

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Evaluation und Weiterentwicklung eines in vitro
Testverfahrens zur Bestimmung des sensibilisierenden
Potenzials von Kontaktallergenen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maximilian Schreiner

aus Braunschweig

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. R. Wanner
2. Prof. Dr. med. M. Worm
3. Prof. Dr. rer. nat. habil. B. Schäfer

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abstract.....	5
1. Einleitung und Ziele	6
2. Methodik: Entwicklung des Loose-fit Coculture Based Sensitization Assay (LCSA)	7
2.1. Vorgedanken, Gewinnung primärer menschlicher Zellen.....	7
2.2. Entwicklung einer Kokultur aus Keratinozyten und dendritischen Zellen	7
2.3. Zellgebundene Proteine als Ausleseparameter	8
2.4. Sezernierte Proteine als Ausleseparameter	8
3. Ergebnisse.....	9
3.1. Vergleich zwischen LCSA-Kokultur und einer Monokultur aus dendritischen Zellen.....	9
3.2. Charakterisierung der dendritischen Zellen in der LCSA-Kokultur.....	9
3.3. Testung von Allergenen.....	9
3.4. Testung der Metallallergene Nickelchlorid und Cobaltchlorid	10
3.5. Testung von Irritanzen.....	10
3.6. Zusammenfassung der Evaluation und Erweiterung des LCSA	10
3.7. Refinement.....	10
4. Diskussion	11
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	11
4.2. Vergleich zum Local Lymph Node Assay.....	11
4.3. Vergleich zu Sensibilisierungs-Assays mit kontinuierlichen Zelllinien.....	12
4.4. Limitationen des LCSA	13
4.5. Ausblick.....	13
Literaturverzeichnis	15
 Anteilerklärung	 20
 Publikation 1: A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell related cells for prediction of sensitizing potential	 21
 Publikation 2: A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens.....	 31

Publikation 3: TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23	38
Lebenslauf	48
Komplette Publikationsliste	50
Erklärung	51
Danksagung	52

Zusammenfassung

Abstract

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine der häufigsten Pathologien des menschlichen Immunsystems und von großer volkswirtschaftlicher Relevanz. Ein konsequentes Screening von Chemikalien auf kontaktallergene Eigenschaften und eine Beschränkung ihrer Verwendung im täglichen Leben kann die Prävalenz dieser Erkrankung senken. Zur Zeit ist der am meisten verwendete Assay für eine solche prädiktive Testung der Local Lymph Node Assay (LLNA) in Mäusen. Aus ethischen Gründen, aber auch in Hinsicht auf kommende gesetzliche Beschränkungen für Tierversuche – z.B. für Kosmetika – ist es wünschenswert, einen *in vitro* Assay für diese Fragestellung zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solcher *in vitro* Assay – der Loose-fit Coculture-based Sensitization Assay (LCSA) – evaluiert, weiterentwickelt und verfeinert. Der LCSA basiert auf einer Kokultur aus primären humanen Keratinozyten, auf welche allogene humane Monozyten gesät werden. Nach Gabe von Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF), Interleukin-4 (IL-4) und Transformierendem Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1) konnten aus den Monozyten Langerhanszell-ähnliche Zellen generiert werden, welche die Fähigkeit besitzen, auf Kontaktallergene zu reagieren.

Alle acht getesteten Kontaktallergene konnten eine messbare Reaktion in der Kokultur hervorrufen, sechs davon im Sinne einer Hochregulation von CD86 bei den Langerhanszell-ähnlichen Zellen. Für die zunächst negativ getesteten Metallallergene Nickel und Cobalt konnten im Rahmen dieser Arbeit alternative Parameter gefunden werden: die ins Kulturmedium sezernierten Proteine Macrophage Inflammatory Protein-1 β (MIP-1 β , auch: CCL-4) und Interleukin-6 (IL-6).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zeit zur Generierung der Langerhanszell-ähnlichen Zellen, sowie die hierfür benötigten Zytokine reduziert werden können, ohne dass die Aussagekraft des Assays beeinträchtigt wird, wodurch dessen Wirtschaftlichkeit erhöht wird.

Neben dem Verzicht auf Tierversuche hat der hier vorgestellte LCSA weitere Vorteile gegenüber dem LLNA in Mäusen: reine Irritantien (im LLNA oft falsch positiv) riefen hier keine Reaktion hervor, Metallallergene (im LLNA oft nur mit Hilfe spezieller Techniken erkennbar) konnten durch die Implementation zusätzlicher Ausleseparameter positiv getestet werden.

Als Nachteil des LCSA muss gelten, dass das Stratum corneum, welches *in vivo* die erste Barriere für Kontaktallergene darstellt, nicht simuliert wird. So kann die unterschiedlich starke Hautpenetration von Allergenen nicht in deren Risikobewertung mit einbezogen werden. Realistischerweise muss man davon ausgehen, dass nicht ein *in vitro* Assay allein den LLNA wird ersetzen können, sondern vielmehr eine Zusammenschau der Ergebnisse unterschiedlicher Assays eine detaillierte Bewertung des allergenen Risikopotenzials von Chemikalien möglich machen wird.

1. Einleitung und Ziele

Die Allergische Kontaktdermatitis ist eine Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IV. Im Gegensatz zu den Typen I bis III, die Antikörper-vermittelt sind, ist der Pathomechanismus bei der Typ IV-Allergie Zell-vermittelt. Es wird zwischen einer Sensibilisierungs- und einer Effektorphase unterschieden. Die Sensibilisierungsphase läuft stumm ab und wird vom Patienten nicht bemerkt. Frühestens ab dem zweiten Kontakt mit einem Allergen kann das eigentliche klinische Erscheinungsbild der Kontaktdermatitis als Effektorphase in Erscheinung treten.

