

Anpassung eines Monozyten-Aktivierungstests (MAT) für den Nachweis von Pyrogenen unter Verwendung von THP-1 Zellen

Master-Thesis im Masterstudiengang Pharmaceutical
Biotechnologie
Wintersemester 2018

Adrian Dittberner
Matrikelnummer: XXXXXXXXXX

14. Juni 2019

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Oliver Ullrich (HAW-Hamburg)
2. Gutachter: Frau Dr. Karen Hinsch (acCELLerate)

acCELLerate GmbH
Osterfeldstraße 12-14
22529 Hamburg



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Dr. Oliver Wehmeier und Herrn Dr. Alexander Loa der Firma acCELLerate GmbH für die Möglichkeit bedanken das vorliegende Thema bearbeiten zu können. Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Karen Hinsch für die Unterstützung bei der Bearbeitung dieser interessanten Thematik. Vielen Dank für die konstruktiven Besprechungen, das Vertrauen und die Möglichkeit einer selbstständigen Arbeitsweise.

Bedanken möchte ich mich auch beim gesamten Team von acCELLerate für den offenen Empfang und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die große Hilfsbereitschaft. Ganz besonders möchte ich Frau Verena Jörger für ihre Unterstützung und ihre gute Laune danken.

Auch bei Prof. Dr. Oliver Ullrich möchte ich mich für die Bereitschaft als Ansprechpartner zu dienen und die Zustimmung diese Thesis als Gutachter zu bewerten bedanken.



Inhalt

Abbildungen	III
Tabellen	V
Abkürzungen	VI
1 Einleitung	1
1.1 Lipopolysaccharide	2
1.1.1 Struktur	2
1.1.2 LPS Signaltransduktion	3
1.2 Lipoteichonsäure	6
1.3 Testmethoden für den Pyrogen-Nachweis	7
1.4 Differenzierung von THP-1 zu Makrophagen	12
1.5 Zielsetzung	14
2 Material	16
2.1 Verwendete Zelllinie	16
2.2 Medien, Lösungen und Chemikalien	16
2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
3 Methoden	22
3.1 Zellkultur	22
3.1.1 Auftauen von Zellen	23
3.1.2 Expansion und Erhaltung von Zellen	23
3.1.3 Kryokonservierung von Zellen	24
3.1.4 Zellzahlbestimmung mit dem CASY [®] Cell-Counter	25
3.1.5 Differenzierung von THP-1 Zellen zu Makrophagen und Ablösung	26
3.2 Durchflusszytometrie	28
3.2.1 Durchführung und Färbeprotokoll	30
3.3 Nachweis und Quantifizierung von Interleukin 6	31
3.4 Endotoxinnachweis mittels LAL-Test	34



4	Ergebnisse	35
4.1	Einfluss des Kunststoffmaterials	35
4.2	48 h Differenzierung	38
4.3	72 h Differenzierung	40
4.3.1	Ablösung mit TrypLE express	41
4.3.2	Einfluss des Endotoxingehalts im Medium	42
4.3.3	Ablösung mit EDTA und TrypLE express	43
4.3.4	Differenzierung auf einer Collagenbeschichtung	45
4.3.5	Ablösung mit TrypLE express im Vergleich zu einem Zellschaber .	47
4.3.6	Ablösung mit einem Zellschaber; Kryokonservierung	49
4.3.7	Inkubation mit Peptidoglycan und Endotoxin	51
4.4	72 h Differenzierung mit Ruhephase	53
4.4.1	Ablösung mit einem Zellschaber; erneute Kultivierung	53
4.4.2	Ablösung mit einem Zellschaber; Medienwechsel	57
4.4.3	Ruhephase nach dem Auftauen	60
4.4.4	Lipoteichonsäure	61
4.5	LAL-Test	62
5	Diskussion	65
5.1	Einfluss des Kunststoffmaterials	65
5.2	48 h Differenzierung	66
5.3	Einfluss des Endotoxingehalts im Medium	66
5.4	72 h Differenzierung	67
5.5	72 h Differenzierung mit Ruhephase	69
5.6	LAL-Test	72
6	Zusammenfassung	73
	Literatur	74



Abbildungen

1	Struktur von Lipopolysacchariden	3
2	Zellantworten auf LPS	5
3	Lipoteichonsäure	6
4	Etablierte Methoden für den Pyrogen-Nachweis	7
5	Gerinnungskaskade des Pfeilschwanzkrebses	9
6	Maskierungseffekte von LPS durch Chelatoren und Detergentien	11
7	THP-1 Zellen	22
8	Prinzip von Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung	28
9	Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers	29
10	Scatter-Plot einer Blutprobe	30
11	ELISA Layout für den Nachweis von Interleukin-6	33
12	Verdünnung von Lipopolysacchariden	33
13	Einfluss des Kunststoffmaterials - undifferenziert	36
14	Einfluss des Kunststoffmaterials - differenziert	37
15	Für 48 h differenzierte THP-1 Zellen	38
16	Differenzierungsstatus nach 48 h	39
17	IL-6 ELISA: 48h Differenzierung	40
18	Für 72 h differenzierte THP-1 Zellen	41
19	Differenzierungsstatus nach 72 h	42
20	IL-6 ELISA: Endotoxingehalt im Medium	43
21	Differenzierungsstatus: 72 h, EDTA & TrypLE	44
22	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, EDTA & TrypLE	45
23	Differenzierungsstatus: 72 h, Collagenbeschichtung	46
24	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Collagen beschichtet	46
25	Differenzierungsstatus: 72 h, TrypLE vgl. Zellschaber	48
26	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, TrypLE vs. Zellschaber	49
27	Differenzierungsstatus: 72 h, Zellschaber, kryokonserviert	50
28	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, kryokonserviert	51
29	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, Peptidoglycan	52



30	Für 72 h differenzierte THP-1 Zellen und 72 h Ruhephase	53
31	Differenzierungsstatus: 72 h, 72 h Ruhephase (mit Ablösung)	54
32	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (mit Ablösung)	56
33	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (mit Ablösung), kryokonserviert	57
34	Differenzierungsstatus: 72 h, 72 h Ruhephase (Medienwechsel)	58
35	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (Medien- wechsel), kryokonserviert	59
36	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (mit Ablösung oder Medienwechsel), kryokonserviert, 24 h Ruhephase	60
37	IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase, LTA . .	62
38	LAL-Test, Standardkurve	63



Tabellen

1	MAT-Varianten und ihre Vor- und Nachteile	12
2	Verwendete Zelllinie	16
3	Zusammensetzung des Zellkulturmediums der THP-1 Zellen	16
4	Lösungen und Chemikalien	17
5	Verwendete Kits	17
6	Eingesetzte Antikörper	18
7	Verwendete Geräte	19
8	Software	20
9	Verbrauchsmaterialien	21
10	Aussaatdichten von THP-1 Zellen	23
11	Eingesetzte Antikörper und deren Spezifität	31
12	Einfluss des Kunststoffmaterials: Wachstumsraten	35
13	LAL-Test: Wiederfindung von RSE	64



Abkürzungen

BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EU	Endotoxin Unit
FBS	Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HSA	Human Serum Albumin
IgG	Immunglobulin G
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LBP	LPS binding protein
LER	Low Endotoxin Recovery
LPS	Lipopolysaccharide
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PGN	Peptidoglycan
RPMI-1640	Zellkulturmedium, benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute
RSE	Reference Standard Endotoxin
TLR4	Toll-like receptor 4



1 Einleitung

Pharmazeutische Produkte sollten frei von Kontaminationen sein, um unerwünschte Nebenwirkungen bzw. Unverträglichkeiten zu minimieren. Dies gilt ganz besonders für parenteral (als Injektion oder Infusion) verabreichte Mittel. Kontaminationen können zum Beispiel aus Pyrogenen, den Fieber auslösenden Substanzen, bestehen. Endotoxine stellen als Bestandteil der Zellmembran gramnegativer Bakterien einen wichtigen Vertreter der Pyrogene dar. Sie begegnen uns überall, auch in Medizinprodukten, und sind starke Stimuli für das Immunsystem und andere Zelltypen (Erythrozyten, Endo- und Epithelzellen, dendritische Zellen und Zellen monozytischen Ursprungs) [1]. Obwohl Fieber ein natürlicher Abwehrmechanismus des Körpers gegen pathogene Organismen ist, birgt es gesundheitliche Risiken. Besonders wenn Pyrogene in die Blutbahn gelangen, kann eine überproportionale Reaktion des Immunsystems erfolgen (Sepsis, septischer Schock), welches mehrfaches Organversagen und den Tod zur Folge haben kann [2, 3]. Aus diesem Grund müssen pharmazeutische Produkte auf ihren Pyrogengehalt untersucht werden [4].

Lange Zeit waren der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)- und der Kaninchentest die Methoden der Wahl, wenn es um den Nachweis von Pyrogenen ging. Allerdings bleibt die Detektion beim LAL Test auf Endotoxine beschränkt, was nicht die gesamte Bandbreite von für Menschen pyrogen wirkender Substanzen abdeckt. Der Kaninchentest ist sehr aufwendig und erfordert Tierversuche. Eine Alternative stellt der Monozyten-Aktivierungstest (MAT) dar, welcher im Jahr 2010 der Europäischen Pharmakopöe hinzugefügt wurde. Diese Methode beruht auf humanen Monozyten, die bei Kontakt mit Pyrogenen mit der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen reagieren. Dieser Assay nutzt damit eben jene Zellen, die im menschlichen Körper auf Pyrogene ansprechen und deckt deshalb ein breites Spektrum ab. Neben Endotoxinen können dadurch auch andere Fieber auslösende Substanzen detektiert werden. [4, 5]. Seit der Einführung des MAT gingen Nebenwirkungen wie Rötungen und Ähnliches von parenteral verabreichten Medikamenten stark zurück, die vermutlich von NEP („not endotoxin pyrogen“), also anderen Pyrogenen als Endotoxinen, hervorgerufen wurden [5]. In dieser Arbeit der MAT durch die monozytische Zelllinie THP-1 etabliert.



1.1 Lipopolysaccharide

Bei Lipopolysacchariden (LPS, auch Endotoxin genannt) handelt es sich um pyrogene Moleküle, die in der äußeren Membranschicht gramnegativer Bakterien verankert sind. Dort dienen sie der Stabilität und dem Schutz vor einigen (lipophilen) Antibiotika [6]. Freigesetzt werden diese Moleküle als Bestandteil der Zellmembran vor allem beim Zelltod, aber auch während der Zellteilung [7]. LPS neigt zur Bildung von Aggregaten und trägt eine negative Nettoladung. Obwohl die Begriffe LPS und Endotoxin austauschbar sind, bezieht sich LPS vornehmlich auf das aufgereinigte Molekül, während Endotoxin meist den Bezug zur natürlich vorkommenden Form auf der Oberfläche von Bakterien herstellt [8].

1.1.1 Struktur

Lipopolysaccharide haben einen hydrophoben Teil, dem Lipid A, und einen hydrophilen Kern, bestehend aus Polysaccharidketten und der O-spezifischen Kette (siehe Abb. 1). Letztere setzen sich aus vielen Zuckern zusammen, deren Muster sich häufig wiederholen. Diese Muster variieren sehr stark und sind spezifisch für Bakterienstämme [9]. Die O-spezifische Kette schützt Bakterien vor Phagozyten [10]. Die Kern-Oligosaccharide weisen eine weniger starke Variation auf, sie sind bei großen Gruppen von Bakterien identisch [9]. Das Lipid A verankert das LPS in der hydrophoben Membran und ist das Fragment, welches mit den toxischen Eigenschaften des Moleküls assoziiert ist [7, 11, 12]. Es ist der Teil mit der geringsten Varianz, weshalb sehr viele gramnegativen Bakterien Lipid A mit der selben Struktur und Zusammensetzung tragen [9]. Allerdings hängt die Stärke der Immunantwort von der Struktur von Lipid A ab, besonders von der Anzahl und Länge von Acylketten, sowie der Ladung [13]. Das Lipid A von *Escherichia coli* stimuliert menschliche Zellen mit 6 Acylketten (mit einer Länge von 12 bis 14 Kohlenstoffatomen) maximal, während Lipid A mit 5 oder 4 Acylketten (z.B. von *Yersinia pestis*) kaum eine Antwort hervorrufen [13].

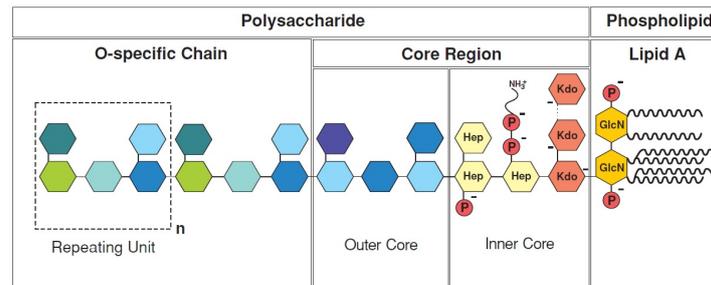


Abb. 1: Struktur von Lipopolysacchariden

Die Abbildung zeigt die schematische Struktur von Lipopolysacchariden (hier anhand von Enterobakterien). Das Molekül kann in drei funktionelle Einheiten eingeteilt werden. Das hydrophobe Lipid A fungiert als eine Art Anker in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien und ist das toxische Fragment. Der Kern und die O-spezifischen Ketten (mit bis zu 50 sich wiederholenden Einheiten - repeating units) setzen sich aus Polysacchariden zusammen und sind hydrophil [10]. Es handelt sich demnach um ein amphiphiles Molekül. Abkürzungen der Monosaccharidreste: GlcN, glucosamine; Kdo, 2-keto-3-deoxyoctulosonic acid (3-deoxy-D-manno-octulosonic acid); Hep, D-glycero-D-manno-heptose

Aus Alexander et al. "Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity" [10]

1.1.2 LPS Signaltransduktion

Für eine Stimulation von Säugetierzellen durch LPS sind viele Proteine und Interaktionen nötig [14]. Neben dem LPS bindenden Protein (LBP), CD14 (cluster of differentiation) und MD-2 (myeloid differentiation factor 2) ist der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) beteiligt [13, 14, 15, 16]. Die Bedeutung dieser Moleküle für die LPS-Detektion lässt sich bei Mäusen erkennen, bei denen je ein Gen, das für eins dieser Genprodukte codiert, ausgeschaltet wurde [13]. Durch den „knockout“ zeigten die genannten Mäuse keine Immunantwort auf LPS und auch die unterschiedlich starke Ausprägung von Immunantworten beim Menschen bedingt durch den Polymorphismus deutet auf die Relevanz der genannten Moleküle für eine Reaktion auf LPS hin [13].

CD14, MD-2 und TLR4 sind bei vielen Zelltypen zu finden, unter anderem bei dendritischen Zellen und Makrophagen [13]. Ein Schema der Signaltransduktion ist in Abbildung 2 dargestellt. LBP interagiert mit LPS an der Membran gramnegativer Bakterien oder direkt mit freien LPS-Aggregaten und transportiert LPS-Monomere zum extrazellulären CD14, das entweder als lösliche Form oder mittels Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in



der Zellmembran verankert vorkommt [13, 16, 17]. Gelöstes CD14 ermöglicht es auch Zellen, die dieses Molekül nicht exprimieren, auf LPS zu reagieren, wie beispielsweise Epithel- und Endothelzellen [18]. CD14 überführt das gebundene LPS an MD-2, welches sich in einem Komplex mit TLR4 befindet [17]. Diese Bindung verursacht eine Dimerisation von TLR4/MD-2 und über die Adapterproteine MyD88 und TIRAP, sowie Serin/Threoninkinasen der IRAK Familie unter anderem die Aktivierung von NF- κ B (nuclear factor) [17, 18]. Dieser Transkriptionsfaktor führt zu einer erhöhten Produktion von Zytokinen, unter anderem des pro-inflammatorischen TNF- α (Tumor necrosis factor) und IL-6 (Interleukin 6) [17, 18]. CD14 initiiert eine Endozytose des Komplexes, was über die Adapterproteine TRAM und TRIF zu einer Produktion von Interferonen führt [17, 18].

Die Tatsache, dass ein Mangel an CD14 die Signaltransduktion über MyD88 und TRIF nicht im gleichen Maße beeinträchtigt, deutet darauf hin, dass CD14 mehr Funktionen hat als nur gebundenes LPS an den TLR4/MD-2 Komplex zu liefern [18]. Fehlt CD14, findet keine Endozytose statt, sodass der Signalweg über TRIF nicht erfolgen kann, weshalb keine Interferone produziert werden [19, 20]. Im Gegensatz dazu kann die Signaltransduktion über MyD88 auch erfolgen, wenn CD14 nicht vorhanden ist, sofern eine hohe LPS-Konzentration vorliegt [19, 20]. Die CD14-abhängige Endozytose findet auch bei Zellen statt, bei denen die Signalwege über MyD88 und TRIF nicht funktionsfähig sind, was zeigt, dass CD14 eine von TLR4 unabhängige Zellantwort auf LPS kontrolliert (siehe Abbildung 2) [18]. Welche Proteine und andere Moleküle über TLR4 hinaus mittels dieser Endozytose internalisiert werden, muss allerdings noch geklärt werden [18].

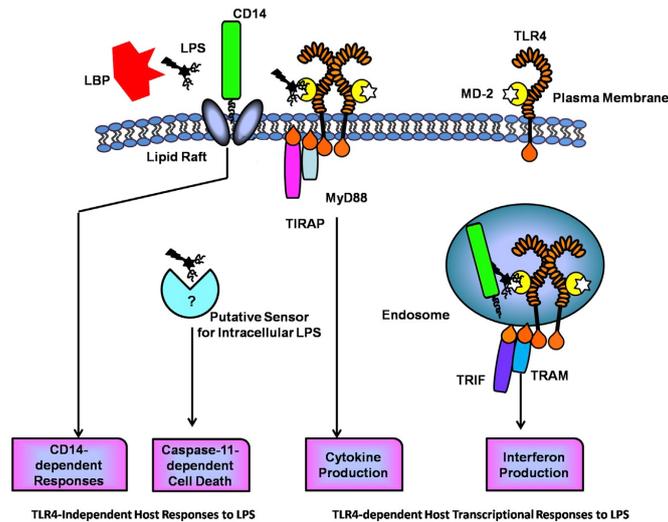


Abb. 2: Zellantworten auf LPS

Die Abbildung stellt schematisch die Zellantworten auf LPS dar. Makrophagen können LPS sowohl in der extrazellulären Matrix, als auch im Zytosol detektieren. Ersteres erfolgt über die Bindung von LBP (LPS binding protein) an LPS, die Übertragung an CD14, welches LPS seinerseits an einen Komplex aus TLR4 (toll-like receptor 4) und MD-2 (myeloid differentiation factor 2) weiterreicht und nach einer Dimerisation von TLR4/MD-2 eine Endozytose vermittelt. TLR4 initiiert eine transkriptionale Antwort über zwei Signalwege. Zum einen über die beiden Adapterproteine TIRAP und MyD88, was zur Produktion von Zytokinen wie Interleukin-6 führt und zum Anderen über TRAM und TRIF, was eine Interferon Produktion nach sich zieht. Darüber hinaus löst CD14 eine von TLR4 unabhängige Endozytose aus. Des Weiteren induziert ein bisher unbekannter intrazellulärer LPS-Rezeptor eine Caspase-11 abhängige Antwort auf LPS.

Verändert nach Tan et al. "A Cross-Disciplinary Perspective on the Innate Immune Responses to Bacterial Lipopolysaccharide" [18]

Neben Signalwegen, die von CD14 und/oder TLR4 abhängig sind, aktiviert intrazelluläres LPS das Enzym Caspase 11 (bei Mäusen) bzw. Caspase 4 und 5 beim Menschen, welche Pyroptose (inflammatorischer Zelltod) initiiert, sowie bei einer hohen LPS-Konzentration zum septischen Schock führen kann [18, 21, 22]. Auch die Tatsache, dass Mäuse, denen Caspase 11 fehlt, gegen eine durch LPS verursachte Sepsis resistent sind, deutet an, dass dieses Enzym bei der Wirtsantwort auf LPS eine Rolle spielt [18]. Caspase 11 bei Mäusen und Caspase 4 und 5 beim Menschen dienen als intrazellulärer LPS-Rezeptor und eine Bindung von LPS führt neben Pyroptose zu Ausschüttung von Interleukin 1α , weshalb diese Enzyme bei der Entstehung eines endotoxischen Schocks beteiligt sind [22, 23].



1.2 Lipoteichonsäure

Bei Lipoteichonsäure (LTA) handelt es sich als Adhäsionsmolekül um einen Bestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien, die sich hauptsächlich aus Peptidoglycan zusammensetzt (siehe Abbildung 3). LTA ist über Glykolipide in der Zellmembran verankert und kann in vielen grampositiven Bakterien gefunden werden [24]. Dieses amphiphile Molekül wird durch die Lyse mittels Lysozym oder Beta-Lactam-Antibiotika freigesetzt und kann in hohen Konzentrationen einen septischen Schock auslösen [24, 25]. LTA kann spezifisch an CD14 binden und löst über TLR2 die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren (unter anderem IL-1, IL-6 und TNF- α) in mononukleären Zellen wie Monozyten bzw. Makrophagen aus [24, 25].

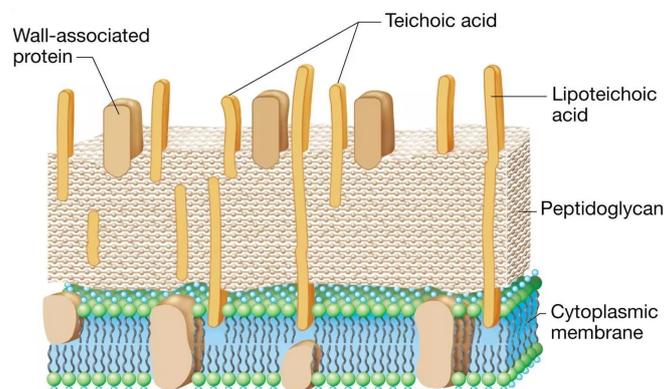


Abb. 3: Lipoteichonsäure

Schematischer Aufbau der Zellwand grampositiver Bakterien mit der Zellmembran und der Peptidoglycanschicht. Lipoteichonsäure ist ein Adhäsionsmolekül, durchspannt die Peptidoglycanschicht und ist in der Zellmembran verankert.

<https://i1.wp.com/microbeonline.com/wp-content/uploads/2013/04/Gram-positive-cell-wall.jpg>



1.3 Testmethoden für den Pyrogen-Nachweis

Pyrogene lassen sich mit drei etablierten Methoden nachweisen, welche in Abbildung 4 historisch eingeordnet sind. Zunächst wurde 1912 ein Test entwickelt, der auf dem Einsatz von Kaninchen beruhte. Eine Alternative wurde 1956 in Form des LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat) Testes entwickelt. 1995 kam mit dem Monozyten Aktivierungstest eine weitere Methode dazu, während es 2001 gelang Faktor C, der die Schlüsselrolle der LAL-Reaktion spielt, rekombinant herzustellen.

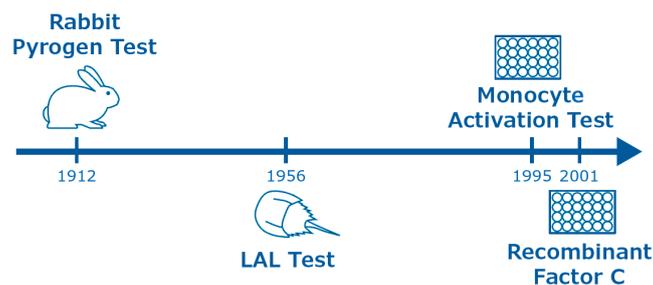


Abb. 4: Etablierte Methoden für den Pyrogen-Nachweis

Der erste Rabbit Pyrogen Test (RPT) wurde 1912 entwickelt, ein alternativer Nachweis ergab sich 1956 mit dem LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat). 1995 kam mit dem Monozyten Aktivierungstest eine weitere Methode dazu. 2001 gelang es eine rekombinante Variante des Faktor C, der die Schlüsselrolle beim LAL Test spielt, einzusetzen.

