberflächenmarker liegen auf THP-1 Zellen basal niedrig vor und werden nach Kontakt mit einer sensibilisierenden Substanz hochreguliert. Dabei werden beide Oberflächenmarker betrachtet, da die vermehrte Expression substanz- und zeitabhängig ist. Manche Substanzen erhöhen nur die CD86-Expression und andere nur die CD54-Expression. Daher sind zwei Oberflächenmarker zuverlässiger als einer [6].

In dieser Arbeit werden zum Nachweis der Responsivität der Zellen drei Kontrollsubstanzen verwendet: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB), Nickelsulfat ($NiSO_4$) und Milchsäure (LA). Diese Substanzen sollen zeigen, ob eine Zellcharge erwartungsgemäß reagiert [12].

DNCB besteht aus einem Benzolring mit einem Chlor und zwei Nitrogruppen als Substituenten (Abbildung 2). Es ist ein starker Sensibilisator und dient daher als Positivkontrolle. DNCB ist ein Elektrophil und bindet kovalent an nukleophile

Aminosäureseitenketten wie Cystein und Lysin [13]. So entstehen Strukturen, die das Immunsystem als körperfremd erkennt. Es ist kaum wasserlöslich und wird daher zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

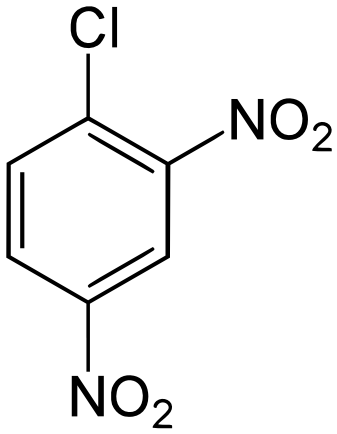

Abbildung 2: Strukturformel 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (DNCB)
Bildquelle: [14]

$NiSO_4$ ist das Nickelsalz der Schwefelsäure und besteht aus einem Nickel-Kation und einem Sulfat-Anion. Eingesetzt wurde das Hexahydrat, in dem das Nickel-Kation von sechs Wassermolekülen umgeben ist (Abbildung 3). $NiSO_4$ ist wasserlöslich und dissoziiert in biologischen Flüssigkeiten in seine Ionen. Ni^{2+} bildet Koordinationskomplexe mit nukleophilen Aminosäureseitenketten wie Histidin und Cystein, wodurch körperfremde Strukturen entstehen, die das Immunsystem erkennen kann [13]. Deshalb wird auch $NiSO_4$ als Positivkontrolle verwendet.

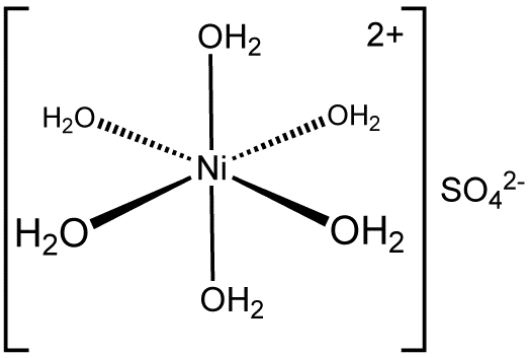

Abbildung 3: Strukturformel Nickelsulfat-Hexahydrat
Bildquelle: [15].

Die beiden Positivkontrollen wirken über zwei chemisch unterschiedliche Wege. Wenn eine Zellcharge auf beide reagiert, ist ihre Responsivität nicht an einen einzelnen Reaktionsweg gebunden. Dabei fällt die Hochregulation der beiden Marker

unterschiedlich stark aus. Für $NiSO_4$ wurde gezeigt, dass die CD54-Expression deutlich stärker ansteigt als die CD86-Expression [6].

Milchsäure wird als Negativkontrolle verwendet, da sie keine hautsensibilisierende Wirkung hat [12]. Sie ist eine Hydroxycarbonsäure und enthält eine Carboxy- sowie eine Hydroxygruppe (Abbildung 4).

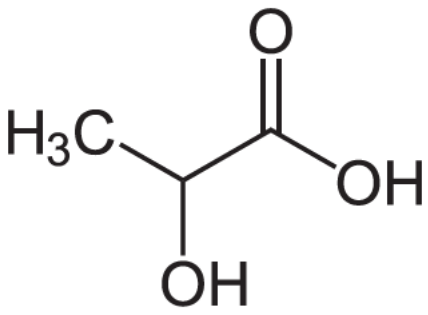

Abbildung 4: Strukturformel Milchsäure (LA)
Bildquelle: [16].

2.3 Assay Ready Cells

Zellen können mit zunehmender Kultivierungsdauer ihre Eigenschaften verändern. Die Anzahl der Passagen, die Wachstumsphase sowie Unterschiede in der Handhabung der Zellen können zu Schwankungen in *Bioassays* führen. Mit Hilfe von Kryokonservierung lassen sich Zellen in großen Chargen expandieren und diese dann unter denselben Bedingungen einfrieren [17]. Diese als *Assay Ready Cells* (ARC) bezeichneten Zellen können bei Bedarf aufgetaut und direkt verwendet werden [18]. Die Methodik bietet einige Vorteile. Ein großer Vorteil ist dabei die Konsistenz. Dieselbe Charge ist über lange Zeit verwendbar und bietet Zellen, die unter gleichen Bedingungen kultiviert und eingefroren wurden. Ein weiterer Vorteil ist die Flexibilität, da Versuche zu jeder Zeit gestartet werden können und nicht abhängig von einer laufenden Kultur sind. Das Wegfallen der in der Regel zweimal pro Woche erforderlichen Passage führt gleichzeitig auch zu weniger Aufwand und Kosten [17]. Der Vorteil gleichbleibender Ergebnisse setzt voraus, dass die eingefrorene Charge auch die benötigte Qualität besitzt. Sichergestellt wird das, indem ein kleiner Teil der Charge aufgetaut und vorab getestet wird. Wenn Qualitätsprobleme erst während einer großen Versuchsreihe entdeckt werden, sind Zeit, Material, Substanzen und Kosten verloren [17]. Auch für THP-1 Zellen wird eine solche Überprüfung vor Hautsensibilisierungstests durchgeführt. Hierzu wird der *Reactivity Check* verwendet, um die Funktionalität jeder neuen Zellcharge zu

überprüfen (siehe 2.6) [12]. Ob eine Charge diese Überprüfung besteht, ist unter anderem auch davon abhängig, wie sie eingefroren wurde. Viele Zelllinien können nach dem Auftauen problemlos in *Bioassays* verwendet werden. Allerdings gilt dies nicht für jede Zelllinie. Einige Zelllinien müssen nach dem Auftauen zunächst einige Tage kultiviert werden, um gute Ergebnisse zu liefern [17]. Das Einfrierverfahren muss daher für jede Zelllinie optimiert werden [17]. Das DB-ALM-Protokoll Nr. 158 sieht für den *Reactivity Check* von THP-1 Zellen eine Kulturphase nach dem Auftauen vor [12]. Ob THP-1 Zellen auch ohne diese Phase, also im ARC-Format, funktional sind, ist damit offen und wird in dieser Arbeit geprüft.

2.4 Kryokonservierung

Bei sehr tiefen Temperaturen kommt der Stoffwechsel von Zellen praktisch zum Stillstand. Zellen lassen sich auf diesem Wege langfristig lagern. Die Herausforderung für die Zellen liegt weniger bei der Lagerung bei sehr niedrigen Temperaturen (Lagerung in flüssigem Stickstoff) selbst, vielmehr in der Zwischenzone bei Temperaturen zwischen -15 °C und -60 °C, die beim Einfrieren und beim Auftauen jeweils durchlaufen werden muss [19]. Das Problem stellt das Gefrieren des Wassers dar. Dabei gibt es zwei Mechanismen, die zu Schädigung der Zellen führen (Abbildung 5). Wenn langsam abgekühlt wird, bilden sich zunächst außerhalb der Zelle Eiskristalle, die Restlösung wird konzentrierter und Wasser strömt osmotisch aus den Zellen. Dadurch dehydrieren die Zellen. Bei schnellem Abkühlen kann das Wasser die Zellen nicht schnell genug osmotisch verlassen und es bilden sich Eiskristalle innerhalb der Zellen. Diese können die Zellen mechanisch beschädigen. Zwischen zu schnellem und zu langsamem Einfrieren liegt eine optimale Kühlrate, die zelltypabhängig ist [19].

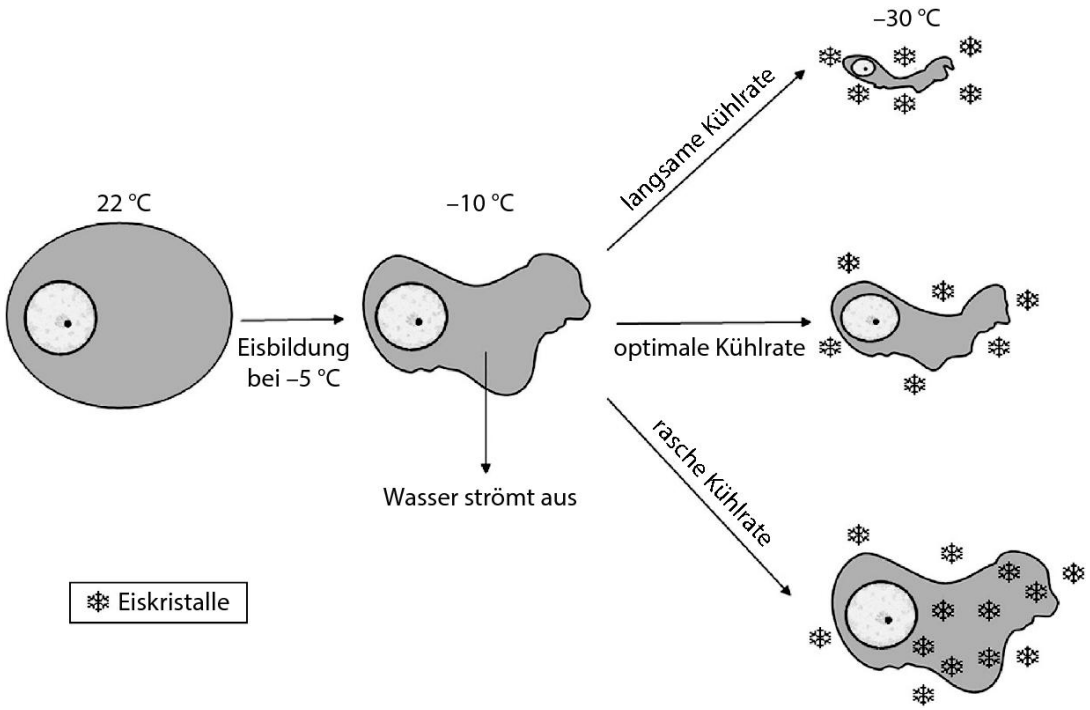

Abbildung 5: Verhalten einer Zelle beim Einfrieren in Abhängigkeit von der Kühlrate
Bildquelle: Abbildung 13.2 aus [20], S. 276. *Reproduced with permission from* Springer Nature.

Eine optimale Kühlrate allein reicht nicht, um die Zellen beim Einfrier- und Auftauprozess zu schützen. Deshalb werden dem Einfriermedium Schutzstoffe, sogenannte Kryoprotektiva, zugesetzt. Dabei unterscheidet man zwischen penetrierenden und nicht penetrierenden Kryoprotektiva. Erstgenannte wie DMSO sind klein genug, um in die Zelle einzudringen. Sie senken den Gefrierpunkt, verringern die Eisbildung [21] und vermindern während des Gefrierens die Elektrolytkonzentration sowie die osmotische Schrumpfung der Zelle [19]. Damit wirken sie beiden Schadensmechanismen entgegen. Nicht penetrierende Kryoprotektiva, wie Zucker oder Polymere, sind größer, dringen nicht in die Zelle ein und wirken daher ausschließlich außerhalb [21]. Sie stabilisieren Proteine und Membranen und hemmen die fortschreitende Eisbildung. Allein schützen sie meist nicht, ermöglichen aber eine niedrigere Konzentration penetrierender Kryoprotektiva wie DMSO [19]. Kryoprotektiva haben allerdings auch Nebenwirkungen. Ihre Zugabe und Entfernung verursachen osmotischen Stress. In einigen Zelltypen wurde zudem eine chemische Schädigung des Zytoskeletts durch DMSO beobachtet [19]. Die Zellen werden dem Kryoprotektivum daher möglichst kurz ausgesetzt, indem es nach dem Auftauen durch Verdünnen und Zentrifugieren entfernt wird.

Für die meisten Zellarten ist für eine bestmögliche Überlebensrate eine Abkühlgeschwindigkeit von etwa -1 °C/min empfehlenswert [21]. Um diese Rate zu erreichen,

gibt es mehrere Möglichkeiten. Ein *Controlled Rate Freezer* (CRF) passt die Abkühlung kontinuierlich an die gemessene Probentemperatur an. Beim Übergang von flüssigem Wasser zu Eis wird Kristallisationswärme frei, die die Zellsuspension kurzzeitig erwärmt. Dieser freiwerdenden Wärme soll der CRF aktiv entgegenwirken, sodass die Kühlrate gehalten wird [22]. Eine andere Methode ist das passive Einfrieren mit einem Einfrierbehälter wie Mr. Frosty. Dabei handelt es sich um einen mit Isopropanol befüllten Behälter, in den die *Vials* gestellt werden und der anschließend in einen Gefrierschrank bei -80 °C überführt wird. Das Isopropanol ermöglicht eine Kühlrate von etwa -1 °C/min [23]. Diese wird jedoch weder geregelt noch aufgezeichnet. Nach dem Einfrierprozess werden die *Vials* in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen sollte zügig durchgeführt werden, da so das Wachstum kleiner intrazellulärer Eiskristalle zu größeren, schädlichen Kristallen verhindert werden kann [19]. Neben Kühl- und Auftaurate hat auch die Wahl des Einfriermediums einen Einfluss auf die Zellen.

2.5 Einfriermedien

In der Regel werden Zellen in serumhaltigen Einfriermedien mit DMSO eingefroren [17]. Auch das DB-ALM-Protokoll sieht für THP-1 als Einfriermedium das Kulturmedium mit 10 % *Fetal Bovine Serum* (FBS) und 10 % DMSO vor [12]. FBS wird seit Jahrzehnten in der Zellkultur eingesetzt. Es enthält wesentliche Inhaltsstoffe für die Zellproliferation und den Zellunterhalt wie Hormone, Vitamine, Transportproteine, Spurenelemente, Wachstumsfaktoren und viele weitere für die Zelle wichtige Bestandteile [24]. Die Verwendung von FBS hat allerdings auch ihre Kehrseite. Die genaue Zusammensetzung von FBS ist nicht bekannt. Zudem kann es saisonal und ortsabhängig zu Schwankungen zwischen den Chargen in Bezug auf Konzentrationen der Serumkomponenten und deren biologische Aktivität kommen. Diese können entsprechend auch zu Schwankungen in Experimenten führen. Außerdem können unerwünschte Wechselwirkungen mit Testsubstanzen auftreten, die zu unerwarteten Ergebnissen führen können. Des Weiteren bestehen Sicherheitsbedenken für das Laborpersonal durch Endotoxine, Mykoplasmen sowie virale Kontaminanten [24].

FBS wird, wie der Name schon sagt, aus dem Blut ungeborener Kälber gewonnen. Zur Maximierung der FBS-Produktion wird das Blut per Herzpunktion am schlagenden Herzen des Fötus entnommen. Nach dem Vorsorgeprinzip kann nicht ausgeschlossen

werden, dass die Föten dabei Schmerzen empfinden. Es wird geschätzt, dass jährlich etwa 800.000 Liter FBS produziert werden, was 2 Millionen Rinderföten entspricht [24].