In der Sensibilisierungsphase erfolgt die Bildung des immunologischen Gedächtnisses. Nach Penetration des Stratum corneum trifft ein potentielles Allergen in der Epidermis auf Langerhans-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen der Haut. Die Mehrheit der Allergene besitzt nur ein geringes Molekulargewicht und ist von sich aus nicht in der Lage, eine Immunantwort zu provozieren. Diese sogenannten Haptene müssen eine Bindung mit körpereigenen Proteinen eingehen, um einen Komplex zu bilden, der von Langerhans-Zellen phagozytiert und auf ihrer Oberfläche präsentiert werden kann. Während der anschließenden Wanderung zu den lokalen Lymphknoten machen die Langerhans-Zellen eine Reifung durch, wobei u.a. MHC-II und kostimulatorische Moleküle für T-Zellen wie CD80 und CD86 hochreguliert werden. Im Lymphknoten wird dann eine klonale Expansion von naiven T-Helfer Zellen mit der Bildung von Gedächtnis-T-Zellen, sowie eine Polarisierung in T_{H1} -Richtung provoziert.

Die Allergische Kontaktdermatitis ist eine der häufigsten Pathologien des menschlichen Immunsystems mit einer Prävalenz in der Bevölkerung westlicher Industrieländer von 19,5 % (THYSSEN ET AL. 2007). Zusammen mit der irritativen Kontaktdermatitis ist sie für bis zu 30 % aller berufsbedingten Erkrankungen in Industrieländern verantwortlich (CLARK & ZIRWAS 2009), womit hohe volkswirtschaftliche Schäden einhergehen. Ein erweitertes Screening von Substanzen auf ihre allergene Potenz kann im Rahmen einer Primärprävention diese Schäden abmildern. Ohnehin ist seitens der Europäischen Union durch das Vertragswerk REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) eine umfangreiche Risikoevaluation von über 30.000 Chemikalien geplant. Aus ethischen Gründen ist es hierbei wünschenswert, vorrangig *in vitro* Tests – wo verfügbar – an Stelle von Tierversuchen zu verwenden.

Ziel dieser Doktorarbeit war daher die Evaluation, Erweiterung und das Refinement eines *in vitro* Assays zur Bestimmung des sensibilisierenden Potenzials von möglichen Kontaktallergenen. Es waren Versuche mit verschiedenen metallischen und nicht-metallischen Allergenen geplant, denen rein irritative Substanzen gegenübergestellt werden sollten. Eine Erweiterung sollte in Hinsicht auf zusätzliche Ausleseparameter stattfinden. Unter Refinement sollen Maßnahmen wie Verkürzung der Assaydauer und Reduzierung der Menge der eingesetzten Verbrauchsstoffe, insbesondere kostspieliger Zytokine, verstanden werden.

2. Methodik: Entwicklung des Loose-fit Coculture Based Sensitization Assay (LCSA)

Genauere Einzelheiten über die verwendeten Materialien und eine detaillierte Beschreibung der Methoden können den zu dieser Promotion gehörigen Publikationen entnommen werden (SCHREINER ET AL. 2007, SCHREINER ET AL. 2008, ALIAHMADI ET AL. 2009).

2.1. Vorgesdanken, Gewinnung primärer menschlicher Zellen

Nach dem Hautkontakt findet in der Epidermis das erste Zusammentreffen zwischen dem Allergen und Zellen des Körpers statt. Hier finden sich an immunologisch aktiven Zellen die zu den dendritischen Zellen gehörigen Langerhans-Zellen und die epidermalen Keratinozyten. Für diesen Assay sollte ein stark vereinfachtes Modell der Epidermis mittels einer Zellkultur emuliert werden, in welcher Langerhans-Zellen auf einem Rasen aus Keratinozyten frei im Zellkulturmedium schwimmen.

Menschliche Keratinozyten wurden aus der Haut freiwilliger Spender gewonnen, die im Rahmen von plastischen Operationen entfernt worden war. Da Langerhans-Zellen in Kultur rasch absterben (PEISER ET AL. 2003), sind sie für diesen Assay ungeeignet. Man kann jedoch aus Monozyten nach Hinzugabe von Granulozyten/Makrophagen koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF), Interleukin-4 (IL-4) und Transformierendem Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1) in Kultur vitale Langerhanszell-ähnliche Zellen generieren (GEISSMANN ET AL. 1998). Menschliche Monozyten wurden hierfür aus der Leukozytenmanschette (buffy-coat) zentrifugierter Blutspenden gewonnen. Keratinozyten und Monozyten wurden nach ihrer Gewinnung für ihre spätere Verwendung kryokonserviert.

2.2. Entwicklung einer Kokultur aus Keratinozyten und dendritischen Zellen

Keratinozyten wurden in 12-Loch Zellkulturplatten ausgesät. Nach Erreichen der halben Konfluenz, üblicherweise nach zwei Tagen, erfolgte die Zugabe von allogenen Monozyten direkt auf den Keratinozytenrasen. Die Kokulturen wurden nun dreimalig, im Abstand von je zwei Tagen, mit einem Cocktail aus GM-CSF, IL-4 und TGF- β 1 behandelt. In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch eine einmalige Gabe von lediglich IL-4 und TGF- β 1 ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse möglich ist (SCHREINER ET AL. 2008). In beiden Fällen differenzierten die Monozyten zu dendritischen Zellen, was morphologisch an der Ausbildung von zytoplasmatischen Ausläufern und molekularbiologisch an einer Veränderung des Profils der exprimierten Oberflächenantigene zu erkennen war.