Aus „White Paper - Monozyten Aktivierungstest“ von Merck, Version 2 vom Dezember 2017 [26]

Rabbit Pyrogen Test (RPT)

Der älteste Test ist der Rabbit Pyrogen Test (RPT). Dabei wird pro Test drei Kaninchen die zu testende Probe mit bis zu 10 ml kg^{-1} intravenös injiziert und ein möglicher Anstieg der Körpertemperatur über einen Zeitraum von drei Stunden gemessen [26]. Liegt die Summe der Temperaturänderung unter $1,15 \text{ }^\circ\text{C}$ gilt der Test als bestanden, während ab einer Änderung von $2,65 \text{ }^\circ\text{C}$ Pyrogene vorhanden sind [26]. Bei einem Wert zwischen den beiden genannten, muss der Test wiederholt werden [26]. Der RPT hat den Vorteil, dass neben Endotoxin auch andere Pyrogene detektiert werden [5, 26, 27]. Neben dem hohen Verbrauch an Versuchstieren und den daraus resultierenden ethischen Probleme und hohe Kosten, weist der Pyrogennachweis mit Kaninchen folgende weitere Nachteile auf. Die Sensitivität ist mit einem Wert von $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$ (EU: Endotoxin Unit) für



Endotoxin recht niedrig [5, 26]. Zudem handelt es sich um einen qualitativen Nachweis, weshalb eine Quantifizierung von Pyrogenen nicht möglich ist [5, 26]. Darüber hinaus ist der Test anfällig, da er auf der physiologischen Reaktion von Versuchstieren beruht und die Ergebnisse verfälscht werden können, wenn die Tiere Stress haben [26]. Zudem können Pharmazeutika wie Chemoterapeutika, Immunsuppressiva, Zytokine, Analgetika oder menschliche zelluläre Produkte mit dem RPT nicht getestet werden, weil diese die Fieberreaktion beeinflussen können [5, 26]. Auch wenn mit dem Rabbit Pyrogen Test neben Endotoxinen ebenso andere Pyrogene detektiert werden, ist der Test in einigen Fällen negativ, obwohl das Medikament eine pyrogene Wirkung im Menschen haben kann [5].

Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test

Der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) Test basiert auf der Aktivierung einer Gerinnungskaskade des Pfeilschwanzkrebse (*Limulus polyphemus*) durch LPS [28]. Die Bedeutung dieser Methode zeigt sich daran, dass 2014 etwa 90% der Endotoxin-Nachweise mittels LAL Test erfolgten [29]. Entwickelt wurde dieser Assay 1970 von Levin et al. nach der Beobachtung von Fred Bang 1956, dass die Hämolymphe von Pfeilschwanzkrebsen zu einem Gel gerinnt, wenn es gramnegativen Bakterien oder deren Lysat ausgesetzt ist [26, 28]. Die Hämolymphe dieser Krebsart beinhaltet lediglich eine Zellart, die Amöbozyten. In Abbildung 5 ist die Kaskade schematisch dargestellt. An der Zelloberfläche der Amöbozyten wird Faktor C durch eine Bindung von LPS aktiviert und Gram-negative Bakterien detektiert [3]. Es folgt eine Aktivierung von Faktor B. Dieser wandelt das für die Gerinnung zuständige Proenzym in die aktive Variante um. Das Gerinnungsenzym setzt das lösliche Protein Coagulogen zu Coagulin um, was zu einer Gelbildung führt [3]. Den LAL Test gibt es in drei Varianten. Bei der ersten Methode, dem Geltest, handelt es sich um eine quantitative Messung, da die Bildung eines Gels bei der Anwesenheit von LPS das Testkriterium ist. Die zweite Variante ist die kinetische, bei der die Turbidimetrie gemessen wird, die bei der Gerinnung entsteht. Je schneller die Reaktion abläuft, desto mehr LPS ist in der Probe vorhanden, weshalb eine Quantifizierung möglich ist. Bei der chromogenen Methode setzt das Gerinnungsenzym eine chromogene Substanz um, was zu



einem Farbumschlag führt. Die Endpunktmessung der OD erlaubt eine Quantifizierung, da eine intensivere Färbung auf eine erhöhte LPS-Konzentration zurück geht. Mit dem Geltest lässt sich LPS mit einer Sensitivität von $0,03 \text{ EU ml}^{-1}$ nachweisen, die beiden anderen Methoden weisen eine Sensitivität von $0,01 \text{ EU ml}^{-1}$ auf. Eine Endotoxin-Einheit (EU - endotoxin unit) entspricht dabei $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ an Lipopolysacchariden.

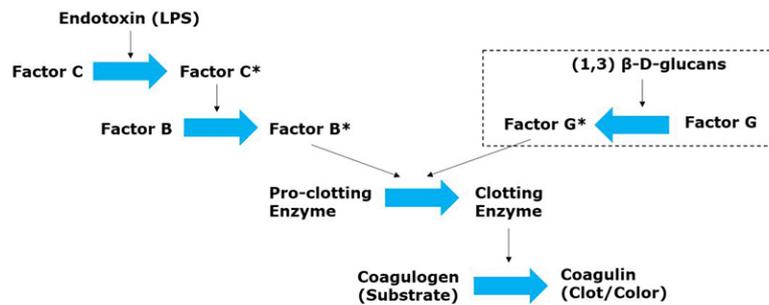


Abb. 5: Gerinnungskaskade des Pfeilschwanzkrebses

LPS aktiviert den Faktor C (dargestellt durch den Stern *), was wiederum zu einer Aktivierung von Faktor B führt. Dieser wandelt das für die Gerinnung zuständige Proenzym in die aktive Variante um. Das Gerinnungsenzym setzt Coagulogen zu Coagulin um, was zu einer Gelbildung führt. Handelt es sich um einen colorimetrischen Test, setzt das Enzym eine chromogene Substanz um. Das Proenzym kann auch durch andere Stoffe wie β Glukane aktiviert werden.

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/stem-cell-biology/lal-assay.jpg> 03.05.19

Auch wenn der LAL Test den Vorteil einer hohen Sensitivität hat und auch gut durchführbar ist, weist er doch einige Nachteile auf. Zum einen wird Pfeilschwanzkrebsen Hämolyse entnommen, der Test ist also von dem Gebrauch von Tieren abhängig, wenn auch in geringerem Maße als beim RPT. Zum anderen ist die Pyrogendetektion auf Lipopolysaccharide beschränkt [30]. Darüber hinaus löst auch (1,3)- β -Glukan ein positives Ergebnis aus (siehe Abbildung 5) [3, 30, 31]. (1,3)- β -Glukan ist nicht pyrogen und kommt in Pilzen, Hefen, aber auch in Cellulose vor, weshalb eine Kontamination mit Glukanen aus Cellulosemembranen einerseits zu einem falsch positiven Ergebnis und andererseits zu einer erhöhten Reaktivität gegenüber LPS führen kann [30, 32]. Des Weiteren ist der Einsatz dieses Testes bei Serum und Blutproben schwierig, da Proteine wie HDL (high density lipoprotein) und HSA (human serum albumin) an LPS binden und dieses somit bis eine Sättigung erreicht ist maskieren können [3, 30, 33]. Obwohl die



Bindung von Albumin an LPS bei mononuklearen Zellen zu einer erhöhten Sekretion von Zytokinen führt, wird die LAL-Reaktivität dadurch geschwächt [34]. Daraus wird deutlich, dass der LAL Test unterschiedlich auf LPS reagiert, als das humane Immunsystem [3].

Ein anderes großes Problem, das den Pyrogenanachweis mittels LAL Test betrifft, ist die sogenannte Low Endotoxin Recovery (LER). Eine LER liegt vor, wenn weniger als 50% Endotoxin in der Probe wiedergefunden wird, der vorher LPS zugesetzt wurde und ist von verschiedenen Faktoren wie Lagertemperatur, Pufferzusammensetzung, Herkunft der Endotoxine (z.B. Bakterienstamm) und der Zeit abhängig [8, 12]. Dieses Phänomen kann in Anwesenheit von chelatbildenden Verbindungen und Tensiden bzw. Detergentien auftreten [8, 12]. Lipopolysaccharide bilden als amphiphile Moleküle häufig Aggregate in wässriger Umgebung in Form von Mizellen oder Vesikeln, wobei die negativen Ladungen, die an den Phosphatgruppen lokalisiert sind, durch divalente Kationen stabilisiert werden (Abbildung 6). Chelatoren schwächen diese Aggregate, indem sie die genannten Ionen komplexieren [8]. Nun können Detergentien interkalieren und die Aggregate aufbrechen, was zur Freisetzung von LPS-Monomeren führt [8]. Faktor C der Gerinnungskaskade kann von LPS-Monomeren nicht aktiviert werden, weshalb eine Detektion mit dem LAL-Test nicht möglich ist [8]. LER betrifft neben Endotoxinen aus natürlichen Vorkommen auch synthetisches LPS. Beides kann maskiert nicht vom Faktor C gebunden werden, was einen Nachweis mit dem LAL Test nicht möglich macht, obwohl primäre Monozyten auf den Kontakt mit der Expression proinflammatorischer Zytokine auch bei geringen Konzentrationen reagieren [8]. Demnach ist davon auszugehen, dass maskierte LPS eine Immunantwort hervorrufen, obwohl ein LAL Test negativ ausfallen würde [8].

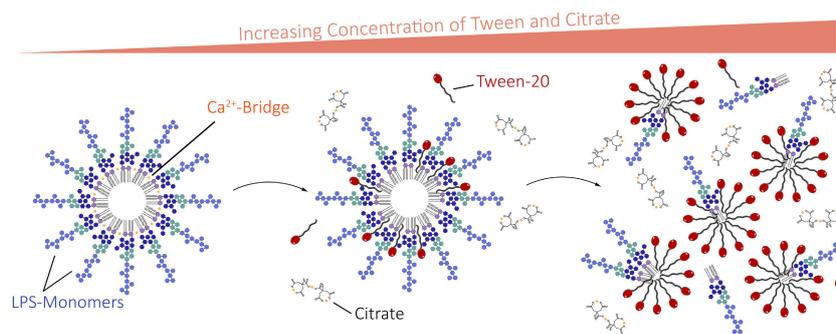


Abb. 6: Maskierungseffekte von LPS durch Chelatoren und Detergentien

Dargestellt sind Maskierungseffekte von LPS durch chelatbildende Verbindungen (hier Citrat) und Detergentien (hier Tween-20). In wässrigen Lösungen formen LPS-Monomere Aggregate wie Mizellen oder Vesikel, wobei die negativen Ladungen an den Phosphatgruppen durch divalente Kationen (hier Ca^{2-}) stabilisiert werden. Chelatoren können diese Ionen aus den Aggregaten entfernen und diese damit destabilisieren. Detergentien wie Tween-20 können nun interkalieren und die Aggregate aufbrechen, sodass LPS-Monomere vorliegen.

Aus Schwarz et al. „Biological activity of masked endotoxin“[8]

Monozyten-Aktivierungstest (MAT)

Der Monozyten-Aktivierungstest (MAT) basiert auf der Bildung von pro-inflammatorischen Zytokinen durch Monozyten bei Kontakt mit Pyrogenen. Dieser Test setzt demnach auf eben jene Zellen, die im menschlichen Organismus für die Auslösung von Fieber (die pyrogene Reaktion) verantwortlich sind und bildet damit die Fieberreaktion (siehe Kapitel 1.1.2) *in vitro* nach [4]. Im Jahr 2010 wurde er als MAT in die Europäische Pharmakopöe aufgenommen und detektiert neben LPS auch andere für den Menschen pyrogene Stoffe, da humane Zellen eingesetzt werden [4, 5]. Es gibt verschiedene Test, die sich in der Herkunft der Monozyten unterscheiden. Zum einen kann menschliches Vollblut verwendet werden, zum anderen können isolierte primäre Monozyten (z.B. mononukleäre Zellen des peripheren Blutes - PBMC Peripheral blood mononuclear cell) zum Einsatz kommen. Bei der dritten Variante handelt es sich um eine monozytische Zelllinie wie MM6 (MONO MAC6) oder THP-1 [5]. Auch bei der Wahl des Zytokins, das quantifiziert wird gibt es verschiedene Möglichkeiten. Gängig ist der Nachweis von $\text{IL-1}\beta$ (Interleukin 1β), $\text{TNF-}\alpha$ (Tumor-Nekrose-Faktor) und IL-6 (Interleukin 6). Tabelle 1 listet die Vor- und Nachteile der verschieden MAT-Varianten auf.



Tab. 1: MAT-Varianten und ihre Vor- und Nachteile. Nach „White Paper - Monozyten Aktivierungstest“ von Merck [26]

	Vollblut	PBMC	Zelllinie
Sensitivität	0,25 EU/ml	0,01 EU/ml	0,05 EU/ml (MM6)
Vorteile	physiologische Reaktion, da Monozyten in natürlicher Umgebung	Sensitivität	Sensitivität robust, da keine Variabilität durch verschiedene Spender kein Blutprodukt
Nachteile	Blutprodukt Variabilität (Schwankungen zwischen Lots) Verfügbarkeit von Blutspenden abhängig	komplexe Produktion, damit erschwerte Verfügbarkeit Variabilität durch verschiedene Spender Blutprodukt	Monozyten nicht in physiologischer Umgebung

Vorteile gegenüber dem LAL-Test weist der MAT beim Test von Serum und Blutproben auf, da die beschriebene Maskierung durch HSA (Human Serum Albumin) nur für den LAL-Test gilt und der MAT Assay nicht von der Interaktion zwischen LPS und HSA beeinflusst wird [3, 30]. Auch bei der Untersuchung von Serum für den Einsatz in der Zellkultur hinsichtlich des Endotoxingehaltes scheint der MAT Vorteile gegenüber dem LAL-Test zu haben [31]. Darüber hinaus wird der MAT von dem größten Problem des LAL-Testes, der LER (Low Endotoxin Recovery) (unter vorherigem Unterpunkt beschrieben) nicht beeinflusst [8]. So induziert maskiertes LPS auch in geringer Konzentration eine Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, was auch das pyrogene Potential und damit die potentielle Gefahr von maskiertem LPS aufzeigt [8].

1.4 Differenzierung von THP-1 zu Makrophagen

Bei THP-1 handelt es sich um eine monozytische Zelllinie, die aus einem Patienten mit Leukämie isoliert und etabliert wurde [35]. THP-1 lassen sich durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) differenzieren und weisen phänotypische und funktionelle Charakteristiken auf, die denen von primären Makrophagen stark ähneln [36]. Sie ist deshalb die am häufigsten eingesetzte Zelllinie, um die Funktion menschlicher primärer Makrophagen zu untersuchen, besonders die Reaktion auf pro-inflammatorischer Stimuli [36]. Wie primäre Makrophagen reagieren differenzierte THP-1 Makrophagen auf eine



Stimulation mit pro-inflammatorischen Signalen wie LPS mit der Sekretion einer Reihe von pro-inflammatorischer Mediatoren [36, 37]. Auch wenn die Genexpression durch Stimulation mit LPS bei undifferenzierten und differenzierten THP-1 Zellen ähnlich ist, werden durch THP-1 Makrophagen deutlich mehr Zytokine sekretiert als durch Monozyten [38]. Im Zuge der Differenzierung werden die Zellen adhären, exprimieren Marker, die typisch für Makrophagen sind und weisen eine erhöhte Fähigkeit zur Phagozytose auf [36]. Die Konzentration von PMA spielt eine wichtige Rolle. Wird eine hohe Konzentration für die Differenzierung verwendet, ist die Reaktion auf LPS deutlich erhöht [36]. Allerdings führt die Exposition mit einer hohen PMA Konzentration auch dazu, dass die Genexpression pro-inflammatorischer Gene in Abwesenheit von LPS hoch reguliert wird, was eine Stimulation unter Umständen maskieren könnte [36, 39]. Darüber hinaus sind mit einer hohen PMA Konzentration differenzierte Zellen sehr anfällig bei Exposition mit LPS abzusterben, während Zellen, die mit einer geringeren Konzentration differenziert wurden robuster sind [40]. Außerdem sekretieren THP-1 Makrophagen bei geringer PMA Konzentration ähnlich viel Zytokine wie humane MDM („Monocyte Derived Macrophages“) [40]. Wird eine Ruhephase ohne PMA an die Differenzierung angeschlossen, erhöht sich die Expression von für Makrophagen typischen Markern [38]. Um auf eine erfolgreiche Differenzierung zu testen, können die Oberflächenmarker CD14 und CD11b verwendet werden [38]. Bei CD11b handelt es sich um Integrin α -M, das mit Integrin β -2 einen Proteinkomplex bildet, der bei der Zelladhäsion beteiligt ist. CD14 ist ein Protein, das als Co-Rezeptor neben dem TLR4 und MD-2 bei der Detektion von LPS mitwirkt.



1.5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen Monozyten-Aktivierungstest (MAT) für den Nachweis von Pyrogenen anzupassen. Dazu sollten THP-1 Zellen, eine humane, monozytische Zelllinie, differenziert werden, sodass sie in ihren Eigenschaften Makrophagen ähneln und für den Test eingesetzt werden können. Es konnte zu Beginn der Arbeit auf bereits bestehende Protokolle für die Differenzierung mit PMA und für die Inkubation mit Lipopolysacchariden und anschließender Auslesung des gebildeten Interleukin 6 aufgebaut werden. Auch auf den Nachweis des Differenzierungsstatus mit Hilfe des Durchflusszytometers konnte zurück gegriffen werden.

Es galt Differenzierungsbedingungen zu finden und zu etablieren, die zu einer möglichst starken Reaktion der differenzierten Makrophagen in Form von einer hohen Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine führen, insbesondere von IL-6, da dieses Interleukin als Readout verwendet wurde. Als Parameter wurden einerseits die Dauer der Differenzierung und andererseits eine Ruhephase im Anschluss an die Differenzierung untersucht. Neben LPS aus *E. coli* 055:B5 sollte der internationale Standard für Endotoxine (RSE - „Reference Standard Endotoxin“) eine Sekretion von IL-6 seitens der Makrophagen initiieren. Ein entscheidender Vorteil eines MAT ist der Nachweis eines breiten Pyrogenspektrums über Endotoxine hinaus. Um dieses Spektrum darzustellen, sollte auch ein anderes Pyrogen, wie Lipoteichonsäure aus grampositiven Bakterien, zu einer Ausschüttung von Zytokinen bei Kontakt mit differenzierten THP-1 Zellen führen. Da ein Kit entwickelt werden soll, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit den Differenzierungsstatus und die Sekretion von Zytokinen kryokonservierter Zellen mit denen frischer zu vergleichen und zu optimieren. Die kryokonservierten Zellen sollten wie ein Reagenz einsetzbar sein, demnach ihre Funktionalität unmittelbar nach dem Auftauen aufweisen, ohne dass eine Kultivierung im Vorfeld notwendig ist. Diese sogenannten „Assay Ready Cells“ haben den Vorteil, dass sie sehr flexibel eingesetzt werden können ohne eine aufwendige Zellkultur etablieren zu müssen. So können Experimente einfacher geplant und durchgeführt werden, da „Assay Ready Cells“ einfach zu handhaben sind. Zudem kann eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden, da kontrollierte Kultivierungsbedingungen herrschen und



viele Vials derselben Charge kryokonserviert gelagert werden können. Mit „Assay Ready Cells“ kann der geforderte Assay direkt durchgeführt werden ohne die Zellen vorher zu expandieren oder zu passagieren.

Weiterhin galt es die Ablösung von differenzierten Zellen zu verbessern, um eine hohe Ausbeute zu erzielen. Um Zellen in einem größeren Maßstab zur Verfügung zu haben, sollte die Produktion ebenfalls angepasst werden. Zusätzlich musste eine vergleichbare Sensitivität des Assays zu bereits auf dem Markt befindlichen Methoden für den Pyrogennachweis erreicht werden ($0,05 \text{ EU ml}^{-1}$).



2 Material

2.1 Verwendete Zelllinie

Tab. 2: Verwendete Zelllinie

Bezeichnung	Interne Lotnummer
THP-1	92-180514JP01 (ID40)

2.2 Medien, Lösungen und Chemikalien

Tab. 3: Zusammensetzung des Zellkulturmediums der THP-1 Zellen

Medium	Zusätze	Hersteller & Bestellnr.
RPMI 1640		Sigma, R0883-500ML
	+ 10 % FBS Sera Pro, low Endotoxin (FBS)	PAN-Biotech, P30-5500 Corning, 35079CV, Lot 35079002)
	+ 2 mM L-Glutamin	PAN-Biotech, P04-80100
	+ 10 mM HEPES	PAN-Biotech, P05-01100
	+ 1 mM Natriumpyruvat	Sigma, S8636-100ML
	+ 50 μ M β -Mercaptoethanol	AppliChem, A4338 0100

**Tab. 4:** Lösungen und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller & Bestellnr.
BSA	Sigma, 05479-50G
Collagen I, Rat Tail	Enzo, ALX-522-435-0100
Coulter Clenz Cleaning Agent	Beckman Coulter, 8448222
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, D4540
Dulbecco´s Phosphatpuffer (PBS)	Sigma-Aldrich, D8537
EDTA	AppliChem, A2937
Essigsäure	AppliChem, A0820
	Sigma, 45754-500ML-F
IsoFlow™ Sheath Fluid	Beckman Coulter, 8546859
TrypLE express	Life Technologies, A12177-01
Tween 20	Sigma, P7949-100ML
Zellkulturwasser	PAN, P04-991500
Lipopolysaccharide <i>E. coli</i> 055:B5	Sigma, L6529-1MG, Lot: 28M4138V
Lipoteichonsäure	InvivoGen, tlrl-lta
Peptidoglycan	InvivoGen, tlrl-ksspgn
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Acros Organics, 356150010
Reference Standard Endotoxin (RSE)	USP,1235503, Lot: H0K354

Tab. 5: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller & Bestellnr.
Chromogenic Endotoxin Quant Kit	Pierce, A39552S
IL-6 Human uncoated ELISA Kit	Thermo Fischer, 88-7066-88

**Tab. 6:** Eingesetzte Antikörper

Bezeichnung	Hersteller & Bestellnr.
CD11b-FITC, rekombinant, Human IgG1	Miltenyi Biotec, 130-110-610
CD14-FITC, rekombinant, Human IgG1	Miltenyi Biotec, 130-110-576
CD281, Mouse IgG1	Thermo Fisher, 14-9911-80
Anti-Mouse-FITC, Goat IgG	Dianova, 115-095-003
CD284-Alexa Fluor 488, Mouse IgG2	Thermo Fisher, 53-9917-41
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, 130-059-901



2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	V150	Systec
Barcodedrucker	CL-S631	Citizen
Durchflusszytometer	Cytomics FC500	Beckman Coulter
Fluoreszenzmikroskop	CKX41	Olympus
Inkubatoren	Heracell 150	Heraeus
	Forma Series II	Water Jacket
	Reach-In CO2 Inkubator	Thermo Scientific
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikroskopkamera	Mikrocam 1.3MP	Bresser
Sterilwerkbank	Herasafe	Heraeus
Wasserbad	Typ 1003	GFL
Zellzählgerät	CASY [®] -TT	Schärfe System, mittlerweile Roche
Zentrifuge	GPKR	Beckman
Stickstofftank	Chronos	Messer
Ultraschallbad	Sonorex RK100H	Bandelin
Mikroplate reader	Safire2	Tecan

**Tab. 8:** Software

Software	Entwickler
BarTender UltraLite	Seagull Scientific
CXP Analysis, Version 2.2	Beckman Coulter
CXP Cytometer, Version 2.2	Beckman Coulter
MicroCamLab, Version 7.3.1.8	Bresser
GraphPad Prism, Version 6	GraphPad Software
MS Office Paket	Microsoft Corporation



Tab. 9: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller & Bestellnr.
Serologische Pipetten:	
1 mL	Sarstedt, 861251001
2 mL	Sarstedt, 861252001
5 mL	Sarstedt, 861253001
10 mL	Sarstedt, 861254001
25 mL	Sarstedt, 861685001
50 mL	Sarstedt, 861689001
Zellkulturgefäße:	
T25 Flask	Sarstedt, 833910002
T75 Flask	Sarstedt, 833911002
T175 Flask	Sarstedt, 833912002
Square dish	Corning, 431110
96-Well Plate (TC)	Eppendorf, 0030730135
Zentrifugengefäße:	
50mL	Sarstedt, 62547254
15mL	Sarstedt, 62554502
Cryotube 1,8 ml	Thermo Scientific, 377267
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, 72706400
Pipettenspitzen:	
50 - 1.250 µl	Sarstedt, 701186100
2 - 200 µl	Sarstedt, 70760502
0,1 - 20 µl	Sarstedt, 701114100
Zellschaber	Sarstedt, 831831



3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen fanden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank der Klasse 2 statt, um Kontaminationen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Ein Zusatz von Antibiotika erfolgte nicht. Die Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie, sowie der verwendete ELISA wurden nicht steril durchgeführt.

Bei THP-1 Zellen handelt es sich um Monozyten, die aus einem einjährigen Jungen, der an akuter monozytischer Leukämie litt, isoliert und als Zelllinie etabliert wurden [35]. THP-1 Zellen haben die Eigenschaften monozytischer Zellen behalten, weshalb sie Suspensionszellen sind und eine runde Morphologie aufweisen (Abb. 7).