In-vitro-Methoden sollen Tierversuche ersetzen, doch mit FBS steckt in den Methoden wieder ein Tierprodukt, dessen Gewinnung selbst ethisch problematisch ist. Der Ersatz von serumhaltigen Medien durch serumfreie Medien führt den Gedanken der Tierleidminderung bis in die Methode fort, weshalb die FBS-Reduktion auch dem 3R-Prinzip zuzuordnen ist [24]. Da ein vollständiger Ersatz von FBS eine Umstellung der gesamten Kultivierung erfordern würde, beschränkt sich diese Arbeit ausschließlich auf das Einfriermedium, ohne in die Kultivierung einzugreifen.

Für die Kryokonservierung gibt es kommerzielle, definierte, serumfreie Alternativen ohne tierische Bestandteile. Ein Beispiel dafür ist CryoStor der Firma Biolife Solutions. Ob THP-1 Zellen nach dem Einfrieren in solchen Medien im ARC-Format responsiv bleiben, wurde bislang kaum untersucht.

2.6 Beurteilung der Funktionalität

Um die Funktionalität von THP-1 Zellen nach dem Einfrieren und Auftauen zu beurteilen, muss untersucht werden, ob die Zellen den Prozess überleben und ob sie weiterhin auf sensibilisierende Substanzen reagieren. Beides kann durchflusszytometrisch erfasst werden.

In einem Durchflusszytometer passieren Zellen in Suspension einzeln einen Laser. Gemessenes Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter*) gibt die Zellgröße wieder, das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*) zeigt, wie körnig und strukturiert das Innere einer Zelle ist [11]. So lassen sich Zellen von Zelltrümmern abgrenzen. Parallel dazu kann auch die Fluoreszenz gemessen werden. Befinden sich Fluorophore auf oder in der Zelle, nehmen diese das Laserlicht auf, werden angeregt (Exzitation) und geben bei der Emission Licht einer längeren Wellenlänge wieder ab. Filter trennen die Farben des abgegebenen Lichts und eigene Detektoren messen diese separat [11].

In dieser Arbeit wird zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Vitalität Propidiumiodid (PI) verwendet. Es kann intakte Membranen nicht passieren und gelangt daher nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran. PI interkaliert in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) der Zelle und fluoresziert rot. So lassen sich lebende und tote Zellen unterscheiden [11]. Die Vitalität spielt auch für die Beurteilung der Funktionalität der Zellen eine Rolle. Die Hochregulation der Oberflächenmarker hängt mit der Vitalität

der Zellen zusammen und trat bei Vitalitäten von etwa 65 % bis 90 % auf [6]. Das DB-ALM-Protokoll setzt für die THP-1 Zellen entsprechende Grenzen: über 90 % Vitalität bei unbehandelten Zellen und über 50 % für behandelte Zellen [12]. Daher werden die Vitalität und die Oberflächenmarker parallel gemessen.

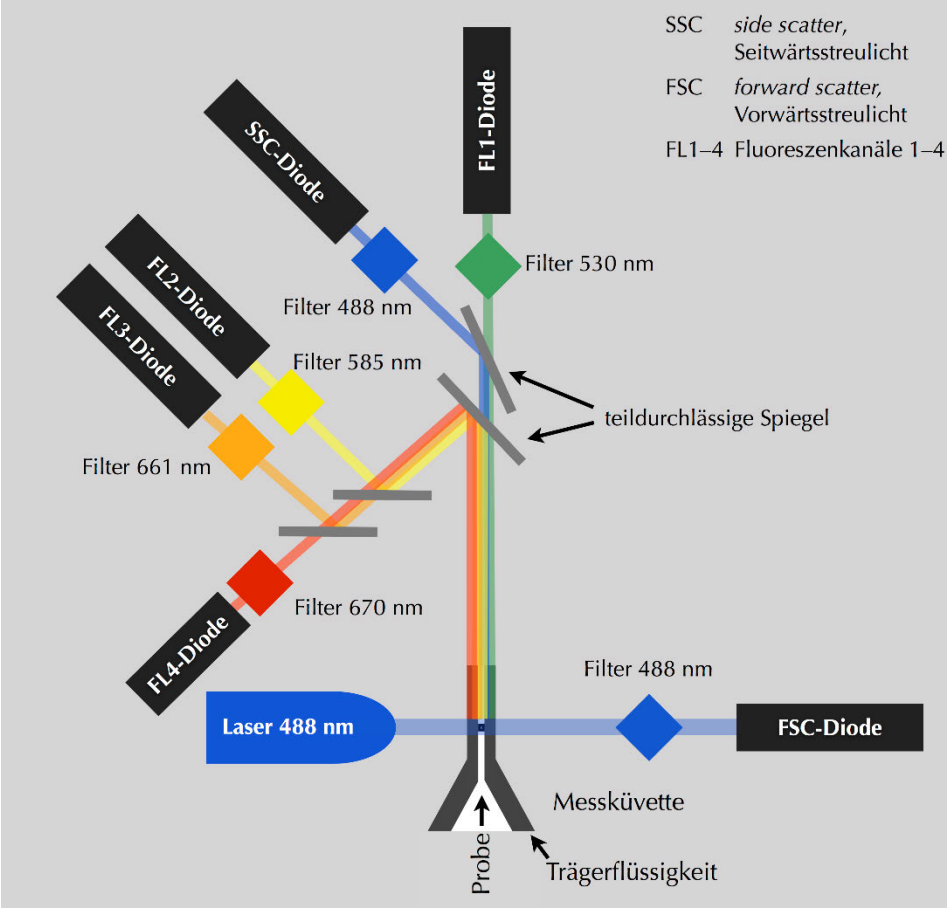

Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers
Die Probe strömt durch eine Messküvette, sodass die Zellen einzeln nacheinander den Laserstrahl kreuzen. Das Streulicht wird in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung erfasst. Die Fluoreszenz wird über teildurchlässige Spiegel und Filter nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt und in getrennten Kanälen detektiert. In dieser Arbeit wurden ein grüner Kanal für Fluoresceinisothiocyanat und ein roter Kanal für PI genutzt. Bildquelle: [25].

Zur Erfassung der Hochregulation von Oberflächenmarkern wie CD54 und CD86 werden Fluorophor-gekoppelte Antikörper verwendet, welche an die Marker binden können. In dieser Arbeit sind die Antikörper mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt, welches grün fluoresziert. FITC gehört zu den am häufigsten verwendeten Fluorophoren in der Durchflusszytometrie [26]. Das liegt vor allem an seinen spektralen Eigenschaften: Das Anregungsmaximum liegt bei etwa 495 nm und damit nahe an der 488 nm-Laserwellenlänge, mit der auch in dieser Arbeit angeregt wurde. Das Emissionsmaximum liegt bei etwa 519 nm und fällt damit in den grünen Detektionskanal.

Über seine Isothiocyanatgruppe lässt sich FITC zudem einfach an Antikörpern koppeln, weshalb eine große Auswahl an fertigen Konjugaten verfügbar ist [26]. Die Fluoreszenz kann dann am Durchflusszytometer erfasst werden. Dabei wird die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) berechnet. Diese ist ein Maß dafür, wie viel Antikörper gebunden hat, was abhängig von der Menge der Oberflächenmarker ist. Zur Beurteilung der Expressionssteigerung wird die MFI der Proben in Relation zu unbehandelten Kontrollen gesetzt. Als unbehandelte Kontrollen dienen eine Medienkontrolle (MC) und eine Lösungsmittelkontrolle (SC). Das Verhältnis der MFI einer behandelten Probe zu dieser Kontrolle wird als relative Fluoreszenzintensität (RFI) bezeichnet.

Mit den in 2.2 beschriebenen Kontrollsubstanzen und der Vitalitätsmessung kann die Funktionalität kryokonservierter Zellen beurteilt werden.

2.7 Zielsetzung

Es wird untersucht, wie sich serumhaltige und serumfreie Einfriermedien auf die Funktionalität von THP-1 Zellen im ARC-Format auswirken. Ziel ist es, ein Einfriermedium zu identifizieren, mit dem die Zellen direkt nach dem Auftauen funktional einsetzbar sind. Als serumhaltige Medien werden Kulturmedium mit 5 % (KM5) und 10 % DMSO (KM10), FBS mit 5 % DMSO (FBS5) und FBS mit 10 % DMSO (FBS10) getestet. Für die serumfreien Einfriermedien werden instaFREEZE (insta), CryoStor CS5 (CS5) und CryoStor CS10 (CS10) untersucht.

Da für diese Arbeit THP-1 Zellen aus zwei unterschiedlichen Quellen zur Verfügung standen, wird im ersten Schritt geprüft, welche der beiden Zellquellen nach dem Auftauen die höhere Vitalität aufweist. Dazu wird die Vitalität 24 h nach dem Auftauen mittels PI-Färbung bestimmt. In einem weiteren Vorscreening werden dann mit der ausgewählten Zellquelle alle sieben Einfriermedien getestet. Im zweiten Schritt, dem *Reactivity Check*, wird mit den ausgewählten Einfriermedien die Responsivität über die Hochregulation von CD54 und CD86 nach Exposition mit DNCB, $NiSO_4$ und LA untersucht. Die Bewertung orientiert sich an den Akzeptanzgrenzen des DB-ALM-Protokolls Nr. 158, ohne sich daran zu binden.

3 Ergebnisse

3.1 Viability Check

3.1.1 Vergleich der Zellquellen

Zu Beginn wurden die THP-1 Zellen der Quellen 1 und 2 gemäß Kapitel 5.2 aufgetaut, expandiert, geerntet und eingefroren. Zum Vergleich der THP-1 Zellen wurde ein *Viability Check* nach Kapitel 5.3 durchgeführt. Hierzu wurden Zellen verwendet, die in instaFREEZE mit 5 % DMSO eingefroren wurden. Der Versuch diente dazu, die besser geeignete Zellquelle zu finden. Zur Beurteilung wurden die Vitalitäten der MC und SC 24 h nach dem Auftauen untersucht (Abbildung 7).

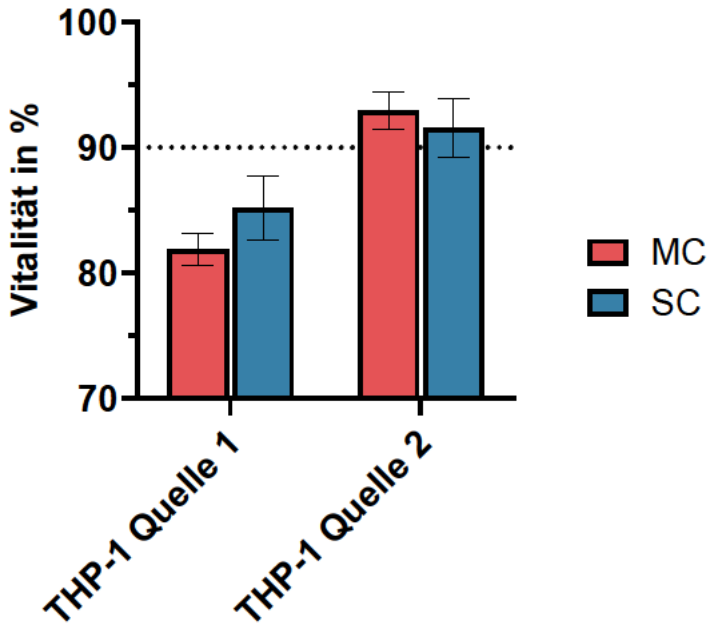

Abbildung 7: Vergleich der MC- und SC-Vitalitäten der THP-1 Quellen 1 und 2
Die THP-1 Zellen beider Quellen wurden zuvor in instaFREEZE mit 5 % DMSO kryokonserviert und 24 h nach dem Auftauen gemessen. Die MC (rot) enthielt *Assay Buffer* und die SC (blau) *Assay Buffer* mit 0,2 % DMSO. Die Vitalität wurde nach einer PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. Die Balken zeigen die Mittelwerte aus drei *wells* eines aufgetauten *Vials*. Zusätzlich sind die Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert den Orientierungswert von 90 %. Die y-Achse beginnt für den besseren Vergleich bei 70 %.

Die THP-1 Zellen aus Quelle 2 (Q2) zeigen eine deutlich höhere Vitalität als die der Quelle 1 (Q1) (siehe Abbildung 7). Die Vitalität liegt bei der MC der Q2 bei 92,9 ± 1,5 % und bei der SC bei 91,6 ± 2,4 %. Bei den Zellen der Q1 liegen die Vitalitäten bei 81,9 ± 1,3 % (MC) und 85,2 ± 2,6 % (SC). Die Vitalität der Q2 liegt damit bei der MC um 11,0 Prozentpunkte höher und bei der SC um 6,4 Prozentpunkte. Zusätzlich

erreicht nur die Q2 den Orientierungswert von 90 %. Zudem liefern die unterschiedlichen Differenzen zwischen MC und SC innerhalb der Zellquellen keinen Hinweis auf einen gravierenden Unterschied bei Einsatz der SC oder MC. Die Vitalität der SC ist bei Q2 um 1,4 Prozentpunkte niedriger als die von der MC, wogegen bei Q1 die Vitalität der SC um 3,3 Prozentpunkte höher ist als die der MC. Aufgrund der höheren Vitalität wurden die THP-1 Zellen der Q2 verwendet.

3.1.2 Vergleich der Einfriermedien

Nach Auswahl der Zellquelle wurde ein weiterer *Viability Check* nach Kapitel 5.3 durchgeführt. Diesmal wurden die sieben verschiedenen Einfriermedien (Tabelle 6 und Tabelle 7) der Zellen aus Q2 gegeneinander verglichen. Für diesen Versuch wurde je ein *Vial* pro Einfriermedium aufgetaut. Dieser Versuch diente dazu, die Einfriermedien mit den höchsten Vitalitäten auszuwählen (Abbildung 8).

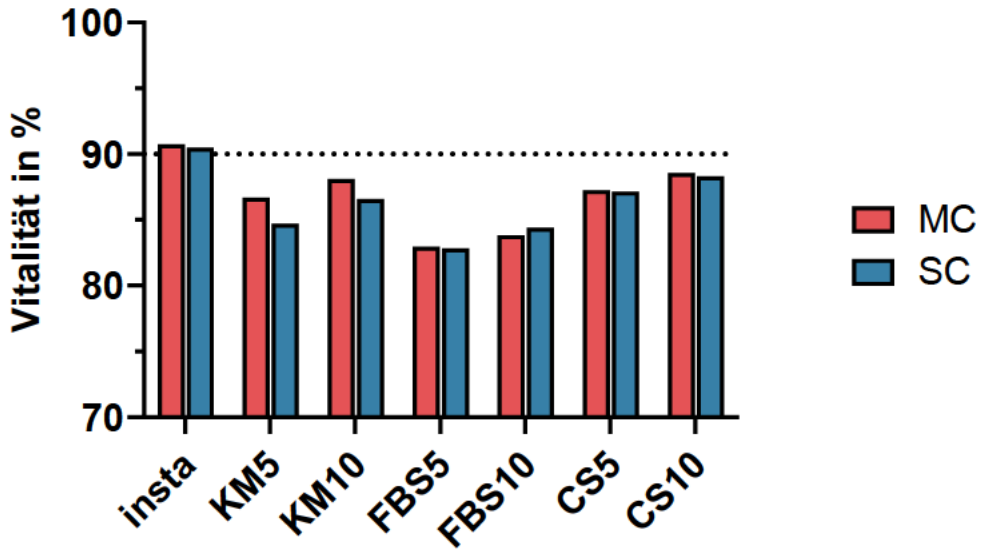

Abbildung 8: Vergleich der Vitalitäten der verschiedenen Einfriermedien von THP-1 Quelle 2
Die THP-1 Zellen wurden zuvor in angegebenen Einfriermedien kryokonserviert (Tabelle 17) und 24 h nach dem Auftauen gemessen. Die MC (rot) enthielt *Assay Buffer* und die SC (blau) *Assay Buffer* mit 0,2 % DMSO. Die Vitalität wurde nach einer PI-Färbung am Durchflusszytometer bestimmt. Je Bedingung wurde ein Ansatz gemessen, weshalb Einzelwerte ohne Fehlerbalken dargestellt sind. Die gestrichelte Linie markiert den Orientierungswert von 90 %. Die y-Achse beginnt für den besseren Vergleich bei 70 %.

Die Vitalitäten liegen bei allen Proben zwischen 82,8 % und 90,7 %. Zwischen der höchsten und niedrigsten Vitalität liegen damit etwa 8 Prozentpunkte. Es ist direkt sichtbar, dass nur instaFREEZE knapp den Orientierungswert von 90 % erreicht. Die Proben aus allen anderen Einfriermedien liegen darunter. Geordnet von der höchsten

Vitalität zur niedrigsten ergibt sich folgende Rangfolge: instaFREEZE, CryoStor CS10 und Kulturmedium mit 10 % DMSO, dann CryoStor CS5 und Kulturmedium mit 5 % DMSO und zuletzt deutlich abgesetzt die beiden FBS-Medien. Es fällt außerdem auf, dass beim Vergleich der DMSO-Konzentrationen das Medium mit 10 % DMSO bei jedem Medium eine etwas höhere Vitalität aufzeigt. Ohne Replikate lässt sich allerdings nicht sagen, ob dieser Einfluss über der Messstreuung liegt. In sechs der sieben Medien liegt die Vitalität der SC unter der der MC. Die Differenzen sind jedoch gering (0,1 bis 2,0 Prozentpunkte). FBS5 und FBS10 wiesen die niedrigsten Vitalitäten auf und wurden für die weiteren Versuche nachrangig eingeordnet. Da die *Reactivity Check*s aus zeitlichen Gründen auf fünf Einfriermedien begrenzt werden mussten, wurden diese beiden Medien nicht weiter untersucht.

3.2 Reactivity Check

Im Anschluss an die *Viability Check*s wurde untersucht, wie responsiv die kryokonservierten Zellen sind. Dazu wurden *Reactivity Check*s gemäß Kapitel 5.4 mit den fünf ausgewählten Einfriermedien durchgeführt. In jedem Lauf wurden die in einem Grundmedium eingefrorenen Zellen getestet, wofür erneut *Vials* aus den zuvor kryokonservierten Chargen aufgetaut wurden. Untersucht wurden die RFI von CD54 und CD86 nach Inkubation mit DNCB, $NiSO_4$ und LA sowie die Vitalitäten. Nach Messung der MFI von CD54, CD86 und Isotypkontrolle wurden die RFI der beiden Oberflächenmarker entsprechend Kapitel 5.5 berechnet (Abbildung 9). Die Einzelwerte aller Messungen der *Reactivity Checks* sind im Anhang aufgeführt.

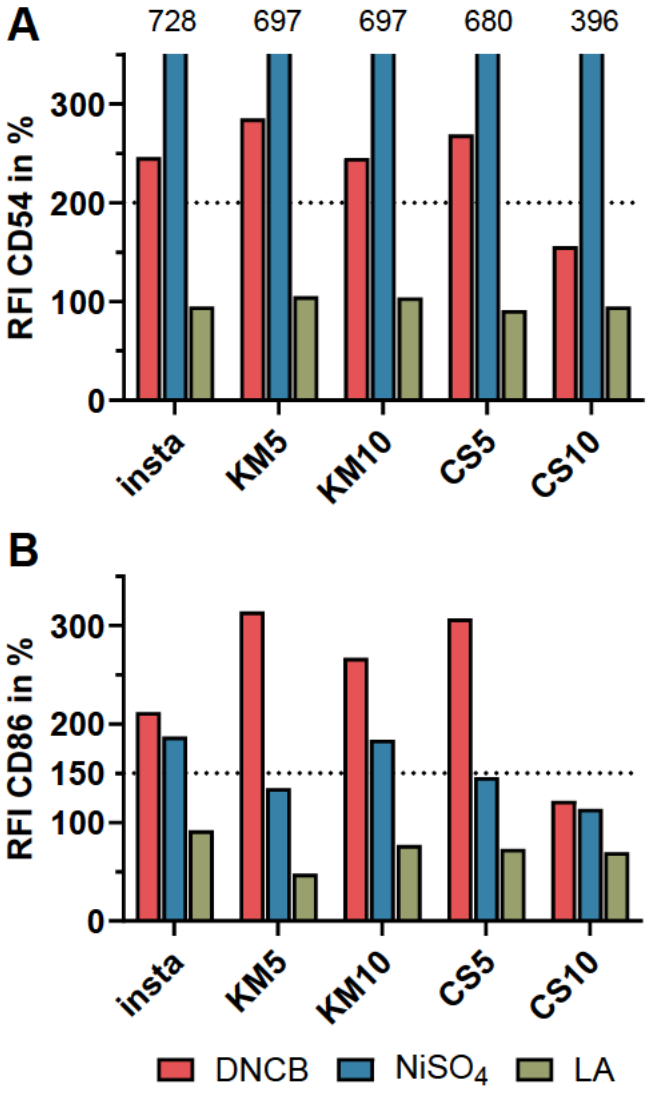

Abbildung 9: Vergleich der RFI für CD54 und CD86 der verschiedenen Einfriermedien von THP-1 Quelle 2
A) RFI für DNCB, $NiSO_4$ und LA durch Messung des CD54-Oberflächenmarkers B) RFI für DNCB, $NiSO_4$ und LA durch Messung des CD86-Oberflächenmarkers. Die THP-1 Zellen wurden zuvor in den angegebenen Einfriermedien kryokonserviert (Tabelle 17) und 24 h nach dem Auftauen gemessen. Die Endkonzentrationen im *well* betrugen 4 µg/mL für DNCB, 100 µg/mL für $NiSO_4$ und 1000 µg/mL für LA. Die RFI der DNCB-Probe bezieht sich auf die SC, die der $NiSO_4$- und LA-Probe auf die MC (Kapitel 5.5). Je Bedingung wurde ein Ansatz gemessen, weshalb Einzelwerte ohne Fehlerbalken dargestellt sind. Die gestrichelten Linien markieren die Orientierungswerte von 200 % für CD54 A) und von 150 % für CD86 B). Die y-Achsen reichen bis 350 %. Höhere Werte sind abgeschnitten dargestellt und mit dem Zahlenwert angegeben.

Die Negativkontrolle (LA) bleibt bei allen fünf Einfriermedien unter beiden Orientierungswerten. Bei CD54 liegen die Werte zwischen 90,8 % und 104,9 % und damit nahe am Erwartungswert von 100 %, der sich ergibt, wenn die Expression gegenüber der MC unverändert bleibt. Bei CD86 liegen die Werte mit 47,9 % bis 92,4 % dagegen

durchgehend darunter und streuen deutlich stärker. Zwischen den beiden Oberflächenmarkern zeigen sich bei $NiSO_4$ deutliche Unterschiede. Für CD54 liegen die RFI-Werte aller Medien zwischen 395,6 % und 728,0 %, für CD86 dagegen zwischen 113,7 % und 186,7 %. Bei DNCB liegen die RFI beider Marker näher beieinander. Für CD54 liegen diese zwischen 156,4 % und 284,8 % und für CD86 zwischen 121,9 % und 313,7 %. Die bereinigten MFI der MC und SC, die als Bezugsgröße in die Berechnung der RFI eingehen, liegen für CD54 bei allen Einfriermedien deutlich niedriger als für CD86.

Des Weiteren sind auch im *Reactivity Check* die Vitalitäten relevant. Diese wurden wie in Kapitel 5.4 beschrieben parallel mitbestimmt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Vitalitäten der Isotypkontrollen der verschiedenen Einfriermedien von THP-1 Quelle 2
Angegeben sind die Vitalitäten der Zellen aus den fünf Einfriermedien 24 h nach dem Auftauen, getrennt nach MC, SC und den drei Kontrollsubstanzen. Die Endkonzentrationen im *well* betrugen 4 µg/mL für DNCB, 100 µg/mL für $NiSO_4$ und 1000 µg/mL für LA. Die MC enthielt *Assay Buffer* und die SC *Assay Buffer* mit 0,2 % DMSO. Die Werte stammen aus dem Ansatz mit der Isotypkontrolle und wurden parallel zur Antikörpermessung nach einer PI-Färbung bestimmt (Kapitel 5.4). Die Vitalitäten der übrigen Ansätze sind im Anhang aufgeführt. Der Grenzwert für die MC und SC liegt bei 90 % und für die mit den Kontrollsubstanzen behandelten Zellen bei 50 %.

	Vitalität in %				
Medium	**MC**	**SC**	**DNCB**	**$NiSO_4$**	**LA**
insta	92,1	91,4	82,5	72,6	91,8
KM5	93,0	92,4	81,7	67,8	91,3
KM10	93,9	94,1	84,4	73,4	93,4
CS5	94,9	94,4	87,5	74,3	92,9
CS10	82,7	81,4	73,6	62,4	81,5

Die Vitalität wird durch $NiSO_4$ bei allen Einfriermedien am stärksten gesenkt mit Werten zwischen 62,4 % und 74,3 %, gefolgt von DNCB mit 73,6 % bis 87,5 %. Bei LA liegen die Vitalitäten zwischen 81,5 % und 93,4 % im Bereich der MC und SC, obwohl die RFI für CD86 bei allen Medien unterhalb von 100 % liegen.

Die in instaFREEZE eingefrorenen Zellen erfüllen für DNCB beide Orientierungswerte mit einer RFI von 212,4 % für CD86 und 246,5 % für CD54. Für $NiSO_4$ wird der Orientierungswert für CD86 mit 186,7 % erreicht, für CD54 wird er mit 728,0 % deutlich übertroffen. Die Negativkontrolle LA bleibt mit 92,4 % für CD86 und 94,6 % für CD54 unterhalb beider Orientierungswerte. Die Vitalität liegt in der MC bei 92,1 % und in der SC bei 91,4 % und damit über 90 %. Bei den behandelten Proben liegt sie zwischen 72,6 % für $NiSO_4$ und 91,8 % für LA. Damit erfüllt instaFREEZE sämtliche Orientierungswerte.

Für DNCB liegen die RFI mit 313,7 % für CD86 und 284,8 % für CD54 bei KM5 am höchsten unter allen Einfriermedien. Für $NiSO_4$ wird der Orientierungswert für CD86 mit 134,7 % dagegen nicht erreicht, während CD54 bei 697,4 % liegt. Die RFI für LA ist bei CD86 mit 47,9 % die niedrigste aller Medien, bei CD54 liegt sie mit 104,9 % im Bereich der übrigen Medien. Die bereinigte MFI der MC, die bei $NiSO_4$ und LA als Bezugsgröße dient, liegt für CD86 bei KM5 fast doppelt so hoch wie bei KM10, obwohl beide Proben im selben Lauf gemessen wurden. In der $NiSO_4$-Probe liegt sie dagegen etwas über dem Wert von KM10. Die Vitalität liegt in der MC bei 93,0 % und in der SC bei 92,4 %, bei den behandelten Proben zwischen 67,8 % für $NiSO_4$ und 91,3 % für LA. Auffällig ist, dass KM5 bei DNCB die höchsten RFI beider Marker erreicht, aber bei $NiSO_4$ für CD86 unter dem Orientierungswert bleibt.

Die in KM10 eingefrorenen Zellen erfüllen für DNCB beide Orientierungswerte mit 267,0 % für CD86 und 244,8 % für CD54. Für $NiSO_4$ wird der Orientierungswert für CD86 mit 184,0 % erreicht, CD54 liegt bei 696,5 % deutlich darüber. LA bleibt mit 76,6 % und 104,4 % unter beiden Werten. Die Vitalität liegt in der MC bei 93,9 % und in der SC bei 94,1 %, bei den behandelten Proben zwischen 73,4 % für $NiSO_4$ und 93,4 % für LA. KM10 erfüllt wie instaFREEZE sämtliche Orientierungswerte.

Bei CS5 liegt für DNCB die RFI bei 306,7 % für CD86 und bei 268,7 % für CD54. Für $NiSO_4$ wird der Orientierungswert für CD86 mit 146,1 % knapp verfehlt, CD54 liegt bei 680,1 % erneut deutlich darüber. LA bleibt mit 73,0 % und 90,8 % unter beiden Werten. Die Vitalität ist mit 94,9 % in der MC und 94,4 % in der SC die höchste aller Einfriermedien. Bei den behandelten Proben liegt sie zwischen 74,3 % für $NiSO_4$ und 92,9 % für LA. CS5 erfüllt damit alle Orientierungswerte außer dem für CD86 bei $NiSO_4$.

CS10 verfehlt als einziges Einfriermedium die Orientierungswerte für DNCB mit 121,9 % für CD86 und 156,4 % für CD54. Auch für $NiSO_4$ wird der Wert für CD86 mit 113,7 % nicht erreicht. Für CD54 liegt die RFI mit 395,6 % deutlich niedriger als bei allen anderen Medien. LA bleibt mit 69,9 % und 95,2 % unter beiden Orientierungswerten. Die bereinigte MFI der MC für CD54 liegt bei CS10 fast doppelt so hoch wie bei CS5, während sie in der $NiSO_4$-Probe auf vergleichbarem Niveau liegt. Für CD86 liegt die bereinigte MFI der SC bei CS10 ebenfalls höher als bei CS5, in der DNCB-Probe dagegen deutlich niedriger. Die Vitalitäten liegen in der MC und SC mit 82,7 % und 81,4 % als einzige unterhalb des Orientierungswerts von 90 %. Bei den behandelten Proben liegen die Vitalitäten zwischen 62,4 % für $NiSO_4$ und 81,5 % für LA. CS10 ist damit das einzige Einfriermedium, das sowohl bei den RFI als auch bei der Vitalität auffällt.

Bei instaFREEZE, KM5, KM10 und CS5 werden für DNCB beide Orientierungswerte erfüllt. Zudem werden auch die Vitalitätsgrenzen eingehalten. LA bleibt bei allen Medien negativ. CS10 verfehlt als einziges Medium sowohl die RFI-Orientierungswerte bei DNCB als auch die 90 %-Vitalitätsgrenze bei der MC und SC. Für $NiSO_4$ wird der Orientierungswert für CD86 nur bei instaFREEZE und KM10 erreicht, CS5 verpasst ihn knapp, KM5 und CS10 unterschreiten ihn deutlicher.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, wie sich serumhaltige und serumfreie Einfriermedien auf die Funktionalität von THP-1 Zellen im *Assay Ready Cell* Format auswirken. Da ARC nach dem Auftauen ohne weitere Kultivierung direkt in *Assays* verwendet werden, müssen sie nach der Kryokonservierung sowohl vital sein, als auch weiterhin auf sensibilisierende Substanzen reagieren. Beides zusammen wird in dieser Arbeit als Funktionalität bezeichnet (Kapitel 2.6). Das DB-ALM-Protokoll Nr. 158 sieht vor, dass der *Reactivity Check* zwei Wochen nach dem Auftauen einer Charge, also nach einer Kulturphase, erfolgt [12]. Die Vitalität und Responsivität wurden in dieser Arbeit dagegen ohne eine solche Kulturphase 24 h nach der Aussaat getestet. Nach den Akzeptanzkriterien des *Reactivity Checks* sollen beide Positivkontrollen für beide Oberflächenmarker eine positive Antwort erzeugen [12].