Zwei Tage nach der (letzten) Zytokingabe wurden Allergene, Irritantien, Positiv- und Negativkontrollen hinzugegeben. Für nicht wasserlösliche Substanzen wurden Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol als Vehikel benutzt. In diesen Fällen wurden auch die Vehikel in der

jeweils auftretenden Endkonzentration im Zellkulturmedium als Kontrollen alleine hinzugegeben.

2.3. Zellgebundene Proteine als Ausleseparameter

Das Oberflächenantigen CD86 wird von Antigen-präsentierenden Zellen (z.B. dendritischen Zellen) exprimiert und ist eines der wichtigsten kostimulatorischen Signale zur Aktivierung von naiven T-Helfer-Zellen (SELIGER ET AL. 2008). Ohne kostimulatorisches Signal kann keine Immunantwort im Sinne einer Sensibilisierung auf ein Kontaktallergen erfolgen. CD86 dient in diesem Assay als Gradmesser für die Aktivierung der dendritischen Zellen in der Kokultur und somit als Marker für die sensibilisierende Potenz einer Substanz.

Da die Keratinozyten fest auf dem Plastik der Zellkulturschale haften und die dendritischen Zellen obenauf schwimmen, können letztere leicht heruntergespült werden. Die so geernteten Zellen wurden mit fluoreszierenden anti-CD86 Antikörpern, sowie mit einem Lebendfarbstoff gefärbt und anschließend in einem Durchflusszytometer gemessen. Der relative Anstieg von CD86 wurde bestimmt, indem der Quotient aus der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) behandelter Zellen und der MFI der korrespondierenden Negativ- bzw. Vehikelkontrolle gebildet wurde. Für diese Auswertung wurde nur eine in der Scatter-Analyse eindeutig abgrenzbare Population von dendritischen Zellen berücksichtigt; zudem wurden tote Zellen von der Analyse ausgenommen.

2.4. Sezernierte Proteine als Ausleseparameter

Bei der Ernte der dendritischen Zellen wurden die zellfrei zentrifugierten Überstände des Zellkulturmediums eingefroren und mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) darin gelöste Proteine bestimmt. Das hierbei gemessene Chemokin Macrophage Inflammatory Protein-1 β (MIP-1 β , auch: CCL-4) spielt eine Rolle in der Generierung einer T_{h1}-Immunantwort (LEBRE ET AL. 2005), zu der auch die Kontaktallergie gehört, und wurde bereits als Marker für Sensibilisierung in einem *in vitro* System für die Messung der sensibilisierenden Potenz vorgeschlagen (HIROTA ET AL. 2006).

Ein weiterer Ausleseparameter für diesen Assay ist Interleukin-6 (IL-6), welches eine zentrale Rolle bei der Auslösung der Akute-Phase-Reaktion bei systemischen Entzündungsreaktionen hat (JONES 2005). Eine Präferenz für T_{h1}- oder T_{h2}-Polarisierung besteht nicht, jedoch wurde in der Vergangenheit die Expression von IL-6 in der Haut sowohl in Modellen von allergischer, als auch irritativer Kontaktdermatitis nachgewiesen (HARTMANN ET AL. 2006, BONNEVILLE ET AL. 2007).

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich zwischen LCSA-Kokultur und einer Monokultur aus dendritischen Zellen

Initial wurden Monokulturen aus dendritischen Zellen, welche aus Monozyten generiert wurden, mit dem starken Kontaktallergen Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS) und dem bakteriellen Antigen Lipopolysaccharid (LPS) behandelt (SCHREINER ET AL. 2007). Während LPS erwartungsgemäß eine Hochregulation von CD86 verursachte, konnte keine Reaktion auf das Allergen festgestellt werden. Erst nach dem Hinzufügen von Keratinozyten gemäß dem oben beschriebenen Protokoll konnte ein signifikanter Anstieg von CD86 bei den dendritischen Zellen gemessen werden. Bei der Applikation unterschiedlicher Konzentrationen von TNBS konnte zudem eine lineare Dosis-Wirkung-Beziehung zwischen Allergen-Konzentration und CD86-Anstieg demonstriert werden.

3.2. Charakterisierung der dendritischen Zellen in der LCSA-Kokultur

Während der ersten Experimente mit der LCSA-Kokultur fiel auf, dass sich die unter Kokultur-Bedingungen generierten dendritischen Zellen in ihrem Oberflächenantigenprofil von den in Monokultur generierten Zellen unterschieden. Während letztere positiv für CD1a und Langerin waren, fehlten diese beiden Marker bei den dendritischen Zellen der Kokultur. Bemerkenswerterweise wurden diese Marker in der Monokultur ebenfalls nicht exprimiert, wenn man das serumhaltige Zellkulturmedium durch ein serumfreies Medium austauschte, welches standardmäßig für die Experimente mit der LCSA-Kokultur verwendet wurde.

Da sich der Phänotyp von dendritischen Zellen aus der Kokultur offensichtlich von dem der nach „klassischem“ Protokoll generierten Zellen unterschied, wurde ihnen die neue Bezeichnung „Dendritic Cell-related cells“ (DCrc) gegeben. DCrc wurden charakterisiert als CD11c⁺, HLA-DR⁺, CD86⁺, CD14⁻, CD1a⁻, CD1c^{dim} bis CD1c⁻ und Langerin⁻ (SCHREINER ET AL. 2007).