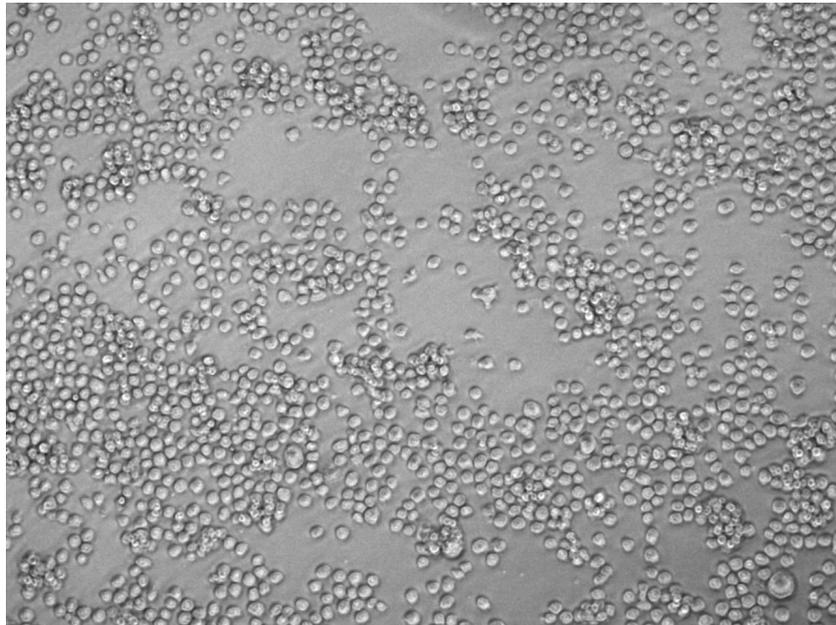


Abb. 7: THP-1 Zellen

Diese Abbildung zeigt THP-1 Zellen in einer 96-Well-Platte. Als Monozyten und damit Suspensionszellen zeigen sie eine typische runde Morphologie. Das Bild wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.



3.1.1 Auftauen von Zellen

Die Lagerung von Zellen erfolgte im eingefrorenen Zustand bei unter -150 °C in der Gasphase über flüssigem Stickstoff. Um mit einer Kultivierung beginnen zu können, mussten die Zellen zunächst aufgetaut werden. Da kryokonservierte Zellen sehr empfindlich sind, wurden sie bis zum Auftauen auf Trockeneis gelagert. Um eine hohe Vitalität zu erreichen, sollte der Auftauvorgang möglichst schnell abgeschlossen sein, weshalb das Cryovial, in dem sich die Zellen befanden, für 2 Minuten in ein Wasserbad bei 37 °C gestellt wurde. Nach der Überführung unter die Sterilwerkbank, wurde die Zellsuspension (1,8 ml) mit einer Pipette aufgenommen und zu 8 ml vorgewärmten Medium in ein Zentrifugen-Röhrchen (15 ml) gegeben, um das im Einfriermedium enthaltene zytotoxische Dimethylsulfoxid (DMSO) schnell zu verdünnen. Das Cryovial wurde mit etwas Medium nachgespült, um den Verlust von Zellen möglichst gering zu halten. Die Zellen wurden nun bei 80 g für fünf Minuten abzentrifugiert und der Überstand, bestehend aus Medium und DMSO, abgesaugt. Das Zellpellet wurde durch vorsichtiges Klopfen aufgelockert und anschließend in einer definierten Menge vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert. Es folgte die Ermittlung der Zellzahl mittels CASY[®]-Counter (siehe Kapitel 3.1.4), woraufhin die Zellen mit einer definierten Zelldichte ausgesät werden konnten. Die Aussaatdichten für THP-1 Zellen basierten auf Erfahrungswerten und die laborinternen Werte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tab. 10: Aussaatdichten von THP-1 Zellen für Zeiträume zwischen zwei Expansionen von zwei bis vier Tagen. Diese Werte beruhen auf Erfahrung in der Kultivierung dieser Zelllinie und wurden laborintern ermittelt.

Tage bis zur nächsten Expansion	Aussaatdichte in Zellen ml^{-1}
2	$4,0 \cdot 10^5$
3	$2,5 \cdot 10^5$
4	$1,5 \cdot 10^5$

3.1.2 Expansion und Erhaltung von Zellen

Um Wachstumshemmungen wegen zu hoher Zelldichte (hier $1 \cdot 10^6$ Zellen ml^{-1}) zu vermeiden, wurden die Zellen alle 2-3 Tage passagiert bzw. das Medium gewechselt, sodass



sich die Kultur permanent in der exponentiellen Wachstumsphase befand. Da es sich bei THP-1 um Suspensionszellen handelt, konnte eine Expansion entweder durch Ausdünnen mit frischem Medium, oder durch einen Mediumwechsel mit erhöhtem Volumen erfolgen. Hierbei wurde die Kultur bei 80 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen resuspendiert, gezählt und mit frischem Medium versetzt. Die Passagenzahl erhöhte sich mit jeder Expansion. Wurde das Volumen an Medium nicht verändert, handelte es sich um einen Mediumwechsel und die Passagenzahl blieb unverändert.

Nach einer Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe des CASY[®] Systems, wurde das für die Aussaat der nächsten Passage benötigte Volumen an Zellsuspension mit der folgenden Formel (1) berechnet.

$$V_{\text{Suspension}} = \frac{N_{\text{Aussaat}}}{N_{\text{Suspension}}} \cdot V_{\text{Kultur}} \quad (1)$$

mit

$V_{\text{Suspension}}$	benötigtes Volumen der Zellsuspension
N_{Aussaat}	benötigte Zellzahl zum Aussäen
$N_{\text{Suspension}}$	totale Zellzahl der Zellsuspension
V_{Kultur}	Volumen an Medium, in dem die Kultivierung erfolgt

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen über einen längeren Zeitraum lagern zu können, müssen diese eingefroren werden. Zunächst wurde die Kultur wie beschrieben abzentrifugiert und mittels CASY[®] TT die Zellzahl bestimmt. Je nach gewünschter Zellzahl pro Kryovial (hier 1 oder 2 · 10⁶ Zellen für differenzierte Zellen, bzw. 1 · 10⁷ Zellen für undifferenzierte THP-1 Zellen in 1,8 ml) ergeben sich aus der totalen Zellzahl die Anzahl der Vials, sowie die benötigten Mengen an Einfriermedium (Tabelle 3) und DMSO. Da bei der Zugabe von



DMSO Wärme entsteht, wird dieses zunächst zu dem gekühlten Medium gegeben und erst anschließend auf die Zellen, um Zellschäden zu vermeiden. Die Zugabe von DMSO ist insofern wichtig, als dass es ein Gefrierschutzmittel ist. Es passiert die Zellmembran und verringert die Bildung von Eiskristallen, die zellschädigend wirken. Nach der Abfüllung wurden die Vials in einen Kunststoffbehälter gestellt, der mit Isopropanol gefüllt war. Dieser Behälter nennt sich Mr. Frosty[®] und wurde für mindestens 4 h in einen Eisschrank bei -80 °C gestellt. Der Behälter sorgt dafür, dass die Vials und deren Inhalt mit einer Rate von einem Grad pro Minute abgekühlt werden, was die Entstehung von intrazellulären Eiskristallen verringert und den Zellen erlaubt ihr osmotisches Gleichgewicht zu halten. Die so eingefrorenen Zellen wurden am nächsten Tag auf Trockeneis in den Stickstofftank überführt und dort bei unter -150 °C in der Gasphase gelagert, bzw. verblieben im Eisschrank bei einer zeitnahen Verwendung.

3.1.4 Zellzahlbestimmung mit dem CASY[®] Cell-Counter

Das Messprinzip zur Zellzählung mit dem CASY[®] System beruht auf der Messung von Widerständen. Die zu messenden Zellen werden in CASY[®]ton suspendiert, hierbei handelt es sich um eine Elektrolytlösung [41]. Diese Lösung wird durch eine Messpore mit definierter Größe bei konstanter Flussrate gegeben. Die Pore besteht aus einem künstlichen Edelstein, welcher in eine Kapillare integriert ist [41]. Bei der Messung wird eine geringe Spannung mit Hilfe zweier Platinelektroden an die Pore angelegt. Dieses elektrische Feld pulsiert mit 1 MHz. Passiert eine Zelle die Messpore, verdrängt sie das entsprechende Volumen an Elektrolytlösung. Intakte Zellen sind elektrisch nicht leitfähig und fungieren somit als eine Art Isolator, was zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstandes führt [41]. Die Änderung des Widerstandes ist proportional zur Größe der Zelle, da viel oder wenig Volumen an Elektrolyt verdrängt wird. Auch eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ist möglich. Die Zellmembran toter Zellen verliert ihre Integrität, weshalb die elektrische Barriere nicht mehr gegeben ist und lediglich der Widerstand des Nukleus gemessen wird [41].



Das CASY[®] System liefert reproduzierbare Daten zur Zellzahl, Vitalität (Verhältnis lebender zu toten Zellen), Zellgröße, Debrisanteil, Größenverteilung und Zellaggregation [41]. Das Verfahren ist nicht-invasiv und die Zellen müssen vor der Messung nicht angefärbt werden.

3.1.5 Differenzierung von THP-1 Zellen zu Makrophagen und Ablösung

Wie in Absatz 1.4 beschrieben, lassen sich THP-1 Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenzieren. In dieser Arbeit wurde mit einer PMA-Konzentration von 10 nM gearbeitet. Zunächst wurde mit DMSO eine PMA-Stammlösung angesetzt und so verdünnt, dass Aliquots von je 20 μ l mit einer Konzentration von 50 μ M in Reaktionsgefäße überführt werden konnten. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Die Differenzierung erfolgte in T175-Flaschen von Sarstedt für adhärenente Zellen, da sich die Makrophagen am Flaschenboden anheften. Zum Teil wurden die Kulturflaschen mit Collagen beschichtet. Dabei wurden 10 μ l pro cm^2 für eine Stunde auf den Flaschenboden gegeben, sodass dieser vollständig bedeckt war. Für die Differenzierung wurden $1 \cdot 10^7$ THP-1 Zellen aus laufender Kultur in 60 ml Kultivierungsmedium gegeben und 12 μ l PMA aus einem Aliquot (50 μ M) hinzugefügt, sodass sich eine finale PMA-Konzentration von 10 nM ergab. Um in einem größeren Maßstab differenzieren zu können, wurde das Vorgehen ebenfalls mit Zellkulturschalen von Corning durchgeführt. Diese Schalen bieten mit 500 cm^2 eine größere Fläche als T175-Flaschen (175 cm^2). Die Zellzahl wurde entsprechend der Flächenvergrößerung um den Faktor 2,86 angepasst, es wurden demnach $2,86 \cdot 10^7$ THP-1 Zellen in 100 ml Medium eingesät und mit 20 μ l PMA-Aliquot versetzt. Die Differenzierung erfolgte über einen Zeitraum von 48, bzw. 72 h, in einigen Versuchen schloss sich eine Inkubation ohne PMA als Ruhephase an.

Die Ablösung erfolgte entweder mit TrypLE express (mit und ohne zusätzliche Inkubation mit 10 nM EDTA) oder mit Hilfe eines Zellschabers. Für die Behandlung mit TrypLE wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen, um Rückstände des Mediums zu entfernen, da diese die in der Ablösereagenz TrypLE



enthaltenen Enzyme inhibieren würden. Wurde mit EDTA gearbeitet, schloss sich an das Waschen eine 10 minütige Inkubation mit 10 ml einer 10 mM EDTA-Lösung bei 37 °C an. Da sich dadurch bereits Zellen ablösten, wurde die Lösung nach der Inkubation aufbewahrt und am Ende mit der durch die TrypLE-Behandlung entstandenen Zellsuspension vereinigt. Die Zellen wurden durch Zugabe von TrypLE abgelöst. Hierbei wurde TrypLE für 20 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Durch Klopfen wurden noch an der Oberfläche haftende Zellen abgelöst und in Medium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet resuspendiert und die Zellzahl mit dem CASY[®] System ermittelt. Alternativ wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Um die Zellen ablösen zu können, wurde als erster Schritt das Medium abgenommen. Es schloss sich eine 5 minütige Inkubation mit 10 mM EDTA in PBS bei 37 °C an. Nun wurde der Schaber vorsichtig über die Oberfläche des Kulturgefäßes geführt und die Zellen dabei abgelöst. Nach einem Spülen des Gefäßes sowie des Schabers und einer anschließenden Zentrifugation, wurde die Zellzahl mit dem CASY[®] System bestimmt.



3.2 Durchflusszytometrie

Die Messung mit einem Durchflusszytometer erlaubt Aussagen über die Größe und Granularität von Zellen oder Partikeln [42, 43, 44]. Darüber hinaus kann Fluoreszenz detektiert werden, was den Einsatz bestimmter mit Fluoreszenz markierter Antikörper ermöglicht, um zelltypspezifische Marker anzufärben [44].

Die zu messende Zellsuspension ($1 \cdot 10^5$ Zellen ml^{-1}) wird angesaugt und in einer Kammer (siehe Abb. 9) mit Hüllflüssigkeit (Sheathfluid) umhüllt. Durch die Geometrie der Kammer werden Zellen durch hydrodynamische Fokussierung vereinzelt und durchlaufen eine Kapillare [45]. Das optische System besteht aus einer Lichtquelle, häufig ein Laser, sammelnden Linsen und mehreren Detektoren. Die Zellen werden in einer Durchflusszelle mit monochromatischem Licht, z.B. aus einem Laser (häufig mit einer Wellenlänge von 488 nm), in einem Winkel von 90° zur Fließrichtung bestrahlt, was zu einer Streuung führt [45]. Die Detektion der Vorwärtslichtstreuung (FSC - "forward scatter", Abb. 8), also das in einem kleinen Winkel von der Zelle gestreute Licht, erlaubt Rückschlüsse auf die Größe bzw. das Volumen der Zelle [42]. Es ist jedoch von der Form, Oberflächenbeschaffenheit sowie Inhalt der Zellen abhängig und zeigt auch keinen linearen Zusammenhang zur Zellgröße [42, 43]. Die Seitwärtslichtstreuung (SSC - "side scatter", Abb. 8) hingegen wird in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl von einem Photomultiplier (Abb. 9 Nummer 1) detektiert und gibt Hinweise auf die Granularität, das heißt auf die innere Beschaffenheit der Zelle, da Organellen u. Ä. das einfallende Licht mehrfach streuen [42].

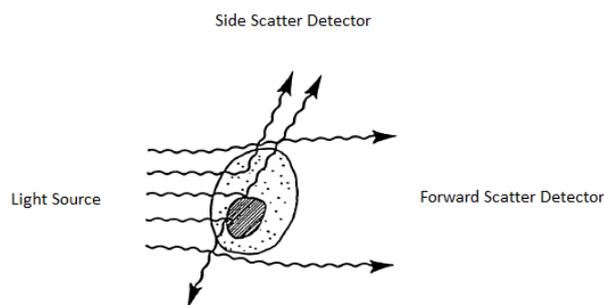


Abb. 8: Prinzip von Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung

Die Vorwärtslichtstreuung (FSC) ist proportional zur Größe und Oberfläche der Zelle, während die Seitwärtslichtstreuung (SSC) auf die Komplexität im Inneren der Zelle hindeutet. Sie entsteht durch die Streuung an Organellen wie dem Zellkern.

Aus "Flow Cytometry - A Survey and the Basics", Tom Rowley et al. (2013) [46]

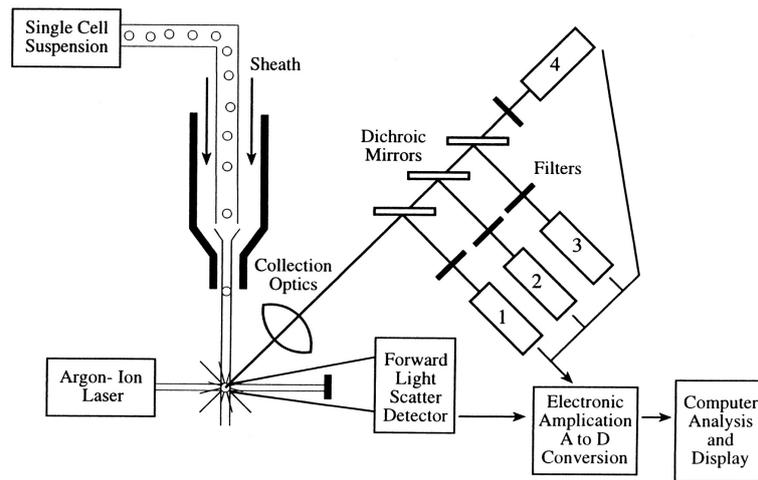


Abb. 9: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Die Zellsuspension wird eingesaugt und mit Hüllflüssigkeit (Sheathfluid) umhüllt. Durch hydrodynamische Fokussierung werden einzelne Zellen in eine Messkammer gegeben, in der sie mit einem Laserstrahl in einem Winkel von 90° bestrahlt werden. Die daraus resultierende Streuung wird detektiert, zum Einen als Vorwärtslichtstreuung (FSC) und zum Anderen als Seitwärtslichtstreuung (SSC, hier unter Nummer 1). Auch Fluoreszenzen, durch den Laser angeregt, können detektiert werden (Nummern 2 bis 4). Dichroitische Spiegel sorgen dafür, dass selektiv einzelne Wellenlängen detektiert werden können. Die gemessenen Signale werden digitalisiert, analysiert und ausgegeben.

Aus "Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology", Michael Brown und Carl Wittwer (2000) [44]

Zusätzlich können Fluorochrome mit dem Laser angeregt werden, die bei Rückkehr in den Ausgangszustand Licht einer definierten Wellenlänge emittieren [44]. Da diese Fluoreszenz ebenfalls im Winkel von 90° zum Laser gemessen wird, kommen dichroitische Spiegel zum Einsatz, die selektiv einzelne Wellenlängen passieren lassen und somit die Detektion spezifischer Wellenlängen erlauben [42]. Daraus ergeben sich mehrere Kanäle, je nach Wellenlänge und damit Farbe der Fluoreszenz (beim Beckmann Coulter FC500 FL1-5). Die Lichtintensität wird mit Hilfe von Photomultipliern gemessen, dabei erfolgt eine Verstärkung des Signals. Dies wird detektiert und für weitere Analysen digitalisiert und verarbeitet [44].

Trägt man die Seitwärtslichtstreuung (Side Scatter) gegen die Vorwärtslichtstreuung (Forward Scatter) auf, so können die Charakteristika verschiedener Zellen dargestellt werden (Abb. 10). So können verschiedene Zelltypen anhand ihrer Größe und Granula-



rität unterschieden werden, zum Beispiel weisen Lymphozyten eine geringe Größe und Granularität auf, weshalb sie in der Abb. 10 unten links erscheinen [46]. Obwohl Monozyten und neutrophile Granulozyten eine ähnliche Größe haben (vergleichbare Werte für Vorwärtslichtstreuung), können sie durch ihre unterschiedliche Granularität unterschieden werden [46]. Auf diese Weise kann auch Zelldebris von vitalen Zellen unterschieden werden und bei der Auswertung ein Rahmen (Gate) um die gewünschte Zellpopulation gesetzt werden. Wird ein Gate gesetzt, gehen nur die markierten Zellen in die Analyse mit ein.

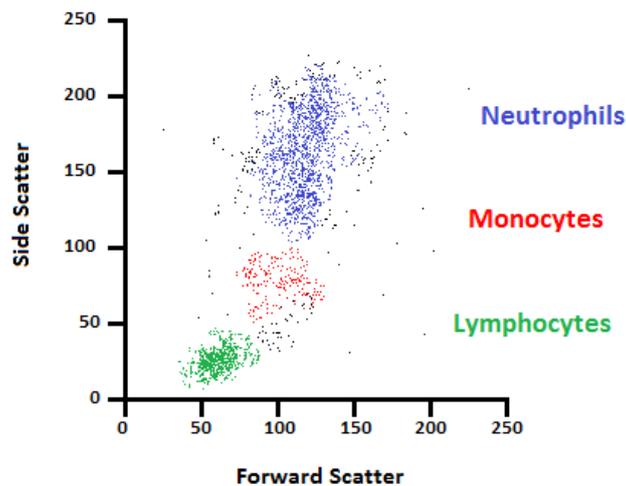


Abb. 10: Scatter-Plot einer Blutprobe

Aufgetragen ist die Seitwärtslichtstreuung (Side Scatter) gegen die Vorwärtslichtstreuung (Forward Scatter). Jeder Punkt steht für eine Zelle. Anhand von Größe (Forward Scatter) und Granularität (Side Scatter) kann zwischen den verschiedenen Zelltypen differenziert werden.

Aus "Flow Cytometry - A Survey and the Basics", Tom Rowley et al. (2013) [46]

3.2.1 Durchführung und Färbeprotokoll

Bevor Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert werden konnten, musste die Zellzahl der Suspension mit dem CASY[®] System bestimmt werden. Für eine Probe wurden $1 \cdot 10^5$ Zellen in ein 15 ml-Zentrifugengefäß überführt und für 5 Minuten bei 80 g zentrifugiert. Der Überstand (Medium) wurde verworfen (ausgegossen) und die Zellen mit 3 ml PBS (+ 3 % FBS) gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation, das Pellet wurde in 100 μ l Fc-Blockierlösung (1:20 mit PBS + 3 % BSA verdünnt) resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Ein weiterer Waschschritt schloss sich an, bevor die Zellen mit einer



Antikörperlösung (mit einem Fluorochrom konjugiert bzw. primären unkonjugierten Antikörper) wieder in Lösung gebracht wurden. Die verwendeten Antikörper und ihr jeweiliges Antigen sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 10 Minuten, woraufhin erneut zwei Mal mit PBS (+ 3 % FBS) gewaschen wurde. Sofern ein Primärantikörper eingesetzt wurde, der an den nachzuweisenden Marker gebunden hat, erfolgte nun die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (mit einem Fluorochrom konjugiert) analog zum primären, inklusive zweier Waschschriffe. Abschließend wurde das Pellet in 0,5 ml PBS (+ 3 % FBS) aufgenommen und die Probe in ein Probenröhrchen für die Durchflusszytometrie überführt.

Tab. 11: Eingesetzte Antikörper und deren Spezifität

Bezeichnung	Antigen	Verdünnung
CD11b-FITC, rekombinant, Human IgG1	Integrin α M	1:50 in PBS + 3 % FBS
CD14-FITC, rekombinant, Human IgG1	LPS-Rezeptor	1:50 in PBS + 3 % FBS
CD281, Mouse IgG1	Toll Like Receptor 1	1:50 in PBS + 3 % FBS
Anti-Mouse-FITC, Goat IgG	Maus IgG	1:50 in PBS + 3 % FBS
CD284-Alexa Fluor 488, Mouse IgG2	Toll Like Rezeptor 4	1:50 in PBS + 3 % FBS

3.3 Nachweis und Quantifizierung von Interleukin 6

Die Anwesenheit von Pyrogenen löst die Ausschüttung von Interleukin 6 (IL-6) durch Makrophagen aus (siehe Kapitel 1.1.2). Eine Quantifizierung von IL-6 erlaubt somit Rückschlüsse auf die Konzentration der Pyrogene, denen Makrophagen ausgesetzt waren. Dies erfolgt mittels eines ELISAs. Hierbei handelt es sich um ein Kit der Firma Invitrogen im 96-Well Format. Auf eine Beschichtung einer 96-Well-Platte mit dem sogenannten „Capture Antibody“ folgt die Inkubation mit der Probe. Das gebildete IL-6 wird vom Capture Antibody gebunden. Ein zweiter Antikörper („Detection Antibody“), der mit



Biotin konjugiert ist, bindet ebenfalls an IL-6. Zugegebenes Streptavidin hat eine hohe Affinität für Biotin und eine an Streptavidin geknüpfte Peroxidase setzt zugegebenes Tetramethylbenzidin um, sodass eine farbige Lösung entsteht. Nach der Zugabe einer Stoplösung wird die Extinktion bei einer Wellenlänge 450 nm als Messgröße bestimmt

Die Durchführung des ELISA erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers. Bei den verwendeten Zelltypen handelte es sich um THP-1 als Negativkontrolle (undifferenziert) und aus THP-1 mit PMA (10 nM) differenzierten Makrophagen. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte mit einer Aussaatdichte von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well ausgesät. Zur Ermittlung der Zellzahl differenzierter Makrophagen, wurden diese abgelöst oder aufgetaut und mit dem CASY[®] System gezählt. Um $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well mit 100 µl einsäen zu können, wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^6$ Zellen ml⁻¹ durch geeignete Verdünnung hergestellt. Nach 4 h wurde LPS beziehungsweise RSE in verschiedenen Konzentrationen (2; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,05; 0,025 und 0 EU ml⁻¹) für 18 h auf die Zellen gegeben, um eine Standardkurve zu erzeugen. Die LPS - beziehungsweise RSE-Konzentrationen wurden aus einem Aliquot (2000 EU ml⁻¹) mit Medium gemäß Abbildung 12 verdünnt und 100 µl auf die Zellen gegeben, wobei sich eine 1:2 Verdünnung ergab. Um die Stammlösung anzusetzen, wurde das Lyophilisat zunächst mit Medium in Lösung gebracht und verblieb für 10 Minuten im Ultraschallbad. Durch geeignete Verdünnung wurde eine Konzentration von 2000 EU ml⁻¹ eingestellt und Aliquots zu 50 µl bei -20 °C gelagert. Parallel wurde eine 96-Well-Platte mit dem Capture Antibody beschichtet. Am folgenden Tag folgten eine Inkubation der ELISA-Platte mit einer Blockierlösung von einer Stunde und einige Waschschrte (mit PBS + 0,05 % Tween), bevor 100 µl Kulturüberstand in die ELISA-Platte überführt wurden, sodass das sekretierte IL-6 quantifiziert werden konnte. Die Proben verblieben zusammen mit einer IL-6 Standardreihe für 2 h auf der Platte, bevor der Detektionsantikörper nach einem Waschschrte hinzugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde und erneutem Waschen, wurden 100 µl Streptavidin hinzugefügt und 30 min inkubiert. Der Umsatz von TMB (Tetramethylbenzidin, 100 µl) erfolgte in einem Zeitraum von 15 min. Abschließend wurden 50 µl Stoplösung (1 M H₂SO₄) dazugegeben und die Extinktion gemessen. Ein typisches Platten-Layout für den ELISA ist in Abbildung 11 dargestellt.