4.1 Auswahl der Zellquelle

Die Auswahl der Zellquelle stützte sich auf die höhere Vitalität der Q2. Die beiden Quellen unterschieden sich in weiteren Punkten: im Hersteller des Basismediums und der Form des zugesetzten Glutamins (Tabelle 4 und Tabelle 5), in der Passagenzahl beim Einfrieren (Tabelle 16 und Tabelle 17) und in ihrer Vorgeschichte. Q1 wird im Unternehmen länger geführt und wurde über mehr *Stocks* vermehrt, hat also mehr kumulative Populationsverdopplungen hinter sich als Q2.

Zelllinien können sich mit steigender Passagenzahl in Morphologie, Wachstumsrate, Proteinexpression und in ihrer Antwort auf Stimuli verändern [27]. Für THP-1 Zellen ist darüber hinaus belegt, dass sich Bestände unterschiedlicher Herkunft im hier verwendeten Testsystem unterscheiden können. Kosaka *et al.* verglichen vier THP-1 Lots aus Zellbanken in Amerika, Europa und Japan und fanden, dass eines davon sowohl eine deutlich niedrigere Vitalität unbehandelter Zellen aufwies als auch auf $NiSO_4$ nicht mit einer Hochregulation von CD54 und CD86 reagierte, während DNCB weiterhin eine Antwort auslöste [28]. Als Kriterium für die Auswahl geeigneter THP-1 Zellen leiten sie daraus ab, dass die Vitalität unbehandelter Zellen über 90 % liegen und die Zellen sowohl DNCB als auch $NiSO_4$ korrekt als Sensibilisatoren erkennen sollen [28]. Ein direkter Zahlenvergleich mit den dortigen Werten ist allerdings nicht möglich, da Kosaka *et al.* Zellen aus laufender Kultur untersuchten, während die Vitalitäten dieser Arbeit 24 h nach dem Auftauen bestimmt wurden.

Eine niedrige Vitalität unbehandelter Zellen ist damit nicht nur ein verfehlter Zahlenwert, sondern ein Hinweis auf einen Bestand, der im Test unerwartet reagieren kann. Für die Auswahl der Zellquelle war deshalb nicht allein der Abstand der Vitalität ausschlaggebend, sondern auch, dass Q2 der jüngere Bestand mit der kürzeren Kultivierungsgeschichte ist.

4.2 Vorauswahl der Einfriermedien

Beim anschließenden Einfriermedienvergleich der Q2 fielen die beiden FBS-Medien deutlich ab. Dieser Abstand war größer als die Unterschiede zwischen den restlichen Medien und trat bei beiden DMSO-Konzentrationen gleichermaßen auf, weshalb er als belastbar gelten kann. FBS5 und FBS10 wurden deshalb nachrangig eingeordnet und aus zeitlichen Gründen nicht weiter im *Reactivity Check* untersucht.

Die feine Rangfolge aus dem *Viability Check* sollte dagegen nicht überinterpretiert werden. Einen Maßstab dafür liefern die Versuche dieser Arbeit selbst. Innerhalb eines Laufes streuten die Triplikate des ersten *Viability Checks* um 1,5 bis 2,4 Prozentpunkte. Da es sich um drei *wells* aus einem *Vial* handelte, handelt es sich dabei um die technische Streuung. Zwischen den beiden *Viability Checks* unterschieden sich die Werte für instaFREEZE und Q2 mit 92,9 % und 90,7 % um etwa 2 Prozentpunkte, obwohl Medium und Zellquelle identisch waren. Die Abstände zwischen den mittleren Einfriermedien liegen in derselben Größenordnung. Dazu passt, dass die im *Viability Check* beobachtete Tendenz, wonach die Einfriermedienvariante mit 10 % DMSO jeweils höher lag als die Variante mit 5 %, in den *Reactivity Checks* nur für das Kulturmedium bestätigt wurde und sich für CryoStor umkehrte.

Zwischen den beiden Versuchstypen zeigte sich zudem eine Verschiebung in eine Richtung. Im *Viability Check* erreichte nur instaFREEZE den Orientierungswert von 90 %, in den *Reactivity Checks* lagen vier von fünf Medien darüber. Eine mögliche Ursache lässt sich dabei ausschließen. Bei kontinuierlich geführten Kulturen kann sich der Zellzustand innerhalb weniger Wochen messbar ändern. Kosaka *et al.* mussten die für DNCB bestimmte Konzentration, bei der die Vitalität der Zellen auf 75 % sinkt (CV75), nach einer Woche neu festlegen, weil sie zwischenzeitlich zu zytotoxisch geworden war [28]. Im ARC-Format entfällt diese Quelle, da alle verglichenen *Vials* je Einfriermedium aus derselben, an einem Tag eingefrorenen Charge stammen und zwischen den Versuchen nicht kultiviert, sondern gelagert wurden. Die Verschiebung

muss deshalb auf Unterschiede zwischen einzelnen *Vials*, auf den jeweiligen Versuchstag oder auf die unterschiedlichen Arbeitsschritte zwischen Inkubationsende und Messung zurückgehen. Welcher dieser Anteile überwiegt, lässt sich mit diesen Daten nicht beurteilen. Vitalitäten aus *Viability Check* und *Reactivity Check* können deshalb nur bedingt miteinander verglichen werden.

CS10 folgte dieser Verschiebung als einziges Medium nicht, obwohl es im *Viability Check* noch in der zweitbesten Gruppe gelegen hatte. CS5 und CS10 wurden im selben Lauf getestet, und CS5 lag dort über 90 % Vitalität. Ein fehlerhafter Lauf ist damit als Ursache ausgeschlossen. Mit einem getesteten *Vial* je Bedingung lässt sich die Variation zwischen *Vials* aber nicht von einem Medieneffekt trennen. Abgesehen von den FBS-Medien und dem Einbruch von CS10 trennte die Vitalität die Einfriermedien somit nicht, weshalb die weitere Unterscheidung über die Responsivität erfolgen musste.

4.3 Responsivität gegenüber DNCB

Bei DNCB erreichten vier von fünf Einfriermedien beide Orientierungswerte. Dass beide Marker überhaupt ansprechen konnten, hängt mit der eingesetzten Konzentration zusammen. Sakaguchi *et al.* berichten für DNCB an kultivierten THP-1 Zellen einen positiven Bereich von 1,9 µg/mL bis 5,6 µg/mL für CD86 bei Vitalitäten von 70 % bis 92 % und von 2,5 µg/mL bis 5,6 µg/mL für CD54 bei Vitalitäten von 70 % bis 87 % [6]. Die hier eingesetzten 4 µg/mL liegen in beiden Konzentrationsbereichen, die Vitalitäten der DNCB-Proben ebenfalls. CD86 und CD54 folgen nach DNCB-Behandlung zudem demselben glockenförmigen Verlauf [6], sodass eine einzelne feste Konzentration beide Marker treffen kann.

Dass eine feste DNCB-Konzentration in diesem Bereich auch über verschiedene Zellbestände hinweg funktioniert, zeigt sich bei Kosaka *et al.* Dort löste DNCB bei 5 µg/mL in allen vier untersuchten THP-1 Chargen eine Hochregulation beider Marker über die Orientierungswerte aus, auch in derjenigen Charge, die auf $NiSO_4$ nicht reagierte. Die aus dem Vorversuch abgeleitete CV75-Konzentration für DNCB war dagegen in zwei Chargen so zytotoxisch, dass die Vitalität unter 60 % fiel und keine Werte berechnet werden konnten [28]. Für die Beurteilung einer Zellcharge ist eine feste Konzentration in diesem Bereich, wie sie das Protokoll vorsieht, damit gut geeignet.

Für CS10 scheidet die Konzentration als Ursache damit aus, da auch dort die Vitalität der DNCB-Probe innerhalb des berichteten Bereichs lag. Die Ursache ist bei den Zellen selbst zu suchen (Kapitel 4.6).

4.4 Responsivität gegenüber $NiSO_4$

Bei $NiSO_4$ ergab sich ein anderes Bild. CD54 überschritt den Orientierungswert von 200 % in allen fünf Medien deutlich, während CD86 nur bei instaFREEZE und KM10 über 150 % lag. CS5 lag mit 146,1 % knapp darunter, KM5 und CS10 mit 134,7 % und 113,7 % deutlicher. Da die Werte des Protokolls in dieser Arbeit als Orientierung und nicht als verbindliche Grenzen verstanden werden, macht eine Abweichung von wenigen Prozentpunkten wie bei CS5 ein Einfriermedium nicht unbrauchbar.

Die Zellen reagierten in allen fünf Einfriermedien auf $NiSO_4$ mit einem Anstieg der CD54-Expression auf das Vier- bis Siebenfache des Bezugswerts. Dass CD86 dabei zurückblieb, bedeutet nicht, dass die Zellen insgesamt weniger responsiv waren. Die Hochregulation der beiden Marker fällt substanz- und zeitabhängig unterschiedlich stark aus (Kapitel 2.2), und Kosaka *et al.* verweisen darauf, dass DNCB und $NiSO_4$ unterschiedliche Signalwege in THP-1 Zellen ansprechen [28]. Gerade deshalb werden beide Substanzen gemeinsam zur Prüfung der Funktionalität eingesetzt.

Wie sich eine tatsächlich abweichende Zellcharge äußert, ist bei Kosaka *et al.* dokumentiert. Dort blieb $NiSO_4$ in einer der vier untersuchten Chargen für beide Marker unter den Orientierungswerten. Die CD54-RFI lag dort bei 194 % und 149 %, während sie in den übrigen Chargen bei über 1000 % betrug. Dieselbe Charge wies zugleich eine deutlich niedrigere Vitalität unbehandelter Zellen auf [28]. Dieses Muster liegt hier nicht vor: In allen fünf Einfriermedien überschritt CD54 den Orientierungswert deutlich, und mit Ausnahme von CS10 lagen die unbehandelten Kontrollen über 90 % Vitalität.

Das Protokoll selbst nennt als wahrscheinlichste Ursache für verfehlte Kriterien der Positivkontrollen, dass die eingesetzte Konzentration für die verwendete Zellcharge nicht passend ist, und sieht in diesem Fall eine erneute Bestimmung der CV75 vor [12]. Die Vitalitäten der $NiSO_4$-Proben lagen in dieser Arbeit zwischen 62,4 % und 74,3 % und damit bereits im angestrebten Bereich. Eine chargenspezifische Bestimmung der CV75 hätte die eingesetzte Konzentration daher allenfalls geringfügig verändert. Die vom Protokoll genannte Ursache greift hier also nicht.

Eine Erklärung ergibt sich stattdessen aus den unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Verläufen der beiden Oberflächenmarker. Sakaguchi *et al.* beschreiben für CD54 nach $NiSO_4$-Behandlung einen linearen Anstieg der RFI mit sinkender Vitalität, für CD86 dagegen einen glockenförmigen Verlauf, bei dem die RFI nach einem Maximum wieder abnimmt [6]. Da die Vitalität mit steigender Konzentration sinkt, steigt CD54 also auch stärker im zytotoxischen Bereich weiter an, in dem CD86 bereits wieder abfällt. Dazu passen die dort berichteten Konzentrationsbereiche. CD86 überschritt seinen Orientierungswert bei $NiSO_4$ nur bei einer einzigen von über zehn getesteten Konzentrationen, nämlich bei 78 µg/mL und einer Vitalität von 74 %. CD54 überschritt seinen Orientierungswert dagegen über einen Bereich von 34,7 µg/mL bis 117,1 µg/mL bei Vitalitäten von 66 % bis 88 % [6]. Die hier eingesetzten 100 µg/mL liegen damit oberhalb der einzigen für CD86 positiven Konzentration, aber innerhalb des für CD54 positiven Bereichs. Eine einzelne feste Konzentration kann die beiden Marker daher nicht gleichzeitig optimal abbilden. Eine niedrigere Konzentration hätte CD86 begünstigt und CD54 geschwächt, eine höhere umgekehrt.

Die beiden Verläufe sind dabei aber nicht spiegelbildlich. Ein Gewinn bei CD86 würde daher nicht durch einen gleich großen Verlust bei CD54 aufgehoben. Für CD86 bedeutet der glockenförmige Verlauf, dass eine Annäherung an das Maximum die RFI sprunghaft anheben kann, während für CD54 der lineare Verlauf eine nur allmähliche Abnahme erwarten lässt. Hinzu kommt, dass CD54 zwischen 395,6 % und 728,0 % weit über dem Orientierungswert von 200 % lag und damit großen Spielraum nach unten hatte. Eine Verringerung der Konzentration in Richtung 78 µg/mL könnte die CD86-Werte daher anheben, ohne dass CD54 seinen Orientierungswert verfehlt, da dieser Wert innerhalb des dort für CD54 positiven Bereichs liegt. Das DB-ALM-Protokoll sieht außerdem vor, im *Reactivity Check* zwei oder mehr Konzentrationen parallel zu testen und eine davon für die Beurteilung auszuwählen [12], [28]. Da der Dosis-Wirkungs-Verlauf für die hier verwendeten Chargen nicht bestimmt wurde, soll dies in zukünftigen Experimenten Beachtung finden.

4.5 Negativkontrolle Milchsäure

Die Negativkontrolle LA blieb bei allen fünf Einfriermedien unter beiden Orientierungswerten, womit das entsprechende Kriterium des *Reactivity Checks* erfüllt ist. Zwischen den beiden Oberflächenmarkern bestand dabei ein deutlicher Unterschied. Für CD54

lagen die RFI nahe am Erwartungswert von 100 %, der sich ergibt, wenn die Expression gegenüber der MC unverändert bleibt, für CD86 lagen sie dagegen durchgehend darunter und streuten deutlich stärker.

Dieses Muster ist nicht auf die hier verwendeten Zellen oder Einfriermedien zurückzuführen. Auch bei Sakaguchi *et al.* liegen die RFI nach Behandlung mit einem Nicht-Sensibilisator unterhalb des Erwartungswerts. Für das dort untersuchte Natriumlaurylsulfat werden bei Vitalitäten über 90 % CD86-Werte zwischen 65 % und 97 % berichtet [6]. Eine zytotoxische Wirkung der Milchsäure scheidet als Erklärung für die niedrigen CD86-Werte ohnehin aus, da die LA-Proben mit Ausnahme von CS10 Vitalitäten über 91 % aufwiesen und Milchsäure dort als nicht zytotoxisch beschrieben wird [6]. Da LA in hoher Konzentration zugegeben wurde und dennoch keine Hochregulation auslöste, ist die Antwort auf DNCB und $NiSO_4$ substanzspezifisch und keine unspezifische Reaktion auf die Zugabe einer Testsubstanz.

4.6 Basalniveau der unbehandelten Kontrollen

Die RFI setzt die behandelte Probe ins Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle. Das Basalniveau, also die Markerexpression in der MC beziehungsweise SC, geht damit unmittelbar in die berechneten Werte ein, ohne an der RFI selbst erkennbar zu sein.

Bei CS10 war die Responsivität auf DNCB nicht nur relativ, sondern auch absolut schwächer. Die bereinigte MFI für CD86 lag bei 15,8, während die von CS5 bei 26,0 lag, bei gleichzeitig erhöhtem SC-Bezugswert. Beides zusammen erklärt den schwachen RFI-Wert von 121,9 %.

Bei CD54 ergibt sich dagegen ein anderes Bild. Die bereinigten MFI der behandelten Proben lagen bei CS10 mit 14,4 nach DNCB und 35,3 nach $NiSO_4$ sogar geringfügig über den Werten von CS5 mit 13,1 und 33,9. Absolut betrachtet reagierten die Zellen aus CS10 also genauso stark. Die deutlich niedrigeren RFI entstehen ausschließlich durch den Bezugswert. Die bereinigten MFI der unbehandelten Kontrollen lagen bei CS10 mit 8,9 in der MC und 9,2 in der SC etwa doppelt so hoch wie bei CS5 mit 5,0 und 4,9. Von den vier Kombinationen aus den beiden Positivkontrollen und den beiden Oberflächenmarkern ist bei CS10 damit nur DNCB mit CD86 eine tatsächlich schwächere Antwort.

Die Isotypkontrollen von CS10 lagen mit 6,4 in der MC und 6,3 in der SC nicht über denen von CS5 mit 6,9 und 7,2. Eine verstärkte unspezifische Antikörperbindung

scheidet als Ursache für den erhöhten Bezugswert damit aus. Der Anstieg betrifft ausschließlich die spezifische Bindung und damit die tatsächliche Oberflächenexpression. Die unbehandelten Zellen aus CS10 trugen nach dem Auftauen also bereits mehr CD54 und CD86 auf ihrer Oberfläche als die aus CS5. Zusammen mit der niedrigsten Vitalität aller Medien deutet das auf eine stärkere Belastung durch die Kryokonservierung hin, die zu einer teilweisen Voraktivierung der Zellen geführt haben könnte.

Ein vergleichbares Muster ist für kryokonservierte Zellen bereits beschrieben worden. Martikainen und Roponen verglichen frische und kryokonservierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) und fanden nach dem Auftauen eine erhöhte Zytokinproduktion der unstimulierten Kontrollen bei gleichzeitig schwächerer Antwort auf Stimulation. Als mögliche Ursache für das erhöhte Ausgangsniveau nennen sie den Einfrier- und Auftauprozess selbst sowie Bestandteile des Einfriermediums [29]. Beschrieben ist dort außerdem, dass Kryokonservierung die Reifung monozytärer Zellen beeinflussen kann [29], die gerade durch die Hochregulation von CD86 und CD54 gekennzeichnet ist (Kapitel 2.1). Zu beachten ist, dass dort frische mit kryokonservierten primären Zellen verglichen und die Zytokinproduktion gemessen wurde, während hier zwei Einfriermedien nach der Kryokonservierung gegeneinanderstehen. Übertragbar ist deshalb nicht die Richtung der Veränderung, sondern die Aussage, dass Einfrierprozess und Medienzusammensetzung den Ausgangszustand unbehandelter Zellen beeinflussen können.

Eine solche Voraktivierung wird von den Akzeptanzkriterien nicht erfasst. Für die unbehandelten Kontrollen fordert das Protokoll lediglich, dass das Verhältnis der MFI von CD86 und CD54 zur Isotypkontrolle über 105 % liegt [12]. Dieses Kriterium ist eine Untergrenze und war bei allen Medien deutlich erfüllt. Bei CS10 lag das Verhältnis für CD54 mit 238 % in der MC am höchsten, während die übrigen Medien zwischen 158 % und 178 % lagen. Eine Obergrenze für das Basalniveau sieht das Protokoll dagegen nicht vor, und auch die von Kosaka *et al.* vorgeschlagenen Auswahlkriterien betreffen nur die Vitalität und die korrekte Einstufung der Kontrollsubstanzen, nicht das Basalniveau [28]. Ein erhöhter Bezugswert bleibt damit unbemerkt, senkt aber jede darauf bezogene RFI.

Für die Bewertung von CS10 bedeutet das, dass die Zellen nicht generell weniger responsiv waren, sondern von einem höheren Ausgangsniveau starteten. Die niedrige Vitalität der unbehandelten Zellen ist dabei ein Warnzeichen, das auch in der Literatur

dokumentiert ist: Kosaka *et al.* fanden die abweichende Antwort auf $NiSO_4$ in derjenigen Charge, deren unbehandelte Zellen als einzige deutlich unter den übrigen lagen [28]. Anders als dort blieb die Antwort auf CD54 bei CS10 allerdings erhalten, sodass es sich nicht um eine generell unresponsive Charge handelt.

Ein grundsätzlicher Nachteil von CryoStor CS10 lässt sich aus diesem Befund nicht ableiten. Jantet-Blaudez *et al.* fanden für PBMC gerade bei CS10 eine mit einem FBS-basierten Referenzmedium vergleichbare Vitalität und Funktionalität, während Varianten mit geringerem DMSO-Gehalt schlechter abschnitten [30]. In dieser Arbeit verhielt es sich umgekehrt, was zusammen mit dem Einsatz eines einzelnen *Vials* je Bedingung dafür spricht, das Ergebnis für CS10 nicht zu verallgemeinern.

KM5 und KM10 wurden im selben Lauf gemessen. Nach $NiSO_4$-Behandlung lag die bereinigte MFI für CD86 bei KM5 mit 16,2 über der von KM10 mit 12,4, die daraus berechnete RFI mit 134,7 % gegenüber 184,0 % jedoch deutlich darunter. Ursache ist die MC, die sich zwischen den Medien mit 12,0 und 6,7 um fast das Doppelte unterschied, während die LA-Proben mit 5,8 und 5,1 nahezu gleichauf lagen. Die Zellen aus KM5 starteten also von einem höheren Ausgangsniveau und steigerten die Expression von dort aus weniger stark.

Ein erhöhter Bezugswert senkt die RFI rechnerisch, ohne dass die Antwort der Zellen schwächer ausfallen muss. Trennen lässt sich beides mit diesen Daten nicht, da die MC je Bedingung nur einmal gemessen wurde. Jede Kenngröße, die die behandelte Probe auf die MC bezieht, übernimmt deren Unsicherheit, und das gilt für die RFI als Verhältnis ebenso wie für die absolute Zunahme gegenüber der MC. Unabhängig vom Bezugswert ist allein die bereinigte MFI der behandelten Proben selbst, und nach diesem Maß verschiebt sich die Rangfolge deutlich. KM10 erreichte nach $NiSO_4$-Behandlung den niedrigsten absoluten Wert aller fünf Medien, wies aber die zweithöchste RFI auf, während KM5 umgekehrt an zweiter Stelle der absoluten Werte lag und dennoch den Orientierungswert verfehlte. Eindeutig ist das Ergebnis nur für instaFREEZE, das bei der RFI wie beim absoluten Wert nach der Behandlung an erster Stelle lag, und zwar bei gleichzeitig höchstem Basalniveau. Ein hohes Basalniveau begrenzt die Antwort also nicht grundsätzlich.

Für die Beurteilung einer Substanz ist die RFI die geeignete Kenngröße, da dort alle Proben auf dieselbe Kontrolle einer einzigen Zellcharge bezogen werden. In dieser

Arbeit werden dagegen Zellen aus verschiedenen Einfriermedien miteinander verglichen, die jeweils ihre eigenen Bezugskontrollen mitbringen. Unterschiede im Basalniveau gehen damit in den Vergleich zwischen Medien ein, weshalb die Abstufung zwischen den Medien nicht überinterpretiert werden sollte.

4.7 Eignung der Einfriermedien im ARC-Format

Zusammengenommen erfüllten zwei der fünf Einfriermedien alle Orientierungswerte des *Reactivity Checks*: instaFREEZE und KM10. Beide erreichten dieses Ergebnis auf unterschiedlichem Weg. Mit einer bereinigten MFI von 27,3 nach $NiSO_4$-Behandlung lieferte instaFREEZE die mit Abstand größte absolute Antwort, wies dabei aber auch das höchste Basalniveau auf. KM10 zeigte umgekehrt das niedrigste Basalniveau aller Medien bei zugleich schwächster absoluter Antwort. Ein niedriges Basalniveau ist für den *Assay* günstig, da sich eine substanzbedingte Hochregulation davon deutlicher abhebt. Eine große absolute Antwort macht die Messung dagegen unempfindlicher gegenüber Schwankungen des Bezugswerts. Beide Medien erfüllten die Kriterien, betonen dabei aber unterschiedliche Eigenschaften.

Für die praktische Anwendung kommt ein Unterschied hinzu, der in den Orientierungswerten nicht abgebildet ist. instaFREEZE wurde mit 5 % DMSO eingesetzt, KM10 dagegen mit 10 %, also mit der vom Protokoll vorgesehenen Konzentration [12]. Da DMSO osmotischen Stress verursacht und in einigen Zelltypen das Zytoskelett schädigt [19], ist ein Medium im Vorteil, das dasselbe Ergebnis mit der halben Konzentration erreicht. Dass die beiden Medien, die alle Orientierungswerte erfüllen, unterschiedliche DMSO-Konzentrationen aufweisen, zeigt zugleich, dass die DMSO-Konzentration allein nicht über das Ergebnis entscheidet.

Deutlich abgefallen ist allein CS10. Anders als bei CS5 und KM5 ließ sich die Abweichung dort weder auf die Konzentration (Kapitel 4.3) noch allein auf den erhöhten Bezugswert zurückführen (Kapitel 4.6), und es war das einzige Medium, dessen unbehandelte Kontrollen die Vitalitätsgrenze unterschritten. Für eine Weiterverwendung käme es nach diesen Daten zunächst nicht in Frage.

4.8 Serumhaltige und serumfreie Einfriermedien

Die untersuchten Einfriermedien lassen sich zwei Gruppen zuordnen. Serumhaltig waren das Kulturmedium mit 5 % und 10 % DMSO sowie die beiden Varianten aus reinem

FBS. Serumfrei waren instaFREEZE und die beiden CryoStor-Varianten. Über beide Versuche hinweg fanden sich in jeder Ergebnisgruppe Medien aus beiden Kategorien: Die Orientierungswerte vollständig erfüllt haben ein serumfreies und ein serumhaltiges Medium, ausschließlich den CD86-Orientierungswert nach $NiSO_4$-Behandlung verfehlt haben ebenfalls je eines aus beiden Gruppen, und das einzige deutlich abgefallene Medium war ein serumfreies (Kapitel 4.7). Ein systematischer Vorteil einer der beiden Gruppen ließ sich nicht erkennen.

Die Einteilung in serumhaltig und serumfrei bildet die Abstufung dabei nur grob ab. Das Kulturmedium enthält 10 % FBS, während die beiden FBS-Medien nahezu vollständig aus Serum bestehen. Getestet wurden also drei Stufen des Serumanteils, und gerade die höchste Stufe schnitt im *Viability Check* am schlechtesten ab (Kapitel 4.2). Daraus lässt sich allerdings keine Dosisabhängigkeit ableiten, da sich die reinen FBS-Medien vom Kulturmedium in mehr als dem Serumanteil unterscheiden. Ihnen fehlen die RPMI-Basis und das 2-Mercaptoethanol.

Für die Fragestellung dieser Arbeit ist entscheidend, dass der Verzicht auf Serum im Einfriermedium die Funktionalität der Zellen nicht beeinträchtigte. Von den beiden Medien, die sämtliche Orientierungswerte erfüllten, ist KM10 genau das Einfriermedium, das das DB-ALM-Protokoll Nr. 158 für THP-1 Zellen vorsieht [12]. Das serumfreie instaFREEZE erreichte dasselbe Ergebnis, dabei mit der halben DMSO-Konzentration und ohne tierische Bestandteile, und lieferte im *Viability Check* zusätzlich die höchste Vitalität. Serum im Einfriermedium ist für die Kryokonservierung von THP-1 Zellen im *Assay Ready Cell* Format demnach nicht erforderlich.

Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen an anderen Zelltypen. Jantet-Blaudez *et al.* verglichen neun tierproteinfreie Einfriermedien mit einem FBS-basierten Referenzmedium für humane PBMC und fanden für mehrere dieser Medien über bis zu zwei Jahre eine vergleichbare Vitalität und Funktionalität [30]. Die Übertragbarkeit auf diese Arbeit ist begrenzt, da es sich um primäre Zellen und andere funktionelle Endpunkte handelt und die Lagerdauer hier nur wenige Wochen betrug.

Serumfrei waren allerdings nur die Einfriermedien selbst, nicht der Versuchsansatz. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in *Assay Medium* resuspendiert und die Kontrollsubstanzen in *Assay Buffer* zugegeben. Beide enthalten FBS, sodass während der gesamten Inkubation Serum im *well* vorhanden war. Ob THP-1 Zellen auch unter

vollständig serumfreien Bedingungen die geforderte Funktionalität zeigen, lässt sich aus diesen Versuchen nicht beantworten.

Der Verzicht auf Serum im Einfriermedium ist dennoch von praktischem Nutzen. FBS ist ein Produkt tierischen Ursprungs und unterliegt Chargenschwankungen, die sich auf die Zellkultur und damit auf die Ergebnisse von *Assays* übertragen können [24]. Für *Assay Ready Cells*, deren Zweck gerade in der Vergleichbarkeit über lange Zeiträume liegt, ist eine solche Variabilitätsquelle besonders ungünstig. Hinzu kommt, dass die Gewinnung von FBS im Widerspruch zum 3R-Prinzip steht, an dem sich auch *in-vitro*-Methoden orientieren [24]. Ein definiertes serumfreies Einfriermedium wie instaFREEZE vermeidet beide Nachteile. Auch wenn der Verzicht hier nur das Einfriermedium betrifft, ist damit bereits ein Teil des FBS-Einsatzes eingespart.

4.9 Einschränkungen

Die hier gezogenen Schlüsse unterliegen mehreren Einschränkungen, die zum Teil bereits an den jeweiligen Stellen genannt wurden. Je Einfriermedium und Bedingung wurde ein *Vial* eingesetzt, sodass sich Unterschiede zwischen *Vials* nicht von Unterschieden zwischen den Medien trennen lassen. Dasselbe gilt für den Zellquellenvergleich, bei dem je Quelle ein *Vial* aufgetaut wurde. Die drei *wells* je Kontrolle erfassen nur die Streuung innerhalb eines Versuchs, nicht die zwischen *Vials* oder Chargen. Die Medienkontrollen wurden im *Reactivity Check* nur einmal gemessen, weshalb sich die Verlässlichkeit der Bezugswerte nicht prüfen ließ. Die fünf Einfriermedien wurden zudem in drei getrennten Läufen an verschiedenen Tagen getestet. In allen drei Läufen wurden dieselben Antikörperchargen in identischer Verdünnung eingesetzt. Die Isotypkontrollen der Medienkontrollen lagen mit 6,4 bis 7,0 eng beieinander. Die Messbedingungen waren zwischen den Läufen also vergleichbar. Ob die spezifischen Antikörper in allen Läufen gleich gut gefärbt haben, lässt sich daraus allerdings nicht beurteilen.

Eingefroren wurde durchgehend passiv mit Mr. Frosty-Einfrierbehältern. Die Kühlrate wurde dabei weder geregelt noch aufgezeichnet, und die Einfrierläufe fanden nacheinander an verschiedenen Tagen statt. Unterschiede im tatsächlichen Kühlverlauf zwischen den Läufen lassen sich daher nicht ausschließen und nicht von der Schutzwirkung des jeweiligen Einfriermediums trennen.

Hinzu kommt, dass für die verwendeten Chargen kein *Dose Finding Assay* durchgeführt und der pH-Wert der Ansätze nicht gemessen wurde. Für DNCB fällt das weniger ins Gewicht. Kosaka *et al.* setzten eine feste Konzentration von 5,0 µg/mL ein und überschritten damit in allen untersuchten THP-1 Chargen die Kriterien für beide Oberflächenmarker [28]. Für $NiSO_4$ wiegt das Fehlen einer Konzentrationsreihe dagegen schwerer, da die beiden Marker dort unterschiedliche Konzentrationsbereiche haben (Kapitel 4.4). Die beiden FBS-Medien wurden nach dem *Viability Check* nicht weiter untersucht, sodass für sie keine Aussage zur Responsivität möglich ist. Die Zellen wurden wenige Wochen nach dem Einfrieren aufgetaut. Ob die Funktionalität auch nach längerer Lagerung erhalten bleibt, wurde nicht untersucht.

4.10 Fazit und Ausblick

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass THP-1 Zellen nach der Kryokonservierung ohne eine Kulturphase im *Assay Ready Cell* Format eingesetzt werden können. Zellen aus vier von fünf Einfriermedien erreichten 24 h nach der Aussaat und Behandlung mit DNCB beide Orientierungswerte. Die Negativkontrolle blieb durchgehend negativ. Ob ein Einfriermedium Serum enthält, war dabei nicht entscheidend. Das über beide Versuche hinweg beste Ergebnis lieferte mit instaFREEZE ein serumfreies Medium, das dieselben Orientierungswerte erfüllte wie das im DB-ALM-Protokoll vorgesehene Einfriermedium, dabei aber ohne tierische Bestandteile und mit der halben DMSO-Konzentration auskam.

Für weiterführende Arbeiten ergeben sich mehrere Ansatzpunkte. Zunächst sollten mehrere *Vials* je Einfriermedium und mehrere Ansätze je Medienkontrolle eingesetzt werden, um Unterschiede zwischen *Vials* von Unterschieden zwischen den Medien trennen und die Bezugswerte absichern zu können. Sinnvoll wäre außerdem, die Medien in einem CRF mit optimiertem Programm einzufrieren. Dieser regelt die Kühlrate aktiv und zeichnet sie auf, sodass sie als Einflussgröße dokumentiert und zwischen den Medien vergleichbar wäre. Für $NiSO_4$ bietet sich eine Konzentrationsreihe an, da die hier verwendeten 100 µg/mL nach den Angaben von Sakaguchi *et al.* oberhalb des für CD86 günstigen Bereichs liegen könnten [6]. Das DB-ALM-Protokoll erlaubt dafür ausdrücklich, mehrere Konzentrationen parallel im *Reactivity Check* zu testen [12]. Darüber hinaus wäre es hilfreich, beim Vergleich mehrerer Chargen oder Einfriermedien die bereinigten MFI der unbehandelten Kontrollen mit zu betrachten. Eine

Obergrenze für das Basalniveau sehen weder das DB-ALM-Protokoll Nr. 158 [12] noch Kosaka *et al.* [28] vor, die entsprechende Kriterien für die Prüfung neuer THP-1 Chargen formuliert haben. Für die Beurteilung einer einzelnen Charge ist die RFI ausreichend, beim Vergleich untereinander erklärt das Basalniveau jedoch einen Teil der Unterschiede. Offen bleibt schließlich die Responsivität der beiden FBS-Medien und die Frage, ob sich der FBS-Anteil auch in *Assay Buffer* und *Assay Medium* verringern lässt.

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Katalognummer
T75-Zellkulturflasche	Sarstedt	83.3911.502
T175-Zellkulturflasche	Sarstedt	83.3912.502
24-*well* Platte	Sarstedt	83.3922.500
96-*well* Platte	Sarstedt	83.3926.500
Kryovials	Thermo Fisher Scientific	377267
Reaktionsgefäße	Sarstedt	72.706
Reaktionsgefäße (dunkel)	Eppendorf	0030 120.191
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Sarstedt	62.547.255
Zentrifugenröhrchen (500 mL)	Corning	431123
Pipettenspitzen	Sarstedt	70.3030.305, 70.3031.255, 70.3030.255, 70.3060.255, 70.3060.205, 70.3060.100, 70.3030.100
Serologische Pipetten	Sarstedt	86.1252.001, 86.1253.001, 86.1254.001, 86.1685.001, 86.1256.001, 86.1252.011

5.1.2 Zellen

Tabelle 3: Verwendete Zellen

Zelllinie	Charge	Passage
THP-1 (Quelle 1)	92-210908VP01	5
THP-1 (Quelle 2)	92-241021FEH01	7

5.1.3 Medien und Puffer

Tabelle 4: Verwendetes Medium zur Kultivierung der THP-1 Zellen (Quelle 1)

Reagenz	Konzentration	Hersteller	Katalognummer
RPMI 1640	-	Capricorn Scientific	RPMI-XA
Fetal Bovine Serum Sera Low (heat inactivated) (FBS HI)	10 %	Capricorn Scientific	FBS-HI-12A
Stable Glutamine	2 mM	PAN-Biotech	P04-82100
Natriumpyruvat	1 mM	Capricorn Scientific	NPY-B
2-Mercaptoethanol	50 µM	PAN-Biotech	P07-05100
HEPES Buffer	10 mM	Capricorn Scientific	HEP-B

Beide Kulturmedien enthalten 1 mM Natriumpyruvat, bei Quelle 1 als separaten Zusatz und bei Quelle 2 bereits im Basalmedium. Das DB-ALM-Protokoll Nr. 158 sieht dagegen ein RPMI 1640 Medium vor, das HEPES und L-Glutamin, aber kein Natriumpyruvat enthält [12].

Tabelle 5: Verwendetes Medium zur Kultivierung der THP-1 Zellen (Quelle 2)
Das verwendete RPMI 1640 Medium enthält bereits L-Glutamin (2 mM), Natriumpyruvat (1 mM) und HEPES Puffer (10 mM).

Reagenz	Konzentration	Hersteller	Katalognummer
RPMI 1640	-	PAN-Biotech	P04-18047
FBS HI	10 %	Capricorn Scientific	FBS-HI-12A
2-Mercaptoethanol	50 µM	PAN-Biotech	P07-05100

Tabelle 6: Abkürzung, Name und Zusammensetzung der verwendeten serumhaltigen Einfriermedien zur Kryokonservierung der Zellen

Abkürzung	Zusammensetzung
KM5	Kulturmedium + 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
KM10	Kulturmedium + 10 % DMSO
FBS5	FBS HI + 5 % DMSO
FBS10	FBS HI + 10 % DMSO

Tabelle 7: Verwendetes serumfreies Medium zur Kryokonservierung der Zellen

Abkürzung	Name	Hersteller	Katalognummer	DMSO Konzentration
CS5	CryoStor CS5	STEMCELL Technologies	7933	5 %
CS10	CryoStor CS10	STEMCELL Technologies	7930	10 %
insta	instaFREEZE	acCELLerate	-	5 %

Tabelle 8: Zusammensetzung *Assay Buffer*

Reagenz	Volumen in mL	Hersteller	Katalognummer
RPMI 1640 (ohne Phenolrot)	500	Gibco	32404-014
Penicillin/Strepto-mycin (Pen/Strep) (10.000 U/10 mg)	5	Capricorn	PS-B
L-Glutamin (200 mM)	5	Capricorn	GLN-B
Hepes Buffer (1 M)	10	Capricorn	HEP-B
Natriumpyruvat (100 mM)	5	Capricorn	NPY-B
FBS HI	50	Capricorn	FBS-HI-12A

Tabelle 9: Zusammensetzung *Assay Medium*

Reagenz	Volumen in mL	Hersteller	Katalognummer
Assay Buffer	250	-	-
FBS HI	25	Capricorn	FBS-HI-12A

5.1.4 Antikörper

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für den *Reactivity Check*

Antikörper	Hersteller	Katalognummer	Klon
Anti-CD54-FITC	Dako	F7143	6.5B5
Anti-CD86-FITC	BD Pharmingen	555657	Fun-1
Isotypkontrolle (Maus-IgG1-FITC)	BD Pharmingen	555748	MOPC-21

5.1.5 Weitere Reagenzien

Tabelle 11: Weitere Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	Capricorn	PBS-1A
Natriumchlorid	Carl Roth	HN00.1
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich	A4503
Propidiumiodid	Sigma Aldrich	P4864
Globulins Cohn Fraktion II, III	Sigma Aldrich	G2388
DMSO	Carl Roth	A994.2
2-Mercaptoethanol	PAN-Biotech	P07-05100
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	Sigma Aldrich	138630
Nickelsulfat x 6 H_2O	Sigma Aldrich	227676
Milchsäure 88 %	Sigma Aldrich	W261106

5.1.6 Geräte

Tabelle 12: Verwendete Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Durchflusszytometer	Guava easyCyte HT	Merck
Analysenwaage	CP124S	Sartorius
Inverses Mikroskop mit Phasenkontrast	Eclipse TS100	Nikon
Sicherheitswerkbank	MSC Advantage 1.2	Thermo Fisher Scientific
Zellzähler	CASYvivo 150	OMNI Life Science
Zentrifuge	Mega Star 1.6R	VWR
Zentrifuge	Megafuge 40R	Heraeus
Inkubator	Heracell 150	Thermo Fisher Scientific
Inkubator	Steri-Cycle i250	Thermo Fisher Scientific
Wasserbad	-	GFL
Einfrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific
Pipettierhilfen	Pipetboy acu 2	Integra Biosciences
Kolbenhubpipetten	Research Plus, Reference	Eppendorf
Multikanalpipetten	Xplorer plus, Xplorer	Eppendorf
-20 °C Gefrierschrank	TKSS400H	GGM Gastro International
-80 °C Gefrierschrank	TDE Series	Thermo Fisher Scientific
Kryotank	Chronos	Messer

5.2 Zellkultivierung

In dieser Arbeit wurden THP-1 Zellen aus zwei unterschiedlichen Quellen verwendet. Für die Zellkultivierung wurde das entsprechende Kulturmedium aus Tabelle 4 (THP-1 Zellen aus Quelle 1) und Tabelle 5 (THP-1 aus Quelle 2) genutzt. Die Zellkulturarbeit einschließlich der Kryokonservierung diente der Vorbereitung der Versuchsdurchführung. Die Zellen beider Quellen wurden aufgetaut, expandiert, geerntet und in allen sieben Einfriermedien kryokonserviert (Kapitel 5.2.4). Für die Versuche wurde jeweils ein *Vial* aus diesen Chargen aufgetaut. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten alle Zentrifugationsschritte bei 200 x g. Die jeweilige Dauer ist bei den einzelnen Schritten genannt. Kulturmedium wurde vor der Verwendung auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Alle Kultivierungs- und Inkubationsschritte erfolgten im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Wasserdampfatmosphäre.

5.2.1 Zellzählung und Vitalitätsmessung mittels CASYvivo

Die Zellzählung und Vitalitätsmessung erfolgte mittels CASYvivo (OMNI Life Science), welches zur Messung *Electrical Current Exclusion* und *Pulse Field Analysis* kombiniert und eine färbefreie Unterscheidung lebender und toter Zellen ermöglicht [31]. Es bestimmt sowohl die Lebend- als auch die Totzellzahl und berechnet damit die Vitalität. Für die Messung wurden 200 µL der homogenen Zellsuspension in ein unsteriles Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde je nach benötigter Verdünnung mit *CASYton* verdünnt und anschließend am Gerät gemessen.

5.2.2 Auftauen von Zellen für die Zellexpansion

Um die kryokonservierten Zellen in Kultur zu bringen, wurde das 2 mL-*Vial* für 3 Minuten bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Währenddessen wurden 8 mL Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Mit einer 5 mL serologischen Pipette wurden die aufgetauten Zellen zügig in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das Pellet in 6 mL Kulturmedium resuspendiert. Es wurden 200 µL Suspension für eine Zellzählung in ein Mikroreaktionsgefäß entnommen. Die Zellzählung und Vitalitätsmessung erfolgten gemäß Kapitel 5.2.1. Die Zellen wurden mit den folgenden Zelldichten bei größtmöglichem Volumen in Zellkulturflaschen ausgesät. Das Volumen ergab sich aus der ermittelten Lebendzellzahl (Tabelle 13).

Tabelle 13: Aussaatdichten nach dem Auftauen
Aussaatdichten für die THP-1 Zellen der beiden Quellen direkt nach dem Auftauen. Die Zellen wurden ausgesät und für drei Tage kultiviert. Die Dichten sind höher als die für die Erhaltungskultur üblichen, da die Zellen nach dem Auftauen erfahrungsgemäß mit einer geringeren Wachstumsrate starten. Die Aussaatdichte ist in Zellen pro Milliliter (c/mL) angegeben.

Zelllinie	Aussaatdichte in c/mL
THP-1 (Quelle 1)	$2{,}5 \cdot 10^5$
THP-1 (Quelle 2)	$3{,}0 \cdot 10^5$

5.2.3 Passagieren und expandieren von Zellen

Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert oder expandiert. Vor jeder Passage wurde die Kultur visuell beurteilt. Dabei wurde das Medium zunächst ohne Mikroskop auf Trübung geprüft. Anschließend wurden die Zellen unter dem inversen Lichtmikroskop hinsichtlich Morphologie, Verteilung und Zelldichte beurteilt. Als unauffällig galt eine Kultur mit runden, überwiegend vereinzelt vorliegenden Zellen. Ein getrübtes Medium oder eine Vielzahl an beweglichen kleinen Partikeln wurde als Hinweis auf eine Kontamination gewertet. In diesem Fall wurde die Kultur verworfen und ein neues *Vial* derselben Charge aufgetaut. Für jede Passage oder Expansion wurde die gesamte Zellsuspension aus den Zellkulturflaschen mit einer serologischen Pipette in Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert. Das Volumen zum Resuspendieren wurde je nach Größe des Zellpellets und der benötigten Verdünnung zur Zellzählung gewählt und war daher nicht konstant. Die Zellzahl des in Medium resuspendierten Zellpellets wurde gemäß Kapitel 5.2.1 ermittelt und die Zellsuspension nach Tabelle 14 ausgesät.

Tabelle 14: Aussaatdichten der THP-1 Zellen
Aussaatdichten der THP-1 Zellen für ein Passagierungsintervall von 2 bzw. 3 Tagen. Die Dichten sind so gewählt, dass sich die THP-1 Zellen zum Passagierzeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Kultivierungszeitraum in Tagen	THP-1 (Quelle 1) Aussaatdichte in c/mL	THP-1 (Quelle 2) Aussaatdichte in c/mL
2	$2{,}4 \cdot 10^5$	$2{,}4 \cdot 10^5$
3	$1{,}4 \cdot 10^5$	$1{,}4 \cdot 10^5$

Die Berechnung der Aussaat richtete sich nach dem Ziel der Kultivierung. Wenn für eine spätere Zellernte eine große Zellzahl benötigt wurde, wurde maximal expandiert und die gesamte Zellsuspension eingesetzt. Da die Gesamtzellzahl in diesem Fall bekannt war, ergab sich das Aussaatvolumen aus der gewünschten Aussaatdichte (Gl. 1). Sollte die Kultur dagegen bei gleichem Volumen erhalten werden, war das Aussaatvolumen vorgegeben. Daraus wurde zunächst die benötigte Gesamtzellzahl berechnet (Gl. 2) und anschließend über die ermittelte Zelldichte das einzusetzende Volumen der Zellsuspension (Gl. 3). In beiden Fällen ergab sich das Volumen des zu ergänzenden Kulturmediums als Differenz aus Aussaatvolumen und Volumen der Zellsuspension (Gl. 4).

$$V_{Gesamt} = \frac{\text{Gesamtzellzahl}}{\text{Aussaatdichte}} \qquad \text{Gl. 1}$$

$$\text{Benötigte Gesamtzellzahl} = V_{Gesamt} \cdot \text{Aussaatdichte} \qquad \text{Gl. 2}$$

$$V_{Zellsuspension} = \frac{\text{Benötigte Gesamtzellzahl}}{\text{Zelldichte}} \qquad \text{Gl. 3}$$

$$V_{Medium} = V_{Gesamt} - V_{Zellsuspension} \qquad \text{Gl. 4}$$

Die Wahl und Kombination der Zellkulturflaschen richtete sich nach dem Aussaatvolumen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Minimal- und Maximalvolumen der Zellkulturflaschen

Gefäß	Minimalvolumen in mL	Maximalvolumen in mL
T75	12	40
T175	25	80

5.2.4 Zellernte und Einfrieren

Für die Versuche wurden die THP-1 Zellen aus beiden Quellen nach und nach in sieben verschiedenen Einfriermedien eingefroren (Tabelle 16 und Tabelle 17). Wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben, wurden die THP-1 Zellen zunächst visuell untersucht. Aufgrund des größeren Suspensionsvolumens bei der Ernte wurde die Kultur in ein 500 mL-Zentrifugengefäß überführt. Da das größere Volumen zu einem längeren Sedimentationsweg führt, wurde für 15 min zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in DMSO-freiem Einfriermedium resuspendiert. Dabei sollte das Volumen nach dem Resuspendieren 50 % des gesamten

Einfriervolumens nicht überschreiten. Das Einfriermedium wurde erst kurz vor der Verwendung aus dem Kühlschrank (4 °C) entnommen.

Die Zellzahl der Zellsuspension wurde nach Kapitel 5.2.1 bestimmt. Die gewünschte Zellzahl betrug $1 \cdot 10^7$ Zellen pro *Vial* und das gewünschte Volumen pro *Vial* 1,8 mL. Mit der gewünschten Zellzahl, der gewünschten Anzahl an *Vials*, dem Volumen und der Zelldichte der Zellsuspension konnte die Zusammensetzung aus Zellsuspension, Einfriermedium und DMSO in der jeweils gewünschten Konzentration berechnet werden (Tabelle 6 und Tabelle 7). Das DMSO wurde im vorgekühlten Einfriermedium vorgelegt, da die Zugabe zu einer Erwärmung des Mediums führt. Die Zellsuspension konnte wenig später dazugegeben werden.

Bei den kommerziellen Einfriermedien CryoStor CS5 und CryoStor CS10 ist DMSO bereits enthalten, weshalb die Supplementation nicht benötigt wurde. Daher wurde das Zellpellet zunächst in Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl nach Kapitel 5.2.1 bestimmt. Anschließend wurde das benötigte Volumen für die gewünschte Zellzahl erneut zentrifugiert (3 min) und das Pellet im DMSO-haltigen Einfriermedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde durch Schwenken homogenisiert und zügig in die Kryovials aliquotiert. Die Kryovials wurden in den Mr. Frosty-Einfrierbehälter gestellt und dieser im -80 °C Gefrierschrank gelagert. Am nächsten Arbeitstag wurden die *Vials* aus dem Einfrierbehälter in einen Stickstofftank eingelagert.

Tabelle 16: Einfrierläufe der THP-1 Zellen (Quelle 1)
Übersicht Zellkultivierung der THP-1 Zellen aus Q1, bevor sie geerntet und eingefroren wurden. Angegeben sind das Einfriermedium und die Passagenzahl. Alle Ernten erfolgten nacheinander aus derselben fortlaufenden Kultur. Die Passagenzahl nach dem Auftauen lag bei 6.

Einfriermedium	Passagenzahl
insta	8
KM5	11
KM10	11
FBS5	13
FBS10	13
CS5	14
CS10	14

Tabelle 17: Einfrierläufe der THP-1 Zellen (Quelle 2)
Übersicht der Zellkultivierung der THP-1 Zellen Q2, bevor sie geerntet und eingefroren wurden. Angegeben sind das Einfriermedium und die Passagenzahl. Nach der Ernte für das instaFREEZE-Medium trat eine Kontamination der laufenden Kultur auf, weshalb für alle weiteren Einfriermedien eine neue Kultur aus einem neuen *Vial* derselben Charge gestartet wurde. Alle weiteren Ernten erfolgten nacheinander aus derselben fortlaufenden Kultur. Die Passagenzahl nach dem Auftauen lag bei 8.

Einfriermedium	Passagenzahl
insta	11
KM5	12
KM10	12
FBS5	12
FBS10	12
CS5	12
CS10	12

5.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der Vitalität

Im *Viability Check* wurde die Vitalität der aufgetauten THP-1 Zellen nach 24 h Kultivierung durchflusszytometrisch bestimmt. Alle Zentrifugationen erfolgten für 5 min.

Vor dem Auftauen wurden 30 µL 2-Mercaptoethanol (50 mM) zu 30 mL *Assay Medium* (Zusammensetzung siehe Tabelle 9) gegeben, woraus sich eine Konzentration im Medium von 50 µM ergab. Für jedes Einfriermedium wurde ein *Vial* für 3 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Währenddessen wurden je 8 mL *Assay Medium* in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Mit einer serologischen Pipette wurden 4 mL des vorgelegten *Assay Mediums* aufgezogen und damit die aufgetauten Zellen aufgenommen. Diese wurden zügig in das Zentrifugenröhrchen überführt. Zur vollständigen Überführung wurde etwa 1 mL in der Spitze belassen, mit dem das *Vial* erneut gespült wurde. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand aspiriert und das Pellet in 5 mL *Assay Medium* resuspendiert, um eine Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ c/mL zu erhalten.

Anschließend wurden je 500 µL Zellsuspension pro *well* in eine 24-*well*-Platte dazugegeben. Für den *Viability Check* wurden eine Medienkontrolle und eine Lösungsmittelkontrolle getestet. Die MC bestand dabei aus *Assay Buffer* und die SC aus *Assay Buffer* mit 0,2 % DMSO (Endkonzentration in *well*). Die MC dient dabei als unbehandelte Referenz, während die SC zeigt, ob das eingesetzte DMSO für sich genommen die Vitalität beeinflusst. Von den Kontrollen wurden ebenfalls je 500 µL zur Zellsuspension in das *well* dazugegeben. Die Aussaat wurde unter dem inversen Lichtmikroskop visuell überprüft. Dabei wurde beurteilt, ob die Zellen einzeln und nicht verklumpt vorlagen und ob sich die *wells* in Zelldichte und Verteilung ähnelten. Anschließend wurde die 24-*well*-Platte für 24 h inkubiert.

Am Folgetag wurde zunächst ein *Staining Buffer* angesetzt. Dazu wurde eine 10 %ige BSA-Lösung 1:100 in DPBS verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde jedes *well* in ein 1,5-mL-Mikroreaktionsgefäß überführt und die Zellen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 600 µL *Staining Buffer* resuspendiert und je 200 µL in eine 96-*well*-Platte überführt. Diese wurde anschließend erneut zentrifugiert und zweimal mit 150 µL *Staining Buffer* gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Pellet in 190 µL *Staining Buffer* resuspendiert und 10 µL PI-Lösung (12,5 µg/mL) dazugegeben. Daraufhin wurde die 96-*well*-Platte am Durchflusszytometer gemessen.

Die Anregung erfolgte bei 488 nm, die Detektion der PI-Fluoreszenz im Kanal RED-B (680/30 nm). Die Grenze des *Viability-Gates* wurde anhand einer Totkontrolle festgelegt und war Teil der übernommenen Messmethode. Zellen unterhalb dieses Werts wurden als lebend bewertet und Zellen oberhalb dieses Werts als tot. Die Vitalität ergab sich aus dem Anteil der PI-negativen Zellen an der Gesamtzellzahl. Je Probe wurden 10.000 lebende Zellen gemessen, wobei die Messzeit auf 120 s begrenzt wurde.

Der erste *Viability Check* diente dem Vergleich der beiden Zellquellen. Hierfür wurden Zellen beider Quellen verwendet, die in instaFREEZE eingefroren wurden, da dieses im Unternehmen als Standard-Einfriermedium für THP-1 Zellen eingesetzt wird. Je Zellquelle wurde ein *Vial* aufgetaut und sowohl MC als auch SC in Triplikaten ausgesät. Im zweiten *Viability Check* wurden alle sieben Einfriermedien mit Zellen aus Quelle 2 untersucht, wobei für jede Bedingung ein einfacher Ansatz verwendet wurde.

5.4 Reactivity Check

Zur Überprüfung der Funktionalität der aufgetauten THP-1 Zellen wurde ein *Reactivity Check* durchgeführt. Dafür wurde über FITC-markierte Antikörper die Expression der Oberflächenmarker CD54 und CD86 gemessen. Die Expression beider Marker wird von den Zellen nach Kontakt mit sensibilisierenden Substanzen hochreguliert. Eine Hochregulation zeigt somit die Responsivität der Zellen (Kapitel 2.6). Die Durchführung orientierte sich dabei am DB-ALM-Protokoll Nr. 158 [12]. Alle Zentrifugationen erfolgten für 5 min bei 200 x g.

Zunächst wurden die Kontrollsubstanzen angesetzt. Dabei wurde auf Lichtschutz geachtet und in dunklen Mikroreaktionsgefäßen gearbeitet. Als Positivkontrollen wurden DNCB und $NiSO_4$ verwendet und als Negativkontrolle LA. Die Stammlösungen wurden einmal angesetzt, aliquotiert (DNCB: 50 µL, $NiSO_4$: 80 µL, LA: 50 µL) und bei -20 °C eingefroren. Es wurde für jeden Versuch ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Stammlösung von DNCB wurde in DMSO angesetzt (50 mg/mL), während $NiSO_4$ (100 mg/mL) und LA (100 mg/mL) in Saline (0,91 % (w/v)) angesetzt wurden. Die Saline wurde durch Einwiegen von Natriumchlorid in vollentsalztem Wasser angesetzt. Zur Herstellung der Arbeitslösungen wurden die Stammlösungen seriell verdünnt (Tabelle 18). Die Arbeitslösung wird als 2x-konzentrierte Lösung angesetzt, da diese im *well* mit der Zellsuspension final 1:2 verdünnt wird. Durch die Verdünnungsschritte der

DNCB-Lösung ergibt sich in der Arbeitslösung eine DMSO-Konzentration von 0,4 %. Die SC wurde entsprechend mit derselben Konzentration von 0,4 % angesetzt, was einer Endkonzentration von 0,2 % im *well* entspricht. Für die MC wurden 500 µL *Assay Buffer* zugegeben.

Tabelle 18: Ansatz der Kontrollsubstanzen
Als Kontrollsubstanzen wurden DNCB, $NiSO_4$ und LA verwendet. DNCB wurde für die Stammlösung in DMSO gelöst, während $NiSO_4$ und LA in 0,91 %iger Saline angesetzt wurden. Die Stammlösungen wurden aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Zum Ansatz der Arbeitslösungen wurde seriell verdünnt.

Substanz	Stammlösung in mg/mL	Verdünnungsschritte	Arbeitslösung in µg/mL
DNCB	50	1:25 in DMSO, 1:25 in *Assay Buffer*, 1:10 in *Assay Buffer*	8
$NiSO_4$	100	1:10 in *Assay Buffer*, 1:50 in *Assay Buffer*	200
LA	100	1:50 in *Assay Buffer*	2000

Das Auftauen der Zellen und der Ansatz der SC-Arbeitslösung erfolgten analog zu Kapitel 5.3. Fünf Einfriermedien wurden in drei Läufen getestet. InstaFREEZE wurde nur mit 5 % DMSO getestet, CryoStor und Kulturmedium mit jeweils beiden DMSO-Konzentrationen. Die fünf Einfriermedien wurden auf Grundlage des *Viability Check*s ausgewählt (Kapitel 5.3). Nachdem die aufgetauten Zellen in den *wells* vorlagen, wurden pro *well* je 500 µL Arbeitslösung zugegeben. Für jede Bedingung des Einfriermediums wurden DNCB, $NiSO_4$, LA, MC und SC getestet. Die Aussaat wurde unter dem inversen Lichtmikroskop visuell überprüft und die 24-*well*-Platte für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst ein *Staining Buffer* (Kapitel 5.3) und zusätzlich ein *Blocking Buffer* angesetzt. Dafür wurde eine 1 %ige Globulins Cohn Fraktion II, III-Lösung in DPBS angesetzt und 1:100 in *Staining Buffer* verdünnt. Der *Staining* und der *Blocking Buffer* wurden auf Eis gelagert und gekühlt verwendet. Nach 24 h Inkubation wurde jedes *well* in ein 1,5-mL-Mikroreaktionsgefäß überführt und die Zellen abzentrifugiert. Zum Lösen des Pellets wurden die Reaktionsgefäße leicht über ein Rack gezogen. Die Zentrifuge wurde ab diesem Zeitpunkt auf 4 °C eingestellt. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 mL *Staining Buffer* gewaschen und anschließend in 600 µL

Blocking Buffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Globuline besetzen unspezifische Bindungsstellen und reduzieren so die unspezifischen Bindungen der FITC-Antikörper. Nach dem *Blocking* wurde jede Probe in drei Aliquots aufgeteilt. Dafür wurden jeweils 180 µL Probe in ein *well* einer 96-*well*-Platte gegeben. Die Platte wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Lösen der Pellets in der Platte wurde diese für wenige Sekunden auf einen Plattenschüttler bei etwa 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) gestellt.

Die FITC-Antikörper wurden als *Mastermix* in *Staining Buffer* unter Lichtschutz angesetzt. Dabei wurde der CD86-Antikörper 3:25 verdünnt, die Isotypkontrolle 3:50 und der CD54-Antikörper ebenfalls 3:50. Von jedem *Mastermix* wurden jeweils 50 µL zu einem der drei Aliquots gegeben und die Platte in Dunkelheit für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden zweimal mit je 150 µL *Staining Buffer* gewaschen und zuletzt in 190 µL *Staining Buffer* resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µL PI-Lösung (12,5 µg/mL) wurde die 96-*well*-Platte am Durchflusszytometer gemessen.

Die Messung der Vitalität mit PI im roten Kanal erfolgte analog zu Kapitel 5.3. Parallel wurde die Fluoreszenz der FITC-Antikörper gemessen. Die Anregung erfolgte ebenfalls bei 488 nm und die Detektion im Kanal GRN-B (525/30 nm). Die MFI wurde aus der lebenden Population bestimmt. Die Anzahl der Events und die maximale Messdauer sind ebenfalls Kapitel 5.3 zu entnehmen.

5.5 Datenauswertung

Bei der Messung wurden für jede Probe die Fluoreszenzintensitäten im roten und im grünen Wellenlängenbereich bestimmt. Die Bestimmung der Vitalität aus dem roten Wellenlängenbereich erfolgte wie in Kapitel 5.3 beschrieben. Aus dem grünen Wellenlängenbereich wurde die MFI der lebenden Population ermittelt und für weitere Berechnungen verwendet. Für die bereinigte MFI der Antikörper CD54 und CD86 wurde von der ursprünglichen MFI die MFI der Isotypkontrolle abgezogen, da diese die Intensität der unspezifischen Bindungen wiedergibt. Die RFI wurde entsprechend dem DB-ALM-Protokoll Nr. 158 berechnet [12]. Die DNCB-Proben beziehen sich auf die SC, da DNCB in DMSO gelöst wurde und $NiSO_4$ sowie LA auf die MC, weil sie in Saline angesetzt wurden (Gl. 5).

$$\mathbf{RFI} = \frac{\mathbf{MFI_{behandelte\ Zellen} - MFI_{Isotypkontrolle\ behandelte\ Zellen}}}{\mathbf{MFI_{MC\ oder\ SC} - MFI_{Isotypkontrolle\ MC\ oder\ SC}}} \cdot \mathbf{100} \qquad \textbf{Gl. 5}$$

Auch die Grenzwerte für die Vitalitäten und RFIs orientierten sich am DB-ALM-Protokoll Nr. 158 [12]. Zur Vitalitätsuntersuchung wurde geprüft, ob die MC und SC eine Vitalität von über 90 % und die mit Kontrollsubstanzen behandelten Zellen eine Vitalität von über 50 % aufweisen. Es wurden die Werte aus der Isotypkontrolle verwendet, wie es das Protokoll vorsieht. Die RFIs für den CD54-Antikörper der Positivkontrollen sollten über 200 % liegen und für den CD86-Antikörper über 150 %. Die Negativkontrolle LA sollte unterhalb dieser Grenzwerte liegen. Zur Beurteilung der Funktionalität wurden die Grenzwerte als Orientierungspunkte verwendet.

6 Literaturverzeichnis

[1] A. Mehling *u. a.*, „Non-animal test methods for predicting skin sensitization potentials“, *Arch. Toxicol.*, Bd. 86, Nr. 8, S. 1273–1295, Aug. 2012, doi: 10.1007/s00204-012-0867-6.

[2] W. M. S. Russell und R. L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen, 1959.

[3] Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, „Verordnung (EG) Nr. 1223/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel“, 1223/2009, Nov. 2009. Zugegriffen: 18. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32009R1223

[4] Europäisches Parlament und Rat der Europäischen Union, „Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 18. Dezember 2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH)“, 1907/2006, Dez. 2006. Zugegriffen: 18. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex:32006R1907

[5] S. K. Doke und S. C. Dhawale, „Alternatives to animal testing: A review“, *Saudi Pharm. J.*, Bd. 23, Nr. 3, S. 223–229, Juli 2015, doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002.

[6] H. Sakaguchi *u. a.*, „The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test – human cell line activation test (h-CLAT)“, *Cell Biol. Toxicol.*, Bd. 25, Nr. 2, S. 109–126, Apr. 2009, doi: 10.1007/s10565-008-9059-9.

[7] K. Hardonnière, N. Szely, Z. El Ali, M. Pallardy, und S. Kerdine-Römer, „Models of Dendritic Cells to Assess Skin Sensitization“, *Front. Toxicol.*, Bd. 4, S. 851017, März 2022, doi: 10.3389/ftox.2022.851017.

[8] Y. Yoshida, H. Sakaguchi, Y. Ito, M. Okuda, und H. Suzuki, „Evaluation of the skin sensitization potential of chemicals using expression of co-stimulatory molecules, CD54 and CD86, on the naive THP-1 cell line“, *Toxicol. In Vitro*, Bd. 17, Nr. 2, S. 221–228, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0887-2333(03)00006-7.

[9] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, und K. Tada, „Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)“, *Int. J. Cancer*, Bd. 26, Nr. 2, S. 171–176, Aug. 1980, doi: 10.1002/ijc.2910260208.

[10] P. Azam *u. a.*, „The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers“, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Bd. 212, Nr. 1, S. 14–23, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.taap.2005.06.018.

[11] K. Murphy und C. Weaver, *Janeway Immunologie*, 9. Aufl. 2018. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2018. doi: 10.1007/978-3-662-56004-4.

[12] European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing, „DB-ALM Protocol n° 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT)“, European Commission, Joint Research Centre, Protokoll 158, Version 7, Juli 2018. Zugegriffen: 16. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/methods-and-protocols/protocols

[13] M. Divkovic, C. K. Pease, G. F. Gerberick, und D. A. Basketter, „Hapten–protein binding: from theory to practical application in the *in vitro* prediction of skin sensitization“, *Contact Dermatitis*, Bd. 53, Nr. 4, S. 189–200, Okt. 2005, doi: 10.1111/j.0105-1873.2005.00683.x.

[14] „2,4-Dinitrochlorobenzene.svg“. Zugegriffen: 29. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://de.wikipedia.org/wiki/2,4-Dinitrochlorbenzol#/media/Datei:2,4-Dinitrochlorobenzene.svg

[15] „N9(H2O)6SO4.png“. Zugegriffen: 29. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://en.wikipedia.org/wiki/Nickel%28II%29_sulfate#/media/File:N9(H2O)6SO4.png

[16] „Milchsäure.svg“. Zugegriffen: 29. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://de.wikipedia.org/wiki/Milchs%C3%A4ure#/media/Datei:Milchs%C3%A4ure.svg

[17] G. J. R. Zaman, J. A. D. M. De Roos, M. Blomenröhr, C. J. Van Koppen, und J. Oosterom, „Cryopreserved cells facilitate cell-based drug discovery“, *Drug Discov. Today*, Bd. 12, Nr. 13–14, S. 521–526, Juli 2007, doi: 10.1016/j.drudis.2007.05.008.

[18] O. Wehmeier und A. Loa, „Turning Cells into Reagents: The Preparation of Assay Ready Cells for Routine Use in Bioassays“, in *Animal Cell Biotechnology*, Bd. 2095, R. Pörtner, Hrsg., in Methods in Molecular Biology, vol. 2095. , New York, NY: Springer US, 2020, S. 17–25. doi: 10.1007/978-1-0716-0191-4_2.

[19] D. Gao und J. K. Critser, „Mechanisms of cryoinjury in living cells“, *ILAR J.*, Bd. 41, Nr. 4, S. 187–196, 2000, doi: 10.1093/ilar.41.4.187.

[20] S. Schmitz, „Kryokonservierung und Langzeitlagerung von Zellen“, in *Der Experimentator: Zellkultur*, in Experimentator. , Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2020, S. 273–289. doi: 10.1007/978-3-662-58951-9_13.

[21] D. Whaley, K. Damyar, R. P. Witek, A. Mendoza, M. Alexander, und J. R. Lakey, „Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations“, *Cell Transplant.*, Bd. 30, S. 0963689721999617, Jan. 2021, doi: 10.1177/0963689721999617.

[22] T. Buhl, T. J. Legler, A. Rosenberger, A. Schardt, M. P. Schön, und H. A. Haenssle, „Controlled-rate freezer cryopreservation of highly concentrated peripheral blood mononuclear cells results in higher cell yields and superior autologous T-cell stimulation for dendritic cell-based immunotherapy“, *Cancer Immunol. Immunother.*, Bd. 61, Nr. 11, S. 2021–2031, Nov. 2012, doi: 10.1007/s00262-012-1262-0.

[23] Thermo Fisher Scientific, „Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1 °C Freezing Containers“, Gebrauchsanweisung 8-0404-28 0211, 2010. Zugegriffen: 21. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://documents.thermofisher.com/TFS-Assets/LCD/manuals/Nalgene-Mr-Frosty-EN-8-0404-28-0211.pdf

[24] J. Van Der Valk, „Fetal bovine serum (FBS): Past – present – future“, *ALTEX*, S. 99–118, 2018, doi: 10.14573/altex.1705101.

[25] FabianK, „Duchflusszytometer.png“. Zugegriffen: 28. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Duchflusszytometer.png

[26] T. L. Kirley und A. B. Norman, „Characterization and optimization of fluorescein isothiocyanate labeling of humanized h2E2 anti-cocaine mAb“, *Biochem. Biophys. Rep.*, Bd. 35, S. 101520, Sep. 2023, doi: 10.1016/j.bbrep.2023.101520.

[27] American Type Culture Collection, „Passage Number Effects in Cell Lines“, Technical Document TD-112021-v04, 2022. Zugegriffen: 28. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://www.atcc.org/-/media/resources/technical-documents/passage-number-effects-in-cell-lines.pdf

[28] N. Kosaka *u. a.*, „A Study of the Criteria for Selection of THP-1 Cells in the Human Cell Line Activation Test (h-CLAT): Results of 2nd Japanese Inter-laboratory Study“, *AATEX*, Bd. 13, Nr. 2, S. 55–62, 2008, doi: 10.11232/aatex.13.55.

[29] M.-V. Martikainen und M. Roponen, „Cryopreservation affected the levels of immune responses of PBMCs and antigen-presenting cells“, *Toxicol. In Vitro*, Bd. 67, S. 104918, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.tiv.2020.104918.

[30] F. Jantet-Blaudez, J. Ruiz, S. Gautheron, und A. Pagnon, „Evaluation of the viability and functionality of human peripheral blood mononuclear cells cryopreserved up to 2 years in animal-protein-free freezing media compared to the FBS-supplemented reference medium“, *Front. Immunol.*, Bd. 16, S. 1627973, Aug. 2025, doi: 10.3389/fimmu.2025.1627973.

[31] OMNI Life Science GmbH & Co. KG, „Zellzählung: Methoden ohne Färbung“. Zugegriffen: 2. September 2026. [Online]. Verfügbar unter: https://www.ols-bio.com/de/casy-s-technology

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Björn Schorle, versichere hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem o.a. formulierten Titel ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht veröffentlicht oder einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

KI-Nutzung

Für die sprachliche Überarbeitung, die Verbesserung von Formulierungen sowie die Strukturierung von Textpassagen wurde das KI-gestützte Sprachmodell Claude von Anthropic verwendet. Alle inhaltlichen Aussagen wurden eigenständig erarbeitet. Die Erhebung, Auswertung, Interpretation und Darstellung von Messdaten erfolgten ohne Einsatz von KI. Von der KI vorgeschlagene Formulierungen und Strukturierungen wurden kritisch geprüft und eigenverantwortlich überarbeitet.

Zur sprachlichen Überarbeitung, Verbesserung von Formulierungen sowie der Strukturierung von eigenständig verfassten Textpassagen wurde folgender Prompt verwendet: „Überprüfe den folgenden Text auf Rechtschreib- und Grammatikfehler und schlage Verbesserungen zur Klarheit und Verständlichkeit vor.“

Hamburg, den 30.09.2026

Anhang

Reactivity Check: Kulturmedium mit 5 % DMSO

Reactivity Check	MFI (Geo Mean)			corrected MFI		RFI (CD86)		RFI (CD54)	
KM5	CD86	CD54	Isotype	CD86	CD54	vs MC	vs SC	vs MC	vs SC
media control (MC)	18,86	11,06	6,83	12,03	4,23	100		100	
DMSO control (SC)	19,33	11,40	6,42	12,92	4,98		100		100
positive control (DNCB)	47,51	21,20	7,01	40,51	14,19		314		285
positive control (NiSO4)	21,95	35,25	5,75	16,20	29,51	135		697	
negative control (LA)	11,82	10,51	6,07	5,76	4,44	48		105	

Gemessene Vitalitäten im *Reactivity Check* (KM5)

Reactivity Check	viability [%]		
KM5	CD86	CD54	Isotype
media control (MC)	95,4	93,9	93,0
DMSO control (SC)	94,3	93,0	92,4
positive control (DNCB)	83,8	81,7	81,7
positive control (NiSO4)	70,4	67,0	67,8
negative control (LA)	92,5	91,1	91,3

Reactivity Check: Kulturmedium mit 10 % DMSO

Reactivity Check	MFI (Geo Mean)			corrected MFI		RFI (CD86)		RFI (CD54)	
KM10	CD86	CD54	isotype	CD86	CD54	vs MC	vs SC	vs MC	vs SC
media control (MC)	13,69	11,04	6,97	6,72	4,07	100		100	
DMSO control (SC)	14,82	11,36	6,89	7,93	4,47		100		100
positive control (DNCB)	28,33	18,08	7,14	21,18	10,94		267		245
positive control (NiSO4)	18,83	34,82	6,47	12,36	28,35	184		697	
negative control (LA)	11,63	10,74	6,48	5,14	4,25	77		104	

Gemessene Vitalitäten im *Reactivity Check* (KM10)

Reactivity Check	**viability [%]**		
KM10	**CD86**	**CD54**	**Isotype**
media control (MC)	94,2	93,5	93,9
DMSO control (SC)	94,5	93,5	94,1
positive control (DNCB)	82,4	84,1	84,4
positive control (NiSO4)	70,8	69,8	73,4
negative control (LA)	92,8	92,6	93,4

***Reactivity Check*: instaFREEZE mit 5 % DMSO**

Reactivity Check	**MFI (Geo Mean)**			**corrected MFI**		**RFI (CD86)**		**RFI (CD54)**	
instaFREEZE	**CD86**	**CD54**	**Isotype**	**CD86**	**CD54**	**vs MC**	**vs SC**	**vs MC**	**vs SC**
media control (MC)	21,63	12,50	7,03	14,60	5,47	100		100	
DMSO control (SC)	21,33	12,81	7,01	14,33	5,81		100		100
positive control (DNCB)	38,22	22,10	7,79	30,43	14,31		212		246
positive control (NiSO4)	33,63	46,19	6,38	27,25	39,82	187		728	
negative control (LA)	20,23	11,92	6,75	13,48	5,17	92		95	

Gemessene Vitalitäten im *Reactivity Check* (instaFREEZE)

Reactivity Check	**viability [%]**		
instaFREEZE	**CD86**	**CD54**	**Isotype**
media control (MC)	93,2	91,0	92,1
DMSO control (SC)	93,2	92,2	91,4
positive control (DNCB)	82,8	83,5	82,5
positive control (NiSO4)	71,5	69,6	72,6
negative control (LA)	90,3	90,0	91,8

***Reactivity Check*: CryoStor CS5**

Reactivity Check	MFI (Geo Mean)			corrected MFI		RFI (CD86)		RFI (CD54)	
CS5	CD86	CD54	Isotype	CD86	CD54	vs MC	vs SC	vs MC	vs SC
media control (MC)	16,63	11,88	6,89	9,74	4,99	100		100	
DMSO control (SC)	15,65	12,02	7,17	8,48	4,86		100		100
positive control (DNCB)	33,21	20,25	7,19	26,01	13,06		307		269
positive control (NiSO4)	21,05	40,72	6,82	14,23	33,90	146		680	
negative control (LA)	13,78	11,20	6,67	7,11	4,53	73		91	

Gemessene Vitalitäten im *Reactivity Check* (CS5)

Reactivity Check	viability [%]		
CS5	CD86	CD54	Isotype
media control (MC)	94,8	92,9	94,9
DMSO control (SC)	95,4	94,7	94,4
positive control (DNCB)	88,2	87,1	87,5
positive control (NiSO4)	75,9	73,1	74,3
negative control (LA)	92,8	92,2	92,9

***Reactivity Check*: CryoStor CS10**

Reactivity Check	MFI (Geo Mean)			corrected MFI		RFI (CD86)		RFI (CD54)	
CS10	CD86	CD54	isotype	CD86	CD54	vs MC	vs SC	vs MC	vs SC
media control (MC)	17,85	15,36	6,45	11,40	8,92	100		100	
DMSO control (SC)	19,19	15,48	6,25	12,93	9,23		100		100
positive control (DNCB)	22,46	21,12	6,70	15,76	14,43		122		156
positive control (NiSO4)	18,83	41,13	5,86	12,96	35,27	114		396	
negative control (LA)	14,28	14,80	6,31	7,97	8,48	70		95	

Gemessene Vitalitäten im *Reactivity Check* (CS10)

Reactivity Check	**viability [%]**		
CS10	**CD86**	**CD54**	**Isotype**
media control (MC)	80,8	79,9	82,7
DMSO control (SC)	82,8	80,3	81,4
positive control (DNCB)	75,4	71,9	73,6
positive control (NiSO4)	60,8	64,3	62,4
negative control (LA)	82,2	81,9	81,5