3.3. Testung von Allergenen

Zur Evaluierung des Assays wurden mehrere bekannte Kontaktallergene mit dem LCSA-Kokultursystem getestet (SCHREINER ET AL. 2007, SCHREINER ET AL. 2008): TNBS, para-Phenylendiamin (Haarfärbemittel), 2-Amino-p-cresol und 4-Aminoacetanilid (Spaltprodukte eines gelben Textilfarbstoffs), Isoeugenol und α -Hexylzimtaldehyd (Duftstoffe). Alle Substanzen konnten bei den dendritischen Zellen der LCSA-Kokultur einen Anstieg von CD86 hervorrufen. Dieser Anstieg zeigte eine lineare Dosis-Wirkung-Beziehung bis zum Erreichen eines Plateaus, das – je nach Substanz – einer 1,5 bis 3fachen relativen Hochregulation von CD86 entsprach. Als Maß für die sensibilisierende Potenz eines Allergens wurde die Allergenkonzentration gewählt, bei der ein halbmaximaler CD86-Anstieg erfolgte. Allergene mit niedrigen Werten werden als stark, mit hohen Werten als schwach klassifiziert.

Bei manchen Substanzen konnte ab bestimmten Konzentrationen ein zytotoxischer Effekt beobachtet werden, was an einem prozentualen Anstieg toter dendritischer Zellen deutlich wurde.

3.4. Testung der Metallallergene Nickelchlorid und Cobaltchlorid

Diese beiden wasserlöslichen Metallsalze und bekannten Kontaktallergene konnten im LCSA keinen signifikanten Anstieg von CD86 hervorrufen. Es war jedoch möglich, in den Überständen der Kokultur mit MIP-1 β und IL-6 zwei lösliche Marker als zusätzliche Ausleseparameter zu identifizieren, die nach Applikation dieser Allergene auf das bis zu 15fache ihres Ausgangswertes anstiegen (SCHREINER ET AL. 2008). Ein anderes Metallsalz ohne sensibilisierende Wirkung, Zinkchlorid, rief keine Reaktion hervor.

Es ist bemerkenswert, dass die bereits vorher über CD86 positiv getesteten, nicht-metallischen Allergene keinen Anstieg dieser beiden Proteine bewirkten. Die einzige Substanz, die im Kokultur-System sowohl CD86, als auch MIP-1 β und IL-6 hochregulieren konnte, war das bakterielle Antigen LPS.

3.5. Testung von Irritantien

Die Irritantien Natriumdodecylsulfat (SDS, auch: SLS) und Zinkchlorid konnten in keinem der Ausleseparameter des Assays einen Anstieg bewirken (SCHREINER ET AL. 2007, SCHREINER ET AL. 2008).

3.6. Zusammenfassung der Evaluation und Erweiterung des LCSA

Acht von acht untersuchten Allergenen wurden nach Erweiterung der Ausleseparameter in diesem Assay durch den Anstieg mindestens eines Markers (MIP-1 β , IL-6 und/oder CD86) korrekt als positiv getestet. Der Assay erwies sich dabei als sehr robust: trotz einer Vielzahl unterschiedlicher Spender für sowohl Keratinozyten, als auch Monozyten blieb die Schwankungsbreite der gemessenen relativen Hochregulation der oben genannten Proteine gering. Zwei von zwei getesteten Irritantien wurden korrekt als nicht sensibilisierend eingestuft, sodass sich für diese erste Evaluation ein sehr hoher positiver wie negativer prädiktiver Wert für den Assay ergibt.

3.7. Refinement

Im Zuge der Experimente konnte gezeigt werden, dass die Generierungszeit der Dendritischen Zellen für den Assay von sechs auf zwei Tage reduziert werden konnte, zusammen mit der Beschränkung auf eine einmalige statt einer dreimaligen Zytokingabe. Zudem konnte GM-CSF ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse des Assays ganz weggelassen werden, womit eine weitere Verringerung der Verbrauchsmittelkosten erreicht werden konnte (SCHREINER ET AL. 2008).

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Doktorarbeit konnte der in-vitro Assay LCSA zur Bestimmung des sensibilisierenden Potenzials von Substanzen nach Hautkontakt weiterentwickelt werden. Eine erste Evaluation mit acht bekannten Allergenen, die alle korrekt erkannt wurden, verlief erfolgreich. Das Spektrum der Ausleseparameter wurde von einem auf drei erweitert, ferner konnte der Assay verkürzt und seine Kosten verringert werden.

4.2. Vergleich zum Local Lymph Node Assay

Der Local Lymph Node Assay in Mäusen (LLNA, Übersicht bei KIMBER ET AL. 2002 und GERBERICK ET AL. 2007) ist momentan noch der von zahlreichen regulatorischen Behörden bevorzugte Tierversuch zur Bestimmung des sensibilisierenden Potenzials eines Stoffes nach Hautkontakt und würde als solcher voraussichtlich auch im Rahmen des EU-Vertragswerks REACH Anwendung finden (MCGARRY 2007). Ein Standardprotokoll hat die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) bereits in der OECD Test Guideline 429 festgehalten.

Hier können allerdings wasserlösliche Allergene problematisch sein, da Wasser als Vehikel von der Mäusehaut abtropft, bevor ausreichende Mengen des Allergens penetriert haben (RYAN ET AL. 2002). Allergene in wässrigen Vehikeln werden daher in ihrer Stärke regelmäßig unterschätzt (JOWSEY ET AL. 2008). Wasserlösliche Metallsalze wie Nickel- oder Cobaltverbindungen – beides bekannte starke Kontaktallergene im Menschen – konnten im LLNA teils gar nicht (MANDERVELT ET AL. 1997), teils nur mit Hilfe von Adjuvantien (IKARASHI ET AL. 1993) oder in speziellen Vehikeln (IKARASHI ET AL. 1992, RYAN ET AL. 2002) erkannt werden. Die LCSA-Kokultur erwies sich jedoch als sehr sensitiv für Nickel- und Cobaltchlorid, die eine starke Induktion von MIP-1 β und IL-6 bewirkten. Auf der anderen Seite jedoch können lipophile Substanzen im LCSA nur mittels spezieller Vehikel, z.B. Dimethylsulfoxid (DMSO), in das wässrige Zellkulturmedium eingebracht werden.