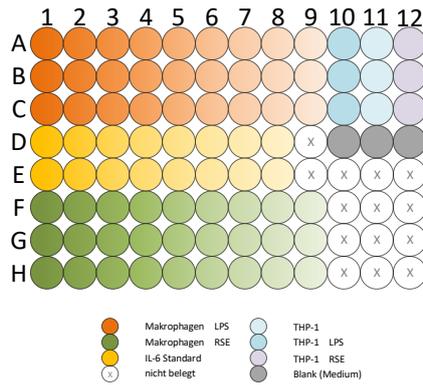


Abb. 11: ELISA Layout für den Nachweis von Interleukin-6

Zu sehen ist ein typisches Layout einer ELISA-Platte für den Nachweis von Interleukin-6. In orange sind die verschiedenen LPS-Konzentrationen (Triplikate), in grün die RSE-Konzentrationen (Triplikate) und in gelb die IL-6 Verdünnungen (Duplikate) dargestellt. Hellblau symbolisiert undifferenzierte THP-1 Zellen mit Medium, dunkelblau mit 2 EU ml^{-1} LPS und violett mit 2 EU ml^{-1} RSE. Der Blank (nur Medium ohne Zellen) ist in grau dargestellt.

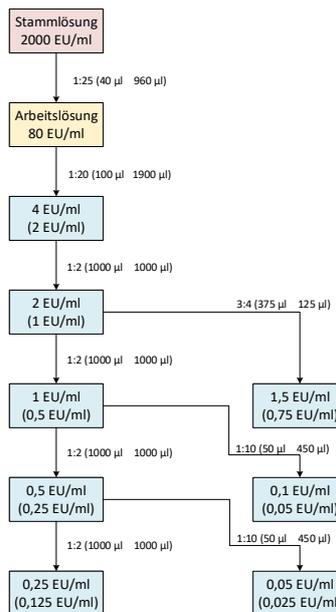


Abb. 12: Verdünnung von Lipopolysacchariden

Die Abbildung zeigt die Verdünnungsreihe der eingesetzten Lipopolysaccharide. Aus einem Aliquot der Stammlösung (in rot) mit einer Konzentration von 2000 EU ml^{-1} wird eine Arbeitslösung (in orange) mit 80 EU ml^{-1} hergestellt. Diese ist Ausgangspunkt für weitere Verdünnungen. Jeweils $100 \mu\text{l}$ der in blau dargestellten Konzentrationen werden zu $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension gegeben, sodass sich eine 1:2 Verdünnung ergibt. In Klammern sind die sich jeweils einstellenden Lipopolysaccharid-Konzentrationen, denen die Zellen ausgesetzt sind, zu finden



3.4 Endotoxinnachweis mittels LAL-Test

Der Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (LAL-Test) stellt eine Methode dar, um Lipopolysaccharide (LPS) nachweisen zu können. Kommt das Amoebocyten-Lysat mit LPS in Kontakt, kommt es zu einer Reihe enzymatischer Reaktionen und schließlich zur Aktivierung eines Gerinnungsfaktors. Dieser Faktor setzt das farblose Substrat Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA (p-Nitroanilin mit einem acetylierten Peptid) in das gelbliche pNA um. Nach der Zugabe einer Stopplösung wird die Extinktion bei 405 nm gemessen. Diese ist proportional zur LPS-Konzentration, weshalb die Konzentration in Proben über eine Kalibriergerade in einem Bereich von 0,01-0,1 EU/ml EU ml⁻¹ (Chromogenic Endotoxin Quant Kit, Pierce) bestimmt werden kann. Allerdings ist der LAL-Test auf den Nachweis von Endotoxinen (LPS) beschränkt.

Die Durchführung des Assays erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die verwendete 96-Well-Platte wurde die gesamte Zeit bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. Zunächst wurden die Standards, Blanks und Proben in eine 96-Well-Platte (je 50 µl) gegeben. Anschließend wurden je 50 µl Amoebocyte-Lysat, das zuvor in Lösung gebracht wurde, hinzu gegeben und inkubiert. Darauf folgte eine weitere Inkubation mit 100 µl chromogenen Substrats und nach 6 Minuten die Zugabe von 50 µl Stopplösung (25 %ige Essigsäure). Nach der Auslesung der Extinktion bei 405 nm wurde die OD des Blanks von den Standards und Proben abgezogen und eine Kalibriergerade erzeugt. Aus der Regression konnte die Endotoxinkonzentration in der Probe bestimmt werden.



4 Ergebnisse

4.1 Einfluss des Kunststoffmaterials

Um einen möglichen Einfluss des bei der Kultivierung und Differenzierung von THP-1 Zellen eingesetzten Kunststoffmaterials zu untersuchen, wurden zwei Ansätze parallel bearbeitet. Einerseits kamen für die Erhaltungskultur und die Differenzierung zu Makrophagen Kulturflaschen für Suspensionszellen von Sarstedt und andererseits Kulturflaschen für adhärenente Zellen (TC - tissue culture) zum Einsatz. Letztere weisen eine Beschichtung auf, die es adhärenente Zellen erleichtert sich an die Flaschenoberfläche anzuheften. In diesem Versuch wurden die THP-1 Zellen für eine Differenzierung zu Makrophagen mit 10 nM PMA über einen Zeitraum von 72 h inkubiert. Das Kulturmedium beinhaltete FBS von Corning (Lot 35079002). Die Erhaltungskultur erfolgte über 14 Tage parallel in TC-Flaschen sowie in Suspensionsflaschen. Die Tabelle 12 listet die Wachstumsraten (μ) dieser Kulturen auf. Die Einsaat erfolgte mit je $1,26 \cdot 10^7$ Zellen. Zwischen dem Start der Kultur und der ersten Zählung nach knapp zwei Tagen lag kein bzw. nur sehr wenig Wachstum (TC-Flasche) vor. Die gemittelten Wachstumsraten der beiden Kulturen lagen mit 0,32 1/d und 0,29 1/d dicht beieinander, allerdings schwankten die Raten der in TC-Flaschen kultivierten Zellen etwas stärker.

Tab. 12: Wachstumsraten (μ) von THP-1 Zellen, die in T-Flaschen für Suspensionskulturen bzw. für adhärenente Kulturen (TC-beschichtet) über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert wurden.

Zeit in d	μ_{Susp} in 1/d	μ_{TC} in 1/d
0,00	0,00	0,00
1,78	0,00	0,02
3,73	0,31	0,28
6,84	0,37	0,41
8,03	0,27	0,18
10,85	0,39	0,33
13,90	0,27	0,27
gemittelt	0,32	0,29



Um einen Einfluss des Kunststoffmaterials auf die Oberflächenmarker CD11b und CD14, die für eine Beurteilung des Erfolges einer Differenzierung verwendet wurden, zu testen, wurden diese am Durchflusszytometer untersucht. Sowohl undifferenzierte THP-1 (Abbildung 13), als auch für 72 h mit PMA differenzierte Zellen (Abbildung 14) wurden hinsichtlich der Expression von CD11b und CD14 verglichen. Bei den nicht differenzierten Zellen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenmarkern, die beiden Peaks der in Flaschen für Suspensionskulturen (blau) und in TC-Flaschen (rot) kultivierten Zellen waren deckungsgleich.

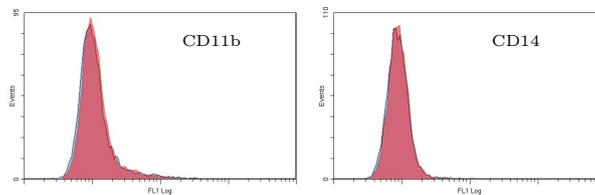


Abb. 13: Einfluss des Kunststoffmaterials - undifferenziert

Die Abbildung zeigt die Histogramme der Immunfluoreszenzfärbung für die Analyse des Einflusses des Kunststoffmaterials auf undifferenzierte Zellen, die am Durchflusszytometer über Kanal F1 erstellt wurden. In blau sind jeweils undifferenzierte THP-1 Zellen dargestellt, die in T-Flaschen für Suspensionszellen kultiviert wurden, während in rot undifferenzierte und in TC-Flaschen kultivierte Zellen zu sehen sind. Bei beiden Oberflächenmarkern (CD11b links, CD14 rechts) sind die Signale für die zwei Kultivierungsbedingungen deckungsgleich.

Bei den differenzierten Zellen zeigte sich bei den Kontrollen (ohne Antikörper) nur eine sehr leichte Verschiebung der Fluoreszenzintensität (Abbildung 14). Differenzierte Makrophagen, sowohl aus Suspensionsflaschen (in grün), als auch aus TC-Flaschen (in rot dargestellt), lieferten eine deutliche Verschiebung bei der Antikörperfärbung gegen CD11b im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Eine Färbung gegen CD14 hatte eine ähnliche Verschiebung zur Folge, auch wenn die Peaks breiter und flacher wurden, als bei der CD11b-Färbung. Diese beiden für Makrophagen typischen Strukturen an der Oberfläche der Zellmembran wurden demnach im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen deutlich stärker nach der Differenzierung mit PMA exprimiert. Ein Unterschied zwischen den Makrophagen, die in Suspensionsflaschen bzw. in TC-Flaschen differenziert wurden, ließ sich hinsichtlich der untersuchten Oberflächenmarker nicht erkennen.

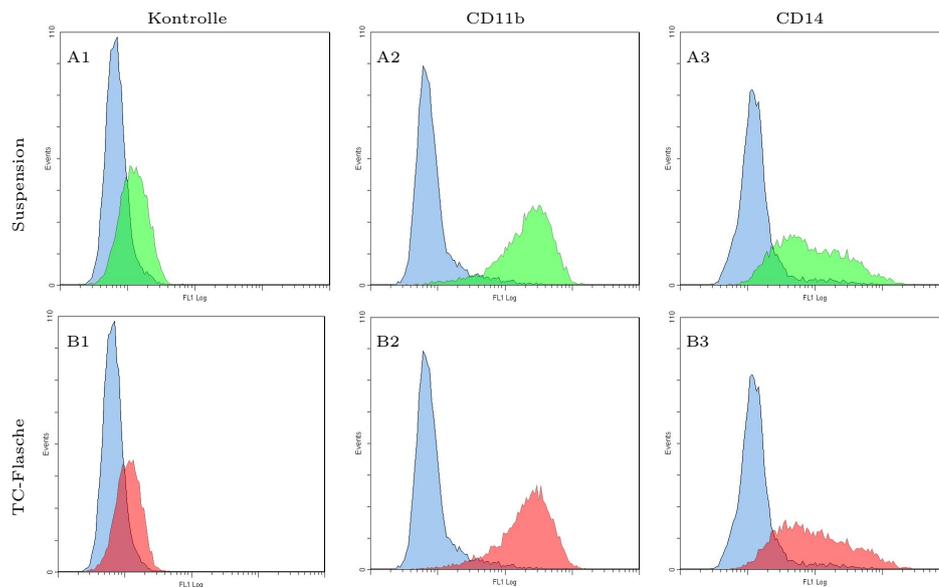


Abb. 14: Einfluss des Kunststoffmaterials - differenziert

Die Abbildung zeigt die Histogramme der Immunfluoreszenzfärbung für die Analyse des Einflusses des Kunststoffmaterials auf differenzierte Zellen, die am Durchflusszytometer über Kanal F1 erstellt wurden. In blau sind jeweils undifferenzierte THP-1 Zellen dargestellt, in grün differenzierte (72 h) Zellen, die in T-Flaschen für Suspensionszellen kultiviert wurden, während in rot Makrophagen (72 h) aus in TC-Flaschen kultivierten Zellen aufgetragen sind. Bei der Kontrolle ohne Antikörper (A1 und B1) zeigte sich nur eine sehr leichte Verschiebung der Fluoreszenzintensität der differenzierten Zellen im Vergleich zu undifferenzierten. Dagegen zeigte sich bei der Inkubation mit dem Antikörper gegen CD11b (A2 und B2) eine starke Verschiebung, der Antikörper gegen CD14 (A3 und B3) hatte ebenfalls eine deutliche Verschiebung zur Folge, jedoch wurde der Peak breiter. Zwischen den beiden Kultivierungs- und Differenzierungsbedingungen zeigte sich kein Unterschied.

Die Erhaltungskultur von THP-1 Zellen erfolgte von nun an in T-Flaschen für Suspensionskulturen, da keinerlei Unterschied hinsichtlich des Differenzierungsmusters erkennbar war.



4.2 48 h Differenzierung

Die Differenzierung von THP-1 Zellen zu Makrophagen durch PMA erfolgte wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Bei einer Inkubationszeit von 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ waren differenzierte Zellen adhärent und zeigen vereinzelt längliche Ausstülpungen (Abbildung 15). Jedoch differenzierten nicht alle vorhandenen THP-1 Zellen, da nicht differenzierte Zellen weiterhin eine runde Morphologie aufwiesen und Aggregate bildeten.

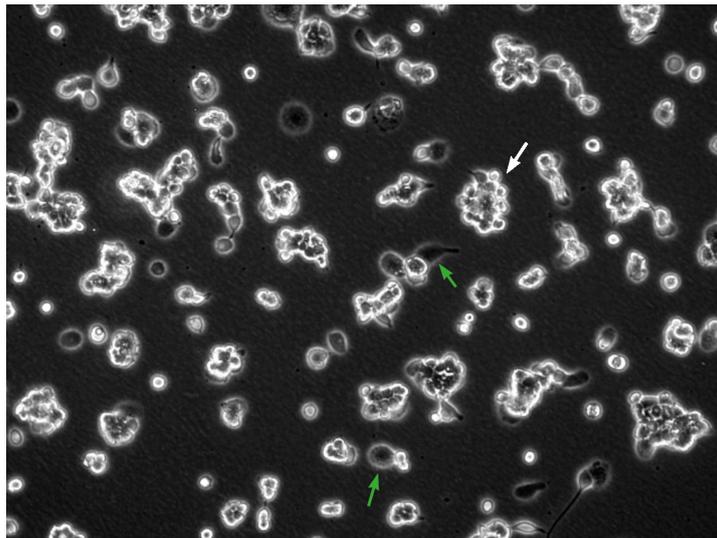


Abb. 15: Für 48 h differenzierte THP-1 Zellen

Diese Abbildung zeigt für 48 h mit 10 nM PMA differenzierte THP-1 Zellen in einer T-175 Kulturflasche. Makrophagen wurden adhärent (grüne Pfeile) und zeigen vereinzelt längliche Ausstülpungen. Nicht differenzierte Zellen (weiße Pfeile) zeigen weiterhin eine runde Morphologie und bildeten hier Aggregate. Das Bild wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

Um den Differenzierungsstatus zu untersuchen, kam das Durchflusszytometer wie unter Abschnitt 3.2.1 beschrieben zum Einsatz. Dabei dienten die beiden Oberflächenmarker CD11b und CD14 als Hinweis auf eine erfolgreiche Differenzierung, da diese typisch für Makrophagen sind und im Zuge der Differenzierung exprimiert werden. In Abbildung 16 sind die Histogramme der Immunfluoreszenzfärbung der erwähnten Marker dargestellt. Während sich die Kontrollen, also Zellen, die nicht mit Antikörpern behandelt wurden, von undifferenzierten THP-1 Zellen und Makrophagen stark gleichen, zeigen die Peaks der differenzierten Zellen sowohl bei der CD11b- als auch CD14-Färbung eine



Rechtsverschiebung, was ein erhöhtes Fluoreszenzsignal bedeutet. Dementsprechend war die Expression beider Oberflächenmarker bei einer Inkubation von 48 h mit PMA im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen erhöht.

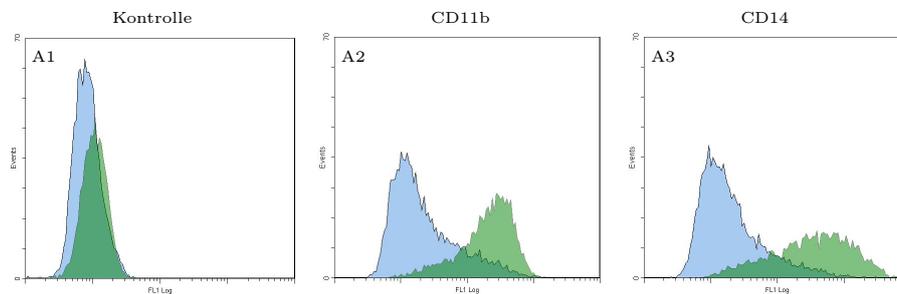


Abb. 16: Differenzierungsstatus nach 48 h

Die Abbildung zeigt die Histogramme der Immunfluoreszenzfärbung für die Analyse des Differenzierungsstatus, die am Durchflusszytometer über Kanal F1 erstellt wurden. In blau sind jeweils undifferenzierte THP-1 Zellen dargestellt, während in grün für 48 h mit PMA differenzierte Makrophagen zu sehen sind. Die Kontrollen (A1), also Zellen, die nicht mit Antikörpern behandelt wurden, sind nahezu deckungsgleich. Bei den Antikörpern zur Färbung von CD11b (A2) und CD14 (A3) zeigt sich jeweils eine deutliche Verschiebung nach rechts und damit eine Zunahme der Fluoreszenzintensität.

Um die Sekretion von Zytokinen der Makrophagen bei Kontakt mit LPS zu messen, wurde IL-6 mittels ELISA nachgewiesen und quantifiziert wie in Abschnitt 3.3 dargestellt. Für die Kultivierung und Differenzierung der Makrophagen sowie undifferenzierter THP-1 Zellen wurde FBS von Corning (Lot 35079002) verwendet und diese wurden Lipopolysacchariden von *E. coli* 055:B5 (Tabelle 4) für einen Zeitraum von 18 h ausgesetzt. In Abbildung 17 ist die Extinktion bei 450 nm über der LPS-Konzentration aufgetragen. Es wurden Konzentrationen von 0; 0,02 und 0,08 EU ml⁻¹ eingesetzt. Auffällig ist, dass bereits die Negativkontrolle einen sehr hohen Extinktionswert von 2,7 lieferte. Auch die beiden LPS-Konzentrationen führten zu hohen Werten über 2, was auf die Anwesenheit von Endotoxinen im Medium hindeutet, da die Makrophagen auch ohne die Zugabe von LPS IL-6 sekretiert haben. Undifferenzierte THP-1 zeigten bei allen verwendeten Konzentrationen sehr niedrige Extinktionen.

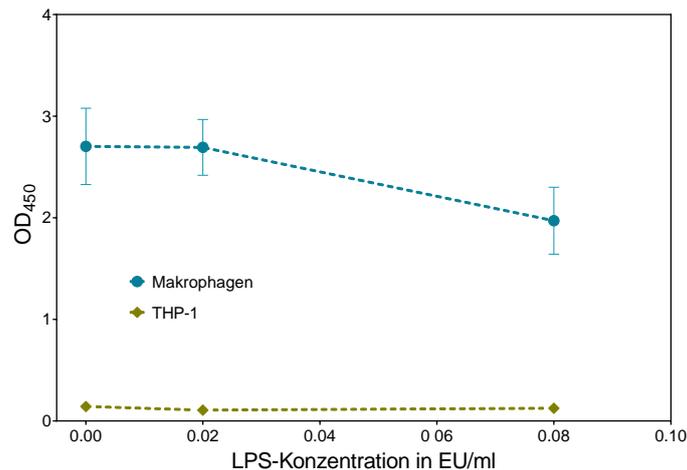


Abb. 17: IL-6 ELISA: 48h Differenzierung

Aufgetragen ist die Extinktion über der LPS-Konzentration, der die Zellen für 18 h ausgesetzt waren. Der Assay wurde in Triplets durchgeführt und die Standardabweichung als Fehlerbalken aufgeführt. Undifferenzierte THP-1 Zellen sind in oliv dargestellt und lieferten über den Konzentrationsbereich geringe Exktinktionswerte. Die Makrophagen (48 h Differenzierung) in blau hingegen zeigten bereits ohne LPS eine sehr hohe OD von 2.7, auch mit LPS lieferten sie ein hohes Signal. Die Kultivierung bzw. Differenzierung der eingesetzten Zellen erfolgte mit Medium, dem FBS von Corning (Lot 35079002) zugesetzt war.

4.3 72 h Differenzierung

Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben wurden THP-1 Zellen mit 10 nM PMA inkubiert, um eine Differenzierung zu Makrophagen zu erreichen. Um die Anzahl an differenzierten Zellen zu erhöhen und um die Taktung der Experimente zu erleichtern, betrug die Inkubationszeit 72 h und erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Differenzierte Zellen wurden adhärent und wiesen vermehrt eine spindelförmige Morphologie mit Ausläufern auf (Abbildung 18). Nicht differenzierte Zellen zeigten weiterhin eine runde Morphologie. Im Vergleich zu einer Differenzierung über einen Zeitraum von 24 h zeigte sich eine erhöhte Anzahl differenzierter Zellen (siehe Abbildung 15)

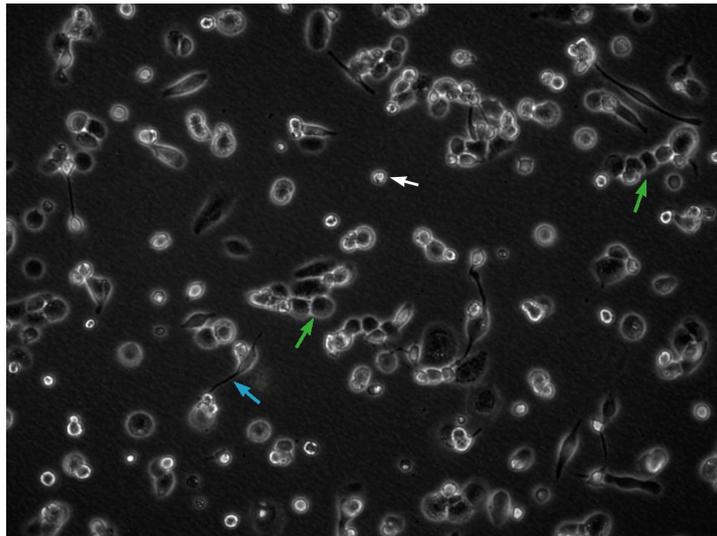


Abb. 18: Für 72 h differenzierte THP-1 Zellen

Diese Abbildung zeigt für 72 h mit 10 nM PMA differenzierte THP-1 Zellen in einer T-175 Kulturflasche. Makrophagen werden adhärent (grüne Pfeile), bilden eine spindelförmige Morphologie und zeigen häufig Ausstülpungen (blaue Pfeile). Nicht differenzierte Zellen (weiße Pfeile) zeigen weiterhin eine runde Morphologie. Das Bild wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

4.3.1 Ablösung mit TrypLE express

Für 72 h zu Makrophagen differenzierte THP-1 Zellen wurden wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben mit der Ablösereagenz TrypLE express von der Oberfläche der Kulturflasche abgelöst. Dabei ergab sich reproduzierbar eine Ausbeute von etwa 25 % bezogen auf die Anzahl an eingesäten THP-1 Zellen. Das Medium, das bei der Erhaltungskultur und der Differenzierung eingesetzt wurde, enthielt FBS von Corning (Lot 35079002). Der Einfluss dieser Art von Ablösung wurde durch eine Messung der Expression von CD11b und CD14 am Durchflusszytometer ermittelt.

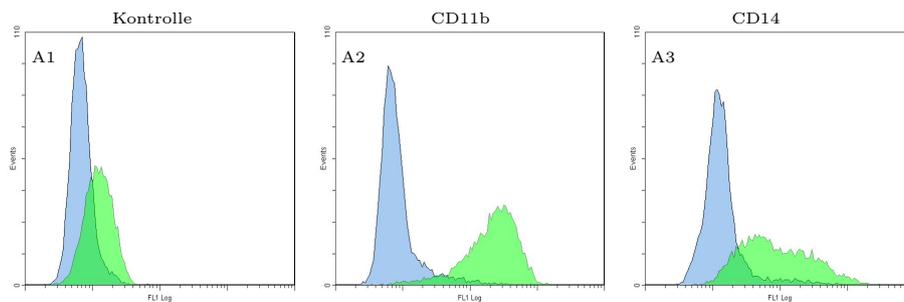


Abb. 19: Differenzierungsstatus nach 72 h

Aufgetragen sind die Histogramme einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b und CD14, die mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. In grün: frisch differenzierte Makrophagen (72 h mit 10 nm PMA). Die Kontrolle ohne Antikörper zeigte nur eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen (A1). Die Färbung gegen CD11b lieferte einen Shift der Makrophagen gegenüber THP-1 Zellen (A2). Auch die Färbung von CD14 (A3) lieferte eine ähnliche Verschiebung.