Die falsch positive Testung von reinen Irritantien wie SLS ist ein weiteres bekanntes Problem des LLNA (BASKETTER ET AL. 2009). In der LCSA-Kokultur hingegen wurde SLS korrekt als nicht sensibilisierend klassifiziert.

Die Verwendung von radioaktivem ³H-Thymidin im LLNA zur Determination der Proliferation in den Lymphknoten hat ebenfalls Nachteile. Zum einen stellt die Radioaktivität besondere Anforderungen und einen erhöhten Aufwand für durchführende Labors dar, zum anderen wird lediglich eine unspezifische immunologische Aktivität gemessen. Dies ist ein Grund dafür, dass Irritantien in manchen Fällen fälschlicherweise als Allergene klassifiziert werden (MONTELIUS ET AL. 1994, MONTELIUS ET AL. 1998, VOHR & AHR 2005). In der LCSA-Kokultur wurden jedoch

die beiden getesteten Irritanzen korrekt als nicht-allergen bewertet, darunter auch das im LLNA falsch positive SLS.

Es sind zwar Varianten des LLNA publiziert, die auf die Inkorporation von ^3H -Thymidin verzichten und mittels Antikörpern nach spezifischen immunologischen Markern in den Zellen der Lymphknoten fahnden (z.B. GERBERICK ET AL. 1999, GERBERICK ET AL. 2002, STAHLMANN ET AL. 2006), jedoch existiert für das originale Protokoll die größte Datenbasis mit publizierten Ergebnissen von mindestens 211 Substanzen (GERBERICK ET AL. 2005), sodass der radioaktive LLNA zur Zeit als die am besten evaluierte Variante gelten muss.

Neben ethischen Gründen bietet der Verzicht auf Tierversuche und die Verwendung primärer menschlicher Zellen auch logistische Vorteile. Die Zellen, welche aus Abfallmaterial von Operationen (Keratinozyten) bzw. von freiwilligen Blutspendern (Monozyten) entnommen werden, können kryokonserviert und nach Belieben an einem anderen Ort oder zu einem anderen Zeitpunkt benutzt werden. Das Labor muss keine Kapazitäten für Tierhaltung oder das Handling von radioaktiven Stoffen vorhalten.

4.3. Vergleich zu Sensibilisierungs-Assays mit kontinuierlichen Zelllinien

Zwar würde die Benutzung von kontinuierlichen Zelllinien anstelle primärer Zellen eine zusätzliche Ersparnis an Zeit und Geld bedeuten, und in der Tat wurden bereits mehrere *in vitro* Assays für Sensibilisierung auf Basis von Zelllinien publiziert (THP-1: ASHIKAGA ET AL. 2006, U937: PYTHON ET AL. 2007, MUTZ-3: AZAM ET AL. 2006), allerdings sind hiermit spezifische Probleme verbunden. Kontinuierliche Zelllinien neigen zu genetischer Instabilität, sodass unterschiedliche Subtypen derselben Zelllinie in mehreren Labors existieren können, oder dass sich selbst innerhalb eines Labors mit steigender Passagezahl der Genotyp und Phänotyp einer Zelllinie ändern können (BRISKE-ANDERSON ET AL. 1997, ESQUENET ET AL. 1997, HIORNS ET AL. 2004, WENGER ET AL. 2004). Kontaminationen mit anderen Zelllinien sind ein weiteres häufiges Problem (MCLEOD ET AL. 1999, CHATTERJEE 2007). Es ist in der Vergangenheit vorgekommen, dass jahre- bis jahrzehntelange Forschung mit einer bestimmten Zelllinie wertlos wird, wenn sich die Identität des jeweiligen Zellklons als falsch herausstellt (BOONSTRA ET AL. 2007, SCHWEPPE ET AL. 2008). Für einen Assay, auf dessen Basis rechtsverbindliche Entscheidungen über das Gefahrenpotenzial einer Substanz getroffen werden, sind diese Risiken inakzeptabel. Umfangreiche Anstrengungen zur genetischen Charakterisierung der Zellen müssten regelmäßig vorgenommen werden, was den Vorteil von kontinuierlichen Zelllinien gegenüber primären Zellen stark schrumpfen lassen würde.

Die Integration von zwei verschiedenen Arten primärer Zellen erscheint zunächst unnötig kompliziert, da es bereits Publikationen gibt, in denen aus Monozyten generierte dendritische Zellen in Monokultur eine Reaktion auf Allergene zeigten (PICHOWSKI ET AL. 2000, AEBY ET AL. 2004, STRAUBE ET AL. 2005). Allerdings waren diese Reaktionen erst bei sehr hohen Dosen an

der Grenze zur Zytotoxizität messbar. Auch in eigenen Versuchen war nur eine marginale Reaktion von dendritischen Zellen in Monokultur auf Allergene messbar (SCHREINER ET AL. 2007) – das Hinzufügen von Keratinozyten schien die Sensitivität der dendritischen Zellen auf Kontaktallergene stark anzuheben, sodass ein aussagefähiges Testergebnis auch unter Verwendung subtoxischer Konzentrationen der jeweiligen Substanzen erreicht wird.