Die Abbildung 19 zeigt für ein für die Differenzierung von 72 h mit 10 nM PMA und eine Ablösung mit TrypLE ein repräsentatives Differenzierungsmuster, das reproduziert werden konnte. Die beiden Antikörperfärbungen gegen CD11b, bzw. CD14 zeigten bei differenzierten Zellen eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Die Kontrolle ohne Antikörper hingegen führte zu einer geringen Verschiebung gegenüber THP-1 Zellen. Daraus folgt, dass CD11b und CD14 verstärkt exprimiert wurden und die Differenzierung erfolgreich verlaufen ist. Da es sich bei CD11b und CD14 um Oberflächenmarker handelt, kann eine enzymatische Ablösung diese bei zu starkem Verdau beeinflussen. Dies ist hier nicht der Fall. Die Vitalität der mit TrypLE express abgelösten Makrophagen, die mit dem CASY System ermittelt wurde, betrug etwa 90 %.

4.3.2 Einfluss des Endotoxingehalts im Medium

Wie schon der IL-6 ELISA bei für 48 h differenzierten THP-1 Zellen (siehe Abbildung 20 auf der linken Seite), zeigten auch für 72 h differenzierte Makrophagen bei der Negativkontrolle ohne LPS erhöhte Extinktionswerte (Abbildung 20 auf der rechten Seite). Die eingesetzten Konzentration waren 0,02; 0,08 und 2 EU ml⁻¹. Über den gesamten Konzentrationsbereich lässt sich ein Anstieg der Extinktion bei Makrophagen erkennen, bis 0,08 EU ml⁻¹ ist der Verlauf linear, bei 2 EU ml⁻¹ scheint die Kurve hingegen bereits in



einer Sättigung zu sein. Auffällig ist jedoch, dass die Makrophagen schon ohne den Zusatz von LPS eine OD von 0,76 aufwiesen. Undifferenzierte THP-1 Zellen lieferten über den gesamten Konzentrationsbereich sehr geringe Extinktionswerte. Für die Erhaltungskultur, die Differenzierung und die Inkubation mit LPS wurde Medium verwendet, dem FBS von Corning (Lot 35079002) zugesetzt war. Die hohen OD-Werte der Negativkontrollen deuten auf die Anwesenheit von Endotoxinen im Medium hin, sodass die Makrophagen bereits ohne weiteren Zusatz von LPS IL-6 bildeten. Laut Herstellerangaben hat das verwendete Serum von Corning einen Endotoxingehalt von $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$.

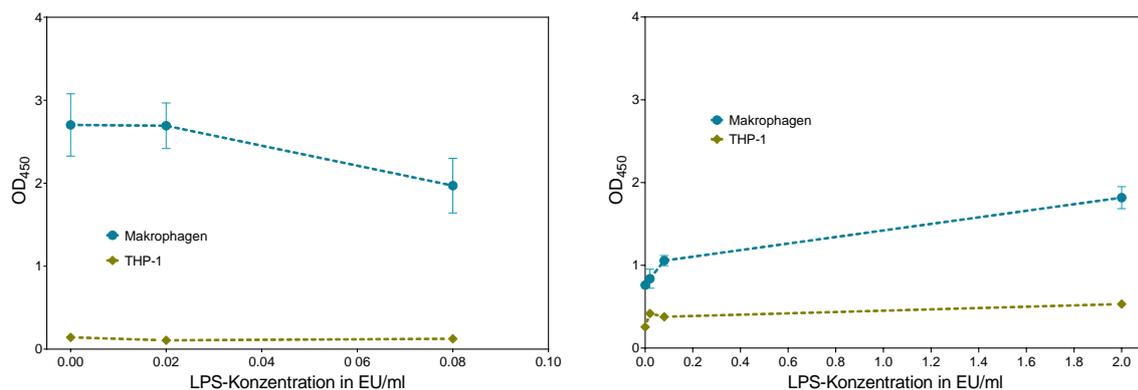


Abb. 20: IL-6 ELISA: Endotoxingehalt im Medium

Aufgetragen ist die Extinktion über der LPS-Konzentration, der die Zellen für 18 h ausgesetzt waren. Der Assay wurde in Triplets durchgeführt und die Standardabweichung als Fehlerbalken aufgeführt. Linke Seite: für 48 h differenzierte Makrophagen; rechte Seite: für 72 h differenzierte Makrophagen. In oliv: undifferenzierte THP-1 Zellen; in blau: Makrophagen.

Die Erhaltungskultur und die Differenzierung erfolgten ab diesem Zeitpunkt mit Medium, dem FBS von PAN (Sera Pro) mit einem niedrigen Endotoxingehalt von $0,087 \text{ EU ml}^{-1}$ zugesetzt war.

4.3.3 Ablösung mit EDTA und TrypLE express

Da die Ablösung mit TrypLE express alleine zu einer geringen Ausbeute von etwa 25 % bezogen auf die Anzahl eingesäter THP-1 Zellen führte, wurde eine zusätzliche Inkubation mit 10 mM EDTA in PBS vorangestellt, wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Es handelte sich um Makrophagen, die für 72 h differenziert worden waren. Bei dieser Ablösemethode konnte eine Erhöhung der Ausbeute nicht erreicht werden, sie lag ebenfalls bei etwa 25 %.



Allerdings führte die zusätzliche Inkubation mit EDTA dazu, dass bei der Zellzahlbestimmung mit dem CASY System ein schmalere Peak zu sehen war. Das spricht für eine geringere Größenverteilung der Zellen. Das aus der beschriebenen Differenzierung und Ablösung resultierende Differenzierungsmuster wurde am Durchflusszytometer anhand der Expression von CD11b und CD14 bestimmt (Abbildung 21). Die Kontrolle ohne Antikörper (A1) sowie die Färbung von CD11b (A2) lieferten ähnliche Verschiebungen wie bei einer Ablösung mit TrypLE als alleinige Ablösereagenz (Abbildung 19, A1 und A2). Die Immunfluoreszenzfärbung gegen CD14 (A3) zeigte jedoch einen geringeren Shift als in vorherigen Versuchen, lediglich die rechte Flanke des Peaks zeigt eine Verschiebung im Vergleich zur Kontrolle (A1).

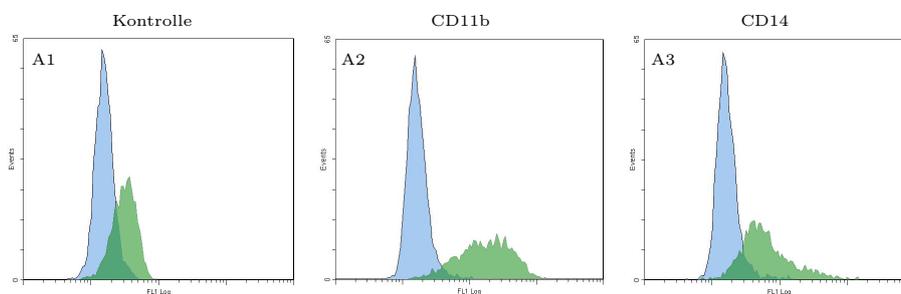


Abb. 21: Differenzierungsstatus: 72 h, EDTA & TrypLE

Die Abbildung zeigt die Histogramme einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b und CD14, die mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. In grün: Makrophagen (72 h mit 10 nm PMA), in blau: undifferenzierte THP-1 Zellen. Die Kontrollen ohne Antikörper zeigten nur eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen (A1). Die Färbung von CD11b lieferte einen deutlichen Shift der Makrophagen gegenüber THP-1 Zellen (A2). Die Färbung von CD14 (A3) lieferte eine geringere Verschiebung als CD11b.

Ob die für 72 h differenzierten Makrophagen nach der beschriebenen Ablöseprozedur auf den Kontakt mit LPS mit der Sekretion von Zytokinen reagieren, wurde mit dem IL-6 ELISA überprüft. Die Zellen kamen über einen Zeitraum von 18 h mit LPS (*E. coli* 055:B5) in Kontakt und die Kulturüberstände wurden über Nacht auf der ELISA-Platte bei 4 °C inkubiert. In Abbildung 22 ist die gemessene Extinktion über der eingesetzten LPS-Konzentration aufgetragen. Es lässt sich ein deutlicher und von der Konzentration abhängiger Anstieg der OD erkennen. Makrophagen, die keinerlei LPS ausgesetzt waren, wiesen sehr niedrige Extinktionswerte auf (0,01). Bereits geringe LPS Konzentrationen führten zu einem starken Anstieg der OD bei kleiner Änderung der Konzentration. Ab einer



LPS-Konzentration von $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$ verlangsamte sich der Anstieg, eine Art Plateau scheint erreicht. Undifferenzierte THP-1 Zellen zeigen über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg sehr niedrige Extinktionswerte.

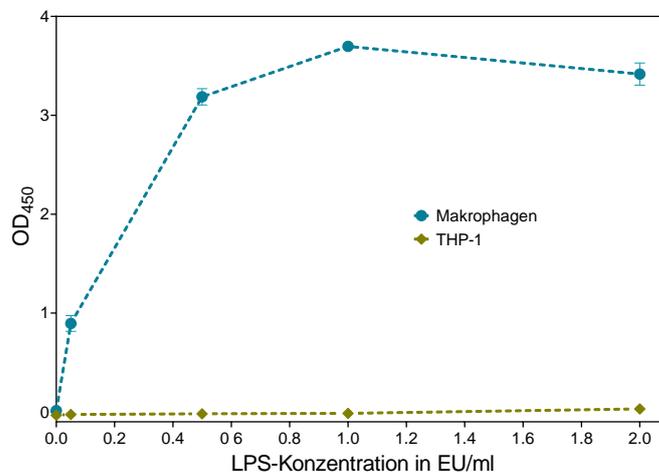


Abb. 22: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, EDTA & TrypLE

Aufgetragen ist die Extinktion über der LPS-Konzentration, der die Zellen für 18 h ausgesetzt waren. Der Assay wurde in Triplets durchgeführt und die Standardabweichung als Fehlerbalken aufgeführt. Oliv: undifferenzierte THP-1 Zellen; blau: Makrophagen (72 h Differenzierung)

4.3.4 Differenzierung auf einer Collagenbeschichtung

Da die Ausbeute der Ablösung bei einer Kombination aus EDTA und TrypLE nicht verbessert werden konnte, wurden Kulturflaschen, in denen differenziert wurde, vor Einsaat der Zellen mit Collagen beschichtet (Abschnitt 3.1.5). Die Differenzierung wurde für 72 h durchgeführt. Die Ablösung erfolgte mit TrypLE, was ebenfalls keine Verbesserung der Ausbeute zur Folge hatte, es wurde etwa ein Viertel der Zellzahl, die eingesät wurde, wieder abgelöst. Das Differenzierungsmuster ist in Abbildung 23 dargestellt. Es ähnelt dem Muster, das aus der Ablösung mit EDTA und TrypLE resultierte (Abbildung 21), jedoch ist der Shift bei der Färbung von CD11b im Vergleich etwas geringer.

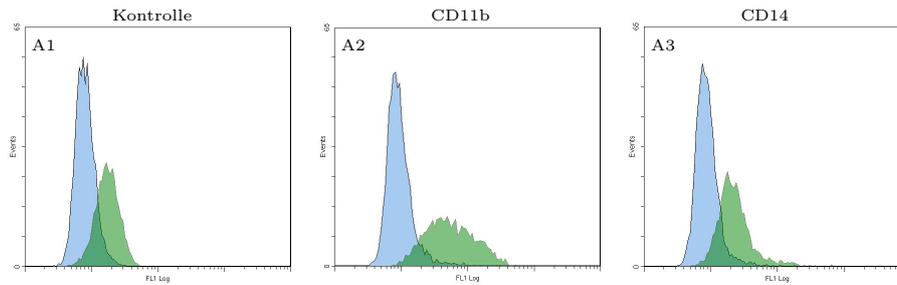


Abb. 23: Differenzierungsstatus: 72 h, Collagenbeschichtung

Die Abbildung zeigt die Histogramme einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b und CD14, die mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. In grün: Makrophagen (72 h mit 10 nm PMA), in blau: undifferenzierte THP-1 Zellen. Die Kontrollen ohne Antikörper zeigten nur eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen (A1). Die Färbung von CD11b lieferte einen deutlichen Shift der Makrophagen gegenüber THP-1 Zellen (A2). Die Färbung von CD14 (A3) lieferte eine geringere Verschiebung als CD11b, lediglich die rechte Flanke des Peaks ist verschoben.

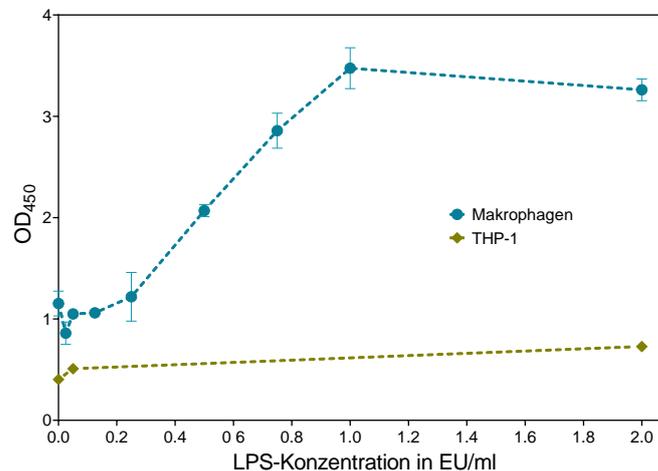


Abb. 24: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Collagen beschichtet

Die Abbildung zeigt die Extinktion über der LPS-Konzentration, der die Zellen für 18 h ausgesetzt waren. Jede LPS-Konzentration wurde in Triplets vermessen und die Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen. Oliv: THP-1 Zellen; blau: Makrophagen.

Für den IL-6 ELISA kam LPS aus *E. coli* 055:B5 zum Einsatz. Abweichend zu dem Vorgehen, das unter Abschnitt 3.3 beschrieben ist, wurden die einzelnen Wells statt mit einer Pipette durch ausschlagen der Platte entleert. In Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse des ELISAs. Bis zu einer LPS-Konzentration von 1 EU ml⁻¹ nimmt die OD des Makrophagenüberstandes stetig zu und sinkt bis 2 EU ml⁻¹ leicht ab. Auffällig ist



jedoch, dass die Makrophagen auch ohne LPS eine Extinktion von 1,1 lieferten. Auch undifferenzierte THP-1 Zellen zeigen durchgehend mit etwa 0,5 höhere Extinktionswerte als in vorangegangenen Versuchen.

4.3.5 Ablösung mit TrypLE express im Vergleich zu einem Zellschaber

Da die Ausbeute der Ablösung von differenzierten THP-1 Zellen noch nicht verbessert werden konnte, wurde mit einem Zellschaber gearbeitet. Für eine bessere Erreichbarkeit und um mehr Makrophagen zur Verfügung zu haben, wurden THP-1 Zellen mit 10 nm PMA in Kulturschalen ausgesät. Nach 72 h Differenzierung wurden die Zellen für 5 Minuten mit 10 mM EDTA in PBS inkubiert und mit dem Zellschaber vorsichtig abgelöst. Zusätzlich wurden Makrophagen mit TrypLE von der Kulturschale gelöst, um beide Ansätze vergleichen zu können. Die Ablösung mit dem Zellschaber führte zu einer Ausbeute von etwas mehr als 100 %, während TrypLE Makrophagen zu etwa 50 % von der Oberfläche einer Kulturschale ablöste. Um die Differenzierung jeweils beurteilen zu können, wurde die Expression von CD14 mit dem Durchflusszytometer untersucht (Abbildung 25). Die Kontrollen, bei denen kein Antikörper zum Einsatz kam (A1 und B1) zeigten eine leichte Verschiebung der Fluoreszenzintensität von den Makrophagen im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Die Färbung von CD14 (A2 und B2) lieferte einen deutlichen Shift bei den Makrophagen im Vergleich zu den Kontrollen und THP-1 Zellen. Beide Ablösebedingungen zeigten keine Unterschiede im Differenzierungsstatus.

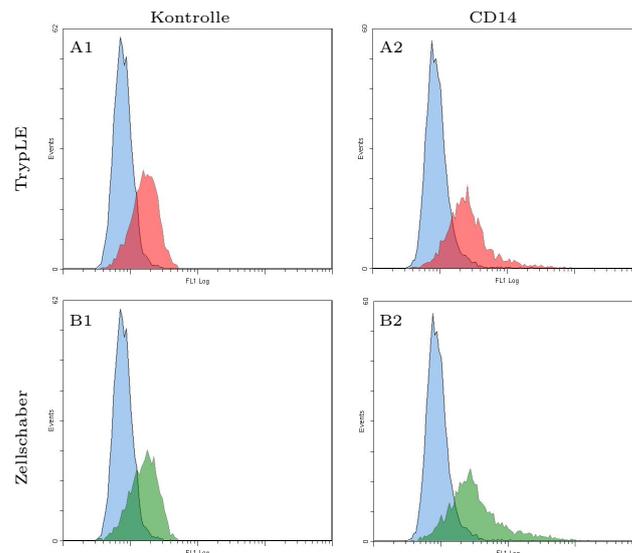


Abb. 25: Differenzierungsstatus: 72 h, TrypLE vgl. Zellschaber

Die Abbildung zeigt die Histogramme einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD14, die mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. In rot: Makrophagen (72 h) mit TrypLE abgelöst; in grün: Makrophagen (72 h) mit dem Zellschaber abgelöst; in blau: undifferenzierte THP-1 Zellen. Die Kontrollen ohne Antikörper zeigten nur eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen (A1 und B1). Die Färbung von CD14 (A2 und B2) lieferte eine Verschiebung im Vergleich zur Kontrolle.

Ob die differenzierte Zellen auf LPS mit der Sekretion von IL-6 reagieren, wurde mit Hilfe eines ELISAs überprüft. Die Abbildung 26 zeigt links die Auftragung von Extinktion über der LPS-Konzentration von mit TrypLE abgelösten Zellen. Neben LPS von *E. coli* 055:B5 (in blau dargestellt), kam der Referenz-Standard von Endotoxinen (RSE) zum Einsatz (in orange). Die Inkubation mit LPS von führt zu einem von der Konzentration abhängigen Anstieg der OD Werte bis zu einem Wert von 3,7 bei 2 EU ml⁻¹. Bis 0,75 EU ml⁻¹ liegt ein linearer Anstieg vor ($R^2 = 0,989$), da das Bestimmtheitsmaß R^2 über 0,95 liegt. Auch bei Kontakt mit RSE bildeten Makrophagen abhängig von der Konzentration IL-6, was sich in einem Anstieg der OD bis 1,8 widerspiegelt. Eine Linearität ist nicht erkennbar.

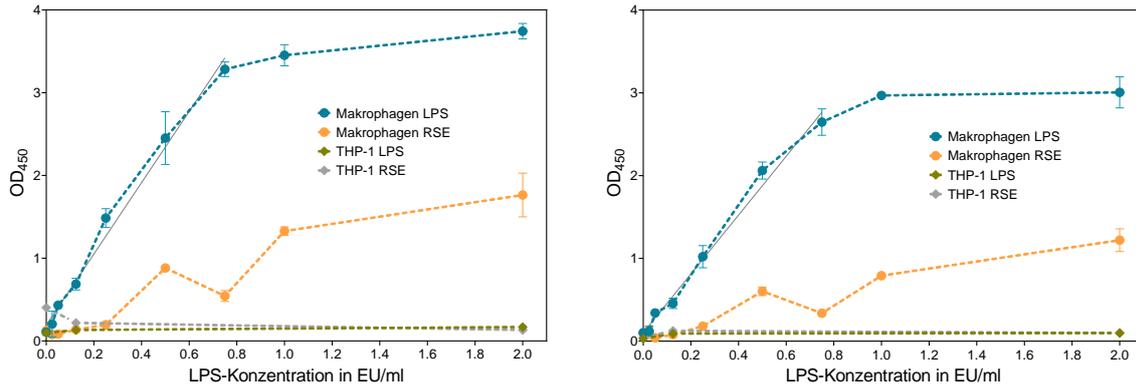


Abb. 26: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, TrypLE vs. Zellschaber
 Aufgetragen sind die Extinktionen über der LPS-Konzentration. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus einem Triplet dar, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken aufgetragen. Links: mit TrypLE abgelöst; rechts: mit einem Zellschaber abgelöst. In blau: Makrophagen mit LPS aus *E. coli* 055:B5; in orange: Makrophagen mit RSE; in oliv: THP-1 mit LPS; in grau: THP-1 mit RSE.

Rechts in der Abbildung 26 sind die Ergebnisse des ELISA mit Makrophagen dargestellt, die mit einem Zellschaber von der Kulturschale gelöst wurden. Wie bei der Ablösung durch TrypLE, zeigen sowohl die Makrophagen, die mit LPS, als auch jene, die mit RSE inkubiert wurden einen Anstieg der OD, der proportional zur eingesetzten Konzentration ist. Bei LPS lässt sich bis $0,75 \text{ EU ml}^{-1}$ ein linearer Zusammenhang erkennen ($R^2 = 0,989$) und ein Endwert von 3 wurde erreicht. Bei RSE zeigte sich mit 2 EU ml^{-1} eine OD von 1,2. Auffällig ist, dass beide Kurven mit RSE bei $0,75 \text{ EU ml}^{-1}$ im Vergleich zum weiteren Verlauf absinken. Dies ist wahrscheinlich auf einen Fehler bei der Verdünnung zurück zu führen. Das Ablöseverfahren zeigt keinen Einfluss auf die Differenzierung und die Funktionalität der Makrophagen. Für weitere Experimente wurde aufgrund einer höheren Ausbeute eine Ablösung mit einem Zellschaber gewählt.

4.3.6 Ablösung mit einem Zellschaber; Kryokonservierung

Um sicher zu gehen, dass mit PMA differenzierte und mit dem Zellschaber abgelöste Makrophagen ihren Differenzierungsstatus erhalten, wenn sie kryokonserviert werden, wurden diese nach 72 h Inkubation mit PMA wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben mit einem Zellschaber abgelöst und eingefroren. Verglichen wurden zum einen die Expression der für Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD11b und CD14 (Abbildung 27)

direkt nach dem Auftauen, sowie die Sekretion von IL-6 bei Disposition mit LPS bzw. RSE (Abbildung 28). Die Kontrollen der Makrophagen ohne Antikörper zeigten bei der Messung mit dem Durchflusszytometer sowohl im frischen, als auch aufgetauten Zustand nur eine leichte Verschiebung der Fluoreszenzintensität (A1 und B1). Die Färbung von CD11b führte in beiden Fällen zu einer starken Verschiebung, von CD14 zu einem geringeren, aber dennoch erkennbaren Shift. Es konnte kein Unterschied in der Expression von CD11b und CD14 und damit im Differenzierungsstatus zwischen den beiden Bedingungen erkannt werden.

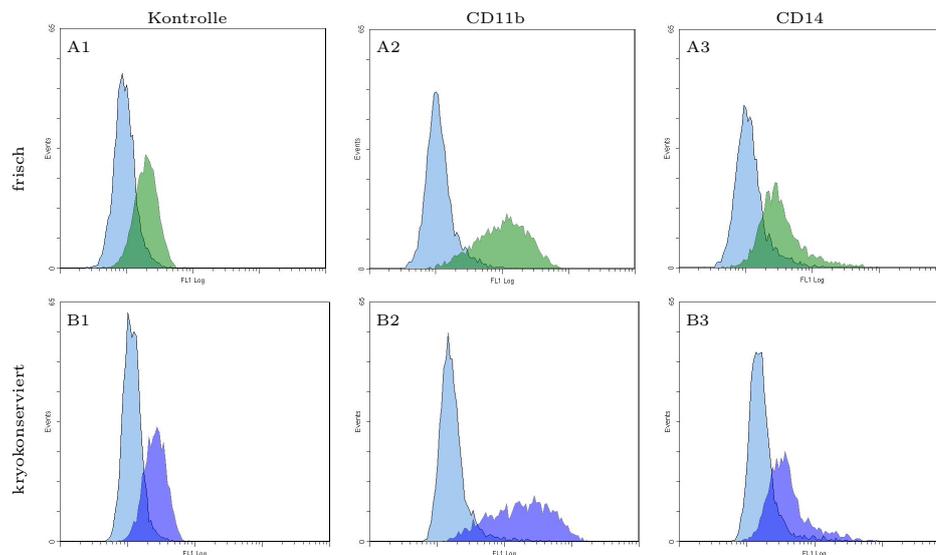


Abb. 27: Differenzierungsstatus: 72 h, Zellschaber, kryokonserviert

Die Abbildung zeigt die Histogramme einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b und CD14, die mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. In grün: frisch differenzierte Makrophagen (72 h); in dunkelblau: aufgetaute, kryokonservierte Makrophagen (72 h); in blau: undifferenzierte THP-1 Zellen. Die Makrophagen wurden mit einem Zellschaber abgelöst. Die Kontrollen ohne Antikörper zeigten nur eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen (A1 und B1). Der Antikörper gegen CD11b führte in beiden Fällen zu einem deutlichen Shift (A2 und B2). Die Färbung von CD14 (A3 und B3) lieferte eine leichte Verschiebung im Vergleich zur Kontrolle.

Für den ELISA wurden kryokonservierte Makrophagen (72 h differenziert), die vor dem Einfrieren mit dem Zellschaber abgelöst worden waren, aufgetaut, gezählt und in 96-Well Platten ausgesät. Zusätzlich wurden frisch differenzierte Zellen (72 h) mit dem Zellschaber abgelöst und ebenfalls in 96-Well Platten eingesät. Nach 4 h, in denen die Zellen adhärenz werden konnten, begann die Inkubation mit LPS bzw. RSE für 18 h. Das während dieser



Zeit gebildete IL-6 wurde mittels ELISA quantifiziert (Abbildung 28). Sowohl frisch differenzierte Zellen, als auch kryokonservierte zeigten einen von der Endotoxinkonzentration abhängigen Anstieg der OD. Wie in vorherigen Experimenten, führt die Inkubation mit LPS von *E. coli* 055:B5 zu höheren Extinktionen als der Standard RSE. Frische Makrophagen erreichten mit LPS einen Wert von 2,5 mit 2 EU ml^{-1} , kryokonservierte einen Wert von 2,7. Mit RSE lieferten die Makrophagen eine OD von 1,2 (frisch) bzw. 1,1 (kryokonserviert). Die Zellen zeigten unter beiden Bedingungen eine vergleichbare Reaktion auf LPS bzw. RSE, was in sehr ähnlichen Kurvenverläufen resultiert.

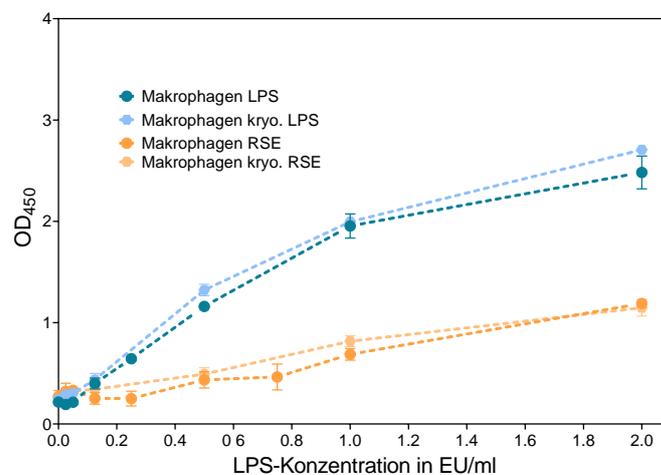


Abb. 28: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, kryokonserviert

Diese Abbildung zeigt die Extinktion über der LPS-Konzentration. Frisch differenzierte Zellen sind in dunkler, kryokonservierte Makrophagen in heller Farbe dargestellt. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus einem Triplikat dar, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken aufgetragen. In blau: Makrophagen mit LPS von *E. coli* 055:B5; in orange: Makrophagen mit RSE.

4.3.7 Inkubation mit Peptidoglycan und Endotoxin

In der Literatur wird beschrieben, dass Peptidoglycan in einer Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ die Reaktion von Makrophagen auf Endotoxine verstärken kann, ohne selbst toxische Effekte zu induzieren [4]. Um eine mögliche Verstärkung zu testen, wurden Makrophagen in 96-Well Platten ausgesät, RSE zusammen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Peptidoglycan hinzu gegeben und für 18 h inkubiert. Die Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse des IL-6 ELISAs. Es ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der OD zu erkennen, bei 2 EU ml^{-1}



wurde ein Wert von 1,2 (nur RSE) bzw. 1,1 (RSE & PGN) erreicht. Allerdings zeigte sich auch ohne Zugabe von RSE bereits eine OD von 0,4 (nur RSE) und 0,8 (RSE & PGN). Beide Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf. Da eine Verstärkung der Reaktion von Makrophagen auf RSE durch Peptidoglycan nicht gezeigt werden konnte, kam diese Substanz in den weiteren Experimenten nicht zum Einsatz.

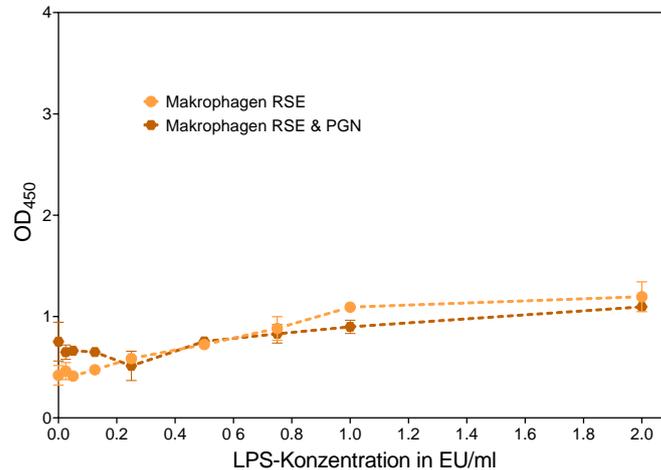


Abb. 29: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, Peptidoglycan

Diese Abbildung zeigt die Auftragung der Extinktion über der LPS-Konzentration. In orange: Makrophagen mit RSE inkubiert; in dunkelorange: Makrophagen mit RSE & Peptidoglycan (PGN) inkubiert. Jeder Messpunkt stellt den Mittelwert aus einem Triplet dar, die Standardabweichung ist als Fehlerbalken aufgetragen.

4.4 72 h Differenzierung mit Ruhephase

THP-1 Zellen wurden mit 10 nM PMA für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, wie es in Abschnitt 3.1.5 beschrieben ist, um diese zu Makrophagen zu differenzieren. Es folgte eine Ruhephase von weiteren 72 h ohne PMA, da in der Literatur beschrieben wird, dass sich dadurch die Expression von für Makrophagen typischen Markern erhöhen lässt [38]. Makrophagen waren adhärent und zeigten eine spindelförmige Morphologie mit Ausläufern (Abbildung 30 rechts). Nicht differenzierte Zellen wiesen weiterhin eine runde Morphologie auf, auch Zelldebris war vereinzelt zu sehen. Im Vergleich zu einer 48 stündigen Differenzierung zeigten sich optisch eine deutlich höhere Anzahl an differenzierten Zellen.

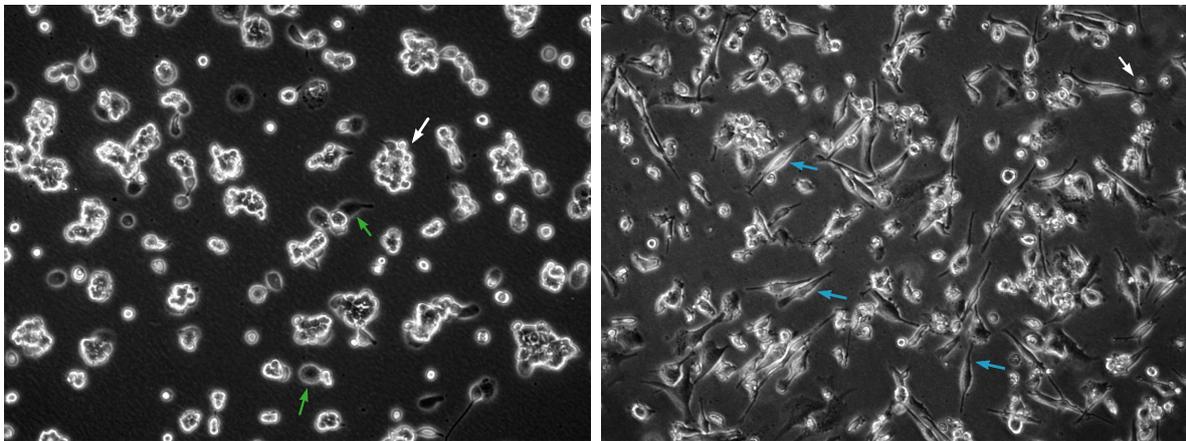


Abb. 30: Für 72 h differenzierte THP-1 Zellen und 72 h Ruhephase vs. 48 h Differenzierung

Diese Abbildung zeigt links THP-1 Zellen nach einer Differenzierung von 48 h mit 10 nM PMA. Und rechts zum Vergleich für 72 h mit 10 nM PMA differenzierte THP-1 Zellen in einer Zellkulturschale. An die Inkubation wurde nach einem Medienwechsel eine Ruhephase von 72 h angeschlossen. Makrophagen werden adhärent, weisen eine spindelförmige Morphologie auf und zeigen Ausstülpungen (blaue Pfeile). Nicht differenzierte Zellen zeigen eine runde Morphologie (weiße Pfeile) und Zelldebris ist ebenfalls zu erkennen. Das Bild wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen.

4.4.1 Ablösung mit einem Zellschaber; erneute Kultivierung

Um zu gewährleisten, dass das PMA für eine Ruhephase entfernt wird, wurden die für 72 h differenzierten THP-1 Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche einer



Zellkulturschale abgelöst, mit Medium gewaschen und für eine Ruhephase von 72 h ohne PMA erneut ausgesät. Der Einfluss einer an die Differenzierung angeschlossenen Ruhephase ohne PMA auf den Differenzierungsstatus von Makrophagen wurde mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b und CD14 am Durchflusszytometer untersucht. In Abbildung 31 sind die Histogramme der Färbungen aufgetragen. Die Makrophagen zeigen bei den Kontrollen ohne Antikörper eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen. Die Färbung von CD11b führte zu einem deutlichem Shift der Makrophagen zu nicht differenzierten Zellen (B2). Die Inkubation mit dem Antikörper gegen CD14 hatte, anders als in vorangegangenen Experimenten ebenfalls eine sehr deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität zur Folge (B3 im Vergleich zu A3). Dies deckt sich mit Beschreibungen in der Literatur [38].

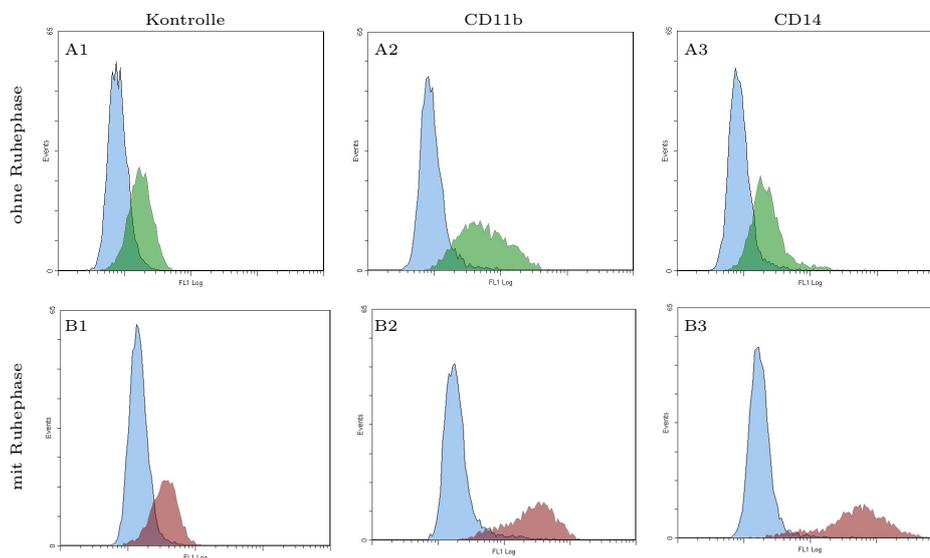


Abb. 31: Differenzierungsstatus: 72 h, 72 h Ruhephase (mit Ablösung)

Die Abbildung zeigt die Histogramme einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b und CD14, die mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. In grün: für 72 h differenzierte Makrophagen ohne Ruhephase; in rot: für 72 h differenzierte Makrophagen, mit einem Zellschaber abgelöst und für eine Ruhephase von 72 h erneut ausgesät; in blau: undifferenzierte THP-1 Zellen. Die Kontrollen ohne Antikörper zeigten nur eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen (A1 und B1). Der Antikörper gegen CD11b führte zu einem deutlichen Shift (A2 und B2). Die Färbung von CD14 (B3) lieferte ebenfalls eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität bei Zellen mit Ruhephase.

Um die Empfindlichkeit von Makrophagen, die nach 72 h Differenzierung für eine Ruhephase von 72 h abgelöst und erneut ausgesät wurden, gegenüber Endotoxin zu testen,



wurden diese für 18 h mit LPS von *E. coli* 055:B5 bzw. mit RSE inkubiert. Das gebildete IL-6 wurde mittels ELISA quantifiziert. Rechts in der Abbildung 32 sind die resultierenden OD-Werte von frischen Makrophagen im Vergleich zu differenzierten Zellen ohne Ruhephase dargestellt, während Abbildung 33 die Ergebnisse kryokonservierter Zellen zeigt. Frische Makrophagen lieferten mit *E. coli* LPS einen sehr steilen Anstieg der OD bereits bei geringer Konzentration, ab 0,25 EU ml⁻¹ scheint eine Sättigung einzutreten, da die OD ab dieser Konzentration nahezu konstant hoch (um 3,5) blieb. Bis 0,125 lag mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,98 ein linearer Zusammenhang vor. Die Nachweisgrenze lag bei LPS von *E. coli* bei 0,025 EU ml⁻¹, das heißt, die OD, die sich bei der genannten Konzentration als Mittelwert ergab, war höher als der dreifache Wert der Standardabweichung. Der Detektionsbereich lag zwischen 0,025 und 0,25 EU ml⁻¹, also zwischen der Nachweisgrenze und dem Eintreten einer Sättigung, sofern ein linearer Zusammenhang vorliegt. Die Inkubation mit RSE hatte einen weniger steilen Anstieg der OD zur Folge, bis zu einer Konzentration von 0,75 EU ml⁻¹ stieg die Extinktion linear an. Die Regression wies ein Bestimmtheitsmaß von 0,97 auf. Bei 2 EU ml⁻¹ wurde eine OD von 3,3 erreicht. Die Nachweisgrenze von RSE lag bei 0,05 EU ml⁻¹ und der Detektionsbereich erstreckte sich bis 0,75 EU ml⁻¹. Durch eine Ruhephase im Anschluss der Differenzierung konnte die Funktionalität der Makrophagen erhöht werden, wie im Vergleich mit den IL-6 ELISA Ergebnissen einer 72 h Differenzierung ohne Ruhephase deutlich wird (links in der Abbildung 32).

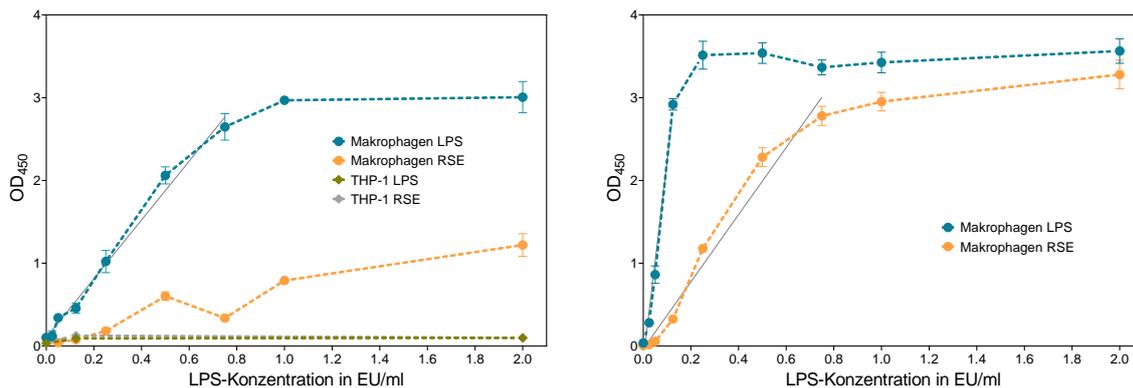


Abb. 32: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (mit Ablösung)

In dieser Abbildung ist die Extinktion über der LPS-Konzentration aufgetragen. Jede Konzentration wurde in Triplikaten gemessen und der Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen. Links: 72 h Differenzierung ohne Ruhephase; rechts: 72 h Differenzierung mit 72 h Ruhephase (mit Ablösung). In blau: Makrophagen mit LPS von *E. coli* 055:B5; in orange: Makrophagen mit RSE.

Kryokonservierte Makrophagen (Abbildung 33) zeigten ebenfalls einen von der Endotoxinkonzentration abhängigen Anstieg der OD. Die Inkubation mit LPS von *E. coli* führte bis zu einer Konzentration von $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$ zu einer linearen Beziehung ($R^2 = 0,99$), bei 2 EU ml^{-1} war eine OD von 2,4 erreicht. Die Nachweisgrenze mit LPS lag bei $0,025 \text{ EU ml}^{-1}$, der Detektionsbereich ging bis $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$. Kamen kryokonservierte Makrophagen in Kontakt mit RSE, zeigten diese über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich einen linearen Anstieg der OD ($R^2 \approx 1$) bis zu einem Wert von 1,3 bei 2 EU ml^{-1} . Die Nachweisgrenze lag bei reproduzierbar bei $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$. Der Detektionsbereich erstreckte sich bis 2 EU ml^{-1} .

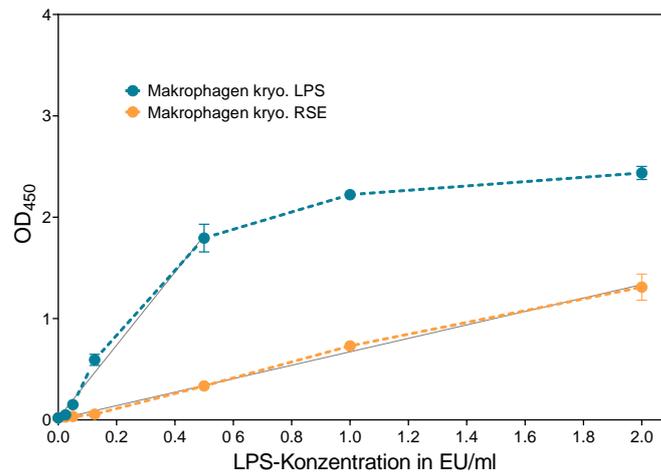


Abb. 33: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (mit Ablösung), kryokonserviert

In dieser Abbildung ist die Extinktion über der LPS-Konzentration aufgetragen. Jede Konzentration wurde in Triplikaten gemessen und der Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen. Die Zellen wurden für 72 h differenziert, anschließend mit einem Zellschaber abgelöst und für eine Ruhephase von 72 h ohne PMA erneut ausgesät und kryokonserviert. In blau: Makrophagen mit LPS von *E. coli* 055:B5; in orange: Makrophagen mit RSE.

4.4.2 Ablösung mit einem Zellschaber; Medienwechsel

Bei für 72 h differenzierte ZHP-1 Zellen wurde im Anschluss der Differenzierung das Medium gewechselt, sodass das PMA entfernt wurde. Es folgte eine Ruhephase von 72 h. Der Differenzierungsstatus wurde am Durchflusszytometer untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 34 im Vergleich zu Makrophagen, die für eine Ruhephase abgelöst und erneut eingesät wurden, dargestellt. Die Makrophagen zeigen bei den Kontrollen ohne Antikörper eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (B1). Die Färbung von CD11b führte zu einem deutlichem Shift der Makrophagen zu nicht differenzierten Zellen (B2). Die Inkubation mit dem Antikörper gegen CD14 hatte ebenfalls eine sehr deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität zur Folge (B3), welche sich nicht signifikant von der Verschiebung bei einer Ruhephase mit Ablösung (A3) unterschied.

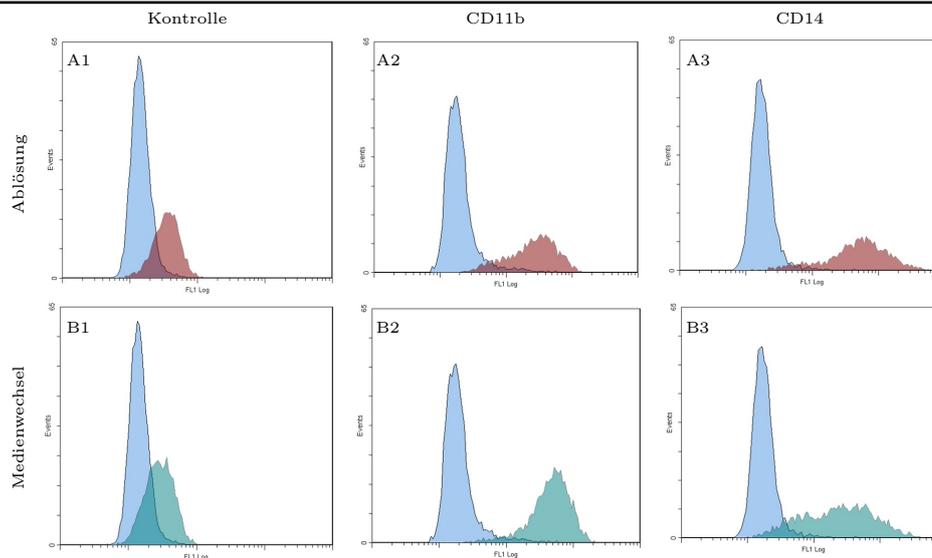


Abb. 34: Differenzierungsstatus: 72 h, 72 h Ruhephase (Medienwechsel)

Die Abbildung zeigt die Histogramme einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b und CD14, die mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. In rot: für 72 h differenzierte Makrophagen mit einer Ruhephase von 72 h (abgelöst und neu ausgesät). In türkis: für 72 h differenzierte Makrophagen mit einer Ruhephase von 72 h (nur Medienwechsel); in blau: undifferenzierte THP-1 Zellen. Die Kontrollen ohne Antikörper zeigten nur eine leichte Verschiebung im Vergleich zu undifferenzierten THP-1 Zellen (A1 und B1). Der Antikörper gegen CD11b führte zu einem deutlichen Shift (A2 und B2). Die Färbung von CD14 (A3 und B3) lieferte ebenfalls eine deutliche Verschiebung der Fluoreszenzintensität.

In Abbildung 35 unter A2 sind die Ergebnisse des IL-6 ELISAs von frischen Makrophagen dargestellt, während unter B2 die Ergebnisse kryokonservierter Zellen zeigt, jeweils im Vergleich mit für die Ruhephase abgelösten Zellen. Frische Makrophagen lieferten mit *E. coli* LPS einen sehr steilen Anstieg der OD bis $0,75 \text{ EU ml}^{-1}$ mit einem Wert von 3,8. Danach sinkt die OD auf einen Wert von 3,4. Bis $0,25 \text{ EU ml}^{-1}$ lag mit einem Bestimmtheitsmaß von 0,97 ein linearer Zusammenhang vor. Die Nachweisgrenze lag bei LPS von *E. coli* bei $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$. Der Detektionsbereich lag zwischen $0,05$ und $0,25 \text{ EU ml}^{-1}$. Die Inkubation mit RSE hatte einen weniger steilen Anstieg der OD zur Folge, bis zu einer Konzentration von 1 EU ml^{-1} stieg die Extinktion linear an. Die Regression wies ein Bestimmtheitsmaß von 0,98 auf. Bei 2 EU ml^{-1} wurde eine OD von 3,1 erreicht. Die Nachweisgrenze von RSE lag bei $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$ und der Detektionsbereich erstreckte sich bis 1 EU ml^{-1} .

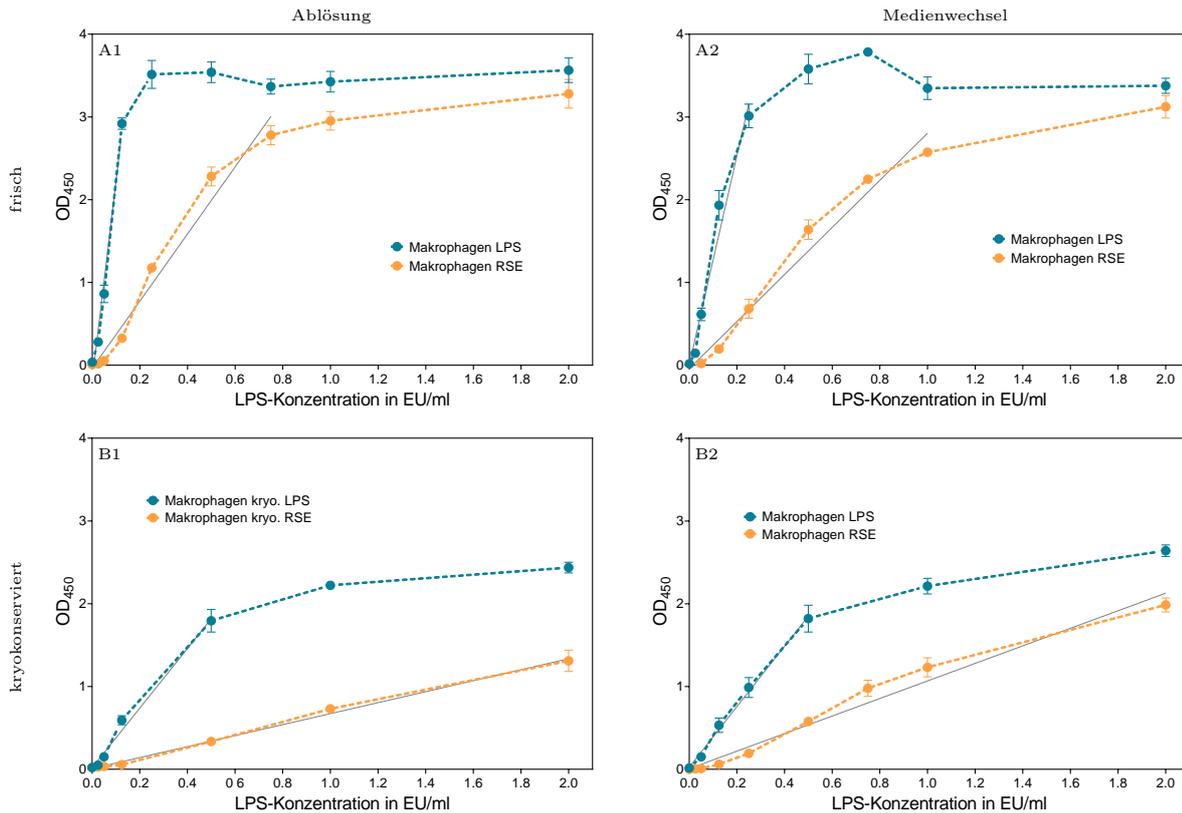


Abb. 35: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (Medienwechsel), kryokonserviert

In dieser Abbildung sind die Extinktionen über der LPS-Konzentration aufgetragen. Jede Konzentration wurde in Triplikaten gemessen und der Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen. Die Zellen wurden für 72 h differenziert, abgelöst (linke Seite) bzw. das Medium gewechselt (rechte Seite), für eine Ruhephase von 72 h ohne PMA kultiviert und kryokonserviert. In blau: Makrophagen mit LPS von *E. coli* 055:B5; in orange: Makrophagen mit RSE.

Kryokonservierte Makrophagen (B2) zeigten ebenfalls einen von der Endotoxinkonzentration abhängigen Anstieg der OD. Die Inkubation mit LPS von *E. coli* führte bis zu einer Konzentration von $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$ zu einer linearen Beziehung ($R^2 = 0,99$), bei 2 EU ml^{-1} war eine OD von 2,6 erreicht. Die Nachweisgrenze mit LPS lag bei $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$, der Detektionsbereich ging bis $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$. Kamen kryokonservierte Makrophagen in Kontakt mit RSE, zeigten diese über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich einen linearen Anstieg der OD ($R^2 = 0,98$) bis zu einem Wert von 1,9 bei 2 EU ml^{-1} . Die Nachweisgrenze lag bei reproduzierbar bei $0,125 \text{ EU ml}^{-1}$. Der Detektionsbereich erstreckte sich von $0,125$ bis 2 EU ml^{-1} . Die Funktionalität der Makrophagen unterschied sich bei den beiden Varianten kaum. Wurden die differenzierten Zellen vor der Ruhephase



abgelöst und gewaschen führte das zu einem etwas steileren Anstieg der OD im Vergleich zu Zellen, bei denen lediglich ein Medienwechsel vorgenommen wurde (A1 im Vergleich zu A2). In beiden Fällen zeigten kryokonservierte Zellen nicht die gleiche Funktionalität wie frische Zellen (B im Vergleich zu A).

4.4.3 Ruhephase nach dem Auftauen

Wie in Abbildung 35 erkennbar, zeigten kryokonservierte, für 72 h differenzierte THP-1 Zellen, die nach der Differenzierung für eine Ruhephase von 72 h ohne PMA inkubiert wurden (mit Ablösung vor der Ruhephase oder nur mit einem Medienwechsel) eine niedrigere OD im IL-6 ELISA und damit eine geringere Funktionalität als frische Zellen. Aus diesem Grund wurden die Makrophagen nach dem Auftauen für 24 h bei 37 °C inkubiert.

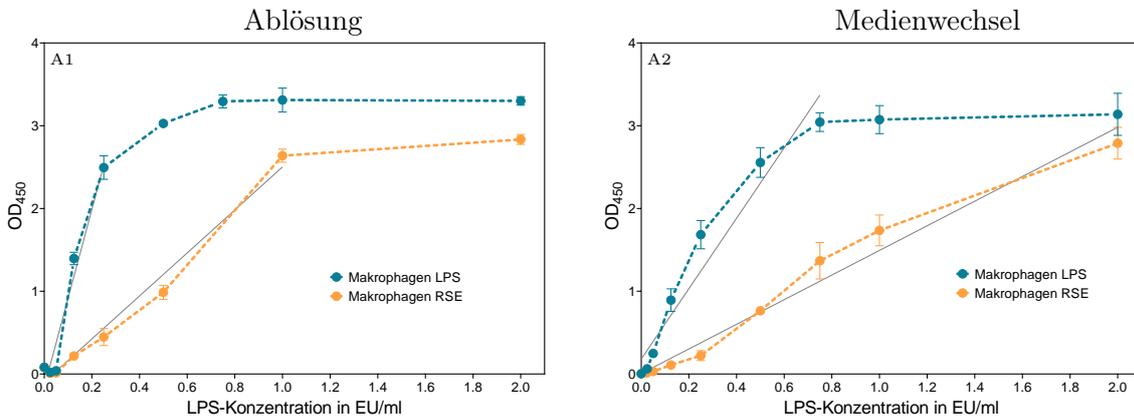


Abb. 36: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase (mit Ablösung oder Medienwechsel), kryokonserviert, 24 h Ruhephase

In dieser Abbildung sind die Extinktion über der LPS-Konzentration aufgetragen. Jede Konzentration wurde in Triplikaten gemessen und der Mittelwert zusammen mit der Standardabweichung als Fehlerbalken aufgetragen. Die Zellen wurden für 72 h differenziert, mit einem Zellschaber abgelöst und für eine Ruhephase von 72 h ohne PMA erneut ausgesät (A1), bzw. das PMA durch einen Medienwechsel entfernt (A2). Die kryokonservierten Zellen erhielten nach dem Auftauen eine weitere Ruhephase von 24 h. In blau: Makrophagen mit LPS von *E. coli* 055:B5; in orange: Makrophagen mit RSE.

Auf der linken Seite von Abbildung 36 unter A1 sind die Ergebnisse des IL-6 ELISAs nach der Inkubation von LPS bzw. RSE mit Makrophagen, die vor der Ruhephase mit einem Zellschaber abgelöst wurden, dargestellt. LPS führte zu einem steilen Anstieg der OD, bis sich diese ab einer Konzentration von 0,75 EU ml⁻¹ bei einem Wert von 3,3. Bis zu



einer Konzentration von $0,25 \text{ EU ml}^{-1}$ liegt ein linearer Zusammenhang vor ($R^2 = 0,95$). Die Nachweisgrenze mit LPS lag bei $0,025 \text{ EU ml}^{-1}$ und der Detektionsbereich erstreckte sich bis $0,75 \text{ EU ml}^{-1}$. Die Inkubation mit RSE hatte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der OD zur Folge. Bis zu einer Konzentration von 1 EU ml^{-1} liegt mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von $0,98$ der Regression eine lineare Beziehung vor. Bei 2 EU ml^{-1} wurde eine OD von $2,8$ erreicht. Die Nachweisgrenze mit RSE lag bei $0,125 \text{ EU ml}^{-1}$, der Detektionsbereich ging bis 1 EU ml^{-1} .

Auf der rechten Seite von Abbildung 36 unter A2 sind die Ergebnisse des IL-6 ELISAs der kryokonservierten Makrophagen, die für 72 h differenziert wurden, für eine Ruhephase von 72 h inkubiert wurden (Medienwechsel) und nach dem Auftauen erneut eine Ruhephase von 24 h erhielten. Die Makrophagen, die LPS von *E. coli* ausgesetzt waren, zeigten einen steilen Anstieg der OD, bis diese ab einer Konzentration von $0,75 \text{ EU ml}^{-1}$ konstant bei $3,1$ blieb. Die Linearität erstreckte sich ebenfalls bis $0,75 \text{ EU ml}^{-1}$ mit einem Bestimmtheitsmaß der Regression von $0,95$. Auch der Detektionsbereich ging bis $0,75 \text{ EU ml}^{-1}$, die Nachweisgrenze lag bei $0,025 \text{ EU ml}^{-1}$. Eine Inkubation mit RSE führte zu einer geringeren Steigung, es zeigte sich eine Proportionalität zur eingesetzten Konzentration. Über den gesamten untersuchten Konzentrationsbereich lag eine lineare Beziehung mit einem Bestimmtheitsmaß der Regression von $0,98$ vor, weshalb auch der Detektionsbereich bis 2 EU ml^{-1} ging. Die Nachweisgrenze lag bei $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$. Bei der höchsten gemessenen Konzentration lag die OD bei $2,8 \text{ EU ml}^{-1}$.

Die Ruhephase im Anschluss an den Auftauvorgang hatte bei den beiden untersuchten Bedingungen eine starke Steigung der OD und eine hohe Sensitivität zur Folge.

4.4.4 Lipoteichonsäure

Für 72 h differenzierte THP-1 Zellen wurden nach einer Ruhephase von 72 h ohne PMA (Medienwechsel) mit einem Zellschaber abgelöst. Um zu testen, ob die aus THP-1 Zellen differenzierten Makrophagen auf andere Pyrogene neben Endotoxinen mit der Sekretion von Zytokinen reagieren, wurden diese statt mit LPS oder RSE mit Lipoteichonsäure



(LTA) in Kontakt gebracht. Analog zur Inkubation mit LPS bzw. RSE verblieb die Substanz für 18 h auf den Zellen, bevor die Sekretion von IL-6 quantifiziert wurde. Dabei wurden sowohl frisch differenzierte, als auch kryokonservierte Zellen verwendet. Die Abbildung 37 zeigt die Auftragung der Extinktion über der LTA-Konzentration. Bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ stiegen beide Kurven linear an, danach lagen die OD Werte konstant um einen Wert von 2,8. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen frischen und kryokonservierten Makrophagen.

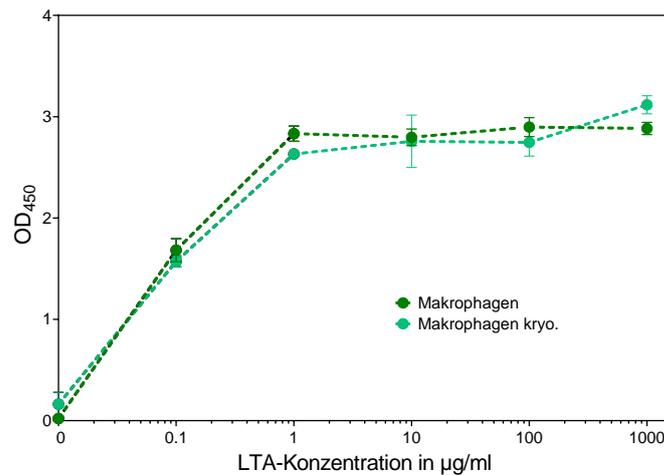


Abb. 37: IL-6 ELISA: 72 h Differenzierung, Kulturschale, 72h Ruhephase, LTA

Diese Abbildung zeigt die Auftragung der Extinktion über der LTA-Konzentration. Es kamen Makrophagen zum Einsatz, die für 72 h differenziert wurden und anschließend für eine Ruhephase 72 h kultiviert wurden. In dunkelgrün: frische Makrophagen; in hellgrün: kryokonservierte Makrophagen. Bis zu einer Konzentration von $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ stiegen beide Kurven linear an, danach lagen die OD Werte konstant um einen Wert von 2,8. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen frischen und kryokonservierten Makrophagen.

4.5 LAL-Test

Das eingesetzte RSE wurde zusätzlich mit einem LAL-Test untersucht, um die Wiederfindung der Verdünnungen mit einer etablierten Standardmethode zu untersuchen. Der Assay wurde wie in Abschnitt 3.4 beschrieben durchgeführt. Der beiliegende Standard wurde wie angegeben verdünnt, um eine Standardgerade zu erzeugen. Abbildung 38 zeigt die Auftragung der OD bei 405 nm Wellenlänge über der LPS-Konzentration in EU ml^{-1} der Standardgerade. Mit einem Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,996 konnte ein linearer



Zusammenhang erzeugt werden. Die Funktionsgleichung der linearen Regression kann der Abbildung entnommen werden und diente für die Berechnung der RSE-Konzentrationen aus den OD-Werten der Proben.

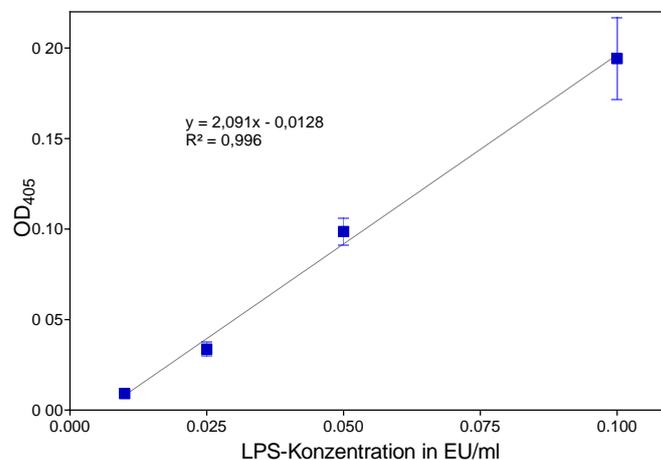


Abb. 38: LAL-Test, Standardkurve

Die Abbildung zeigt die mit dem LAL-Test ermittelte Standardkurve des mitgelieferten Endotoxinstandards. Aufgetragen ist die OD in 405 nm über der LPS-Konzentration in EU ml⁻¹. Die lineare Regression zeigte ein Bestimmtheitsmaß von 0,996 und die Regressionsgleichung lässt sich der Abbildung entnehmen. Diese wurde für die Berechnung der LPS-Konzentration in den Proben aus deren OD verwendet.

In Tabelle 13 sind die durch Verdünnungen eingestellten RSE Konzentrationen, die mit dem LAL-Test gemessen wurden, den aus Messwerten und der Regressionsgleichung bestimmten Konzentrationen gegenüber gestellt. Die Wiederfindung bei der höchsten gemessenen Konzentration (0,1 EU ml⁻¹) ist mit 106 % sehr gut und nimmt mit sinkender Konzentration ab. Die niedrigste gemessene Konzentration von 0,01 EU ml⁻¹ konnte noch eine Wiederfindung von 34 % erreichen.



Tab. 13: RSE wurde so verdünnt (mit Endotoxin-freiem Wasser), dass sich die folgenden errechneten Konzentrationen ergaben. Diese wurden mit dem LAL-Test gemessen und die Konzentrationen über die Regression bestimmt. Aus diesen beiden Werten wurde die Wiederfindung errechnet.

RSE in EU ml ⁻¹	RSE _{Regression} in EU ml ⁻¹	Wiederfindung
0,01	-0,0034	34 %
0,025	0,0111	44 %
0,05	0,0421	84 %
0,1	0,1055	106 %

Zusätzlich wurde LTA in einer Konzentration von 100 µg ml⁻¹ mit dem LAL-Test gemessen, um zu überprüfen, ob dieser Test in der Lage ist neben Endotoxin auch andere Pyrogene zu detektieren. Die eingesetzte LTA Konzentration führte bei Makrophagen zu einer starken Sekretion von IL-6 (Abbildung 37), der LAL-Test hingegen lieferte einen Wert, der äquivalent zu 0,02 EU ml⁻¹ Standard Endotoxin war.



5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es Differenzierungsbedingungen zu finden, die für eine möglichst starke Reaktion von differenzierten Zellen auf Stimuli von Pyrogenen (LPS, RSE und LTA) sorgen. Angepasst wurden einerseits die Differenzierungsdauer, sowie eine Ruhephase im Anschluss an die Differenzierung. Des Weiteren wurde der Einfluss einer Kryokonservierung auf den Differenzierungsstatus und die Reaktion auf Pyrogene im Vergleich zu frisch differenzierten Zellen untersucht, um sie assay ready anbieten zu können.

5.1 Einfluss des Kunststoffmaterials

Ein möglicher Einfluss des Kunststoffmaterials auf die Kultivierung und Differenzierung von THP-1 Zellen wurde untersucht, indem diese parallel in Kulturflaschen für Suspensionszellen und in beschichteten Flaschen, die für adhärente Zellen gedacht sind, kultiviert und differenziert wurden. Die Wachstumsraten lagen bei den beiden Bedingungen sehr nahe beieinander (Tabelle 12). Das spricht dafür, dass das Kunststoffmaterial keinen bzw. einen sehr geringen und damit vernachlässigbaren Einfluss auf das Wachstum von THP-1 Zellen zeigt. Dass während der Kultivierung die Wachstumsrate schwankt, entspricht der Erwartung. Auch die Immunfluoreszenzfärbung und anschließende Analyse am Durchflusszytometer (Abbildung 13) zeigt keine Unterschiede. Demnach induziert keines der beiden Materialien eine Expression von CD11b oder CD14. Differenzierte Zellen (72 h) zeigten bei der Kontrolle ohne Antikörper bereits einen leichten Shift gegenüber undifferenzierten Zellen (Abbildung 14). Dieser Shift war durchgehend bei allen Färbungen zu beobachten. Da bei den undifferenzierten und differenzierten Kontrollzellen nur die Autofluoreszenz der Zellen gemessen wurde, erklärt sich dieser Shift durch die morphologische Veränderung der Zellen. In zukünftigen Experimenten könnte eine Isotypenkontrolle durchgeführt werden, welche diesen Effekt unterdrücken könnte und so zu einer einheitlichen Negativkontrolle führen könnte. Die Färbung von CD11b und CD14 hingegen führte zu deutlichen Verschiebungen der Fluoreszenzintensität, diese beiden Oberflächenmarker wurden demnach exprimiert und die Differenzierung war erfolgreich. Auch hier lässt sich kein Unterschied zwischen Suspensions- und TC-Flaschen erkennen.



5.2 48 h Differenzierung

Die für 48 h mit 10 nM PMA differenzierten THP-1 Zellen wurden adhären und die Zellgröße erhöhte sich im Vergleich zu undifferenzierten Zellen (Abbildung 7 und Abbildung 15). Des Weiteren zeigten sich längliche Zellausläufer. Diese Morphologie deckt sich mit den Ergebnissen von Treggi Starr et al. von 2018 [40]. Zusammen mit den sichtbaren Verschiebungen bei der Immunfluoreszenzanalyse mit dem Durchflusszytometer deutet das auf eine erfolgreiche Differenzierung hin [38, 40]. Denn ein Shift des Peaks bedeutet ein erhöhtes Fluoreszenzsignal, welches proportional zu gebundenen Antikörpern ist. Ein hohes Signal steht demnach für eine starke Expression. Der IL-6 ELISA lieferte bereits in der Negativkontrolle eine sehr hohe OD von 2,7 (Abbildung 17). Dies deutet auf eine Kontamination mit Pyrogenen hin, da auch Makrophagen, die nicht mit LPS in Kontakt kamen, IL-6 gebildet haben. Das für die Kultivierung und Differenzierung verwendete Serum (Corning, Lot 35079002) enthielt laut Herstellerangaben eine Endotoxinkonzentration von $0,5 \text{ EU ml}^{-1}$ und stellte damit wahrscheinlich die Ursache für die hohen OD-Werte im IL-6 ELISA (Abbildung 17) dar, indem die Makrophagen auf das vorhandene LPS mit der Sekretion von IL-6 reagierten (siehe auch Abschnitt 5.3). Insgesamt kann trotzdem festgestellt werden, dass eine Differenzierung der THP-1 Zellen mit PMA zu funktionellen Makrophagen führt.

5.3 Einfluss des Endotoxingehalts im Medium

Analog zur Differenzierung für 48 h und dem Einsatz des Serums von Corning auch bei 72 h und der Ablösung mit TrypLE zu erhöhten OD-Werten der Negativkontrolle des IL-6 ELISA, wenn auch nicht so hoch. Auffällig ist auch, dass die Verwendung des Serums von Corning einen Einfluss auf das Differenzierungsmuster aufwies. So zeigte sich bei Makrophagen, bei deren Differenzierung Serum von Corning eingesetzt wurde, eine stärkere Verschiebung bei der Färbung gegen CD14 im Vergleich zu Makrophagen, bei denen Sera Pro von PAN zum Einsatz kam (vgl. Corning: 16 und 19 mit PAN: 23 und 21). CD14 ist als Co-Rezeptor direkt an der Detektion von LPS beteiligt, wodurch eine stärkere Expression in Anwesenheit von Endotoxinen erklärt werden kann. Obwohl Endotoxin im Medium zu einer erhöhten Expression von für Makrophagen typischen



Markern führt (CD14), was in diesem Fall auch eine erhöhte Sensitivität gegenüber LPS zur Folge haben könnte, wird das Standard-LPS durch den Endotoxingehalt im Medium maskiert, wenn dieser hoch genug ist. Durch eine Ruhephase im Anschluss an die Differenzierung konnte ebenfalls eine erhöhte CD14-Expression erreicht werden, ohne den IL-6 ELISA zu beeinträchtigen, dieser zeigt sogar eine sehr gute Funktionalität (Abbildungen 34 und 35). Ein IL-6 ELISA von Makrophagen, die mit Sera Pro (PAN) kultiviert und differenziert wurden, zeigte nach Inkubation mit LPS einen konzentrationsabhängigen Anstieg der OD. Das Sera Pro von PAN hat einen sehr niedrigen Endotoxingehalt von $0,087 \text{ EU ml}^{-1}$ nach Herstellerangaben. Diese Ergebnisse zeigen, wie sensitiv Makrophagen auf die Anwesenheit von LPS reagieren und wie wichtig es ist für eine möglichst geringe Endotoxinkonzentration in den Medien und Substanzen zu sorgen, die in dem Test verwendet werden, um mögliche Pyrogene in Proben nicht zu maskieren. Die Tatsache, dass undifferenzierte THP-1 Zellen bei beiden Sera sehr niedrige OD-Werte zeigten, spricht dafür, dass sie nicht oder nur in sehr geringem Maße auf LPS mit der Sekretion von IL-6 reagieren.

5.4 72 h Differenzierung

Um eine höhere Anzahl an differenzierten Zellen zu erhalten, wurde der Differenzierungszeitraum auf 72 h ausgeweitet. Eine Inkubation mit 10 nM PMA über einen Zeitraum von 72 h führte zu adhärenen Zellen, die im Vergleich zu einer 48 h langen Differenzierung (Abbildung 15) vermehrt eine spindelförmige Morphologie mit Ausläufern bildeten (Abbildung 18). Auch hier erhöhte sich die Zellgröße. Morphologische Veränderungen brauchen Zeit. Nach 48 h konnten differenzierte THP-1 Zellen adhären werden, allerdings zeigte sich nur vereinzelt eine spindelförmige Morphologie. Diese tritt vermehrt nach 72 h Differenzierung auf, da die Zellen mehr Zeit hatten diese Morphologie auszubilden. Zudem konnte eine größere Anzahl an Zellen adhären werden. Da der Differenzierungsprozess für jede Zelle einen individuellen Zeitraum umfasst, war bei vielen Zellen die Reifung nach 24 h vermutlich noch nicht abgeschlossen, sodass sich diese nicht an die Oberfläche der Kulturflasche anheften konnten. Mit einer höheren PMA Konzentration



könnte man dem entgegenwirken, jedoch sind Makrophagen, die mit einer niedrigen PMA Konzentration differenziert wurden robuster und sekretieren ähnlich viel Zytokine wie humane MDM („Monocyte Derived Macrophages“) [40]. Aus diesem Grund ist eine längere Differenzierung vorteilhaft.

Es wurden unterschiedliche Methoden der Ablösung von Makrophagen untersucht, um die Ausbeute zu optimieren. Die Ablösungen mit TrypLE in T-Flaschen, eine Kombination aus EDTA und TrypLE, sowie eine Collagenbeschichtung führten gleichermaßen zu einer Ausbeute von etwa 25 %. Lediglich zeigte sich bei einer zusätzlichen Inkubation mit EDTA ein schmalerer Peak im Casy. Das deutet auf eine kleinere Größenverteilung und damit bessere Vereinzelung der Zellen hin. EDTA komplexiert zweiwertige Ionen wie Calcium und Magnesium. Da einige Moleküle für die Zelladhäsion (CAM - „cell adhesion molecules“) von Calcium abhängig sind, kann eine Vereinzelung erleichtert werden. Die genannten Bedingungen zeigten keinen Einfluss auf das Differenzierungsmuster (Abbildung 19, 21, 23). Die Ablösung von Makrophagen in Kulturschalen mit TrypLE hatte eine Ausbeute von etwa 50 % zur Folge, während der Einsatz eines Zellschabers zu einer Ausbeute von etwas über 100 % führte. Demnach teilten sich die THP-1 Zellen nach der Aussaat bis sie differenziert waren. Offenbar hat das Kunststoffmaterial einen Einfluss auf die Stärke der Adhäsion von Makrophagen, da sich ein Unterschied in der Ablösung mit TrypLE in T-Flaschen (von Sarstedt) und Kulturschalen (Corning) zeigte. Auf das Differenzierungsmuster hatte das Material und die Art der Ablösung allerdings keinen Einfluss (vgl. Abbildung 23 und 27 A1-A3).

Eine Kryokonservierung von mit einem Zellschaber abgelösten Makrophagen hatte ebenfalls keinen Einfluss auf den Differenzierungsstatus (Abbildung 27).

Auch die mit TrypLE und EDTA abgelösten Makrophagen zeigten eine von der LPS-Konzentration abhängige Sekretion von IL-6, wie sich in der Auftragung in Abbildung 22 zeigt. Jedoch lieferten sowohl die Negativkontrolle der Makrophagen (0 EU ml⁻¹ LPS) als auch undifferenzierte THP-1 Zellen ein erhöhtes Extinktionsignal. Bei diesem Versuch wurde die 96-Well Platte während der Durchführung des ELISA durch Ausschlagen



entleert, statt die Wells einzeln mit einer Pipette zu leeren. Vermutlich ist dabei IL-6 aus den Wells des Standards oder höherer LPS-Konzentrationen in die Negativkontrolle und die von undifferenzierten THP-1 Zellen gelangt. Daraufhin wurde auf ein Ausschlagen verzichtet.

Die für 72 h auf einer Kulturschale differenzierten Makrophagen zeigten bei einer Ablösung mit TrypLE bzw. mit einem Zellschaber im ELISA eine gleichermaßen starke IL-6 Sekretion bereits bei geringen LPS-Konzentrationen. Der Anstieg war über einen großen Bereich linear, was eine mögliche spätere Konzentrationsbestimmung in unbekanntem Proben erleichtert. Auch die Inkubation mit RSE führte zu einer konzentrationsabhängigen Sekretion von IL-6, wenn auch in geringerem Maße als durch LPS von *E. coli* verursacht. Der Anstieg der OD begann bei etwa $0,25 \text{ EU ml}^{-1}$. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Literatur [4]. Eine Kryokonservierung hat keinen Einfluss auf die Reaktion der Makrophagen auf LPS bzw. RSE (Abbildung 28).

In der Literatur wird beschrieben, dass Peptidoglycan in einer Konzentration von $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ die Sekretion von IL-6 durch Makrophagen bei Kontakt mit Endotoxin verstärken kann, ohne selbst einen toxischen Effekt zu zeigen [4]. Dies konnte allerdings nicht gezeigt werden (Abbildung 29).

5.5 72 h Differenzierung mit Ruhephase

Wie von Chanput et al. beschrieben kann die Expression von für Makrophagen typischen Markern durch eine Ruhephase ohne PMA, die an eine Differenzierung angeschlossen wird, erhöht werden [38]. Ein solcher Marker ist CD14, das als Co-Rezeptor an der Detektion von LPS mitwirkt. Eine erhöhte Expression könnte demnach auch zu einer verbesserten Funktionalität bzw. Sensitivität der Makrophagen LPS gegenüber führen.

Nach einer Differenzierung von 72 h mit 10 nM PMA und einer anschließenden Ruhephase von 72 h (Abbildung 30) zeigten sich überwiegend adhärente Makrophagen mit einer



spindelförmigen Morphologie und starker Bildung von Ausläufern im Vergleich zu für 72 h differenzierten THP-1 Zellen (Abbildung 18). Diese Differenzierungsbedingung führte zu der deutlichsten morphologischen Veränderung von THP-1 Zellen. Diese sind vergleichbar mit für 72 h und einer deutlich höheren PMA Konzentration von 320 nM differenzierten THP-1 Zellen, die durch Dehai et al. beschrieben wurden [47]. Makrophagen übernehmen im menschlichen Körper neben Phagozytose von Pathogenen unter anderem auch einen Teil einer Rekrutierung des Immunsystems bei Kontakt mit einem Stimulus. PMA stellt einen solchen Stimulus dar, durch den die Differenzierung stattfindet. Durch eine Ruhephase nach der Exposition könnten sich die Makrophagen in einer Art erhöhter Aktivität befinden, um eventuelle erneut auftretende Pathogene schnell detektieren zu können. Dies könnte der Grund sein, warum sich die Expression von Makrophagen-typischen Markern durch eine Ruhephase erhöht.

Bei der Ruhephase wurden zwei Varianten getestet. Zum einen wurden die Makrophagen nach der Differenzierung abgelöst und neu ausgesät und zum anderen wurde das Medium gewechselt und die Zellen verblieben für die Ruhephase auf der Zellkulturschale. Das Differenzierungsmuster zeigte keinen Unterschied, beide Bedingungen führten zu einer starken Expression von CD11b und CD14 (vgl. Abbildung 31 und 34). Besonders CD14 zeigte einen deutlich größeren Shift als bei einer Differenzierung ohne Ruhephase. Makrophagen beider Varianten einer Ruhephase zeigten einen sehr steilen Anstieg der IL-6 Sekretion bei Kontakt mit LPS von *E. coli* und auch RSE lieferte im Vergleich zu vorherigen Differenzierungsbedingungen einen starken Anstieg, der jedoch niedriger war als der von LPS (*E. coli*), wie in den Abbildungen 32 und 35 zu sehen ist. Der steile Anstieg von LPS (*E. coli*) hat zur Folge, dass sich der lineare Bereich von 0,75 EU ml⁻¹ (Abbildung 26; 72 h Differenzierung) auf 0,125 EU ml⁻¹ (Abbildung 31; Ruhephase mit Ablösung) bzw. 0,25 EU ml⁻¹ verkürzte. Zusätzlich trat sehr schnell eine Sättigung ein, was den Detektionsbereich stark verkürzte. In beiden Fällen konnte die geforderte Nachweisgrenzen von 0,05 EU ml⁻¹ eingehalten werden, ebenso wie bei der Inkubation mit RSE. Dieser Standard hat zudem den Vorteil, dass er einen längeren linearen Zusammenhang und damit einen größeren Detektionsbereich (bis 0,75 EU ml⁻¹) lieferte. Allerdings führte bei beiden Bedingungen eine Kryokonservierung zu einem Einbruch



der IL-6 Sekretion (Abbildung 33 und 35). Bei der Inkubation mit RSE konnte trotzdem eine lineare Beziehung über den gesamten Konzentrationsbereich ermittelt werden, was die Bestimmung von Endotoxinkonzentrationen bis 2 EU ml^{-1} erlaubt. Wurden die Makrophagen vor der Ruhephase abgelöst und erneut ausgesät, konnte die Nachweisgrenze des Mitbewerbers ($0,05 \text{ EU ml}^{-1}$), die für eine erfolgreiche Positionierung auf dem Markt notwendig ist, erreicht und somit die Anforderungen eingehalten werden (Abbildung 33). Dies gelang bei kryokonservierten Makrophagen ohne Ablösung (nur Medienwechsel, Abbildung 35) vor der Ruhephase nicht. Hier wären weitere Wiederholungen hilfreich, um eine Reproduzierbarkeit zu untersuchen. Da sich die Makrophagen bei den beiden Varianten sowohl hinsichtlich des Differenzierungsstatus als auch der Funktionalität nicht signifikant voneinander unterscheiden, bietet sich die Variante des Medienwechsels an. Diese Methode bedeutet weniger Stress für die Zellen, da auf eine Ablösung und Zentrifugation verzichtet wird und darüber hinaus auch einen geringeren Arbeits- und Zeitaufwand.

Um den Anstieg der OD durch kryokonservierte Zellen zu erhöhen, wurden diese nach dem Auftauvorgang für eine Ruhephase von 24 h inkubiert, bevor sie mit LPS bzw. RSE in Berührung kamen. In beiden Fällen zeigte sich ein steiler Anstieg durch LPS, auf RSE lieferte höhere OD-Werte als ohne Ruhephase (Abbildung 36). Da eine Kryokonservierung sowie der nötige Auftauvorgang Stress für die Zellen bedeutet, könnten diese eine hohe Priorität auf den Erhalt von für das Überleben wichtigen Funktionen legen, was zu einem Verlust an Funktionalität führt. Die Zelle wird vermutlich mit den ihr zur Verfügung stehenden Ressourcen haushalten. Eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CD14 direkt nach dem Auftauen könnte im Vergleich zu frischen Makrophagen klären, ob die Expression von CD14 nach dem Auftauen geringer ausfällt als vor der Kryokonservierung. Durch eine Ruhephase können sich die Zellen vermutlich erholen und ihre Funktionalität wiedererlangen. Wurden die Makrophagen vor dem Einfrieren abgelöst und für eine Ruhephase erneut ausgesät, konnte die geforderte Nachweisgrenze nicht erreicht werden, zudem lag eine lineare Beziehung nur bis 1 EU ml^{-1} vor. Wurde hingegen nur ein Medienwechsel vorgenommen, konnte über den gesamten Konzentrationsbereich eine lineare Regression angelegt werden, weshalb sich der Nachweisbereich bis 2 EU ml^{-1}



erstreckte. Darüber hinaus konnte die Bedingung, dass die Nachweisgrenze bei 0,05 EU ml liegt, erfüllt werden. Zwar war dies bereits bei kryokonservierten Makrophagen ohne zusätzliche Ruhephase nach dem Auftauen der Fall (Abbildung 33), jedoch führte eine Ruhephase im Anschluss an die Auftauprozedur zu höheren OD-Werten. Das führt zu einer höheren Genauigkeit bei der Bestimmung von Endotoxinkonzentrationen in Proben aus der Regression.

Um zu prüfen, ob aus THP-1 differenzierte Makrophagen in der Lage sind neben Endotoxinen auch andere Pyrogene zu detektieren, kam Lipoteichonsäure (LTA) zum Einsatz. Sowohl frisch differenzierte, als auch kryokonservierte Makrophagen reagieren auf die Inkubation mit LTA durch die Sekretion des pro-inflammatorischen Interleukin-6 in gleicher Weise. Diese Ergebnisse sind mit denen der Literatur vergleichbar, jedoch scheint anders als bei Holtkamp et al. beschrieben eine Sättigung aufzutreten [4]. Dementsprechend ist die Forderung, dass die Makrophagen andere Pyrogene nachweisen können, als erfüllt anzusehen.

5.6 LAL-Test

Die Wiederfindung des eingesetzten RSE in den verwendeten Verdünnungen wurde mit Hilfe des etablierten LAL-Test untersucht. Die RSE-Verdünnungen im oberen Bereich des Detektionsspektrum der Methode zeigten mit 106 % ($0,1 \text{ EU ml}^{-1}$) und 84 % ($0,05 \text{ EU ml}^{-1}$) sehr gute Wiederfindungswerte. Da mit jeder Verdünnung die Fehler zunehmen und die Messungenauigkeit bei geringen Konzentrationen zunimmt, lässt sich die geringere Wiederfindung bei niedrigen Konzentrationen erklären. Aufgrund der Tatsache, dass die Anforderung für die Nachweisgrenze bei $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$ lag und diese eine Wiederfindung von 84 % zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die für den MAT eingesetzten RSE-Konzentrationen richtig verdünnt wurden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der LAL-Test im Gegensatz zu aus THP-1 differenzierten Makrophagen nicht für den Nachweis von LTA geeignet ist, da $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ bei Makrophagen zu einer deutlich stärkeren Sekretion von IL-6 führt, als die mit dem LAL ermittelten $0,02 \text{ EU ml}^{-1}$ als RSE Äquivalent. Zudem liegt dieser Wert unter der Nachweisgrenze des MAT.



6 Zusammenfassung

Es sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Monozyten-Aktivierungstest (MAT) für den Nachweis von Pyrogenen derart angepasst werden, dass dieser auf den internationalen Standard für Endotoxine (RSE) kalibriert werden kann und eine Nachweisgrenze von $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$ aufweist. Der Test beruht auf der monozytischen Zelllinie THP-1, die durch PMA differenziert werden kann, sodass die Zellen in Morphologie und Funktion menschlichen Makrophagen ähneln. Diese Zellen sekretieren bei Kontakt mit Pyrogenen Zytokine, die quantifiziert werden können. Der Differenzierungsstatus wurde mittels einer Immunfluoreszenzfärbung von den für Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD11b und CD14 am Durchflusszytometer bestimmt.

Die Ablösung differenzierter THP-1 Zellen konnte durch den Einsatz eines Zellschaber auf eine Ausbeute von etwas über 100 % verbessert werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass die Endotoxinkonzentration im Medium und damit insbesondere im Serum, das für die Erhaltungskultur und die Differenzierung verwendet wird, möglichst gering sein sollte, da die Makrophagen sonst auch ohne den weiteren Zusatz von LPS IL-6 sekretieren und damit mögliche Effekte der Probe maskieren können. Um die genannten Anforderungen zu erfüllen, wurde zunächst die Differenzierungsdauer optimiert. Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit 10 nM PMA für 72 h mit einer anschließenden Ruhephase ohne PMA von 72 h zu einer starken und von der Endotoxinkonzentration abhängigen Sekretion von IL-6 führt. Zusätzlich konnte die Nachweisgrenze eingehalten werden. Allerdings zeigten kryokonservierte Makrophagen eine deutlich schwächere Reaktion. Eine weitere Ruhephase nach dem Auftauprozess verbesserte die Reaktion deutlich. Eine Differenzierung für 72 h mit anschließender Ruhephase (mit Medienwechsel) ohne PMA von 72 h, sowie eine 24 stündige Ruhephase nach dem Auftauen kryokonservierter Zellen führt zu einer Nachweisgrenze von $0,05 \text{ EU ml}^{-1}$ und einem Detektionsbereich bis 2 EU ml^{-1} . Zudem konnte gezeigt werden, dass mit PMA differenzierte THP-1 Zellen auf den Kontakt mit Lipoteichonsäure mit der Sekretion von IL-6 reagieren. Somit sind diese Zellen in der Lage neben Endotoxinen auch andere für den Menschen pyrogene Substanzen zu detektieren.



Literatur

- [1] Ronald E Unger, Kirsten Peters, Anne Sartoris, Christian Freese und C James Kirkpatrick. „Human endothelial cell-based assay for endotoxin as sensitive as the conventional Limulus Amebocyte Lysate assay“. In: *Biomaterials* 35.10 (2014), S. 3180–3187.
- [2] Guillermo Martinez De Tejada, Lena Heinbockel, Raquel Ferrer-Espada, Holger Heine, Christian Alexander, Sergio Bárcena-Varela, Torsten Goldmann, Wilmar Correa, Karl-Heinz Wiesmüller, Nicolas Gisch u. a. „Lipoproteins/peptides are sepsis-inducing toxins from bacteria that can be neutralized by synthetic anti-endotoxin peptides“. In: *Scientific reports* 5 (2015), S. 14292.
- [3] Klaus Brandenburg, Jorg Howe, Thomas Gutsman und Patrick Garidel. „The expression of endotoxic activity in the Limulus test as compared to cytokine production in immune cells“. In: *Current medicinal chemistry* 16.21 (2009), S. 2653–2660.
- [4] Bodo Holtkamp, Gabriele Schmitz und Thomas Härtung. „Nachweis eines breiten Pyrogenspektrums im Monozyten-Aktivierungstest“. In: *BIOspektrum* 16.7 (2010), S. 779–781.
- [5] Nina Hasiwa, Mardas Daneshian, Peter Bruegger, Stefan Fennrich, Astrid Hochadel, Sebastian Hoffmann, Felix E Rivera-Mariani, Christoph Rockel, Stefanie Schindler, Ingo Spreitzer u. a. „Evidence for the detection of non-endotoxin pyrogens by the whole blood monocyte activation test“. In: *Alternatives to animal experimentation: ALTEX* 30.2 (2013), S. 169–208.
- [6] H Mayer, RN Tharanathan und J Weckesser. „Analysis of Lipopolysaccharides of Gram-Negative Bacteria“. In: *Methods in microbiology*. Bd. 18. Elsevier, 1985, S. 157–207.
- [7] Pérola O Magalhães, André M Lopes, Priscila G Mazzola, Carlota Rangel-Yagui, TC Penna und Adalberto Pessoa Jr. „Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review“. In: *J Pharm Pharm Sci* 10.3 (2007), S. 388–404.



- [8] Harald Schwarz, Jan Gornicec, Theresa Neuper, Maria Alejandra Parigiani, Michael Wallner, Albert Duschl und Jutta Horejs-Hoeck. „Biological activity of masked endotoxin“. In: *Scientific reports* 7 (2017), S. 44750.
- [9] C Galanos und MA Freudenberg. „Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action“. In: *Mediators of inflammation* 2.7 (1993), S11–S16.
- [10] Christian Alexander und Ernst Th Rietschel. „Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity“. In: *Journal of endotoxin research* 7.3 (2001), S. 167–202.
- [11] Ulrich Seydel, Andra B Schromm, Rikard Blunck und Klaus Brandenburg. „Chemical structure, molecular conformation, and bioactivity of endotoxins“. In: *Chem. Immunol* 74 (2000), S. 5–24.
- [12] Johannes Reich, Pierre Lang, Holger Grallert und Hubert Motschmann. „Masking of endotoxin in surfactant samples: Effects on Limulus-based detection systems“. In: *Biologicals* 44.5 (2016), S. 417–422.
- [13] Samuel I Miller, Robert K Ernst und Martin W Bader. „LPS, TLR4 and infectious disease diversity“. In: *Nature Reviews Microbiology* 3.1 (2005), S. 36.
- [14] Yong-Chen Lu, Wen-Chen Yeh und Pamela S Ohashi. „LPS/TLR4 signal transduction pathway“. In: *Cytokine* 42.2 (2008), S. 145–151.
- [15] Bruce Beutler. „Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor“. In: *Current opinion in immunology* 12.1 (2000), S. 20–26.
- [16] Francesco Peri, Matteo Piazza, Valentina Calabrese, Gaetana Damore und Roberto Cighetti. *Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules*. 2010.
- [17] Charles V Rosadini und Jonathan C Kagan. „Early innate immune responses to bacterial LPS“. In: *Current opinion in immunology* 44 (2017), S. 14–19.
- [18] Yunhao Tan und Jonathan C Kagan. „A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide“. In: *Molecular cell* 54.2 (2014), S. 212–223.



- [19] Rajesh Rajaiah, Darren J Perkins, Derek DC Ireland und Stefanie N Vogel. „CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.27 (2015), S. 8391–8396.
- [20] Zhengfan Jiang, Philippe Georgel, Xin Du, Louis Shamel, Sosathya Sovath, Suzanne Mudd, Michael Huber, Christoph Kalis, Simone Keck, Chris Galanos u. a. „CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling“. In: *Nature immunology* 6.6 (2005), S. 565.
- [21] Jon A Hagar, Daniel A Powell, Youssef Aachoui, Robert K Ernst und Edward A Miao. „Cytoplasmic LPS activates caspase-11: implications in TLR4-independent endotoxic shock“. In: *Science* 341.6151 (2013), S. 1250–1253.
- [22] Jianjin Shi, Yue Zhao, Yupeng Wang, Wenqing Gao, Jingjin Ding, Peng Li, Liyan Hu und Feng Shao. „Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS“. In: *Nature* 514.7521 (2014), S. 187.
- [23] Anja Pfalzgraff, Lena Heinbockel, Qi Su, Klaus Brandenburg und Günther Weindl. „Synthetic anti-endotoxin peptides inhibit cytoplasmic LPS-mediated responses“. In: *Biochemical pharmacology* 140 (2017), S. 64–72.
- [24] Ralf Schwandner, Roman Dziarski, Holger Wesche, Mike Rothe und Carsten J Kirschning. „Peptidoglycan-and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2“. In: *Journal of Biological Chemistry* 274.25 (1999), S. 17406–17409.
- [25] Isaac Ginsburg. „Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation“. In: *The Lancet infectious diseases* 2.3 (2002), S. 171–179.
- [26] *Monocyte Activation Test (MAT), The in vitro test for pyrogen detection - White Paper*. 2. Aufl. Merck KGaA. 2017.
- [27] Caroline Vipond, Lucy Findlay, Ian Feavers und Rory Care. „Limitations of the rabbit pyrogen test for assessing meningococcal OMV based vaccines“. In: *ALTEX- Alternatives to animal experimentation* 33.1 (2016), S. 47–53.



- [28] Robert S Munford. „Endotoxemia—menace, marker, or mistake?“ In: *Journal of leukocyte biology* 100.4 (2016), S. 687–698.
- [29] Thomas Hartung. „The Human Whole Blood Pyrogen Test: Lessons Learned in Twenty Years“. In: *ALTEX: Alternatives to Animal Experimentation* 32.2 (2015), S. 79–100.
- [30] Rolando Perdomo-Morales, Zenia Pardo-Ruiz, Ingo Spreitzer, Alicia Lagarto und Thomas Montag. „Monocyte activation test (MAT) reliably detects pyrogens in parenteral formulations of human serum albumin“. In: *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* 28.3 (2011), S. 227–235.
- [31] Simone Eperon, Donat De Groote, Gabriele Werner-Felmayer und Thomas W Jungi. „Human monocytoïd cell lines as indicators of endotoxin: comparison with rabbit pyrogen and Limulus amoebocyte lysate assay“. In: *Journal of immunological methods* 207.2 (1997), S. 135–145.
- [32] Priscilla F Roslansky und THOMAS J Novitsky. „Sensitivity of Limulus amebocyte lysate (LAL) to LAL-reactive glucans.“ In: *Journal of clinical microbiology* 29.11 (1991), S. 2477–2483.
- [33] HD Hochstein, Jr EB Seligmann, RE Marquina und E Rivera. „Limulus amebocyte lysate testing of normal serum albumin (human) in the United States since 1975.“ In: *Developments in biological standardization* 44 (1979), S. 35–42.
- [34] Gudrun Jürgens, Mareike Müller, Patrick Garidel, Michel HJ Koch, Hiroshi Nakakubo, Alfred Blume und Klaus Brandenburg. „Investigation into the interaction of recombinant human serum albumin with Re-lipopolysaccharide and lipid A“. In: *Journal of endotoxin research* 8.2 (2002), S. 115–126.
- [35] Shigeru Tsuchiya, Michiko Yamabe, Yoshiko Yamaguchi, Yasuko Kobayashi, Tasuke Konno und Keiya Tada. „Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)“. In: *International journal of cancer* 26.2 (1980), S. 171–176.



- [36] Maria E Lund, Joyce To, Bronwyn A O'Brien und Sheila Donnelly. „The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus“. In: *Journal of immunological methods* 430 (2016), S. 64–70.
- [37] Yong-Hong Feng, Yi-Na Zhu, Jin Liu, Yong-Xing Ren, Jian-Yi Xu, Yi-Fu Yang, Xiao-Yu Li und Jian-Ping Zou. „Differential regulation of resveratrol on lipopolysacchride-stimulated human macrophages with or without IFN- γ pre-priming“. In: *International immunopharmacology* 4.6 (2004), S. 713–720.
- [38] Wasaporn Chanput, Jurriaan J Mes und Harry J Wichers. „THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach“. In: *International immunopharmacology* 23.1 (2014), S. 37–45.
- [39] EK Park, HS Jung, HI Yang, MC Yoo, C Kim und KS Kim. „Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli“. In: *Inflammation research* 56.1 (2007), S. 45–50.
- [40] Tregui Starr, Timothy J Bauler, Preeti Malik-Kale und Olivia Steele-Mortimer. „The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with Salmonella Typhimurium“. In: *PloS one* 13.3 (2018), e0193601.
- [41] *CASY Cell Counter + Analyser System Model TT, Operator Manual*. Version 1.3E. Roche Innavatis AG.
- [42] Gregor Rothe. „Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie“. In: *Zelluläre Diagnostik*. Karger Publishers, 2007, S. 27–70.
- [43] Daniel H Ryan, Margaret A Fallon und Paul K Horan. „Flow cytometry in the clinical laboratory“. In: *Clinica Chimica Acta* 171.2-3 (1988), S. 125–173.
- [44] Michael Brown und Carl Wittwer. „Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology“. In: *Clinical chemistry* 46.8 (2000), S. 1221–1229.
- [45] Mark J Jaroszeski und Gilbert Radcliff. „Fundamentals of flow cytometry“. In: *Molecular biotechnology* 11.1 (1999), S. 37–53.



-
- [46] Tom Rowley. „Flow Cytometry-A Survey and the Basics“. In: *Columbia University* (2013).
- [47] Che Dehai, Pan Bo, Tian Qiang, Shang Lihua, Liu Fang, Jin Shi, Cao Jingyan, Yu Yan, Wang Guangbin und Yuan Zhenjun. „Enhanced invasion of lung adenocarcinoma cells after co-culture with THP-1-derived macrophages via the induction of EMT by IL-6“. In: *Immunology letters* 160.1 (2014), S. 1–10.



Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Master Thesis mit dem Titel „Anpassung eines Monozyten-Aktivierungstests (MAT) für den Nachweis von Pyrogenen unter Verwendung von THP-1 Zellen“ 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 Quellen kenntlich gemacht.

Hamburg, 15.06.2019 -----

Adrian Dittberner