4.4. Limitationen des LCSA

Die Verwendung des Konzentrationswertes des halbmaximalen CD86-Anstiegs ermöglicht analog zum EC3-Wert des LLNA die Klassifizierung der relativen Stärke eines Allergens. Die so gemachte Einteilung der hier getesteten Allergene stimmt mit den publizierten LLNA-Daten überein, abgesehen von α -Hexylzimtaldehyd (HCA). Während HCA im LLNA als moderates Allergen klassifiziert wird (GERBERICK ET AL. 2005), würde es im LCSA als sehr stark gelten. Möglicherweise sind die Penetrationseigenschaften von HCA eine Erklärung. Während eine Substanz im Kokultur-System direkt mit den Zellen interagieren kann, müsste sie im Tierversuch und im Menschen zunächst das Stratum corneum durchqueren. Eine schlechte Penetration *in vivo* könnte eine Erklärung für diese überraschend starke Reaktion *in vitro* sein.

Die paradoxe Reaktion auf HCA offenbart eine potentielle Schwachstelle des LCSA. Der Prozess der Penetration eines Allergens durch die obersten Hautschichten ist im Gegensatz zum Tierversuch nicht Teil dieses Assays. Um zu einer realistischen Abschätzung des Gefahrenpotenzials eines Allergens zu kommen, müssten zusätzliche Daten zur Hautpenetration gewonnen werden. Da dreidimensionale *in vitro* Modelle der menschlichen Haut kommerziell erhältlich sind, kann prinzipiell auch hier auf Tierversuche verzichtet werden.

Realistischerweise muss man davon ausgehen, dass nicht ein *in vitro* Assay alleine den LLNA als Tierversuch ersetzen kann. Wahrscheinlich wird erst die Zusammenschau der Ergebnisse mehrerer *in vitro* Assays, welche verschiedene Stufen der Sensibilisierung wie Hautpenetration und Aktivierung dendritischer Zellen nachbilden, eine realistische Einschätzung des Risikopotenzials einer allergenen Substanz ermöglichen.

4.5. Ausblick

Das hier vorgestellte Kokultursystem könnte auch Anwendung in der Grundlagenforschung über die Kontaktallergie finden. Es war ein überraschender Befund, dass die Metallsalze Nickel- und Cobaltchlorid auf molekularer Ebene eine andere Reaktion als die übrigen Allergene hervorriefen, obwohl sich das klinische Bild der Kontaktallergie auf die jeweiligen Substanzen nicht unterscheidet. Hier könnten sich weitere Untersuchungen zur Klärung von Signaltransduktionswegen anschließen.

Interessant ist auch, dass Isoeugenol eine Aktivierung der dendritischen Zellen in der Kokultur bewirken konnte. Isoeugenol ist ein sogenanntes Prohapten: erst nach einer chemischen

Modifikation kann es mit einem Protein verbunden werden (BERTRAND ET AL. 1997). Offenbar ist die LCSA-Kokultur in der Lage, diese Metabolisierung, die auch *in vivo* stattfindet, durchzuführen. Dies ist wichtig, da es die Vorhersagekraft des Assays erhöht, wenn auch Prohaptene unter den Allergenen korrekt erkannt werden. Die Natur dieser Metabolisierungen *in vivo* ist noch nicht geklärt; es wird vermutet, dass Keratinozyten eine Mikroumgebung aufbauen, in der sich Enzyme der Cytochrom P450-Familie befinden (MUKHTAR ET AL. 2007). Die LCSA-Kokultur könnte auch hier einen Beitrag zur Grundlagenforschung leisten, da genaue Details dieser Metabolisierungen *in vitro* gezielt untersucht werden können.

Während die Beteiligung von T_{H1} -Zellen an der Kontaktallergie lange Zeit bekannt war, verdichten sich Hinweise, dass auch T_{H17} -polarisierte T-Helfer-Zellen bei Mäusen (NAKAE ET AL. 2002, HE ET AL. 2006) und Menschen (LARSEN ET AL. 2009) an dieser Immunpathologie beteiligt sind. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass *in vitro* aus Monozyten generierte Langerhanszellen nach Stimulation mit dem Toll-Like-Rezeptor-2-Agonisten Peptidoglykan in der Lage sind, eine T_{H17} -Polarisation hervorzurufen (ALIAHMADI ET AL. 2009). Es bleibt zu untersuchen, ob dieser Befund auch für solche Langerhanszell-ähnlichen Zellen gilt, die unter den Bedingungen der LCSA-Kokultur generiert wurden, und ob dies auch nach Stimulation durch Kontaktallergene geschieht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, dass der LCSA als *in vitro* Test in der Lage ist, Tierversuche beim Screening nach potentiellen Kontaktallergenen einzusparen. Ferner eröffnet er weitere Möglichkeiten in der Grundlagenforschung zur Pathophysiologie der allergischen Kontaktdermatitis.

Literaturverzeichnis

Aeby P, Wyss C, Beck H, Griem P, Scheffler H & Goebel C. Characterization of the sensitizing potential of chemicals by in vitro analysis of dendritic cell activation and skin penetration. *J Invest Dermatol* 2004; 122:1154-64.

Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, et al. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. *Eur J Immunol* 2009; 39:1221-30.

Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, et al. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro* 2006; 20:767-73.

Azam P, Peiffer J, Chamousset D, et al. The cytokine-dependent MUTZ-3 cell line as an in vitro model for the screening of contact sensitizers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212:14-23.

Basketter D, Ball N, Cagen S, et al. Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Regul Toxicol Pharmacol* 2009; 55:90-6.

Bertrand F, Basketter DA, Roberts DW & Lepoittevin JP. Skin sensitization to eugenol and isoeugenol in mice: possible metabolic pathways involving ortho-quinone and quinone methide intermediates. *Chem Res Toxicol* 1997; 10:335-43.

Bonneville M, Chavagnac C, Vocanson M, et al. Skin contact irritation conditions the development and severity of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* 2007; 127:1430-5.

Boonstra JJ, van der Velden AW, Beerens ECW, et al. Mistaken identity of widely used esophageal adenocarcinoma cell line TE-7. *Cancer Res* 2007; 67:7996-8001.

Briske-Anderson MJ, Finley JW & Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214:248-57.

Chatterjee R. Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science* 2007; 315:928-31.

Clark SC & Zirwas MJ. Management of occupational dermatitis. *Dermatol Clin* 2009; 27:365-83.

Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W & Verhoeven G. LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 62:391-9.

Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N & Hermine O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 1998; 187:961-6.

Gerberick GF, Cruse LW & Ryan CA. Local lymph node assay: differentiating allergic and irritant responses using flow cytometry. *Methods* 1999; 19:48-55.

Gerberick GF, Cruse LW, Ryan CA, et al. Use of a B cell marker (B220) to discriminate between allergens and irritants in the local lymph node assay. *Toxicol Sci* 2002; 68:420-8.

Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, et al. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* 2005; 16:157-202.

Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ & Kimber I. Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* 2007; 41:54-60.

Hartmann B, Staedtler F, Hartmann N, Meingassner J & Firat H. Gene expression profiling of skin and draining lymph nodes of rats affected with cutaneous contact hypersensitivity. *Inflamm Res* 2006; 55:322-34.

He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmetts CA, Xu H. CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses. *J Immunol* 2006; 177:6852-8.

Hiorns LR, Bradshaw TD, Skelton LA, Yu Q, Kelland LR & Leyland-Jones B. Variation in RNA expression and genomic DNA content acquired during cell culture. *Br J Cancer* 2004; 90:476-82.

Hirota M & Moro O. MIP-1beta, a novel biomarker for in vitro sensitization test using human monocytic cell line. *Toxicol In Vitro* 2006; 20:736-42.

Ikarashi Y, Tsuchiya T & Nakamura A. Detection of contact sensitivity of metal salts using the murine local lymph node assay. *Toxicol Lett* 1992; 62:53-61.

Ikarashi Y, Tsukamoto Y, Tsuchiya T & Nakamura A. Influence of irritants on lymph node cell proliferation and the detection of contact sensitivity to metal salts in the murine local lymph node assay. *Contact Dermatitis* 1993; 29:128-32.

Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 2005; 175:3463-8.

Jowsey IR, Clapp CJ, Safford B, Gibbons BT & Basketter DA. The impact of vehicle on the relative potency of skin-sensitizing chemicals in the local lymph node assay. *Cutan Ocul Toxicol* 2008; 27:67-75.

Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, Ryan CA & Gerberick GF. The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* 2002; 47:315-28.

Larsen JM, Bonfeld CM, Poulsen SS, Geisler C & Skov L. IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123:486-92.

Lebre MC, Burwell T, Vieira PL, et al. Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: a role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:525-35.

MacLeod RA, Dirks WG, Matsuo Y, Kaufmann M, Milch H & Drexler HG. Widespread intraspecies cross-contamination of human tumor cell lines arising at source. *Int J Cancer* 1999; 83:555-63.

Mandervelt C, Clottens FL, Demedts M & Nemery B. Assessment of the sensitization potential of five metal salts in the murine local lymph node assay. *Toxicology* 1997; 120:65-73.

McGarry HF. The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicology* 2007; 238:71-89.

Montelius J, Wahlkvist H, Boman A, Fernström P, Gråbergs L & Wahlberg JE. Experience with the murine local lymph node assay: inability to discriminate between allergens and irritants. *Acta Derm Venereol* 1994; 74:22-7.

Montelius J, Wahlkvist H, Boman A & Wahlberg JE. Murine local lymph node assay for predictive testing of allergenicity: two irritants caused significant proliferation. *Acta Derm Venereol* 1998; 78:433-7.

Mukhtar H, Afaq F & Matsui MS. Fishing for allergens hiding as prohaptens. *J Invest Dermatol* 2007; 127:992-3.

Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, et al. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 2002; 17:375-87.

Peiser M, Grützkau A, Wanner R & Kolde G. CD1a and CD1c cell sorting yields a homogeneous population of immature human Langerhans cells. *J Immunol Methods* 2003; 279:41-53.

Pichowski JS, Cumberbatch M, Dearman RJ, Basketter DA & Kimber I. Investigation of induced changes in interleukin 1beta mRNA expression by cultured human dendritic cells as an in vitro approach to skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 2000; 14:351-60.

Python F, Goebel C & Aeby P. Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220:113-24.

Ryan CA, Cruse LW, Skinner RA, Dearman RJ, Kimber I & Gerberick GF. Examination of a vehicle for use with water soluble materials in the murine local lymph node assay. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:1719-25.

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T & Wanner R. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy* 2007; 62:1419-28.

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T & Wanner R. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens. *Toxicology* 2008; 249:146-52.

Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, et al. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:4331-41.

Seliger B, Marincola FM, Ferrone S & Abken H. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med* 2008; 14:550-9.

Stahlmann R, Wegner M, Riecke K, Kruse M & Platzek T. Sensitising potential of four textile dyes and some of their metabolites in a modified local lymph node assay. *Toxicology* 2006; 219:113-23.

Straube F, Grenet O, Bruegger P & Ulrich P. Contact allergens and irritants show discrete differences in the activation of human monocyte-derived dendritic cells: consequences for in vitro detection of contact allergens. *Arch Toxicol* 2005; 79:37-46.

Thyssen JP, Linneberg A, Menné T & Johansen JD. The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* 2007; 57:287-99.

Vohr H & Ahr HJ. The local lymph node assay being too sensitive? *Arch Toxicol* 2005; 79:721-8.

Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N & Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep* 2004; 24:631-9.

Anteiserklärung

Maximilian Schreiner hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1:

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy* 2007; 62:1419-28. Impact-Faktor: 5,014.

40 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Bestimmung von Metalloproteinase-Aktivitäten, Zytokinmessungen, FACS, Literaturrecherche, Beteiligung an der Manuskripterstellung (Materials and Methods).

Publikation 2:

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens. *Toxicology* 2008; 249:146-52. Impact-Faktor: 2,836.

60 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Isolation primärer humaner Zellen, Anlegen von Zellkulturen, Analyse von Differenzierungsleistungen durch FACS, ELISA, Vitalitätsbestimmung, Erstellen der Diagramme, Literaturrecherche, Manuskripterstellung (Results, Materials and Methods).

Publikation 3:

Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, Hitzler M, Krüger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig B, Wanner R, Peiser M. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. *Eur J Immunol* 2009; 39:1221-30. Impact-Faktor: 4,865.

10 Prozent

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung von FACS-Analysen zur Bestimmung der Reinheit eingesetzter Zellpopulationen.

In der Originalarbeit befindet sich auf den Seiten 21-30 folgende Publikation, die aus Urheberrechtsgründen nicht in der elektronischen Version dieser Arbeit erscheint:

Schreiner M, Peiser M, Briehle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy* 2007; 62:1419-28.

In der Originalarbeit befindet sich auf den Seiten 31-37 folgende Publikation, die aus Urheberrechtsgründen nicht in der elektronischen Version dieser Arbeit erscheint:

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens. *Toxicology* 2008; 249:146-52.

In der Originalarbeit befindet sich auf den Seiten 38-47 folgende Publikation, die aus Urheberrechtsgründen nicht in der elektronischen Version dieser Arbeit erscheint:

Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, Hitzler M, Krüger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig B, Wanner R, Peiser M. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. Eur J Immunol 2009; 39:1221-30.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Originalarbeiten:

Schreiner M, Liesenfeld O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:221-33.

Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, Hitzler M, Krüger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig B, Wanner R, Peiser M. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23. *Eur J Immunol* 2009; 39:1221-30.

Wanner R, Schreiner M. An in vitro assay to screen for the sensitizing potential of xenobiotics. *ALTEX* 2008; 25:115-20.

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A new dendritic cell type suitable as sentinel of contact allergens. *Toxicology* 2008; 249:146-52.

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Stahlmann R, Zuberbier T, Wanner R. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. *Allergy* 2007; 62:1419-28.

Poster und Kongressbeiträge:

Schreiner M, Peiser M, Briechle D, Wanner R. A loose-fit coculture of activated keratinocytes and dendritic cell-related cells for prediction of sensitizing potential. Second World Congress on Work-Related and Environmental Allergy WOREAL 2007; Weimar 2007.

Schreiner M, Wanner R. A coculture of keratinocytes and dendritic cell-related cells for the screening of potential contact allergens. 18th European Students' Conference ESC 2007; Berlin 2007.

Schreiner M, Wanner R. Optimization of LCSA test protocols for prediction of sensitizing potential. 21st Meeting of the European Research Group on Experimental Contact Dermatitis ERGECD 2008; London 2008.

Erklärung

Ich, Maximilian Schreiner, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation und Weiterentwicklung eines in vitro Testverfahrens zur Bestimmung des sensibilisierenden Potenzials von Kontaktallergenen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Maximilian Schreiner

Danksagung

Ich widme diese Arbeit meinem Freund und Doktorvater
Reinhard Wanner,
der kurz vor Abschluss dieser Promotion unerwartet
und viel zu früh verstorben ist

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. Reinhard Wanner für seine wissenschaftliche Anleitung, seine ständige Ansprechbarkeit und Unterstützung, die Heranführung an das wissenschaftliche Schreiben und die Möglichkeit, die Forschungsergebnisse als Erstautor zu publizieren.

Ich danke Herrn Dr. Matthias Peiser dafür, dass er mein Interesse an einer experimentellen Doktorarbeit geweckt und meine ersten Schritte im Labor überwacht hat.

Ich danke meiner Familie, allen voran meiner Frau Mareike, dafür, dass sie meine Launen während des Studiums und der Erstellung dieser Doktorarbeit ausgehalten haben (und aushalten werden). Besonders danke ich auch meinem Vater Dr. med. Ulrich Schreiner dafür, dass er mich immer gefördert und mich nie dazu gedrängt hat, Medizin zu studieren (auf die Idee bin ich ganz allein gekommen).

An dieser Stelle danke ich auch dem Studiengang Medienwissenschaften an der Technischen Universität Braunschweig und der Hochschule für Bildende Künste Braunschweig, der mir klar gemacht hat, dass ein durchstrukturiertes Studium mit einem klaren Berufsbild vielleicht doch die bessere Wahl für mich war.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie und Bioinformatik der Charité, der Firma Mologen und des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité, besonders Prof. Dr. Ralf Stahlmann und Anna Sonnenburg, für ihre Hilfe und Unterstützung.

Außerdem danke ich der Bundeswehr für ihre finanzielle Unterstützung während des Studiums, was mir den Freiraum gegeben hat, studienbegleitend eine experimentelle Doktorarbeit durchzuführen.

Teile dieser Arbeit wurden gefördert durch die Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR).