Aus dem Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. R. Ludwig

Drug Repurposing zur Steigerung der B-Lymphozyten-Aktivität

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Johannes Zanken

aus Münster

Lübeck 2016

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Ludwig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Olaf Jöhren

Tag der mündlichen Prüfung: 27.8.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 27.8.2018

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Abkürzungsverzeichnis

°C	-	Grad Celsius
µg	-	Mikrogramm
µl	-	Mikroliter
µM	-	1µmol/Liter
A488	-	Alexa Fluor® 488
Abb.	-	Abbildung
ANOVA	-	*analysis of variance* (Varianzanalyse)
APC	-	Allophycocyanin
aqua dest.	-	*aqua destillata* (destilliertes Wasser)
AUC	-	*Area under the curve* (Fläche unter der Kurve)
BALB/cJ	-	Bagg albino color by Jackson Laboratory
BCR	-	*B-Cell receptor* (B-Zell-Rezeptor)
BrdU	-	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	-	Bovines Serumalbumin
B-Zelle	-	B-Lymphozyt („B“ für *Bursa fabricii*)
ca.	-	circa
CD	-	*cluster of differentiation* (Oberflächenmolekülklassifikation)
CDR	-	*complementary determining regions* (Antigenbindungsstelle)
CLL	-	Chronisch lymphatische Leukämie
C-Region	-	*constant* (konstante) Region
CXCL	-	C-X-C-(Chemokin-)Motiv-Ligand
CXCR	-	C-X-C-(Chemokin-)Motiv-Rezeptor
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	*Deoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
DPBS	-	Dulbecco´s phosphatgepufferte Salzlösung
EBA	-	Epidermolysis bullosa acquisita
EDTA	-	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	-	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
et al.	-	*et alii* (und andere)
Fab	-	Antigenbindendes Fragment
FACS	-	*fluorescence-activated cell sorting* (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)

FBS	-	*fetal bovine serum* (fetales Rinderserum)
Fc	-	*crystallisable* (kristallisierbares) Fragment
FDC	-	*follikular dendritic cell* (follikuläre dendritische Zelle)
FELASA	-	*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*
FITC	-	Fluorescein Isothiocyanate
FSC	-	*forward scatter (Vorwärtsstreulicht)*
g	-	Formelzeichen der Fallbeschleunigung
H_2O	-	Wasser
H_2SO_4	-	Schwefelsäure
H_3PO_4	-	Phosphorsäure
HRP	-	*horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)
H-Kette	-	*heavy* (schwere) Kette
Hrsg.	-	Herausgeber
Ig	-	Immunglobulin
IL	-	Interleukin
i.p.	-	intraperitoneal
ISEF	-	Institut für systemische Entzündungsforschung
ITAM	-	*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
IU	-	*international units* (internationale Einheiten)
LDH	-	Laktat-Dehydrogenase
LIED	-	Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie
L-Kette	-	*light* (leichte) Kette
LPS	-	Lipopolysaccharide
M	-	mol/Liter
MACS	-	*magnetic-activated cell sorting* (magnetisch aktivierte Zellsortierung)
MAK	-	Membranangriffskompex
mCol7	-	murines Kollagen Typ VII
mg	-	Milligramm
MHC	-	*major histocompatibility complex* (Haupthistokompatibilitätskomplex)
ml	-	Milliliter
mM	-	millimol/Liter

MZ-B-Zelle	-	Marginalzonen-B-Zelle
$Na_2HPO_4 – 2H_2O$	-	Dinatriumhydrogenphosphat - Dihydrat
NaCl	-	Natriumchlorid
$NaH_2PO_4 – H_2O$	-	Natriumdihydrogenphosphat - Monohydrat
NAD	-	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
ng	-	Nanogramm
NK-Zellen	-	Natürliche Killerzellen
nm	-	Nanometer
n.s.	-	nicht signifikant
PBMC	-	*peripheral blood mononuclear cell* (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	-	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	-	Phycoerythrin
pH	-	*potentia Hydrogenii* (Skala zur Stärke saurer/basischer Lösungen)
rpm	-	*rounds per minute* (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	-	*Roswell Park Memorial Institute*
SSC	-	*side scatter* (Seitwärtsstreulicht)
STITCH	-	*search tool for interactions of chemicals* (Suchmaschine für Interaktionen zwischen Chemikalien)
Tab.	-	Tabelle
TCR	-	*T-Cell receptor* (T-Zell-Rezeptor)
T_H-Zelle	-	T-Helferzelle
T_{FH}-Zelle	-	follikuläre T-Helferzelle
TLR	-	*Toll-like* Rezeptor
TMB	-	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin
TNFα	-	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Zelle	-	T-Lymphozyt („T“ für Thymus)
VEGF	-	*vascular endothelial growth factor* (vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor)
V-Domäne	-	variable Domäne
vWFA2	-	von Willebrand-Faktor ähnliche Domäne A2
z.B.	-	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Antikörper	5
1.3	B-Zell-Reifung	8
1.4	B-Zell-Rezeptoren und B-Zell-Aktivierung	9
1.5	B-Zell-Migration und -Differentierung	10
1.6	Immunologisches Gedächtnis	13
1.7	Impfungen	13
1.8	Drug Repurposing	15
1.9	Identifizierte, potentiell B-Zell-aktivierende Medikamente	17
1.10	Ziele dieser Arbeit	20

2 Material und Methoden

2.1	Verwendete Laborgeräte und Materialien	21
2.2	Probanden	28
2.3	Isolation humaner B-Lymphozyten	28
2.4	Stimulation und Inkubation der isolierten B-Zellen	31
2.5	LDH-Zytotoxizitätsassay	32
2.6	BrdU-Proliferationsassay	34
2.7	Durchflusszytometrie isolierter humaner B-Lymphozyten	35
2.8	ELISA zur Quantifizierung der IgG- und IgM-Konzentration	36
2.9	Mäuse	40
2.10	Immunisierung der Mäuse mit murinem Kollagen 7 (mCol7)	41
2.11	Verdünnung und Applikation der Medikamente	41
2.12	Gewinnung murinen Serums und Leukozyten aus dem Blut	43
2.13	FACS-Färbung der murinen Leukozyten aus dem Blut	43
2.14	Tötung, Organentnahme und Isolation der Leukozyten aus Milz und Lymphknoten	44

2.15 FACS-Färbung zur Analyse der B-Lymphozyten und antigenspezifischen Plasmazellen aus Milz und Lymphknoten 46
2.16 ELISA zum Nachweis spezifischer IgM- und IgG-Antikörper gegen mCol7-vWFA2 47
2.17 Auswertung und Statistik 49

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Wirkung potentiell B-Zellfunktionssteigernder Substanzen auf die Aktivität humaner B-Lymphozyten in vitro 50
3.1.1 Die Stimulation mit anti-CD40-Antikörpern und IL-21 steigert die Proliferation und ermöglicht die Bildung von Plasmazellen und Antikörpern. 50
3.1.2 Ceforanid, Itoprid und Progesteron steigern die Proliferation isolierter humaner B-Zellen. 52
3.1.3 Alle Wirkstoffe haben in den untersuchten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf isolierte humane B-Zellen. 53
3.1.4 Die Kombination der wirksamen Substanzen steigert die Proliferation nicht stärker als die Einzelsubstanzen. 55
3.1.5 Sieben der getesteten Wirkstoffe erhöhen den Plasmazellanteil in der B-Zellkultur am sechsten Tag nach Isolation. 58
3.1.6 Ceforanid, Itoprid, Progesteron, Famprofazon und Trapidil steigern sowohl die Produktion von IgM- als auch die von IgG-Antikörpern in vitro. 60
3.2 In vivo Validierung der in vitro beobachteten B-Zellfunktions-steigernden Wirkungen von Ceforanid und Progesteron 63
3.2.1 Die Immunisierung mit mCol7-vWFA2 bewirkt eine Immunreaktion, die mit einer Steigerung der Plasmazellanteile und Antikörperproduktion, aber nicht der B-Lymphozyten einhergeht. 64
3.2.2 Weder Ceforanid noch Progesteron haben einen Einfluss auf die Menge der B-Lymphozyten, Plasmablasten und Plasmazellen. 64

3.2.3 Ceforanid und Progesteron steigern die Produktion antigenspezifischer Antikörper gegenüber der Kontrollgruppe in vivo. 70

4 Diskussion

4.1 Resümee 77
4.2 Ergebnisse nach Medikamenten 78
4.2.1 Ceforanid 78
4.2.2 Progesteron 80
4.2.3 Sechs Wirkstoffe, die nur in vitro getestet wurden 82
4.2.4 Wirkstoff-Kombinationen 85
4.3 Limitationen 85
4.4 Ausblick 86

5 Zusammenfassung 88

6 Literaturverzeichnis 89

7 Anhänge 101
7.1 Kongressbeiträge 101

8 Danksagung 108

9 Lebenslauf 110

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Zu jedem Zeitpunkt seines Lebens ist der menschliche Körper von Gefahren bedroht, die sich dem bloßen Auge entziehen. So können Krankheitserreger, mikroskopische Fremdkörper oder unkontrolliert proliferierende Tumorzellen die Gesundheit erheblich beeinträchtigen. Dass er dennoch die meiste Zeit über davon nichts mitbekommt, ist dem Immunsystem zu verdanken, das – bei guter Funktion – einen wirksamen Schutz gegen diese Bedrohungen bietet.

Das Immunsystem ist in vier Teile eingeteilt. Es besteht aus einen angeborenen, unspezifischen und einem erworbenen, spezifischen Teil, die sich wiederum in einen zellulären und einen humoralen Anteil gliedern (siehe Tab. 1.1). Hiervon sind die B-Lymphozyten das Hauptthema dieser Dissertation. Da diese jedoch nicht alleine ihre volle Wirkung entfalten können, stelle ich im Folgenden auch die übrigen Bestandteile des Immunsystems kurz vor.

Wie alle vielzelligen Lebewesen besitzt auch der Mensch zunächst eine angeborene Abwehr (Resistenz), die sich unspezifisch gegen alle fremden Organismen richtet. Die erste Abwehrreihe besteht dabei aus natürlichen Barrieren wie der Haut, die einen wirkungsvollen Schutz vor Invasoren (Bakterien, Viren, Pilze…) bietet. Neben der physikalischen Barrierefunktion schützt die Haut auch durch eine ungefährliche, residente Mikrobenflora an ihrer Oberfläche (Purves et al. 2006) und durch Defensine in den Körpersekreten vor den meisten Krankheitserregern. Läsionen in diesen Schutzwällen ermöglichen jedoch ein leichtes Eindringen in den Körper (Sedlacek 2014a).

Für diesen Fall hält die unspezifische Abwehr die Entzündungsreaktion bereit. Ein wichtiger Bestandteil dieser ist das chemokingesteuerte Einwandern (Chemotaxis) von Fresszellen (Phagozyten), die Krankheitserreger aufnehmen und verdauen können. Hier sind zunächst die neutrophilen Granulozyten zu nennen, die ca. zwei Drittel der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) ausmachen (Sedlacek 2014a). Die selteneren eosinophilen Granulozyten können die Entzündungsreaktion modulieren und produzieren verschiedene basische Proteine, die vor allem der Abwehr von inneren Parasiten dienen (Sedlacek 2014a). Weitere Phagozyten sind die Makrophagen, die sich aus im Blut zirkulierenden Monozyten entwickeln und etwa fünf Prozent der weißen Blutzellen repräsentieren sowie die dendritischen Zellen (Purves et al. 2006).

	unspezifisch	spezifisch
zellulär	• Oberflächenbarrieren • Neutrophile Granulozyten • Eosinophile Granulozyten • Basophile Granulozyten • Natürliche Killerzellen • Monozyten/Makrophagen • Dendritische Zellen • Mastzellen	• T-Lymphozyten • B-Lymphozyten *Innate-like*-Lymphozyten: • B-1-Zellen • γδ-T-Zellen • NK-T-Zellen • Marginalzonen-B-Zellen
humoral	• Zytokine/Chemokine • Interferone • Histamin • Defensine • Komplementsystem	• Immunglobuline (Antikörper)

Tab. 1.1: Gezeigt ist die Einteilung des Immunsystems in einen unspezifischen (angeborenen) und einen spezifischen (erworbenen) Teil, sowie in einen zellulären und einen humoralen Teil. Während die zahlreichen Bestandteile des unspezifischen Immunsystems die Abwehrreaktion einleiten, adaptieren die Lymphozyten des spezifischen Immunsystems an das Pathogen, um eine schlagkräftigere Immunantwort mit anhaltendem Schutz zu gewährleisten. Das humorale Immunsystem hat einerseits eine direkte Abwehrfunktion über Immunglobuline (Ig) und das Komplementsystem, andererseits stellt es über Entzündungsmediatoren eine Kommunikationsmöglichkeit zwischen den Bestandteilen des Immunsystems dar, die keinen direkten Zell-Zell-Kontakt erfordert, wobei auch hier die Immunglobuline und das Komplementsystem eine wichtige Rolle spielen (Sedlack 2014a) Da beide Systeme eng zusammenarbeiten, ist eine genaue Trennung nicht immer möglich. Die *innate-like*-Lymphozyten gehören zwar zu den Lymphozyten als klassische Zellen des spezifischen Immunsystems, nehmen aber auch Aufgaben des angeborenen Immunsystems war (Murphy 2011a).

Während neutrophile Granulozyten nach erfolgter Phagozytose absterben und als Eiter am Ort der Infektion verbleiben, sind Makrophagen und dendritische Zellen langlebiger und präsentieren dem spezifischen Immunsystem einzelne Antigene der verdauten Organismen auf ihrer Oberfläche (Murphy 2011a). All diese Zellen erkennen Pathogene nicht an spezifischen Antigenen sondern an Mustern die unspezifisch auf vielen Krankheitserregern vorkommen. Weit verbreitet sind hierfür Toll-ähnlichen-Rezeptoren (*Toll-like* Rezeptoren, TLR), die beispielweise auf bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) reagieren (Holländer et al. 2006a).

Eine weitere zelluläre Komponente des unspezifischen Immunsystems sind die Natürlichen Killlerzellen (NK-Zellen), die aus der lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark entstehen und ein Zehntel aller Lymphozyten ausmachen (Sedlacek 2014a). Sie greifen nicht direkt Krankheitserreger, sondern körpereigene Zellen, an und dienen dadurch der Virusabwehr sowie der Verhinderung unregulierter Zellproliferation im Sinne einer Krebserkrankung (Murphy 2011a). Einen noch geringeren Anteil machen die basophilen Granulozyten aus. Sie repräsentieren weniger als ein Prozent der Leukozyten, sind vor allem bei allergischen Reaktionen aktiv und verstärken die Immunreaktion durch die Freisetzung von Histamin und anderen Mediatoren (Holländer et al. 2006a). Eine ähnliche Funktion üben die Mastzellen aus.

Das Komplementsystem besteht aus etwa 20 verschiedenen Molekülen (Komplementfaktoren), die sich in einer kaskadischen Reaktionsfolge, an deren Ende die Formierung des Membranangriffskomplexes (MAK) steht, der die Zielzelle abtötet. Außerdem wirken einige Komplementfaktoren durch Anheftung an die Zielzelle opsonierend (siehe unten) für die zelluläre Immunabwehr, bei der Aktivierung abgespaltene Peptidfragmente wirken als Anaphylatoxine proinflammatorisch (Holländer et al. 2006b). Zur Abwehr viraler Infektionen tragen die sogenannten Interferone bei, die die intrazelluläre Vermehrung der Viren durch Induktion replikationshemmender Enzyme unterbinden. Außerdem haben sie verschiedene Wirkungen auf die anderen Zellen des Immunsystems, vergleichbar mit denen der Zytokine (Murphy 2011a).

Im Gegensatz zur unspezifischen Immunantwort, die sehr schnell abläuft, benötigt die spezifische Immunantwort beim ersten Kontakt mit einem Antigen einige Tage, bis es zur Bekämpfung des Erregers kommt. Sie ist jedoch unbedingt nötig, da das unspezifische Immunsystem sich nur gegen Pathogene richten kann, die bestimmte, nicht spezifische Molekülmuster aufweisen oder die Bildung von Abwehrstoffen induzieren. So gelingt es Fremdorganismen häufig, in ihrer Evolution dem unspezifischen Immunsystem auszuweichen (Holländer et al. 2006a). Von besonderer Bedeutung ist hierbei, dass das spezifische Immunsystem ein immunologisches Gedächtnis aufbaut. Beim zweiten Kontakt mit einem Antigen läuft die Immunreaktion dadurch wesentlich schneller und stärker ab. Repräsentiert wird das spezifische Immunsystem durch die Lymphozyten, die in zwei Gruppen unterschieden werden: die T-Lymphozyten (auch T-Zellen) und die B-Lymphozyten (auch B-Zellen) (Welsch und Deller 2010).

Die T-Lymphozyten sind die Effektorzellen der spezifischen zellulären Immunantwort und machen ca. drei Viertel aller Blutlymphozyten aus. Zur Antigenerkennung tragen sie an ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TCR), wobei jede T-Zelle nur ein Antigen erkennen kann (Welsch und Deller 2010). Es werden verschiedene Untergruppen der T-Lymphozyten unterschieden, an denen die $CD4^+$-T-Lymphozyten den größten Anteil haben. Ihre Hauptaufgabe ist die Aktivierung der anderen Immunzellen, sie werden daher auch als T-Helferzellen bezeichnet, wobei auch hier verschiedene Subpopulationen wie T_H1, T_H2, T_H3, T_H9, T_H17 oder T_H22 unterschieden werden können, die sich funktionell in den von ihnen ausgeschütteten Zytokinen unterscheiden (Purnama et al. 2013, Sedlacek 2014b). Zu den $CD4^+$-T-Lymphozyten gehören außerdem regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}), die andere T-Zellen und dendritische Zellen supprimieren, autoaggressive Zellen inaktivieren, die Immunantwort regulieren und die Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen erhalten (Holländer et al. 2006c). Für die Funktion des spezifischen Immunsystems sind vor allem die T_H2-Zellen von entscheidender Bedeutung, da sie die B-Lymphozyten aktivieren und ihre weitere Differenzierung induzieren. Daneben spielen CD8+-T-Lymphozyten (zytotoxische T-Lymphozyten, T-Killerzellen), deren Aufgabe die Abtötung infizierter oder entarteter Körperzellen ist, eine wichtige Rolle. Bei der Stimulation von T-Lymphozyten entstehen darüber hinaus auch T-Gedächtniszellen, die einen wichtigen Beitrag zum immunologischen Gedächtnis leisten. (Welsch und Deller 2010). Eine strikte Trennung in $CD4^+$-Helferzellen und $CD8^+$-Killerzellen ist jedoch, wenn überhaupt, vereinfachend möglich, da z.B. auch kleine Populationen $CD4^+$-Killerzellen oder $CD8^+$ regulatorischer T-Zellen bekannt sind (Holländer et al. 2006c).

Die B-Lymphozyten hingegen sind die Effektorzellen der humoralen spezifischen Abwehr. Ihre Hauptaufgabe ist die Produktion einer Vielzahl gelöster, spezifischer Antigenrezeptoren, den sogenannten Antikörpern. Diese nehmen im Immunsystem eine zentrale Rolle ein, da sie nicht nur der direkten Bekämpfung der Fremdorganismen dienen, sondern auch eine wichtige Unterstützung für andere Komponenten der spezifischen und unspezifischen Abwehr sind.

Eine kleine Untergruppe der Lymphozyten entzieht sich der Einteilung ins spezifische Immunsystem, indem sie Aufgaben des angeborenen Immunsystems wahrnimmt. Zu diesen *innate-like*-Lymphozyten gehören die γδ-T-Zellen, die in Epithelien anzutreffen sind, dort ihre Antigene ohne vorherige Präsentation erkennen und sofort Zytokine produzieren können (Murphy 2011a). Diese Eigenschaft haben sie mit den Natürlichen

Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen) gemeinsam, denen eine regulatorische Funktion zugesprochen wird (Murphy 2011a). Die dritte Zellart dieser Gruppe sind die B-1-Zellen, die zu den B-Lymphozyten gehören und in der Pleurahöhle sowie im Peritoneum zu finden sind. Ihre Rezeptorvielfalt ist gegenüber den konventionellen B-2-Lymphozyten (im Folgenden gemeint, wenn von B-Lymphozyten die Rede ist) deutlich eingeschränkt, sie produzieren ohne T-Zell-Unterstützung eine geringe Menge „natürlicher Antikörper", die beispielsweise vor Pneumokokkeninfektionen schützen können (Murphy 2011a). Ähnlich diesen sind die nur in der Milz vorkommenden Marginalzonen-B-Zellen (MZ-B-Zellen), die der schnellen Abwehr im Blut gelöster Pathogene dienen. Sie produzieren ebenfalls stetig polyreaktive Antikörper und verfügen außerdem über TLR, bei deren Aktivierung sie rasch eine große Menge Antikörper produzieren (Cerutti et al. 2013).

1.2 Antikörper

Antikörper sind Glykoproteine der Immunglobulinsuperfamilie (Ig). Ihre Immunglobulindomänen sind durch gegenläufige β-Faltblattstrukturen charakterisiert, die mit Disulfidbrücken verknüpft sind. Es gibt sie als konstante (C-) oder variable (V-) Domänen. Anhand ihrer Struktur und Aminosäurensequenz werden fünf Isotypen unterschieden: $IgA_{(1+2)}$, IgD, IgE, $IgG_{(1-4)}$ und IgM. Der Aufbau eines monomeren Immunglobulins ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Am konstanten Teil befinden sich außerdem verzweigte Kohlenhydrat-Seitenketten, die als Schutz vor Proteolyse dienen und die physikochemischen sowie die biologischen Eigenschaften des Immunglobulins beeinflussen (Sedlacek 2014b).

Die größte Rolle unter den Isotypen spielen die **IgG**-Antikörper. Sie kommen beim Menschen monomerisch in den Subklassen 1-4 vor und weisen die höchsten Konzentrationen im Serum auf (Murphy 2011b). IgG-Antikörper sind hochaffin und übernehmen eine Reihe an wichtigen Funktionen. Über ihre Fab-Fragmente binden sie an Antigene und können so bakterielle Toxine neutralisieren oder die Anheftung von Krankheitserregern und deren Eindringen in die Körperzellen blockieren. Kommt es zur Bindung an ein Pathogen, durchlaufen die Antikörper eine Konformitätsänderung und es bilden sich Antigen-Antikörper-Immunkomplexe.

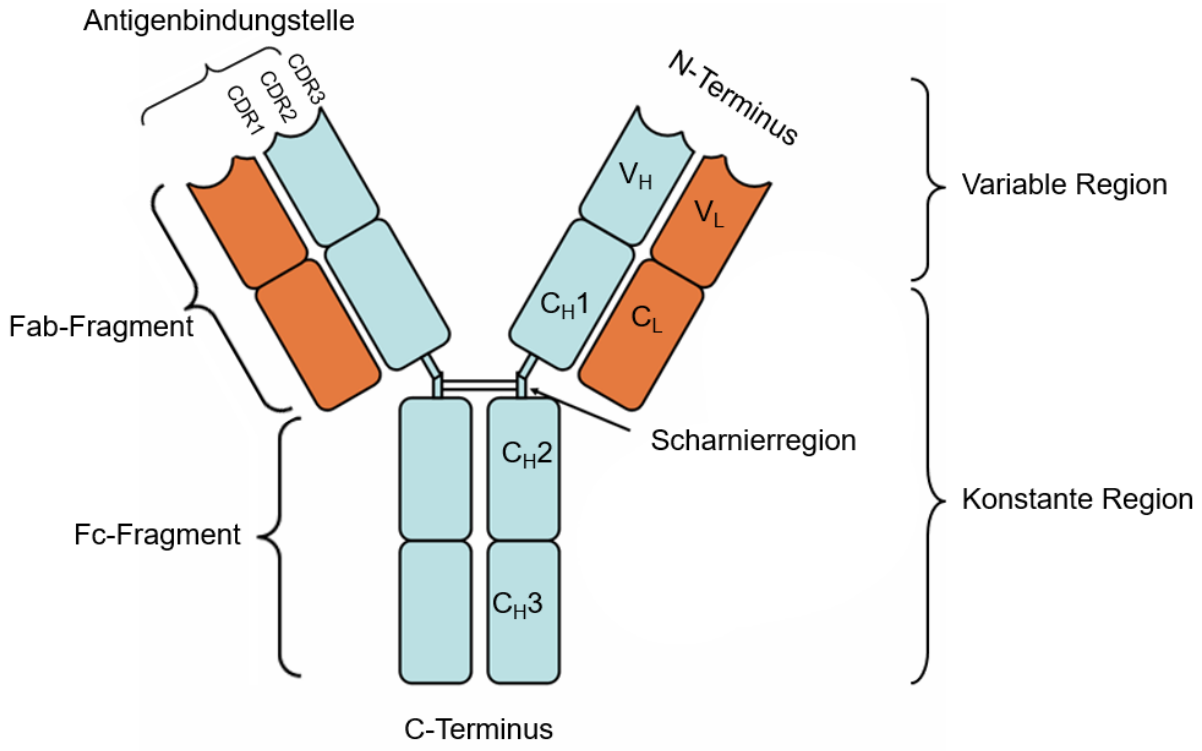


Abb. 1.1 Dargestellt ist der grundlegende Aufbau eines monomeren Immunglobulins. Es besitzt zwei identische, schwere H-Ketten (hellblau dargestellt), die jeweils N-terminal eine variable Domäne (V_H) zur Antigenerkennung aufweist. C-terminal befinden sich drei (bei IgA, IgD und IgG) beziehungsweise vier (bei IgE und IgM) konstante Domänen (C_H1-4), die den jeweiligen Isotypen definieren (α, δ, ε, γ und μ). Neben den H-Ketten besteht ein Immunglobulin noch aus zwei gleichen, leichten L-Ketten (orange dargestellt), die wiederum jeweils aus einer variablen Domäne (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L) bestehen. Bei C_L werden κ- und λ-Leichtketten unterschieden (Murphy 2011c). Zwischen C_H1 und C_H2 befindet sich jeweils ein Scharnier (*hinge*-Region), das die Y-Struktur des Immunglobulins beweglicher und damit in der Anpassung an ein Antigen variabler macht (Sedlacek 2014b). Die V-Domänen einer L- und einer H-Kette bilden jeweils die Antigenbindungstasche (Paratop), die spezifisch über je drei CDR-Sequenzen (*Complementary Determining Regions*) ihre Antigendeterminante (Epitop) binden kann. Jedes monomere Immunglobulin ist bivalent, besitzt also zwei identische Paratope (Sedlacek 2014b). Durch die Spaltung mit Papain entstehen zwei identische Fab-Fragmente (antigenbindende Fragmente) und ein Fc-Fragment (Kristalle-bildendes Fragment), das den Isotypen bestimmt und zur Kommunikation mit der unspezifischen Abwehr dient (Sedlacek 2014b).

Abb. modifizert, gemeinfrei zur Verfügung gestellt von „Je at uwo“ auf https://commons.wikimedia.org.

Immunkomplexe sind in der Lage, über ihren Fc-Teil den klassischen Weg des Komplementsystems zu aktivieren, was über die Bildung des MAK einige Bakterien abtöten kann (Antikörperabhängige Komplement-mediierte Zytotoxizität) und zur Freisetzung vieler entzündungsfördernder Mediatoren führt (Murphy 2011b, Sedlacek 2014b).

Um die Fremdorganismen aus dem Körper vollständig zu entfernen, bedarf es zusätzlich der Hilfe akzessorischer Effektorzellen, die mit Fc-Rezeptoren ausgestattet sind. Diese Fc-Rezeptoren binden an den konstanten Teil eines Immunglobulins, wobei sie spezifisch nur eine oder eng verwandte H-Ketten-Isotypen binden (Murphy 2011b, Sedlacek 2014b). Die wichtigste Aufgabe übernehmen dabei Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Da kapseltragende Bakterien vor der Phagozytose geschützt sind, kann die Endozytose nur über die Bindung von Fcγ- und Komplement-Rezeptoren an gebundene Immunglobuline gelingen. Diese „Markierung" der Zielzellen wird als Opsonierung bezeichnet. Darüber hinaus können NK-Zellen über den Fcγ-RIII-Rezeptor (CD16), IgG-behaftete Zielzellen erkennen und töten (Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität) (Sedlacek 2014b). IgG-Antikörper sind außerdem die einzigen, die bei Schwangeren durch den neonatalen Fc-Receptor über die Plazenta in den fetalen Blutkreislauf gelangen können. Dort sorgen sie für einen von Geburt an vorliegenden „Nestschutz" gegen in der Umwelt geläufige Pathogene (Murphy 2011b). Ihr Fehlen (z.B. Agammaglobulinämie) führt zu rezidivierenden schweren Infekten, die ohne rechtzeitige Antikörperersatztherapie früh zum Tode führen können (Ledermann und Winkelstein 1985, Quartier et al.1985).

IgM-Antikörper kommen im Blut und in Sekreten meist als Pentamere vor, wodurch sie im Vergleich mit IgG eine höhere Avidität aufweisen, die ihre geringere Affinität kompensiert (Murphy 2011b, Sedlacek 2014b). Bei Infektionen wird zuerst IgM gebildet, was es zu einem Marker für akute Infektionen macht (Sedlacek 2014b). Neben der Agglutinierung und Neutralisierung von Antigenen ermöglicht die pentamere Struktur außerdem eine besonders effektive Komplementsystemaktivierung bei bereits einem einzigen gebundenen IgM-Antikörper (Murphy 2011b, Sedlacek 2014b). Für die Bildung von IgM benötigt die B-Zelle außerdem nicht die Hilfe einer T_H2-Zelle, sodass sie von den *innate-like*-Lymphozyten zur Frühabwehr von Infektionen produziert werden können (Murphy 2011b).

Antikörper von Typ **IgA_{1+2}** kommen als Monomer oder Dimer im Blut vor. Sie werden vor allem von Plasmazellen in Schleimhäuten gebildet und finden sich als sekretorische Antikörper (sIgA) in den Sekreten der Haut und Schleimhäute. Hier verhindern sie das Anheften und Eindringen von Krankheitserregern und neutralisieren Toxine (Sedlacek 2014b). IgA findet sich außerdem in der Muttermilch und trägt so zum Nestschutz bei (Murphy 2011b).

Die monomeren **IgD**-Antikörper treten vor allem bei naiven B-Lymphozyten auf, werden aber nur zu einem sehr geringen Teil sezerniert. Ihre genaue Funktion ist nicht bekannt (Murphy 2011c). Vermutet wird, dass sie einen Hilfsrezeptor darstellen, auch weil Mäuse ohne IgD ein anscheinend normal funktionierendes Immunsystem besitzen, bei dem die Affinitätsreifung etwas verzögert ist (Roes und Rajewsky 1993).

Ebenfalls nur als Monomer treten die **IgE**-Antikörper auf. Ihre Hauptfunktion ist die Aktivierung der Mastzellen und basophiler Granulozyten über deren hochaffinen Fcε-Rezeptor. Hierdurch werden einerseits die Schleimhäute vor der Invasion durch Parasiten geschützt, andererseits ist dies aber auch die Ursache allergischer Reaktionen vom Soforttyp (Sedlacek 2014b).

1.3 B-Zell-Reifung

B-Lymphozyten entwickeln sich im Knochenmark und wandern dann in die peripheren Lymphorgane ein, wo sie durch Antigenkontakt aktiviert werden können. Gemeinsamer Ursprung aller Blutzellen ist dabei die multipotente hämatopoetische Stammzelle, die dann die lymphatische Vorläuferzelle, den gemeinsamen Nenner von B-, T- und NK-Zellen, hervorbringt (Murphy 2011d). Über mehrere Zwischenschritte werden die Gene, die für die antigenerkennenden Elemente verantwortlich sind, umgelagert, sodass eine IgM-exprimierende, unreife B-Zelle entsteht, die einen vollständigen B-Zell-Antigenrezeptorkomplex trägt. Sie verweilen einige Tage in diesem Stadium, während sie noch im Knochenmark auf ihre Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen überprüft werden (negative Selektion). Dieser Vorgang wiederholt sich in der Peripherie (Sedlacek 2014b).

Über den Blutweg gelangen diese Übergangs-B-Zellen in die parakortikale Zone der Lymphknoten, wo sie von T-Lymphozyten auf ihre Aktivierbarkeit getestet werden (positive Selektion). Im Idealfall werden nur B-Zellen in die Zirkulation entlassen, die sich einerseits aktivieren lassen, die aber andererseits nicht auf körpereigene Antigene reagieren. Ist jedoch das positive Selektionssignal gleichzeitig stärker als das negative, können autoreaktive B-Zellen entstehen, die zur Entstehung autoimmuner Erkrankungen beitragen (Murphy 2011d, Sedlacek 2014b).

Die reifen B-Lymphozyten zirkulieren dann in Blut und Lymphe, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen und aktiviert werden (Sedlacek 2014b).

1.4 B-Zell-Rezeptoren und B-Zell-Aktivierung

Die antigenspezifischen Bindungsstellen der B-Lymphozyten sind die Immunglobuline. Sind sie membrangebunden an der Zelloberfläche exprimiert, werden sie als B-Zell-Rezeptor (BCR) bezeichnet (Murphy 2011e). Um der unüberschaubaren Vielfalt an Antigenen in der Umwelt gerecht zu werden, besitzt der Mensch ein Immunglobulinrepertoire von geschätzt mindestens 10^{11} verschiedenen Spezifitäten, nur limitiert durch die Anzahl zum jeweiligen Zeitpunkt vorliegender B-Lymphozyten (Murphy 2011c). Da das menschliche Genom aber insgesamt nur über etwa 22.500 Gene verfügt (Pertea und Salzberg 2010), ist dies nur durch die ständige Neukombination (somatische Rekombination) verschiedener Gene möglich. Diese Diversität wird weiter erhöht, indem Nucleotidsequenzen zwischen den Segmenten addiert oder entfernt werden. Falls dabei kein funktioneller BCR gebildet wird, stirbt die Zelle ab. Eine weitere Potenzierung der möglichen Antigenspezifitäten findet im Rahmen der somatischen Hypermutation (siehe unten) statt (Murphy 2011c).

Zum BCR gehören jedoch nicht nur das Immunglobulin, sondern auch die zwei antigenunabhängigen Proteine Igα und Igβ (CD79α+β). Sie steuern den Transport des Immunglobulins an die Zelloberfläche und übernehmen mittels Immunrezeptor Tyrosin-basierter Aktivierungsmotive (ITAM) die Signaltransduktion (Murphy 2011f) Neben dem BCR benötigt die B-Zelle außerdem einen Korezeptor. Dieser ist ein Komplex aus CD19, CD21, CD81 und CD225, der sich bei gleichzeitiger Bindung seines Liganden und der Antigenbindung an den BCR mit diesem vernetzt, womit er das BCR-Signal deutlich verstärkt (Sedlacek 2014b). Der transmembranäre Rezeptor CD27 kommt auf aktivierten B-Lymphozyten, Gedächtnis-B-Lymphozyten und Plasmazellen vor. Durch Bindung seines Liganden CD27L (CD70) steigert er die Antikörpersekretion und die Differenzierung hin zur Plasmazelle (Sedlacek 2014b). Neben der zuvor beschriebenen Signalkaskade übernimmt der BCR aber noch eine weitere Funktion. Das gebundene Antigen wird ins Zellinnere befördert, dort zerlegt und als Peptide an die Zelloberfläche zurückgebracht, wo es auf MHC-II-Molekülen (Haupthistokompatibilitätskomplex II) präsentiert wird, um mit T-Helferzellen eine immunologische Synpase (siehe Abb. 1.2) zu bilden (Sedlacek 2014b). Diese MHC-II-Moleküle sind in ihrem Antigenspektrum individuell verschieden und finden sich nur auf antigegenpräsentierenden Zellen, während sich MHC-I bei allen kernhaltigen Zellen vorkommt und der Präsentation an $CD8^+$-T-Lymphozyten dient (Murphy 2011g).

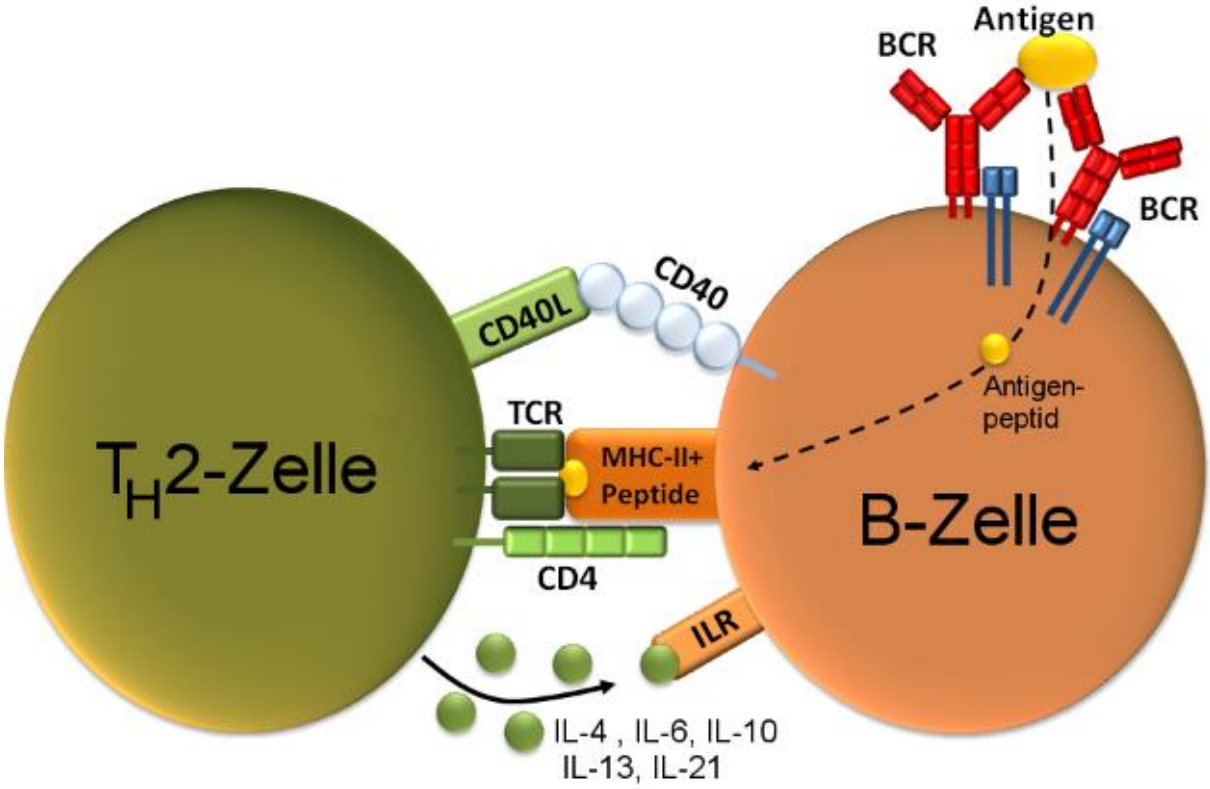


Abb. 1.2: Gezeigt ist die Interaktion zwischen einer T_H2-Zelle und einer antigenbindenden B-Zelle. Über den BCR wird das Antigen in die Zelle aufgenommen, dort in Peptide gespalten und über MHC-II-Moleküle der kognaten T-Helferzelle präsentiert. Diese aktiviert nun über den CD40-Ligand (CD40L, CD154), der an CD40 auf der B-Zelle bindet, und die Produktion von IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 und IL-21 die B-Zelle so, dass sie die Expression kostimulatorischer Moleküle erhöht, klonal proliferiert und weiter differenziert (Murphy 2011d).
Modifizert, gemeinfrei zur Verfügung gestellt von „Altaileopard“ auf https://commons.wikimedia.org.

Die oberflächlichen MHC-II:Antigenpeptid-Komplexe werden von bereits differenzierten $CD4^+$-T-Helferzellen, die spezifisch für das gleiche Antigen (kognat) sind, erkannt und gebunden (*linked recognition*). Diese Interaktion ist für die vollständige Aktivierung der B-Zelle von entscheidender Bedeutung, da sie die Proliferation der B-Zelle und ihre Differenzierung zur Antikörper produzierenden Plasmazelle induziert (Murphy 2011b).

1.5 B-Zell-Migration und -Differentierung

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass eine B-Zelle ihr Antigen und dazu ihre kognate T-Zelle trifft, durchläuft sie eine gezielte Migration durch die lymphatischen Gewebe. Zirkulierende naive B-Zellen werden durch das Chemokin CXCL13

follikulärer dendritischer Zellen in den primären Lymphfollikel gelockt. Dort treffen sie auf Antigene, die über die Lymphe in den Lymphknoten oder über den Blutweg in die Milz gelangt sind und dort von dendritischen Zellen festgehalten werden. Kommt es hier zum Aufeinandertreffen einer B-Zelle mit ihrem spezifischen Antigen, wird die Expression der Chemokinrezeptoren verstärkt (Murphy 2011b).

Diese B-Zelle wandert dann in Richtung der T-Zell-Zone wie auch die T-Zellen, die im Lymphfollikel als follikuläre Helferzellen (T_{FH}-Zellen) bezeichnet werden. Nach gegenseitiger Aktivierung bilden sie dort einen Primärfokus und proliferieren dort über mehrere Tage (Murphy 2011b). Einige der B-Zellen differenzieren über Plasmablasten zu kurzlebigen, IgM-synthetisierenden Plasmazellen, um den Körper direkt mit schützenden Antikörpern zu versorgen, die anderen migrieren in den primären Lymphfollikel, um dort weiter zu differenzieren (Murphy 2011b). Dort proliferieren sie, wodurch ein Keimzentrum im nun sekundären Follikel entsteht (siehe Abb.1.3). Hier steigert sich die Effektivität der humoralen Immunantwort durch somatische Hypermutation, also zahlreichen Punktmutationen (millionenfach häufiger als durch die basale Mutationsrate erklärbar), um die Affinität zum Antigen weiter zu erhöhen (Affinitätsreifung). Die mutierenden B-Zellen stehen dabei untereinander im Wettbewerb und nur die Zellen mit der stärksten Antigenbindung erhalten Überlebensfaktoren, während die übrigen absterben oder erneut mutieren (Murphy 2011b).

Danach durchläuft die B-Zelle den sogenannten „Klassenwechsel“, der die Produktion von Antikörpern mit gleicher Antigenspezifität bei unterschiedlicher Effektorfunktion zum Ziel hat (Murphy 2011b). Dies gelingt durch das irreversible Entfernen der für IgM und IgD kodierenden Genabschnitte, sodass die anderen Ig-Klassen exprimiert werden können (Murphy 2011b).

Schlußendlich verlassen die B-Zellen das Keimzentrum und differenzieren zu Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen. Diese Entscheidung hängt von der T-Zell-Interaktion ab. Eine starke CD40-Aktivierung und hohe Konzentrationen der Zytokine IL-2 und IL-10 führen zur vermehrten Ausbildung von Gedächtniszellen, eine schwächere Interaktion, IL-15 und IL-21 eher zu einer Differenzierung zur Plasmazelle (Sedlacek 2014b). Plasmazellen exprimieren kein MHC-II oder Kostimulatoren, sie sind also weder zur Zellteilung noch zur Antigenpräsentation fähig. Man kann sie an Oberflächenmolekülen wie CD38 oder CD138 erkennen. Ihnen fehlt hingegen das B-Zell-spezifische CD19 (Rawstron 2006, Sedlacek 2014b).

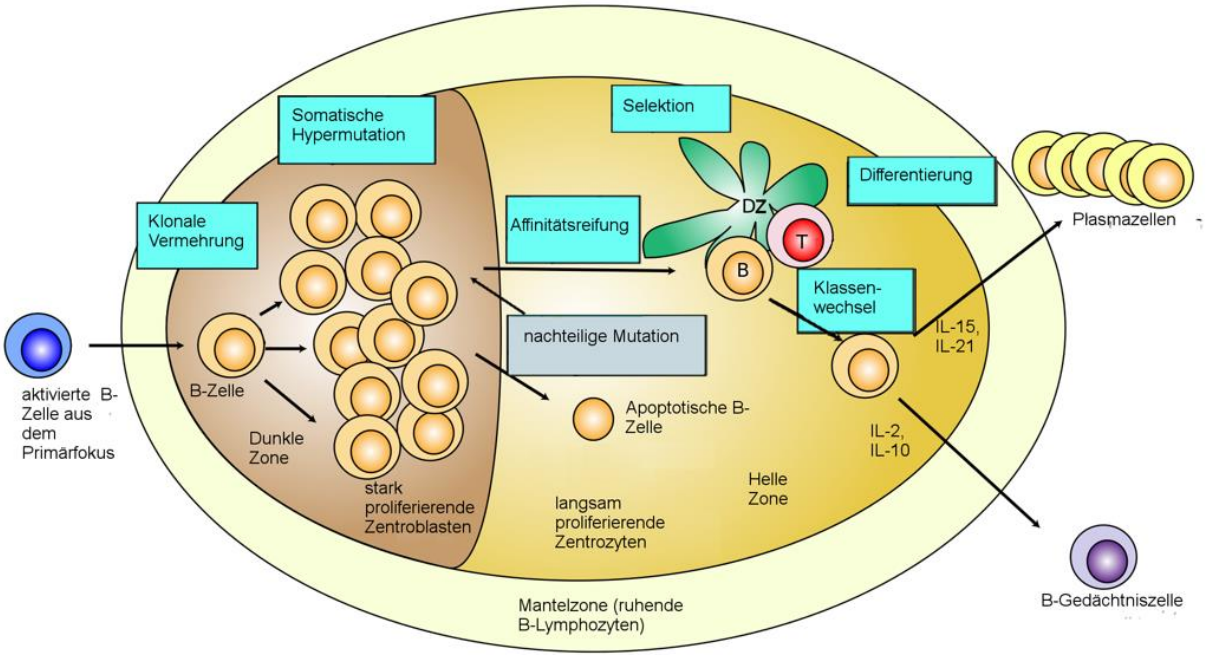


Abb. 1.3: Schematisch darstellt sind die Abläufe im Keimzentrum eines Sekundärfollikels. Das Keimzentrum wird in eine dunkle Zone aus Zentroblasten und eine helle Zone aus Zentrozyten unterschieden. Die Reste des verdrängten Primärfollikels bilden eine Mantelzone aus ruhenden B-Lymphozyten. In der dunklen Zone proliferieren die aktivierten B-Zellen mit deutlich erhöhter Mutationsrate (Somatische Hypermutation). Die entstehenden Varianten wandern als Zentrozyten in die helle Zone. Dort werden diejenigen B-Zellen (B) selektiert, die das von der follikulären dendritischen Zelle (DZ) und der follikulären T-Zelle (T) präsentierte Antigen am besten binden können, während die übrigen absterben oder als Zentroblasten erneut mutieren. Hochaffine Zentrozyten durchlaufen den Ig-Klassenwechsel von IgM zu IgG, IgA oder IgE und differenzieren dann abhängig von den ihnen präsentierten Zytokinen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen (Murphy 2011d, Sedlacek 2014b).

Abbildung modifiziert, zur Veränderung und Verbreitung freigeben „Billy10drs“ auf https://commons.wikimedia.org.

Während die meisten Plasmazellen ins Blut, die Lymphknoten oder in die Milz wandern, wo sie nach kurzer Zeit sterben, begibt sich ein kleiner Teil der Plasmazellen ins Knochenmark, wo sie von den dortigen Stromazellen über Jahre am Leben gehalten werden, um hochaffine IgG-Antikörper zu produzieren (Murphy 2011b).

1.6 Immunologisches Gedächtnis

Das immunologische Gedächtnis ist der Grund für eine langanhaltende Immunität gegenüber einmal überwundenen Krankheiten und somit eines der wichtigsten Merkmale der adaptiven Immunantwort. Verhindert wird das erneute Ausbrechen einer Krankheit von einer kleinen Population langlebiger, antigenspezifischer Lymphozyten, den sogenannten Gedächtniszellen, die auch ohne Antigenpräsenz persistieren können. Diese werden unterschieden in Gedächtnis-T-Zellen, die sich durch eine erleichterte Aktivierbarkeit auszeichen, und Gedächtnis-B-Zellen (Sedlacek 2014b).

Diese haben bereits die Affinitätsreifung und den Klassenwechsel hinter sich und produzieren daher vor allem IgG und IgA von höherer Affinität und in wesentlich größerer Menge als noch bei der Primärantwort. Gedächtnis-B-Zellen ruhen in Milz und Lymphknoten oder zirkulieren im Blut (Murphy 2011h). Sie werden durch Zytokine wie IL-2 oder IL-4 sowie Quervernetzung ihrer membranständigen Immunglobuline, Komplement- oder Fc-Rezeptoren aktiviert (Sedlacek 2014b). Dies geschieht direkt bei erneutem Antigenkontakt, sodass sich innerhalb eines Tages die Gedächtniszellen vermehren und zu antikörpersezernierenden Plasmazellen differenzieren. Dadurch, dass das Ausmaß dieser Sekundärantwort deutlich stärker als das der Primärantwort ist (Booster-Effekt), wird der Körper praktisch immun gegenüber dem Pathogen. Die Medizin macht sich dies bei Impfungen zu Nutze (Murphy 2011h, Sedlacek 2014b).

1.7 Impfungen

Dass lebensbedrohliche Infektionskrankheiten wie die Pocken oder Poliomyelitis heute in Deutschland nicht mehr vorkommen, ist auf flächendeckende Impfungen zurückzuführen. Impfungen sind aktive, antigen-spezifische Immunisierungen gegen ein Pathogen mit einer niedrig-pathogenen Abwandlung des eigentlichen Krankheitserregers, wobei abgeschwächte (attenuierte) lebendige Impfstoffe, gänzlich inaktivierte Totimpfstoffe, einzelne isolierte Pathogenbestandteile, Konjugatimpfstoffe, (an ein Trägereiweiß gekoppelte Pathogenpartikel) und sogar rekombinant hergestellte DNA-Impfstoffe möglich sind. Ziel ist eine langanhaltende Immunität gegen einen Krankheitserreger (Murphy 2011i, Sedlacek 2014c). Um den Impfschutz bei solchen Immunisierungen zu verbessern, werden Adjuvantien hinzugefügt, die die Aktivierung der angeborenen Immunantwort verstärken sollen. Am verbreitetsten sind

hierfür Aluminiumhydroxid zur Aktivierung von Makrophagen und MF59, eine Emulsion, die die Aufnahme des Immunogens in den Lymphknoten beschleunigt (Coffman et al. 2010).

Impfungen funktionieren jedoch nicht immer. So entwickeln beispielsweise 5-15% der Normalbevölkerung (Li et al. 2013) und bis zu 20% der besonders gefährdeten Mitarbeiter im Gesundheitswesen (Zaffina et al. 2014) nach dreimaliger Immunisierung gegen das Hepatitis-B-Virus (HBV) keine ausreichend schützende Antikörperantwort. Diese Population wird abhängig von der Stärke der Antikörperantwort als *Non-Responder* (anti-HBs-Antikörper <10 IU/l) oder als *Poor-Responder* (anti-HBs-Antikörper zwischen 10-100 IU/l) bezeichnet (Robert-Koch-Institut 2014). Dies tritt gehäuft bei Personen auf, die männlich, älter als 40 Jahre, übergewichtig, Raucher und/oder immunsupprimiert sind (Li et al. 2013, David et al.2015). So entwickelten in einer Studie weniger als die Hälfte der Probanden, die älter als 60 Jahre waren, schützende Antikörper (Denis et al. 1984). Neben chronischen Erkrankungen sind auch einige genetische Polymorphismen mit diesem Problem assoziiert. Diese betreffen unter anderem die MHC-Moleküle (Li et al.2013), Cytokine, den TLR sowie CXCR5 und CXCL13 (Duan et al. 2014). Dies kann die bereits beschriebene Zusammenarbeit zwischen den B-Lymphozyten und den T_{FH}-Zellen empfindlich stören. Zwar lässt die im Serum gemessene Menge antigenspezifischer Antikörper Rückschlüsse auf Anzahl und Aktivität der im Knochenmark ansässigen langlebigen Plasmazellen und den Schutz vor einer Infektion zu (Jack et al. 1999, Zaffina et al 2014), die absoluten Mengen an allen B-Lymphozyten im Blut und Gedächtnis-B-Zellen unterscheiden sich zwischen Gesunden und *Non-Respondern* aber nicht. Ebenso finden sich keine Unterschiede in Titern gegen andere Impfantigene (Zaffina et al. 2014).

Je nach Land variieren die Empfehlungen, wie mit *Non-Respondern* verfahren werden sollte. In Deutschland empfiehlt das Robert-Koch-Institut neben dem Ausschluss einer bestehenden chronischen HBV-Infektion die bis zu dreimalige Wiederholung der Immunisierung (Robert-Koch-Institut 2014). In anderen Ländern werden auch Impfungen mit höheren Antigenmengen oder intradermaler Applikation in Betracht gezogen (David et al. 2015). Die einfache Wiederholung der Impfung erwies sich jedoch nicht als effektives Mittel zur Steigerung der Antikörperantwort (Zaffina et al. 2014).

Niedrige Impftiter werden außerdem bei Patienten beobachtet, die sich zum Beispiel auf Grund autoimmuner Erkrankungen oder Organtransplantationen in immunsuppressiver Behandlung befinden. So ist die Immunantwort auf die dringend empfohlene Pneumokokken-Impfung unter Therapie mit TNF-α-Blockern (Tay et al. 2007, Fiorino et al. 2012, Dezfoli et al. 2015) oder Methotrexat (Kapetanovic et al. 2006) vermindert. Ähnliches wird u.a. für die Influenza-Impfung (Kobie et al. 2011, Kotecha et al. 2016), die Tetanus-Impfung (Tay et al. 2006, Dezfoli et al. 2015), die Hepatitis-A-Impfung (Van den Bijllaardt et al. 2013) sowie die Hepatitis-B-Impfung (Rahier et al. 2010) beschrieben. Auch eine Infektion mit dem T-Zell-schädigenden Humanen Immundefizienz Virus (HIV) kann zu einer unzureichenden Antwort auf Impfungen führen (David et al. 2015). So zeigte eine Studie, dass nur etwa 18% der HIV-Patienten eine adäquate Antikörpermenge bilden konnten (Overton et al 2005). Gerade immunsupprimierte Patienten sind aber auf die schützenden Antikörper angewiesen, da Infektionen bei Ihnen oft dramatischer verlaufen als bei Gesunden (Murphy 2011j). Bisher sind diese Patienten auf den Impfschutz der Gesunden angewiesen. Nur wenn der größte Teil all ihrer Kontaktpersonen verlässlich geimpft ist, besteht ein passiver Schutz dadurch, dass die Zahl der empfänglichen Personen als Reservoir und Überträger der Krankheitserreger sehr gering ist (Herdenimmunität) (Murphy 2011i).

Autoimmune Erkrankung betreffen in der Gesamtheit mindestens 5% der westlichen Bevölkerung und ihre Inzidenz steigt weiterhin an (Bach 2002, Murphy 2011k). Zusammen mit primären und sekundären Immundefizienzen und dem häufigen Phänomen der unzureichenden Immunantwort auf die Hepatitis-B-Impfung bildet sich so die große Population der Impfversager, die auf die Entwicklung neuer Impfstoffe oder verträglicher Adjuvantien durch die medizinische Forschung angewiesen ist.

1.8 Drug Repurposing

Die Umfunktionierung etablierter Medikamente von der ursprünglichen Indikation hin zur Therapie anderer Erkrankungen wird als „*Drug Repurposing*“ bezeichnet. Wurden solche neuen Indikationen von Medikamenten früher vornehmlich durch Zufall entdeckt, wird *Drug Repurposing* in den letzten Jahren auch in zum Teil robotergestützten Screeningverfahren systematisch durchgeführt. Gründe dafür gibt es genug: Die Entwicklung bisher unbekannter Wirkstoffe bis hin zur gewinn-

bringenden Vermarktung ist überaus kostenintensiv und nur ein Bruchteil der entwickelten Wirkstoffe hält den Testphasen zur Zulassung stand (DiMasi et al. 2002). Für etablierte Wirkstoffe liegen hingegen oft bereits umfangreiche Daten zur Sicherheit, Pharmakodynamik und -kinetik vor, sodass sie schon zur Anwendung im Menschen zugelassen sind. Viele dieser Substanzen sind außerdem nicht mit einem Patent belegt. Die Entwicklung neuer Therapieoptionen auf der Basis des *Drug Repurposing* spart also Kosten und Zeit (Chong und Sullivan 2007). Dies ist nicht zuletzt für den medizinischen Fortschritt in Entwicklungsländern von großer Bedeutung (Moran 2005).

Ein Beispiel für erfolgreiches *Drug Repurposing* ist Thalidomid (früher z.B. Contergan®), das aufgrund seiner teratogenen Eigenschaften die Zulassung als Beruhigungsmittel verlor und mittlerweile durch einen Zufallsbefund unter strengen Sicherheitsauflagen zur Behandlung der Lepra und des Multiplen Myeloms indiziert ist (Ashburn und Thor 2004). Aus einem systematischen Screening von über tausend Substanzen ging das weitverbreitete Antibiotikum Ceftriaxon als Behandlungsoption der Amyotrophen Lateralsklerose (eine seltene neurodegenerative Erkrankung) hervor (Rothstein et al. 2005). Vor allem solch seltene Erkrankungen könnten von *Drug Repurposing* profitieren, da die de-novo-Entwicklung solcher Medikamente aufgrund des kleinen Patientenkollektivs kaum Rentabilität verspricht (Sardana et al. 2011).

Eine ähnliche Bibliothek liegt dieser Arbeit zu Grunde: Die Prestwick Chemical Library® beinhaltet 1280 patentfreie, zugelassene Wirkstoffe mit einer großen Bandbreite an biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften. Die Chance, mit dieser Sammlung vielversprechende Wirkstoffe auszumachen und diese auch bis zur klinischen Anwendung bringen zu können, ist dadurch deutlich erhöht (Polireddy et al. 2012, Prestwick Chemical 2016). So wurden mit dieser Bibliothek bereits mehrere Hochdurchsatz-Screenings, gemeint ist die nicht-hypothesenbasierte, parallele Untersuchung einer großen Zahl an Wirkstoffen hinsichtlich einer bestimmt Wirkung, durchgeführt. Es fand sich beispielsweise, dass das Malaria-Medikament Chloroquin ein vielversprechendes Mittel gegen in Asien vorkommende Erreger der Gehirnentzündung darstellt (Porotto et al. 2009). Der Blutdrucksenker Guanabenz zeigte eine *in vivo* Aktivität gegen bisher unheilbare Prionerkrankungen (Tribouillard-Tanvier et al. 2008).

Grundlage dieser Arbeit ist ein Screening dieser Bibliothek. Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit hat Kazuko Matsumoto am Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie (LIED) die Prestwick Chemical Library® hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung der B-Lymphozytenfunktion untersucht. In Proliferationsmessungen an isolierten, stimulierten B-Lymphozyten zeigte sich, dass acht dieser Wirkstoffe möglicherweise die B-Zell-Funktion steigern. Die Validierung und die vertiefte Untersuchung dieser bisher unbekannten Funktion bekannter Medikamente werden in dieser Arbeit vorgestellt.

1.9 Identifizierte, potentiell B-Zell-aktivierende Medikamente

Ceforanid (auch BL-S786, Precef® oder Radacef®) ist ein Antibiotikum aus der Stoffklasse der Cephalosporine, das bakterizid wirkt, indem es mit seinem β-Laktam-Ring an das Penicillin-bindende Protein der Bakterien bindet und so die Zellwand-synthese hemmt (Karow und Lang-Roth 2010a). Die intramuskuläre Bioverfügbarkeit beträgt 100%. Ceforanid akkumuliert auch nach wiederholter Gabe über bis zu elf Tage nicht und wird über die Nieren ausgeschieden. In gesunden Erwachsenen beträgt die Plasmahalbwertszeit etwa drei Stunden (Campoli-Richards et al. 1987). Seltene Nebenwirkungen sind Ausschlag und andere Hypersensitivitätsreaktionen, nach intramuskulärer Injektion Schmerzen an der Einstichstelle sowie vorrübergehende leichte Blutbildveränderungen wie Eosinophilie und Thrombozytose (Wallace et al. 1979, Campoli-Richards et al. 1987). Wirkungen auf B-Lymphozyten wurden bisher nicht beschrieben.

Itoprid (auch Ganaton®, Itomed® oder Itogard®) ist ein Dopamin D2-Rezeptor-Antagonist mit zusätzlich hemmender Wirkung auf die Acetylcholinesterase (Iwanga et al.1994). Es wird zur Behandlung der funktionellen Dyspepsie sowie der gastro-ösophagealen Refluxkrankheit verschrieben, da es die Motilität des Magens stimuliert (Holtmann et al. 2006). Itoprid wird schnell resorbiert und erreicht bei einer Bioverfüg-barkeit von 90% nach einer halben Stunde den höchsten Plasmaspiegel. Die Elimination erfolgt vorwiegend renal mit einer Plasmahalbwertszeit von fünf Stunden (Yoon et al. 2014). Nebenwirkungn können abdominelle Schmerzen, Obstipation und Diarrhoe sein. In hohen Dosen verabreicht kann Itoprid den Prolaktinspiegel erhöhen und so theoretisch zu Galaktorrhoe und Gynäkomastie führen (Holtmann et al. 2006). Auch für Itoprid wurden bisher keine Wirkungen auf B-Lymphozyten beschrieben.

Progesteron ist ein physiologisch vorkommendes C_{21}-Steroidhormon, das zur Gruppe der Gestagene gehört. Es wird aus dem Gelbkörper, dem Follikel und der Plazenta sowie bei beiden Geschlechtern aus der Nebennierenrinde freigesetzt. Die Progesteronbildung unterliegt dem weiblichen Hormonzyklus und wird vermehrt in der Schwangerschaft gebildet. Hier fördert es die Nidation und erhält die Schwangerschaft (Klöcker 2010). Außerhalb der Gelbkörperphase und der Schwangerschaft sind die Progesteronkonzentrationen im Serum zwischen Männern und Frauen etwa gleich. Therapeutisch werden Progesteron und seine Derivate vor allem zur Kontrazeption und zur Behandllung der Endometriose eingesetzt. Die Pharmakokinetik ist individuell sehr unterschiedlich, die Halbwertszeit ist kurz. Als Nebenwirkugen werden bei beiden Geschlechtern Appetitsteigerungen mit Gewichtszunahme, pektanginöse Beschwerden, Elektrolytstörungen, Akne, Depressionen, Libidoverlust und Müdigkeit beschrieben (Oettel und Mukkhopadhyay 2004, Karow und Lang-Roth 2010b). Progesteron bindet an den Progesteronrezeptor und in hohen Konzentrationen auch an den Glukokortikoidrezeptor (Hughes und Choubey 2014). Der Einfluß von Progesteron auf das Immunsystem wird widersprüchlich beschrieben, wobei sowohl Anstieg als auch Abfall der Serumkonzentrationen von Antikörpern nach Behandlung mit verschiedenen Progesteronformen beobachtet wurden (Roubinian et al. 1979, Hughes et al. 2009). Bei Mäusen und Affen zeigt Progesteron einen steigernden Effekt auf die lokale antigenspezifische Antikörperproduktion im cervikovaginalen Trakt, ohne Beeinflussung der Serum-Antikörper (Johansson et al. 1998, Lü et al. 1999). Außerdem soll Progesteron die B-Lymphopoese unterdrücken (Medina und Kincade 1994). Übereinstimmend zeigen die Studien, dass Progesteron den Verlauf autoimmuner Erkrankungen wie des systemischen Lupus erythematodes (SLE) abschwächt (Oettel und Mukkhopadhyay 2004, Hughes und Choubey 2014).

Famprofazon (auch Gewodin®, Gewolen®) ist eine analgetisch und antipyretisch wirksame Substanz aus der Gruppe der Pyrazolone und wird im Körper teilweise zu seinem aktiven Metaboliten Metamphetamin abgebaut, über den es durch Erhöhung der zentralen und peripheren Noradrenalin-Konzentration seine Wirkung entfaltet (Neugebauer et al. 1997, Karow und Lang-Roth 2010c). Die Halbwertszeit von Metamphetamin beträgt ca. zehn Stunden (Schepers et al. 2003). Metamphetamin-bedingte Nebenwirkungen sind Blutdruckanstieg, psychotische Zustände, Appetithemmung, Gefäßspasmen und Herzrhythmusstörungen (Karow und Lang-Roth 2010c). Interaktionen mit B-Lymphozyten sind bisher nicht beschrieben.

Vatalanib (auch PTK787) ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der die Gefäßneubildung in Krebspatienten durch Blockade des VEGF-Rezeptors hemmt. Hervorgegangen aus einem Hochdurchsatz-Screening kam es bisher in klinischen Studien zur Therapie maligner Erkrankungen zum Einsatz. (Mariani 2004). Neben gastrointestinalen Nebenwirkungen können bei Einahme von Vatalanib unter anderem Bluthochdruck, Müdigkeit und Schwindel auftreten (Los et al. 2007). Es hat eine Halbwertszeit von etwa fünf Stunden. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass es zur Caspase-abhängigen Apoptose der B-Lymphozyten bei CLL und mit schwächerem Effekt auch bei B-Zellen gesunder Spender führt (Paesler et al. 2010). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass B-Lymphozyten bei CLL VEGF exprimieren (Aguayo et al. 2000).

Trapidil (auch Rocornal®) ist ein nicht-selektiver Phosphodiesterase-Inhibitor. Es wird zur Komplikationsprophylaxe bei koronarer Herzkrankheit verwendet, da es vasodilatierend und positiv inotrop wirkt. Darüber hinaus hemmt es die Thrombozytenaggregation (Karow und Lang-Roth 2010c). Immer wieder werden neue Funktionen des Triazolpyrimidins bekannt. So steigert es die Prostaglandinsynthese, vermindert aktive Makrophagen und wirkt anti-inflammatorisch (Zhou et al. 1999). Es hat eine Halbwertszeit von ca. zwei Stunden und wird in der Leber metabolisiert (Harder et al.1996). Als Nebenwirkungen treten Thrombozytopenien, gastrointestinale Störungen und Kopfschmerzen auf (Maresta et al. 1994). Trapidil kann den CD40-Signalweg in Monozyten/Makrophagen sowie in T-Zellen hemmen (Zhou et al. 1999, Kato et al. 2001). Eine direkte Wirkung auf B-Lymphozyten ist aber nicht bekannt.

Neostigminbromid (auch Prostigmin®) wirkt durch reversible Hemmung der Acetyl-cholinesterase indirekt parasympathomimetisch. Es wird intravenös bei Darm- und Blasenatonien, paralytischem Ileus, zur Antagonisierung nichtdepolarisierender Muskelrelaxanzien sowie bei Myasthenia gravis eingesetzt. Unerwünschte Wirkungen sind Bradykardien, Bronchokonstriktion und Schweißausbrüche (Karow & Lang-Roth 2010c), die Halbwertszeit ist mit ca. zwanzig Minuten kurz (Calvey et al. 1979). Trotz Forschungsergebnissen, die die Sensitivität von B-Lymphozyten gegenüber Acetylcholin zeigen (Fernandez-Cabezudo et al. 2010), ist bisher keine direkte Wirkung von Neostigminbromid auf B-Lymphozyten beschrieben.

Primaquindiphosphat ist ein orales Medikament zur Rezidivprophylaxe der Malaria. Es wird nach oraler Applikation fast vollständig resorbiert und mit einer Halbwertszeit

von ca. sieben Stunden hepatisch eliminiert. Als Nebenwirkungen treten gastrointestinale Störungen sowie Blutbildveränderungen im Sinne von Methämoglobinämien, hämolytischen Anämien und Leukozytosen auf (Graefe 2011). Es ist beschrieben, dass Primaquin *in vitro* vergleichbar mit anderen Malariamedikamenten immunsuppressiv auf Lymphozyten wirkt (Thong et al.1978), was aber bei Untersuchungen zur Malariaprophylaxe am Menschen nicht bestätigt werden konnte (Fryauff et al. 1996).

1.10 Ziele dieser Arbeit

Impfungen sind von großer Bedeutung in der Medizin und nur eine möglichst hohe Impfrate schafft einen flächendeckenden Schutz, der sich auch auf ungeimpfte Individuen ausdehnt (Herdenimmunität). Gewährleistet wird dieser Schutz durch B-Lymphozyten und insbesondere von den aus ihnen hervorgehenden antikörperproduzierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen. Trotz Leitlinien-gerechter Durchführung der Impfung kommt es jedoch häufig vor, dass keine ausreichende Immunität generiert wird. Dies ist insbesondere bei der Hepatitis B-Impfung und bei immunsupprimierten Patienten der Fall (David et al. 2015, Dezfoli et al. 2015). Gerade für medizinisch tätiges Personal und andere Risikogruppen ist aber eine hohe Zahl schützender Antikörper im Blut sehr wichtig. Die bisherige Empfehlung, diese *Non-Responder* nur wiederholt zu impfen (Robert-Koch-Institut 2014), ist nicht immer erfolgreich (Zaffina et al. 2014). Es wird also ein gut verträgliches Adjuvans, das im besten Fall spezifisch die Immunantwort gegen ein Impfantigen steigert, gebraucht.

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, ob acht Wirkstoffe, die aus einem zuvor mit 1280 patentfreien Substanzen (Prestwick Chemical 2016) durchgeführten Hochdurch-satz-Screening hervorgingen, diese Funktion besitzen. Gleichzeitig wird sich also zeigen, ob mit einem derartigen Screening tatsächlich vielversprechende Wirkstoffe für die weitere klinische Erprobung ausfindig gemacht werden können.

Diese Wirkstoffe untersuchte ich einzeln und in Kombination untereinander in verschiedenen *in vitro* Experimenten auf ihr Potential, die Funktion der B-Lymphozyten zu steigern. Diejenigen Medikamente, die sich in diesen Untersuchungen als die aussichtsreichsten hervortaten, testete ich *in vivo* an Mäusen mittels einer aktiven Immunisierung.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Laborgeräte und Materialien

Chemikalien

Name	Firma, Firmensitz
17α-Hydroxyprogesteron	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V, biotinfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ceforanid (Prestw-470)	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz-Lösung 0,1mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70% vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Famprofazon	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Recombinant Human Interleukin 21	Cell Sciences®, Newburyport, USA
Itoprid	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Ketamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
mCol7-vWFA2-Protein	Hergestellt von Karsten Seeger und Claudia Kauderer im Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie (LIED) (Sitaru et al. 2005), Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge 2 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neostigminbromid	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Ortho-Phosphorsäure 85% reinst	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Primaqindiphosphat	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Progesteron	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Salzsäure 2 mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure 25%	Merck, Darmstadt, Deutschland
TiterMax® Classic Adjuvant liquid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trapidil	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
TRIS (hydromethyl)-aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Triton X 100	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland
Turbo-TMB-ELISA	Thermo scientific, Waltham, USA
Tween 20 $C_{58}H_{11}4O_{26}$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Vatalanib	Prestwick Chemical, Illkirch-Graffenstaden, Frankreich
Xylazin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Name	Firma, Firmensitz
Cutasept F Hautdesinfizienz	Bode, Hamburg, Deutschland
End-to-End Kapillare 20 µl, K2 EDTA	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Eppendorf Combitips advanced® 0,5ml, 2,5ml, 5ml, 10ml, 12,5ml	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
epT.I.P.S.® Motion pipette tips 2-200µl, 20-300µl	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
Falcon® Zellsieb 70µm Nylon	Corning, Corning, USA
Filcon, unsteriles 20µm Sieb	BD Biosciences, San Jose, USA
Filtopur V50 Filter	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
LD Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Microplate-96 Well-Flat bottom, high-binding	greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Microplate-96 Well-Flat bottom, non-binding	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Mikrotestplatte 96 Well, Flachboden, mit Deckel, steril	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Minisart® NML Spritzenvorsatzfilter, Porengröße: 0,2µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plate, flat bottom, MaxiSorp™	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Omnican®-F Feindosierungsspritze 1ml	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Pasteur-Pipetten 1ml	BioSigma, Cona, Italien
Pasteurpipetten aus Glas	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 1000µl	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Röhre 5 ml, 75 x 12 mm	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
SafeSeal-Reagiergefäße 1,5ml, 2ml	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland

Schraubröhre 15 ml, 120 x 17 mm	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Schraubröhre 50 ml, 114 x 28 mm	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5ml,10ml, 25ml	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
S-Monovette EDTA 9ml	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Sprühpflaster	Beiersdorf, Hamburg, Deutschland
Sterile Einmalskalpelle Nr.21	FEATHER® SAFETY RAZOR, Osaka, Japan

Geräte und Software

Name	**Firma, Firmensitz**
BD Cellquest™ Pro 5.2.1 Software	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FACSCalibur™	BD Biosciences, San Jose, USA
BD LSR II flow cytometer	BD Biosciences, San Jose, USA
Heraeus® Biofuge® Fresco	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Captair chem -Filterabzug	Erlab, Val-de-Reuil, Frankreich
Feinwaage Analytical Plus	OHAUS, Parsippany, USA
FlowJo Version 10	TreeStar, Ashland, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, USA
Haemocytometer-Cover-Glas	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Heat-stir-plate CB162	Stuart, Staffordshire, UK
Heracell™ 240i CO2-Inkubator	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Infinite® M200 PRO Microplate Reader	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
LaminAir HB2448	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Megafuge® 1.0R	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikro 20 Zentrifuge	Hettich-Zentrifugen Tuttlingen, Deutschland

Multipipetten 0,5-10 µl, 10-100µl, 30-300µl	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Office 365	Microsoft, Redmond, USA
pH-Meter pH562	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten Research 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland
pipetus®	HIRSCHMANN®-Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
QuadroMACS™ Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
SigmaPlot 13.0	Systat, Erkrath, Deutschland
Tail access rodent restrainer	Stoelting Co., Wood Dale, USA
Testplattenmischer TPM 4	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Trocken- und Wärmeschrank ED115	Binder, Tuttlingen, Deutschland
V-1 plus, Einzel-Vortex für Röhrchen	Biosan, Riga, Lettland
VICTOR3™ Multilable Plate Reader	PerkinElmer, Waltham, USA
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waage EMB 220-1	KERN & Sohn, Balingen, Deutschland
Wasserbad 3043	Köttermann-Labortechnik, Uetze, Deutschland
Wilovert S Mikroskop	hund GmbH, Wetzlar, Deutschland

Medien und Puffer

Name	**Firma, Firmensitz**
BD Cytofix/Cytoperm™	BD Biosciences, San Jose, USA
BD Perm/Wash™	BD Biosciences, San Jose, USA
Bio-Withaker RPMI 1640 with L-glutamine, without HEPES	Lonza, Basel, Schweiz
Buffer EL	Qiagen, Hilden, Deutschland

Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (DPBS)	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA
Ficoll™-Paque PLUS	GE-Healthcare, Little Chalfond, UK
Minimum-Essential-Medium Non-essential amino-acids (MEM-NEAA)	Thermo-Fisher scientific, Waltham, USA

Selbsthergestellte Puffer

Name	**Bestandteile**
ELISA Beschichtungspuffer	Aqua dest. mit je 0,05 mol/l Natriumcarbonat und Natriumhydrogencarbonat bei pH=9,6
ELISA Blockierungspuffer	Aqua dest. mit 50mM Tris, 0,14M NaCl, 1%Albumin Fraktion V bei pH=8,0
ELISA Verdünnungslösung	Aqua dest. mit 50mM Tris, 0,14M NaCl, 1%Albumin Fraktion V und 0,05% Tween20
ELISA Waschlösung	Aqua dest. mit 50mM Tris, 0,14M NaCl, 0,05% Tween20 bei pH=8,0
FACS-Puffer	PBS mit 3% Albumin Fraktion V
MACS-Puffer	490ml DPBS, 10ml EDTA, 2,5g Albumin Fraktion V (0,5%, biotinfrei); sterilfiltriert
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Aqua dest. mit 0,154M NaCl, 49mM $Na_2HPO_4 – 2H_2O$, 6,5mM $NaH_2PO_4 – H_2O$ auf pH=7,2 mit H_3PO_4 eingestellt
Zellkultur-Medium	88% RPMI (+L-Glutamin, ohne HEPES), 10% fetales Rinderserum (FBS), 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Nicht-essenzielle Aminosäuren

Antikörper und Antikörperzusammenstellungen (*Kits*)

Name	**Firma, Firmensitz**
APC Mouse Anti-Human CD38 (HIT2)	BD biosciences, San Jose, USA
APC Mouse Anti-Mouse CD19 (6D5)	BioLegend, San Diego, USA
APC Rat Anti-Mouse Ly6G (1A8)	Miltenyi Biotec, Teterow, Deutschland
B Cell Isolation Kit II, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
B220-A405	Gekoppelt von Katharina Hofmann im Institut für systemische Entzündungsforschung, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
Human CD40/TNFRSF5 (Monoclonal Mouse IgG2B Clone #82111	R&D Systems, Minneapolis, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Basel, Schweiz
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Basel, Schweiz
FITC Mouse Anti-Human CD19 (HIB19)	BD biosciences, San Jose, USA
FITC Mouse Anti-Mouse CD19 (6D5)	BioLegend, San Diego, USA
FITC Rat Anti-Mouse/Human CD45R/B220 (RA3-6B2)	BioLegend, San Diego, USA
Human IgG ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA
Human IgM ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA
Kappa-A647	Gekoppelt von Katharina Hofmann im Institut für systemische Entzündungsforschung, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland
Mouse IgG ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA
Mouse IgM ELISA Quantitation Set	Bethyl, Montgomery, USA
PE Hamster Anti-Mouse CD3ε (145-2C11)	Miltenyi Biotec, Teterow, Deutschland
PE Mouse Anti-Human CD27 (M-T271)	BD biosciences, San Jose, USA
PE Rat Anti-Mouse CD138 (Syndecan-1) (281-2)	BioLegend, San Diego, USA

Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block™) (Clone 2.4G2)	BD biosciences, San Jose, USA
vWFA2-A488	Gekoppelt von Katharina Hofmann im Institut für systemische Entzündungsforschung, Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland

2.2 Probanden

Um eine adäquate Aktivierbarkeit der zu entnehmenden Zellen nach Möglichkeit zu gewährleisten, wurden nur Probanden rekrutiert, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund fühlten und keine bekannten chronischen Entzündungskrankheiten aufwiesen. Ergebnisse zweier Probanden, die derartiges nachträglich angaben, wurden nicht verwendet. Völlig ausgeschlossen werden können entzündliche Erkrankungen unter den Probanden mit dieser Methode allerdings nicht. Sämtliche Spender wurden vorher von mir über die Risiken der Blutentnahme und den Rahmen der Studie aufgeklärt und willigten schriftlich ein. Das zur Durchführung der Versuche am Menschen benötigte positive Votum der Ethikkommission lag zu Versuchsbeginn vor (Ethikvotumsnummer 09-140, siehe Anhang).

2.3 Isolation humaner B-Lymphozyten

Die für die in vitro-Experimente benötigten B-Lymphozyten isolierte ich aus dem Blut gesunder Probanden. Hierfür nutze ich zunächst den Dichteunterschied zwischen den mononukleären Zellen, zu denen auch die Lymphozythen gehören, und den übrigen Blutbestandteilen, um diese mittels Zentrifugation voneinander zu trennen (postive Selektion). Aus diesen mononukleären Zellen entfernte ich die unerwünschten Zellen mittels magnetischer Markierung (negative Selektion), sodass ich am Ende eine nahezu reine B-Zell-Suspension erhielt.

Den Spendern wurden höchstens 36ml Blut in (zur Antikoagulation) EDTA-haltigen Monovetten abgenommen und umgehend weiterverarbeitet. Sämtliche folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer LaminAir HB 2448 Werkbank durchgeführt. Aus dem Blut isolierte ich zunächst die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (im Folgenden PBMC für *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).

Dazu verdünnte ich je 9ml Blut in 21ml steriler *Dulbecco´s* phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) und schichtete das verdünnte Blut im Anschluss auf jeweils 15ml Ficoll™-Paque vorsichtig unter Verwendung einer Pipettierhilfe auf, sodass zwei getrennte Phasen entstanden. Dies wurde dann für 25 Minuten in einer Megafuge 1.0R bei 1600 Umdrehungen pro Minute (im Folgenden rpm für *rounds per minute*) (entspricht 535g) und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert, sodass sich vier Phasen differenzierten (siehe Abb. 2.1).

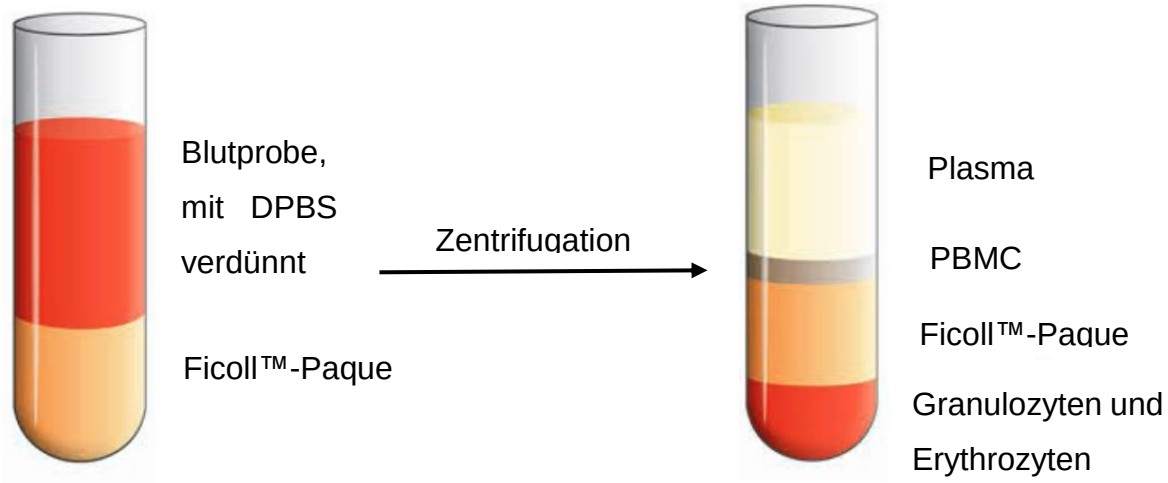


Abb. 2.1: Dargestellt ist die Separation einzelner Blutbestandteile mittels Zentrifugation unter Verwendung von Ficoll™-Paque. Links ist der Zustand vor Zentrifugation gezeigt. Durch den hohen Dichtegradienten mischt sich das Ficoll™-Paque nicht mit der aufgeschichteten Blutprobe. Durch die Zentrifugation bilden sich vier Phasen. Die dichten Granulo- und Erythrozyten finden sich zu unterst, darüber kommen die benötigten PBMC auf einer Ficoll™-Paque-Schicht zu liegen. Darüber befindet sich das Blutplasma.

Modifiziert aus der Gebrauchsanweisung zu Ficoll™-Paque „Isolation of mononuclear cells“ von GE-Healthcare.

Die PBMC-Schicht wurde mittels Einmal-Pasteurpipette in ein separates Röhrchen überführt, mit MACS-Puffer auf 45ml aufgefüllt und für 10 Minuten in derselben Zentrifuge bei 1800rpm (entspricht 677g) und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Sediment in 20ml MACS-Puffer resuspendiert und unter den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und das Sediment in 300µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellzahl bestimmte ich mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop (siehe Abbildung 2.2). Hierfür verdünnte ich 1µl der PBMC in 179µl DPBS und 20µl Trypanblau und zählte vier 4x4-Felder aus. Da Trypanblau nur abgestorbene Zellen anfärbt, zählte ich

die angefärbten Zellen nicht mit. Die Gesamtzellzahl berechnete ich anhand der Formel:

$$Gesamtzellzahl = \frac{(Q1 + Q2 + Q3 + Q4)}{4} \times 10^4 \times Verdünnung \times Gesamtvolumen$$

Q1-Q4 bezeichnet dabei die jeweils gezählten Zahlen in den vier Quadraten. 10^4 ist der Kammerfaktor, die Verdünnung ist hierbei 200, das Gesamtvolumen 0,3ml. Die Gesamtzellzahl ist wichtig für die korrekte Dosierung der in den Folgeschritten benötigten Antikörper.

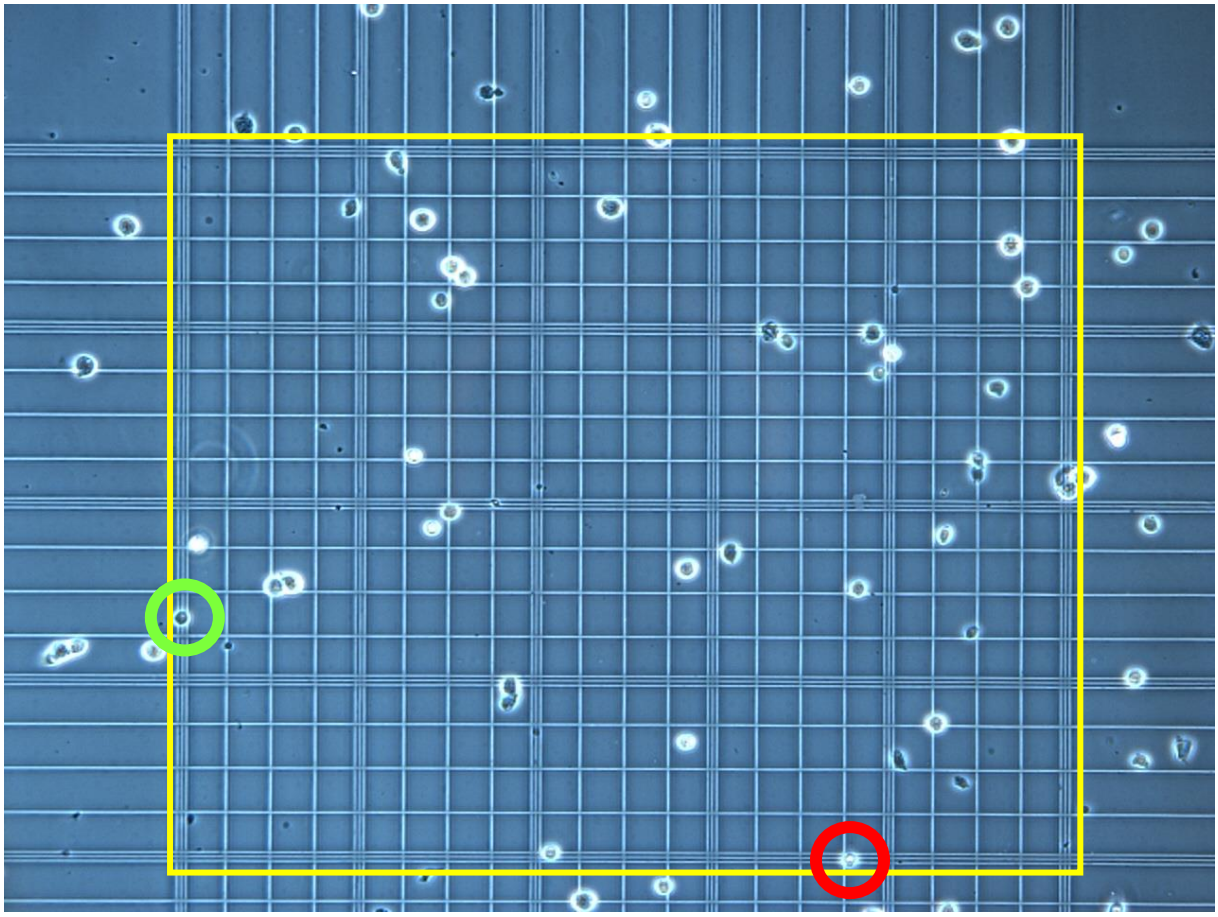


Abb. 2.2: Gezeigt ist ein 5x4 Feld einer erweiterten Neubauer-Zählkammer mit Zellen im Phasenkontrast. Gezählt werden alle Zellen innerhalb des gelben Rahmens. Jede Grenze gehört zu jeweils rechts bzw. darunter gelegenen Feld, sodass die Zelle im grünen Kreis mitgezählt werden muss, während die Zelle im roten Kreis nicht mitgezählt werden darf. In meinen Versuchen verwendete ich eine ähnliche Zählkammer mit 4x4 Feldern.

Abb. modifizert, gemeinfrei zur Verfügung gestellt von „Albiciades“ auf https://commons.wikimedia.org.

Aus der erhaltenen Zellsuspension isolierte ich nun mittels magnetischer Zellsortierung (im Folgenden MACS) die B-Lymphozyten. Die folgenden Schritte entsprechen dem Protokoll des verwendeten „*B Cell Isolation Kit* II, human“ von Miltenyi Biotec. Dazu verdünnte ich die Zellsuspension auf 250.000 PBMC/µl in MACS-Puffer und fügte 1µl/10^6 PBMC des *B Cell Biotin-Antibody Cocktails* (enthält biotinylierte Antikörper gegen CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 und CD235a) hinzu. Die Zellsuspension wurde dann 10 Minuten lang im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss fügte ich pro 10^6 PBMC 3µl gekühlten MACS-Puffer sowie 2µl *Anti-Biotin MicroBeads* (monoklonale, murine IgG1-Antikörper gegen Biotin, an die kleinste metallische Perlen gebunden sind) hinzu. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation im Kühlschrank zentrifugierte ich die Zellsuspension in der zuvor bereits verwendeten Zentrifuge bei 1400rpm (entspricht 409g) und 4°C mit Bremse für sieben Minuten.

Ich resuspendierte die Zellen in 0,5ml MACS-Puffer, ließ die Suspension durch eine mit 2ml MACS-Puffer befeuchtete Trennsäule im *MidiMACS*®- bzw. *QuadroMACS*®-*Separator* laufen und spülte die Säulen dann zweimal mit 1ml MACS-Puffer. Hierbei wurden die markierten Zellen vom Magneten zurückgehalten und nur die unmarkierten B-Zellen durchgelassen. Den Durchfluss fing ich auf und zentrifugierte ihn wie zuvor. Das entstandene Sediment wurde danach in 1ml Zellkultur-Medium (hier nur 1% FBS-haltig) resuspendiert und die Zellzahl wie zuvor mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die erhaltene B-Zell-Suspension verdünnte ich dann mit Zellkultur-Medium auf 2x10^5 Zellen pro Milliliter.

Die in der Trennsäule aussortierten Zellen presste ich aus der Säule in ein separates Gefäß und bewahrte sie für die Reinheitsuntersuchung (siehe Kapitel 2.7) auf.

2.4 Stimulation und Inkubation der isolierten B-Zellen

Die in den Kapiteln 1.4 und 1.5 beschriebene B-Zell-Aktivierung über Antigenbindung, T-Zellinteraktion und zahlreiche Zytokine lässt sich *in vitro* nur aufwendig und nicht umfassend nachbilden. Die Stimulation mit nur zwei Komponenten dieser Reaktion, der Bindung an CD40 und dem essentiellen Zytokin IL-21 (Chen et al. 2007, Kuchen et al. 2007), bot sich aus Kosten- und Aufwandsgründen an, sodass diese Stimulation Grundlage aller folgenden *in vitro*-Experimente ist.

Ähnlich wie in Abb. 2.3 beispielhaft dargestellt, pipettierte ich die Zellsuspension auf eine 96-*Well*-Flachboden-Suspensionsplatte. Zuerst füllte ich zwei Wells mit jeweils $2x10^4$ unstimulierten B-Lymphozyten in je 100µl Zellkulturmedium. Die übrigen Zellen stimulierte ich mit CD40-Antikörpern in einer Konzentration von 2µg/ml und rekombinantem IL-21 in einer Konzentration von 200ng/ml und gab davon je $2x10^4$ Zellen in die beiden für stimulierte B-Lymphozyten vorgesehenen *Wells*. Den restlichen Zellen fügte ich DMSO, das Lösungsmittel der zu untersuchenden Medikamente, zu einem Anteil von 0,2% hinzu. Jeweils $2x10^4$ Zellen in 100µl Zellkultur-Medium hiervon wurden in die übrigen *Wells* pipettiert. In jedes *Well* wurden dann je 100µl in Zellkultur-Medium verdünnten Medikaments hinzugefügt. Ich testete acht Medikamente jeweils in den Konzentration 1µM, 0,1µM und 0,01µM. Den Kontroll-*Wells* fügte ich 100µl Zellkultur-Medium hinzu, sodass jedes *Well* mit 200µl Medium und $2x10^4$ Zellen befüllt war. Zwei weitere befüllte ich mit je 200µl Zellkulturmedium.

Für den LDH-Zytotoxizitätsassay passte ich das Zellkulturmedium dahingehend an, dass es nur 1% FBS enthielt. Auf diesen Platten füllte ich zusätzlich zwei *Wells* mit $2x10^4$ stimulierten Zellen und fügte diesen 0,4% zytotoxisches Triton X-100 hinzu. Sämtliche Versuchsansätze führte ich in Doppelbestimmung durch.

Die Platte wurde dann in einem Heracell™ 240i CO2-Inkubator bei 100% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO_2-Partialdruck aufbewahrt.

2.5 LDH-Zytotoxizitätsassay

Den LDH-Zytotoxizitätsassay wandte ich an, um zu testen, ob die Medikamente einen toxischen Effekt auf die B-Lymphozyten haben. Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) kommt in fast allen Zellen vor und wird bei deren Absterben freigesetzt. Im Serum kann es daher als unspezifischer Marker für eine Gewebeschädigung gemessen werden (Wiesinger 2009). Diese LDH wird durch eine gekoppelte Enzymreaktion, deren Endprodukt Formazan ist, im Zytotoxizitätsassay durch eine bei 490nm messbare Extinktion repräsentiert. Ein im Vergleich zu den stimulierten Kontrollzellen erhöhter Wert spräche in diesem Test demnach für einen B-Zell schädigenden Effekt der getesteten Substanz.

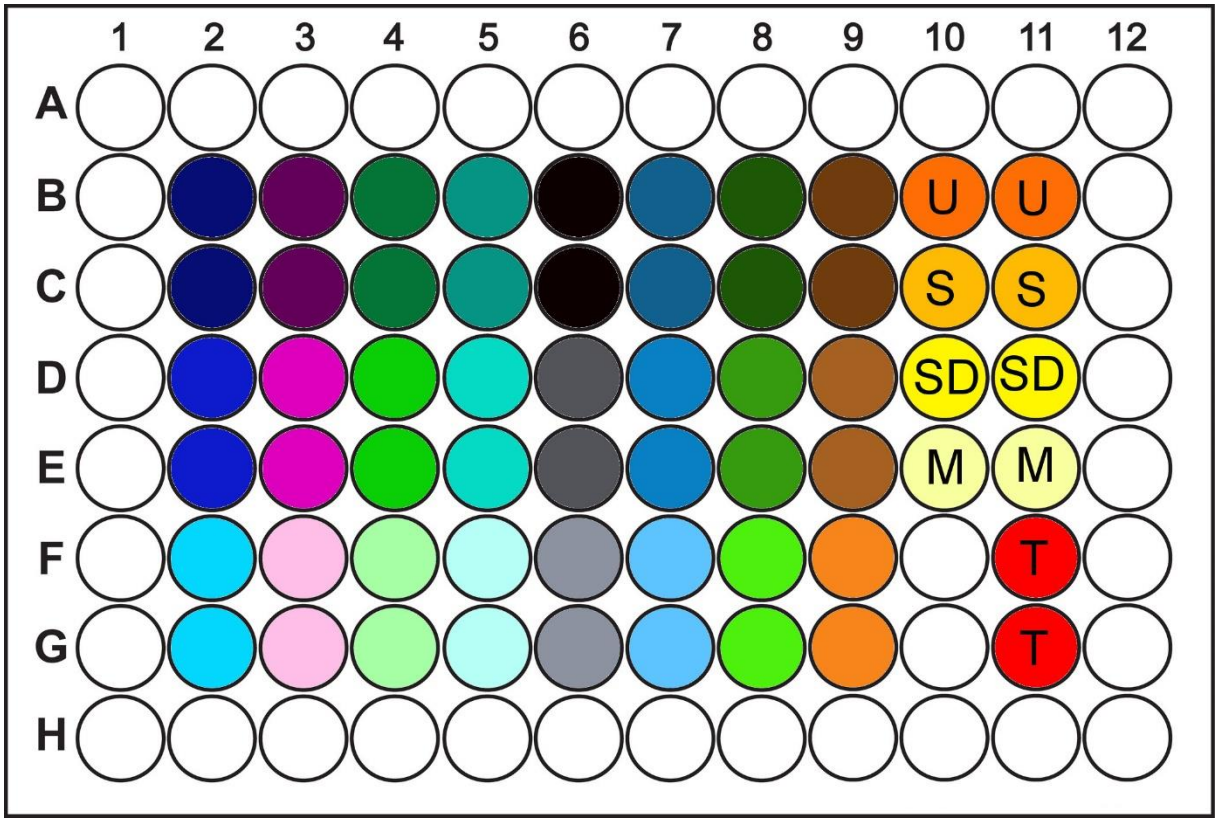


Abb. 2.3: Zu sehen ist die beispielhafte Belegung einer 96-*Well*-Platte. Es wurden immer Doppelbestimmungen durchgeführt. In den Spalten 2-9 ist jeweils eines der acht Medikamente in den Konzentrationen 1µM (Reihe B+C), 0,1µM (Reihe D+E) und 0,01µM (Reihe F+G) aufgetragen. In den Spalten 10+11 befinden sich die Kontrollen ohne Medikamente. U bezeichnet hierbei unstimulierte Zellen, S die stimulierten Zellen ohne DMSO, SD stimulierte Zellen mit 0,1% DMSO, M alleiniges Medium und T bezeichnet stimulierte Zellen mit 0,2% Triton X-100. Weiße Felder sind leer. In jedem befüllten *Well* befinden sich 200µl Medium mit $2x10^4$ Zellen (außer in M), 1µg/ml CD40-Antikörper + 100ng/ml IL 21 (außer in M+U), ca. 0,1% DMSO (außer in M+U+S) und eines der acht getesteten Medikamente in einer der drei genannten Konzentrationen (außer

Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben isoliert, stimuliert und inkubiert. Am Folgetag zentrifugierte ich die Platte bei 1500rpm (entspricht 367g) und Raumtemperatur für 10 Minuten in der schon erwähnten Megafuge 1.0R. Ich entnahm jedem Well 100µl des entstandenen Überstands und überführte diesen unter Beibehaltung der Platten-belegung auf eine nicht-bindende 96-*Well*-Platte.

Die Quantifizierung der LDH-Freisetzung führte ich mithilfe des „*Cytotoxicity Detection Kits* (LDH)“ durch. Hierzu vermischte ich pro *Well* 2,5µl *Catalyst* mit 112,5µl *dye solution* und pipettierte davon jeweils 100µl zum Überstand in die *Wells*. Die Platte inkubierte ich dann für eine halbe Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur.

Die Extinktion der einzelnen *Wells* bei 490nm maß ich mit einem VICTOR3™ *Multilable Plate Reader*. Sie ist proportional zur Konzentration der freigesetzten LDH und damit zur Menge an toten Zellen im *Well*.

2.6 BrdU-Proliferationsassay

Um den Effekt der getesteten Substanzen auf die Proliferation der isolierten B-Lymphozyten zu quantifizieren, führte ich 5-Brom-2-desoxyuridin- (BrdU)-Proliferationsassays durch. Das Pyrimidinanalogon BrdU wird von Zellen anstelle von Thymidin zur DNA-Replikation verwendet und kommt deshalb nur in den neu entstandenen Zellen vor, nicht aber in den schon vorher präsenten (Merrick 2015). Tötet man diese Zellen nach einigen Tagen ab, lässt sich das eingebaute BrdU mit Antikörpern markieren und über einen an Meerrettichperoxidase (HRP) gebundenen Sekundärantikörper in einer farbigen Substratreaktion sichtbar und colorimetrisch messbar machen.

Wie zuvor beschrieben isolierte, stimulierte und inkubierte ich humane B-Lymphozyten. Vier Tage nach der Isolation gab ich unter sterilen Bedingungen 20µl der 1:100 verdünnten „*BrdU labeling solution“* aus dem „*Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)“ Kit* in jedes *Well* hinzu. Die Zellen wurden dann für weitere 24 Stunden bei 100% Luftfeuchtigkeit, 37°C und 5% CO_2-Partialdruck inkubiert.

Am Folgetag zentrifugierte ich die Platte bei 1400rpm (entspricht 319g) und Raumtemperatur für 10 Minuten. Den Überstand entfernte ich durch Auskippen und leichtes Ausklopfen. Im Anschluss trocknete ich die Platte, indem ich sie für eine Stunde offen bei 60°C in einen Trockenschrank stellte.

Auf die getrockneten Zellen gab ich pro *Well* je 200µl *Fix Denat*-Lösung und inkubierte sie für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur. Danach entfernte ich das *Fix Denat* durch Umdrehen und Ausschlagen und pipettierte in jedes *Well* 100µl *anti-Brdu-POD-working-solution,* bestehend aus einem HRP-gekoppelten anti-BrdU-Antikörper 1:100 verdünnt in *dilution solution*. Es folgte eine weitere Inkubationsphase von 90 Minuten dunkel bei Raumtemperatur.

Nach der Inkubationszeit wusch ich die *Wells* je dreimal mit 200µl DPBS und fügte jedem *Well* 100µl *substrate solution*, also 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidin (TMB) – das

Substrat der HRP, hinzu und inkubierte sie bei Raumtemperatur, bis die Farbentwicklung zur photometrischen Detektion ausreichte, was in der Regel 10-20 Minuten dauerte. Die Farbreaktion stoppte ich dann mit 50µl 0,5M H_2SO_4 pro *Well.* Die Extinktion in den Wells maß ich bei 450nm mit einem VICTOR3™ *Multilable Plate Reader*.

2.7 Durchflusszytometrie isolierter humaner B-Lymphozyten

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung einzelner Zellen und deren Sortierung anhand ausgewählter Merkmale, beispielsweise ihrer Oberflächenmoleküle. Zwar erlaubt allein schon die zweidimensionale Sortierung nach Größe im Vorwärtsstreulich (FSC) und nach Granularität im Seitwärtsstreulicht (SSC) eine gewisse Unterscheidung der Zellart, zum Beispiel zwischen Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, viel genauer wird dies aber durch die Markierung einzelner Zellbestandteile mit farbstoffgebundenen Antikörpern. Durch geschickte Auswahl und Kombination dieser Antikörper lassen sich mitunter Subgruppen einer Zellart quantitativ messen. Ich verwendete die Durchflusszytometrie bei den von mir isolierten B-Lymphozyten einerseits zur Kontrolle der Reinheit in der Kultur, anderseits zur Evaluierung der Medikamentenwirkung auf die Differenzierung zu den wichtigen, antikörperproduzierenden Plasmazellen innerhalb der Zellkultur. Hierfür färbte ich die Zellen mit drei Farbstoffen an: anti-CD19-FITC, anti-CD27-PE und anti-CD38-APC. B-Lymphozyten sind $CD19^+$, die aus ihnen hervorgehenden Plasmazellen $CD19^-$ $CD27^+CD38^+$.

Für die Reinheitsanalyse untersuchte ich sowohl die isolierte B-Zellsuspension als auch die aussortierten Zellen. Ich zentrifugierte die zu untersuchenden Zellen für 5 Minuten bei 4°C und 1400rpm (entspricht 409g), goß den Überstand ab, resuspendierte die Zellen in 100µl FACS-Puffer pro Probe. Diesen Proben fügte ich dann je 1µl jeden Antikörpers hinzu, mischte gründlich und inkubierte die Proben für eine halbe Stunde bei 4°C in Dunkelheit. Danach füllte ich die Proben mit 1ml FACS-Puffer auf, zentrifugierte sie erneut für 5 Minuten bei 4°C und 1400rpm, verwarf den Überstand und resuspendierte kurz vor der Eingabe der Probe ins Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ in 300µl PBS. Die Messung und Analyse der Proben erfolgte mit der Software CellQuest™ Pro 5.2.1. Pro Probe maß ich 10^4 Zellen. Die Auswertungen sind exemplarisch in den Abbildungen 2.4 und 2.5 dargestellt.

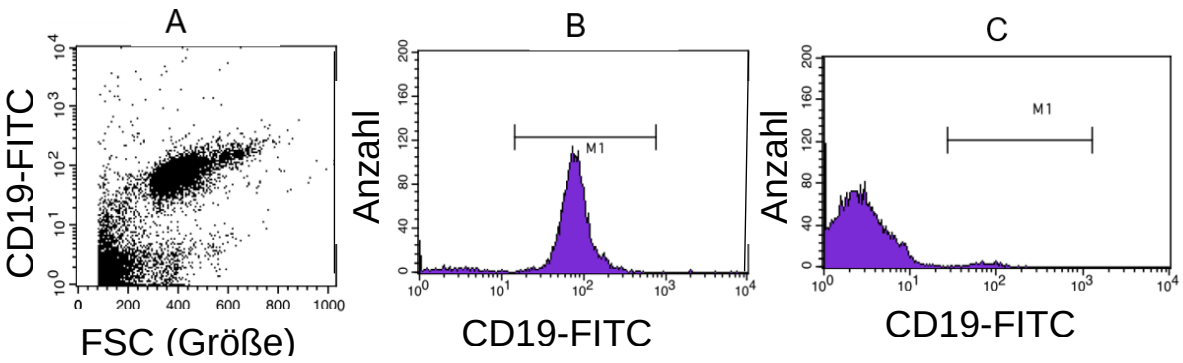


Abb. 2.4: Gezeigt ist die Reinheitsanalyse einer gerade isolierten Zellkultur mit dem Programm CellQuest™ Pro 5.2.1.. **A** zeigt das für FACS-Bilder typische Punktdiagramm, wobei jeder Punkt eine Zelle repräsentiert. Deutlich sind hier zwei sogenannte „Wolken" so erkennen. Eine mit Zellen von geringer Größe und mit geringer CD19-Ausprägung (am ehesten tote Zellen und vereinzelte Erythrozyten), die andere mit größeren, $CD19^+$ Zellen (B-Lymphozyten). **B** zeigt ein Hisotgramm Der CD19-Ausprägrung in der B-Zellkultur, wobei deutlich zu erkennen ist, dass die meisten Zellen im $CD19^+$-Bereich liegen und somit B-Zellen sind. **C** zeigt ein Histogramm der mittels MACS aussortierten Zellen. Hier finden sich nur wenige $CD19^+$-Zellen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Isolation erfolgreich war.

2.8 ELISA zur Quantifizierung der IgG- und IgM-Konzentration

Das zentrale Element der B-Zell-Funktion und unabdingbar für ein gut schützendes Immunsystem ist die Produktion von Antikörpern. Ob die verwendeten Medikamente darauf einen Einfluss haben, testete ich mit sogenannten *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA), die selbst mehrere Antikörperreaktionen nutzen, um eine Antigenkonzentration messbar zu machen. In diesem Fall waren die humanen IgM- und IgG-Antikörper bzw. deren murine Korrelate im Mausversuch die zu quantifizierenden Antigene. Diese werden zunächst durch spezifische Beschichtungs-Antikörper gebunden, während alles Übrige entfernt wird. In einer zweiten Antikörperreaktion wird dann wie schon beim BrdU-Assay über HRP-gekoppelte Sekundärantikörper die Antikörperkonzentration colorimetrisch messbar. Je höher hierbei der Extinktionswert ausfällt, desto größer ist die Konzentration an gebundenen Sekundärantikörpern und damit die Antigenkonzentration.

Um diese zu bestimmen, verwendete ich Quantifizierungs*kits* für humane IgM- und IgG-Antikörper sowie für murines IgM und IgG. Der Versuchsablauf ist für alle diese Versuche gleich, sie unterscheiden sich lediglich in den verwendeten Beschichtungs-antikörpern, der Verdünnung des Referenzserums und den verwendeten Sekundär-antikörpern. In Tab. 2.1 sind die Refenrenzkonzentrationen aufgelistet.

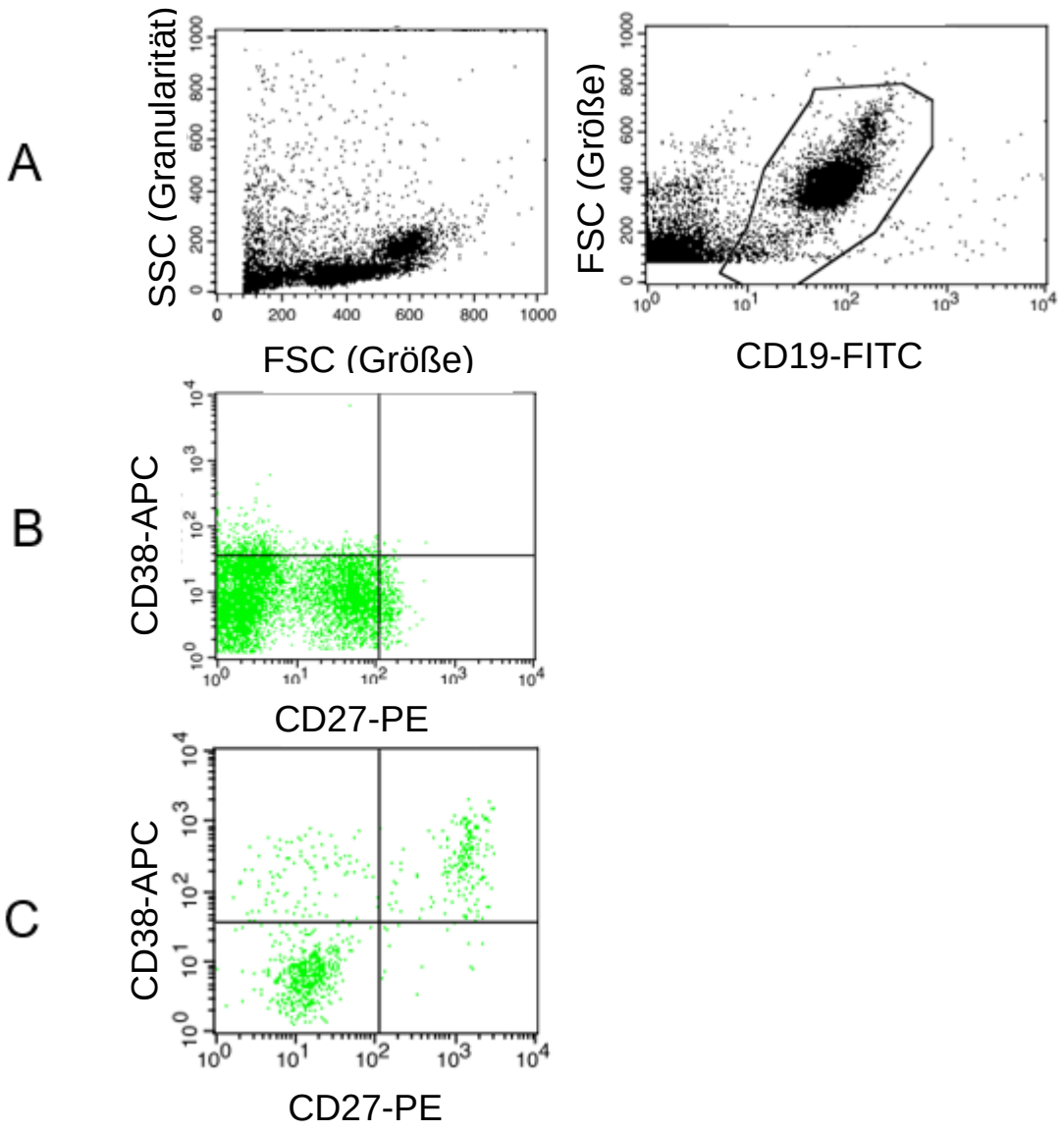


Abb. 2.5: Gezeigt ist die Evaluierung der Medikamentenwirkung auf die Plasmazell-differenzierung mit dem Programm CellQuest™ Pro 5.2.1. **A** zeigt im Punktdiagramm jeweils die B-Lymphozytenpopulation als Wolke im mittelgroßen, wenig-granulierten Bereich bzw. als mittelgroße $CD19^+$-Zellen. **B** zeigt die Darstellung hinsichtlich der Ausprägung von CD27 und CD38 am Tag der Isolation innerhalb der eingerahmten Population in A. Plasmazellen sind sowohl $CD27^+$ als auch $CD38^+$, also hier im oberen rechten Quadranten zu finden, was zu diesem Zeitpunkt noch auf kaum eine Zelle zutrifft. **C** zeigt die gleiche Population fünf Tage später. Sie gehört zur Kontrollgruppe, die stimuliert und mit 0,1% DMSO sowie 0,1µM Progresteron inkubiert worden war. Hier zeigen sich deutlich mehr Plasmazellen im oberen rechten Quadranten, was dafür spricht, dass die Stimulation funktioniert hat.

Die Proben mit murinem IgM und IgG stammen aus wöchentlichen Blutentnahmen während des Mausversuchs, die humanen aus den Zellkulturen der von mir isolierten B-Lymphozyten nach fünf bis sechs Tagen Inkubation. Diesen Zeitpunkt hatte ich zuvor evaluiert (siehe Kapitel 3.1.1 und Abb. 3.2).

Zunächst führte ich den ELISA mit exemplarischen Proben in verschiedenen Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1.10.000…) durch, um die geeignete Probenverdünnung zu evaluieren. Die Proben aus der Zellkultur verdünnte ich 1:20 - 1:60, die murinen Seren 1:20.000 – 1:160.000. Die gemessenen Werte sollten dabei in dem Wertebereich liegen, in dem die Messwerte der Standardreihe linear mit der bekannten Konzentration ansteigen (siehe Abb.2.7).

	Mensch IgM	**Mensch IgG**	**Maus IgM**	**Maus IgG**
Konzentrationen in der Standardreihe in ng/ml	1000 500 250 125 62,5 31,25 15,625	500 250 125 62,5 31,25 15,625 7,8125	1000 500 250 125 62,5 31,25 15,625	500 250 125 62,5 31,25 15,625 7,8125
Leerwert in ng/ml	0	0	0	0

Tab. 2.1: Dargestellt sind die bekannten Konzentrationen des jeweiligen Antigens in den Verdünnungen des dazugehörenden Referenzserums. Eine solche Standardreihe wurde auf jeder Testplatte untersucht. Dadurch, dass diese Werte vorab bekannt sind, können die Messwerte der Proben auf der gleichen Testplatte zu den Standardwerten in Relation gesetzt und so die Antigenkonzentration in der Probe berechnet werden.

Zu Beginn verdünnte ich den Beschichtungsantikörper *(affinity purified antibody)* aus dem jeweiligen Kit 1:100 in carbonathaltigem Beschichtungspuffer und gab davon 100µl in jedes *Well* einer stark bindenden 96-*Well*-Testplatte, die dann über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Im Anschluss wusch ich die Platte fünfmal mit 300µl/*Well* der ELISA Waschlösung durch Ausschütten und Ausklopfen und befüllte die Wells mit je 200µl Blockierungspuffer gefolgt von einer halbstündigen Inkubation bei Raumtemperatur.

Zur Herstellung eines Standards verdünnte ich das Referenzserum nach Protokollvorgabe (siehe Tab. 2.1) mit der Verdünnungslösung. Zusätzlich testete ich Verdünnungslösung ohne Serum, um einen Leerwert zu erhalten. Die geblockte Platte wusch ich erneut fünfmal mit der Waschlösung, fügte dann in jedes *Well* 100µl der

verdünnten Probe bzw. der verdünnten Standardreihe jeweils in Doppelbestimmung hinzu und inkubierte die Platte erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Den jeweiligen Sekundärantikörper (HRP-gekoppelter Antikörper gegen humanes bzw. murines IgG oder IgM) verdünnte ich 1:10.000 mit Verdünnungslösung, wusch die Platte erneut fünfmal mit Waschlösung und gab dann in jedes *Well* 100µl des verdünnten Sekundärantikörpers, bevor ich die Testplatte für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubierte. Nach Ablauf dieser Stunde wusch ich die Platte fünfmal mit Waschlösung, fügte dann jedem *Well* 100µl TMB hinzu und ließ die Platte bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubieren, bis die Farbreaktion zur photometrischen Detektion ausreichte. War dieser Zeitpunkt erreicht, fügte ich 100µl 0,5M H_2SO_4 hinzu, um die Farbreaktion abzustoppen. Es entstand ein Bild ähnlich Abb. 2.6. Die Extinktion in den *Wells* maß ich bei 450nm mit einem VICTOR3™ *Multilable Plate Reader*. Sie spiegelt die im *Well* enthaltene Menge an jeweils IgG bzw. IgM wieder.

Abb. 2.6: Gezeigt ist eine 96-*Well*-Testplatte nach mit H_2SO_4 abgestoppter TMB-Substratreaktion. Je dunkler die goldene Farbe desto höher ist die Antigenkonzentration im *Well*. Diese steigt beispielsweise in den Spalten 2+3 mit jeder Reihe an, wie es bei einer Standardverdünnungsreihe der Fall wäre.

Gemeinfrei zur Verfügung gestellt von „BiotechMichael“ auf https://wikimedia.commons.org.

Zur Auswertung verwendete ich Microsoft Office 365, trug wie in Abbildung 2.7 gezeigt die Messwerte der Standardreihe gegen deren jeweilige Antigenkonzentration (siehe Tab. 2.1) auf und ermittelte den Bereich linearer Steigung durch Einfügen einer Trendlinie. Nur innerhalb dieses Bereichs sind die Werte genau. Probenwerte innerhalb dieses Bereichs setzte ich nach Abzug des Leerwertes (0ng/ml Antigen) in Relation zu einem Standardwert, um die Antigenkonzentration zu berechnen.

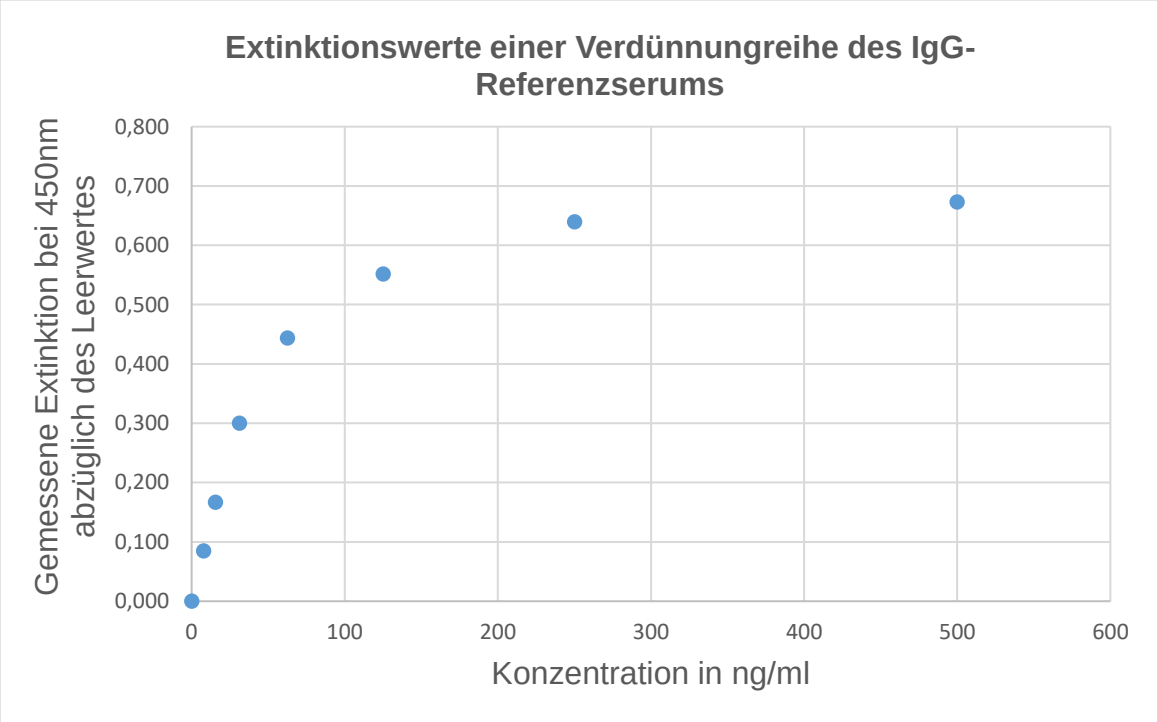


Abb. 2.7: Gezeigt sind die gemessenen Extinktionswerte 450nm abzüglich des Leerwertes. Es ist zwischen den Extinktionswerte ca. 0 - 0,3 ein Bereich linearer Steigung zu erkennen. Messwerte der Proben sollten in diesem Bereich liegen, Werte darüber werden falsch-niedrig, Werte darunter falsch-hoch gemessen. Standardwerte in diesem Bereich eignen sich zur Berechnung der Antigenkonzentration in den Proben.

2.9 Mäuse

Die ingesamt 36 BALB/cJ-Mäuse (Stocknummer 000651) wurden von *Charles River Laboratories* (Wilmington, USA) erworben, der Bestand stammt von *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA). Alle Tiere wurden entsprechend den Auflagen des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein, des Tierschutzgesetzes sowie der Tierschutz-Versuchstier-ordnung in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität zu Lübeck gehalten. Sie erfuhren einen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus und erhielten Standard-Mausfutter sowie angesäuertes Trinkwasser *ad libitum*. Zu Versuchsbeginn waren die

Mäuse zwischen fünf und zweiundzwanzig Wochen alt. Sie wurden ab Versuchsbeginn täglich von mir gesehen und zweimal wöchentlich gewogen, um starke Abnahmen des Körpergewichts als Zeichen zu großer Belastung rechtzeitig zu erkennen. Alle Tierversuche wurden zuvor von der Ethikkommission des Ministeriums für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein genehmigt (Tierversuchsnummer: 122 5(94-8/14), siehe Anhang) und von mir als zertifizierter Fachperson durchgeführt (siehe Anhang).

2.10 Immunisierung der Mäuse mit murinem Kollagen 7 (mCol7)

Das Immunisierungs-induzierte Modell der murinen Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), einer blasenbildenen, autoimmunen Hauterkrankung, mit der von-Willebrandfaktor-A ähnlichen Domäne 2 (vWFA2) des Antigens mCol7 (Iwata et al. 2013) ist bereits etabliert und eignet sich besonders, da B-Lymphozyten hierin eine zentrale Rolle spielen und es zu einer gut nachzuweisenden Autoantikörperproduktion kommt (Bieber et al. 2010, Iwata et al. 2015). Darüber hinaus sind die verwendeten BALB/c-Mäuse nicht empfänglich für die EBA, es kommt also nicht zur Ausprägung eines klinischen Phänotyps (Sitaru et al. 2006, Iwata et al. 2013).

Ich löste 4mg des mCol7-vWFA2 in 2ml sterilem PBS und mischte dies dann mit 2ml des Adjuvans TiterMax® für mindestens eine Stunde bei 4°C mittels Vortex, bis sich eine feste Suspension gebildet hatte. Den mit einem Ketamin (100µg/g)/Xylazin(15µg/g)-Gemisch i.p. narkotisierten Mäusen injizierte ich dann insgesamt 60µl (entspricht 60µg mCol7-vWFA2) der Antigen-Adjuvans-Suspension in die Fußballen der Hinterbeine. Alle Mäuse überstanden diese Prozedur ohne bleibende Schäden, entstandene Schwellungen an den Injektionsstellen bildeten sich innerhalb weniger Tage vollständig zurück. Die intraperitoneale Injektion sowie die Immunisierung in den Fußballen sind in Abbildung 2.8 dargestellt.

2.11 Verdünnung und Applikation der Medikamente

Von den ursprünglich acht verschiedenen Medikamenten, die in den Zellkultur-Versuchen zum Einsatz kamen, übernahm ich zwei in die *in vivo*-Versuche:

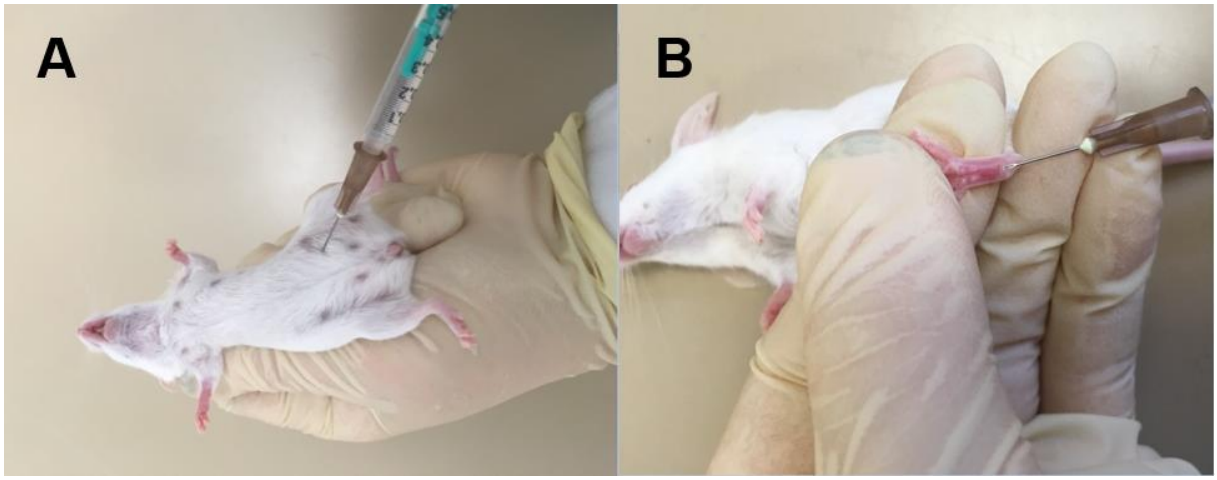


Abb. 2.8 Gezeigt sind die von mir angewandte Injektionstechniken.

A zeigt die intraperitoneale Applikation eines Medikaments. Die unbetäubte Maus wird dabei fest am Schwanz und am Nacken- und Rückenfell gegriffen, injiziert wird in den linken, kaudalen Quadranten der Peritonealhöhle.

B zeigt die Immunisierung mit mCol7-vWFA2 in den Fußballen der Hinterbeine. Dabei wird der Fuß des narkotisierten Tieres zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert und die Kanüle vorsichtig von der Ferse aus unter die Haut des Fußballens geschoben. Dort kann dann ein Antigendepot platziert werden.

Die Abbildungen wurden von Kerstin Neuschütz freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Ceforanid (Prestw-470) verdünnte ich in sterilem DPBS auf 200µg/ml, 17α-Hydroxyprogesteron auf 660µg/ml. Die gelösten Medikamente filtrierte ich anschließend mit einem Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2µm) steril.

Einen Tag vor der Immunisierung beginnend applizierte ich den Mäusen jeden Tag 1mg/kg Körpergewicht Ceforanid i.p. bzw. täglich 3,3mg/kg Körpergewicht 17α-Hydroxyprogesteron i.p. Das maximal mögliche tägliche Injektionsvolumen von 200µl wurde dabei nie erreicht.

Außerdem befand sich im Versuch eine Kontrollgruppe, die wie die übrigen Mäuse immunisiert wurde und jeden Tag 5ml/kg Körpergewicht steriles DPBS i.p. erhielt. Die täglichen Injektionen erfolgten ohne Narkose, es wurden keine Unverträglichkeiten oder Nebenwirkungen der Medikamente beobachtet.

2.12 Gewinnung murinen Serums und Leukozyten aus dem Blut

Vor Versuchsbeginn und danach in wöchentlichen Abständen entnahm ich jeweils zwei Blutproben. Eine (ca. 30-40µl) zur Gewinnung des Serums und eine (ca. 10-20µl), um die darin enthaltenen Leukozyten mittels Durchflusszytometrie zu untersuchen. Zur Blutentnahme ließ ich die jeweilige Maus am Schwanz gepackt in eine Röhre laufen, die ich auf beiden Seiten verschloss, sodass nur der Schwanz zu erreichen war. Mit einem Skalpell amputierte ich die Schwanzspitze (höchstens 1mm) und fing das austretende Blut in kleinen Verschlussgefäßen auf. Die für die durchflusszytometrische Analyse bestimmten Proben wurden unverzüglich mit bereits vorgelegten 30µl EDTA antikoaguliert. Im Anschluss stillte ich die Blutung durch Kompression und verschloss die Wunde mit Sprühpflaster.

Zur Serumgewinnung zentrifugierte ich die Proben bei 10.000rpm (entspricht 8944g) in einer Biofuge® Fresco bei 4°C für 30 Minuten. Dadurch wurde das Serum von den zellulären Blutbestandteilen getrennt und ließ sich abpipettieren. Die gewonnenen Serumproben fror ich bis zur weiteren Verwendung bei -20°C ein.

Um die antikoagulierten Proben für die Duchflusszytometrie vorzubereiten, verdünnte ich sie jeweils in 1ml EL-Puffer (Erythrozyten lysierender Puffer) und inkubierte sie für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach zentrifugierte ich sie in einer Mikro20-Zentrifuge für 5 Minuten bei 2500rpm (entspricht 559g) und pipettierte den Überstand ab. Um die Reinheit zu verbessern, wiederholte ich die Erythrozytenlyse.

2.13 FACS-Färbung der murinen Leukozyten aus dem Blut

Ich untersuchte, ob die täglich applizierten Medikamente einen Einfluss auf die Verteilung der Leukozyten oder die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen haben. Dazu entnahm ich wöchentlich Blut, bereitete es wie in 2.10 beschrieben vor und führte eine durchflusszytometrische Analyse durch.

Nachdem die Erythrozyten entfernt waren, nahm ich die Proben in jeweils 100µl FACS-Puffer auf und teilte die Proben, um zwei Färbungen parallel durchzuführen, in zwei 50µl Ansätze auf. Die erste Färbung zielte auf alle Leukozyten ab und enthielt anti-CD19-FITC (als B-Zell-Marker), anti-CD3-PE (T-Zell-Marker) und anti-Ly6g-APC (zur Markierung neutrophiler Granulozyten). Die zweite Färbung bestand aus anti-CD19-

APC und anti-B220-FITC zur B-Zell-Markierung sowie aus anti-CD138-PE zur Idenfizierung von Plasmazellen.

Zu jeder Probe gab ich 1µl jedes benötigten Antikörpers, mischte gründlich und inkubierte sie für 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit. Danach füllte ich sie mit 300µl PBS aus und maß 10^4 Zellen im Durchflusszytometer BD FACSCalibur™ mit der Software CellQuest™ Pro 5.2.1.

Abbildung 2.9 zeigt das Vorgehen bei der Auswertung der Leukozytenfärbung, Abbildung 2.10 das hinsichtlich der Plasmablasten und Plasmazellen.

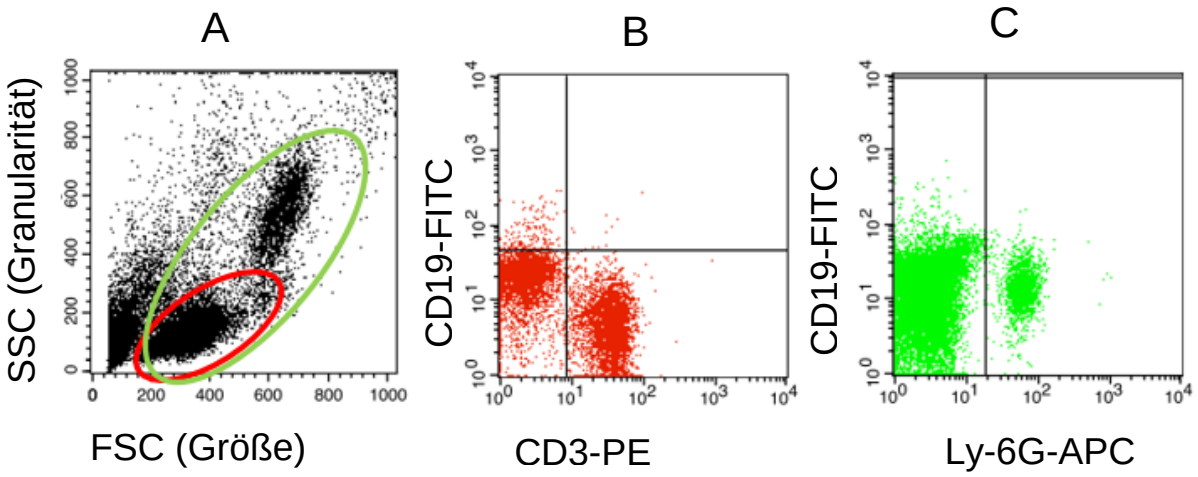


Abb. 2.9 Dargestellt ist die Auswertung der Leukozytenfärbung mit dem Programm CellQuest™ Pro 5.2.1.

In Bild **A** sind alle analysierten Zellen nach Größe und Granularität aufgetragen. Im roten Kreis befindet sich die Lymphozytenpopulation, im grünen werden zusätzlich die Granulozyten eingeschlossen. **B** zeigt die Auftrennung der Lymphozytenpopulation nach ihrer Expression von CD3 (T-Zellen, unterer rechter Quadrant)) und CD19 (B-Zellen, oberer linker Quadrant) In **C** wiederum sind die Zellen innerhalb des grünen Kreis (siehe A) durch ihre Expression von Ly6g (neutrophile Granulozyten) von den anderen Zellen getrennt. Rechts befinden sich die Granulozyten, links die übrigen Zellen.

2.14 Tötung, Organentnahme und Isolation der Leukozyten aus Milz und Lymphknoten

Nach drei Wochen Versuchsdauer tötete ich die Mäuse tierschutzgerecht durch zervikale Dislokation (schnelles Durchtrennen des Rückemarks/Hirnstamms). Die Mäuse wurden vorher mit mindestens 100µg/g Ketamin und 15µg/g Xylazin i.p.

betäubt und erst unter sichergestellter tiefer Narkose getötet. Danach punktierte ich das Herz zur Blutentnahme und entnahm die Milz sowie inguinale und popliteale Lymphknoten.

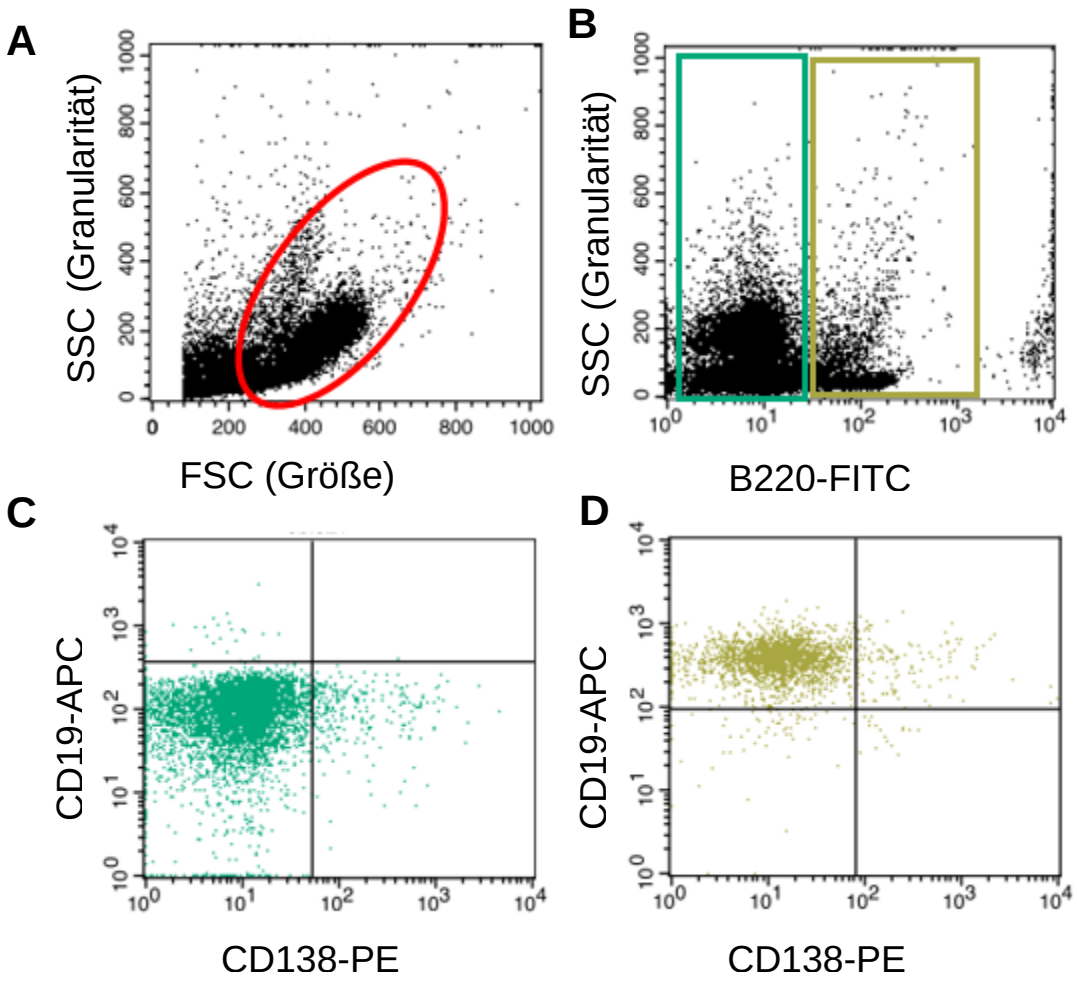


Abb. 2.10 Dargestellt ist die Auswertung der Plasmazellenfärbung mit dem Programm CellQuest™ Pro 5.2.1.

A zeigt die Sortierung aller gemessenen Zellen nach Größe und Granularität. Im roten Kreis befindet sich die Lymphozytenpopulation, die in **B** in eine $B220^-$ (grüner Kasten) - und eine $B220^+$-Population (goldener Kasten) geteilt ist. C zeigt den Inhalt des grünen Kastens nach CD19 und CD138 sortiert. Die $CD19^-CD138^+B220^{-}$Plasmazellen sind im unteren rechten Quadranten von **C** lokalisiert. **D** zeigt die gleiche Sortierung der $B220^+$-Zellen (goldener Kasten), wobei die $CD19^+CD138^+B220^+$-Plasmablasten im oberen rechten Quadranten zu finden sind.

Aus der Milz und den Lymphknoten benötigte ich die Leukozyten, um sie für die durchflusszytometrische Analyse anzufärben. Zunächst zerdrückte ich die Organe

jeweils über einem Sieb (Porengröße 70µm) mit dem Stempel einer Spritze, um die Zellen vom Bindegewebe zu trennen, und spülte mit 1ml FACS-Puffer nach. Die Zellen zentrifugierte ich dann bei 2000rpm (entspricht 358g) für fünf Minuten in einer Mikro20-Zentrifuge. Bei den Milzen wandte ich zusätzlich eine Erythrozytenlyse an. Hierfür verwarf ich den Überstand, resuspendierte die Milz-Zellen in 1ml Erythrozyten lysierenden Puffers und inkubierte sie für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach zentrifugierte ich sie für 5 Minuten bei 2500rpm (entspricht 559g) und pipettierte den Überstand ab. Auch hier wiederholte ich die Erythrozytenlyse. Danach nahm ich die Zellen in 150µl FACS-Puffer (in diesem Versuch 0,5% BSA-haltig) auf. Ich bestimmte die Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer unter einem Lichtmikroskop (siehe 2.3 und Abb. 2.2,) und verdünnte auf 10^7 Zellen/ml.

2.15 FACS-Färbung zur Analyse der B-Lymphozyten und antigenspezifischen Plasmazellen aus Milz und Lymphknoten

Ich färbte die Leukozyten aus murinen Milzen und Lymphknoten hinsichtlich der Anzahl der spezifischen Plasmazellen gegen das Antigen vWFA2, einer Domäne des Proteins mCol7, mit dem ich die Mäuse immunisiert hatte. Dies diente dazu, zu untersuchen, inwieweit die verabreichten Medikamente einen Einfluss auf die zelluläre Proliferation und die Bildung antigenspezifischer Plasmazellen haben. Darüber hinaus färbte ich $2x10^4$ Zellen pro Probe mit den unter 2.13 beschriebenen Färbungen nach den ebenfalls dort beschriebenem Verfahren. Ausgangspunkt sind jeweils die wie unter 2.14 beschrieben gewonnen Zellen aus Milz und Lymphknoten.

Ich zentrifugierte die Proben (10^7 Zellen/ml) für 10 Minuten in einer Biofuge® Fresco bei 4°C bei 1500rpm (entspricht 201g). Vorsichtig kippte ich den Überstand ab und resuspendierte in 50µl verdünntem Fcγ-Block (anti-CD16/CD32-Antikörper, 1:250fach verdünnt in FACS-Puffer), mischte auf dem Vortex und inkubierte die Proben für fünf Minuten auf Eis. Nach Ablauf der Inkubationszeit gab ich 50µl des Oberflächen-Antikörper-Mix, bestehend aus anti-CD138-PE (0,5µg/ml) und anti-B220-Alexa Fluor®405 (10µg/ml) in FACS-Puffer verdünnt, hinzu und inkubierte für weitere zehn Minuten im Dunkeln auf Eis. Ich füllte die Proben dann mit PBS auf 1ml auf, zentrifugierte sie erneut bei 300g für zehn Minuten bei 4°C und kippte den Überstand vorsichtig ab. Nachdem ich das Pellet resuspendiert hatte, gab ich 100µl

Cytofix/Cytoperm™zu jeder Probe, mischte auf dem Vortex und inkubierte sie für 40 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Im Anschluss verdünnte ich die Zellen mit 1ml Perm/Wash™, zentrifugierte bei 3300rpm (entspricht 1000g) für 10 Minuten bei 4°C, schüttete den Überstand vorsichtig ab und resuspendierte, indem ich die Reagenzgefäße mehrmals über einen metallenen Reagenzglashalter zog. Dann gab ich zu jeder Probe 100µl des intrazellulären Anti-körper-Mix aus Kappa-Alexa Fluor®647 (2µg/ml) und mCol7-vWFA2-Alexa Fluor®488 (4µg/ml) (jeweils verdünnt in Waschpuffer), mischte auf dem Vortex und inkubierte die Proben für 20 Minuten im Dunklen auf Eis. Danach füllte ich die Proben auf 1ml mit Waschpuffer auf, zentrifugierte sie erneut bei 3300rpm für zehn Minuten bei 4°C, schüttete den Überstand vorsichtig ab und resuspendierte die Zellen. Für die Analyse füllte ich die Reagenzgefäße auf 500µl mit PBS auf, filtrierte die Proben mit einem 20µm-Sieb und lagerte sie bei 4°C bis zur Messung im BD LSR II-Durchflusszytometer. Die Analyse der Daten führte ich mit FlowJo 10 wie in Abb. 2.11 gezeigt durch.

2.16 ELISA zum Nachweis spezifischer IgM- und IgG-Antikörper gegen mCol7-vWFA2

Die Produktion spezifischer Antikörper gegen ein Antigen ist Kernbestandteil der Impfung und gilt als ein wichtiges Kriterium für den Impferfolg (Jack et al. 1999, Burgmann et al. 2010). Ob die von mir verabreichten Medikamente die Produktion spezifischer Antikörper gegen das Antigen mCol7-vWFA2 und damit den Impferfolg beeinflussen können, testete ich mit einem ELISA. Ein derartiger Test war nicht kommerziell verfügbar, weshalb ich die Testplatte selbst mit dem Antigen beschichtete. Antigenspezifische Antikörper binden an diese Antigenmoleküle und lassen sich dann durch die Substratreaktion HRP-gekoppelter Sekundärantikörper nachweisen. Den Sekundärantikörper entnahm ich jeweils den unter 2.6 beschriebenen *Kits.*

Die Quantifizierung der gesamten IgM- und IgG-Antikörper im murinen Serum habe ich bereits unter 2.6 beschrieben. Im Vergleich zu diesen Versuchen ergeben sich beim Nachweis antigenspezifischer Antikörper zwei Unterschiede. Zum einen beschichtete ich die Testplatte nicht mit einem Antikörper, sondern mit dem Antigen mCol7-vWFA2, indem ich jedes *Well* einer stark-bindenden 96-*Well*-Testplatte mit

100µl des mit Beschichtungspuffer auf 2,5µg/ml verdünnten Antigens befüllte und die Testplatte über Nacht bei 4°C inkubierte.

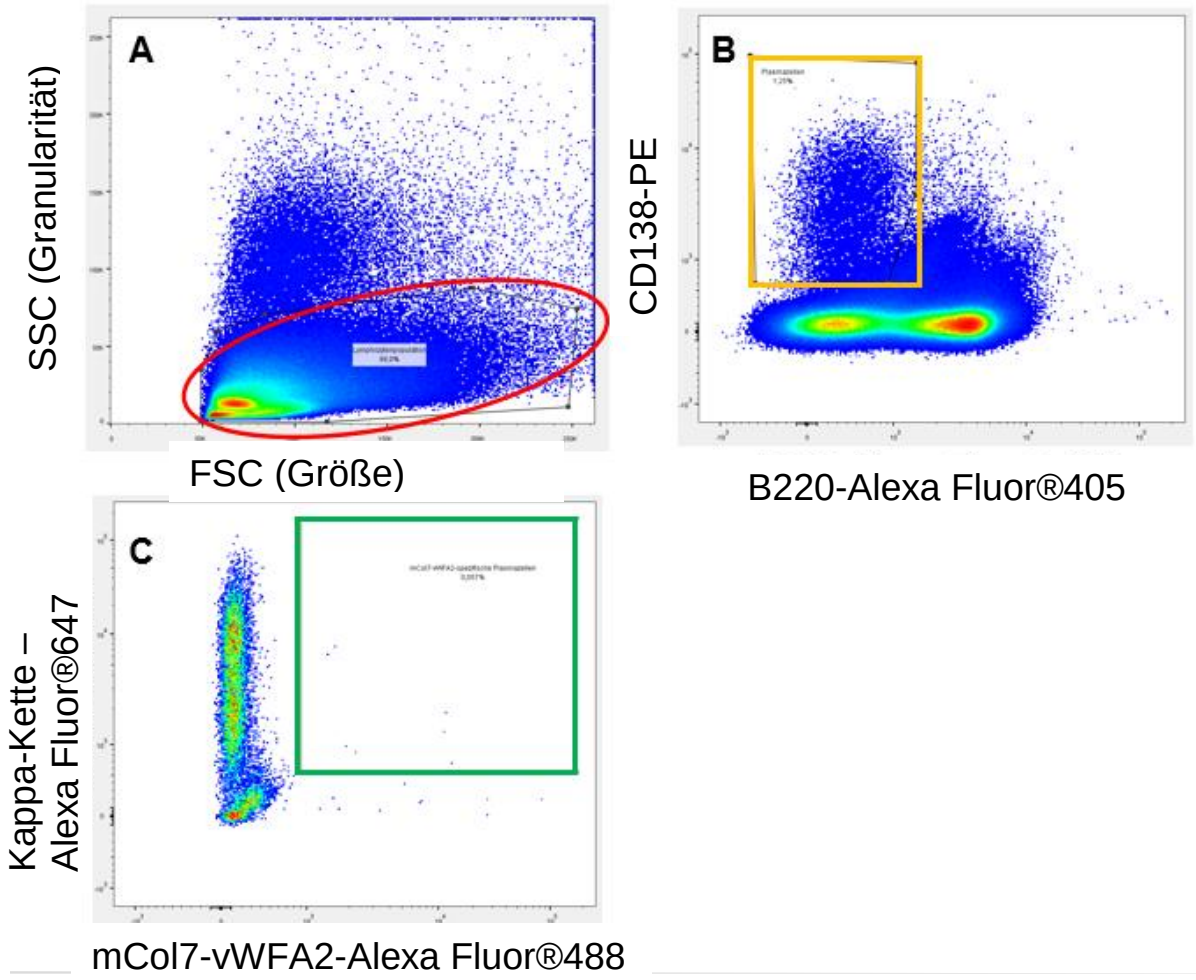


Abb. 2.10 Dargestellt ist die Auswertung der Färbung hinsichtlich mCol7-vWFA2-spezifischer Plasmazellen im Lymphknoten mit dem Programm FlowJo 10.

Das Streudiagramm **A** zeigt die Sortierung aller gemessenen Zellen nach Größe und Granularität. Im roten Kreis befindet sich die Lymphozytenpopulation, die in **B** nach ihrer Ausprägung der Oberflächenmoleküle CD138 und B220 aufgetragen ist, wobei die Plasmazellen ($CD138^+B220^-$) im goldenen Kasten liegen. Diese sind in **C** wiederum nach ihrer Ausprägung der Kappa-Leichtkette und ihrer Fähigkeit, das Antigen mCol7-vWFA2 zu binden, getrennt. Im grünen Kasten liegen dabei die $Kappa^+$mCol7-$vWFA2^+$-Plasmazellen.

Zum anderen war kein Standardserum zur Quantifizierung verfügbar, daher bildete ich aus den Teilen der am letzten Versuchstag gewonnenen Seren einen Seren-Pool, den ich in sieben verschiedenen Verdünnungen (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 bzw. nach gleichem Schema 1:100 – 1:6400) auf die Testplatte pipettierte. Die Proben sowie den Antikörper verdünnte ich hierbei mit Blockierungspuffer. Der

restliche Versuchsablauf entsprach dem unter 2.6 beschriebenen. Auch hier führte ich für jeden Versuchsansatz Doppelbestimmungen durch.

Für die Auswertung nahm ich den Messwert einer Pool-Verdünnung, der im linearen Bereich ihrer Messkurve lag, und setzte alle übrigen Messwerte zu diesem in Relation. Dies erlaubte zwar keine direkte Quantifizierung der Antikörper-konzentrationen, aber dennoch eine gute Vergleichbarkeit der Werte zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe.

2.17 Auswertung und Statistik

Die mittels Durchflusszytometrie erworbenen Daten wertete ich mit Cellquest™ Pro 5.2.1 bzw. FlowJo 10 aus. Für die übrigen Daten verwendete ich Microsoft Office 365. Für die graphische Darstellung verwendete ich GraphPad Prism 6 und Microsoft Office. Für die Daten aus den in vitro-Assays erstellte ich jeweils Streudiagramme mit arithmetischem Mittel und 95%-Konfidenzintervallen respektive Balkendiagramme mit arithmetischem Mittel und der Standardabweichung. Die Tierversuchsdaten stellte ich in *Box&Whisker-Plots* mit Median, Quartilen und 95%-Konfidenzintervallen dar.

Für die statistische Auswertung verwendete ich Systats SigmaPlot 13.0 respektive GraphPadPrism. Die Daten der *in vitro*-Experimente analysierte ich mittels einfaktorieller (Behandlung) Varianzanalyse (One-Way-ANOVA). Da es sich hierbei um nicht-normalverteilte, unverbundene Daten handelte, wählte ich hier den Kruskal-Wallis-Test, als Post-hoc-Test wählte ich jeweils multiple Vergleiche der Methode nach Dunn gegen die Kontrollgruppe. Für die in 3.1.1 und 3.2.1 dargestellten Überprüfungen der Methoden und Analysen hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs innerhalb einer Gruppe wandte ich stattdessen den Friedmann-Test, da es sich in diesen Fällen um verbundene Daten handelte. Für die Daten aus den Mausversuchen kam eine zweifaktorielle (Behandlung und Zeitpunkt) Varianzanalyse (Two-Way-ANOVA) zum Einsatz. Es folgten jeweils multiple Vergleiche der Methode nach Student-Newman-Keuls. Da für Daten aus Lymphknoten und Milz nur ein Zeitpunkt existierte, wandte ich hier den Kruskal-Wallis-Test an. Die Ergebnisse der ELISA des Mausversuchs wurden mit Hilfe von Dr. Yask Gupta (LIED, AG Ibrahim) mittels „*Limma R Package*“ normalisiert und mit einem Kruskal-Wallis-Test und der Benjamini-Hochberg-Prozedur ausgewertet. Für sämtliche Experimente wurde das Signifikanzniveau zuvor auf $p \leq 0{,}05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Wirkung potentiell B-Zellfunktionssteigernder Substanzen auf die Aktivität humaner B-Lymphozyten *in vitro*

Aus einem Screening durch die *Prestwick Chemical Library*®, das im Rahmen der Doktorarbeit von Kazuko Matsumoto im Lübecker Institut für experimentelle Dermatologie durchgeführt wurde, stachen acht Substanzen mit einer steigernden Wirkung auf die B-Zell-Funktion hervor. Ich validierte diesen Effekt und führte weitere Untersuchungen durch. Diese Validierung erfolgte zunächst mittels eines BrdU-Proliferationsassays, der bereits für das zu Grunde liegende Screening angewandt wurde. Parallel prüfte ich mit einem LDH-Zytotoxizitätsassay, ob die Substanzen eine toxische Wirkung auf die B-Lymphozyten haben. Mittels FACS und ELISA evaluierte ich darüber hinaus den Effekt der Wirkstoffe auf die Differenzierung der B-Zellen zu Plasmazellen und die Menge der von diesen produzierten IgM- und IgG-Antikörpern.

3.1.1 Die Stimulation mit anti-CD40-Antikörpern und IL-21 steigert die Proliferation und ermöglicht die Bildung von Plasmazellen und Antikörpern

Um diesen Effekt sicher nachweisen zu können, musste ich zunächst prüfen, ob die Stimulation mit IL-21 und anti-CD40-Antikörpern (siehe Kapitel 2.4) funktioniert. Dies traf zu. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, proliferierten die stimulierten Zellen deutlich stärker als die unstimulierten. Ebenfalls wurde durch die Stimulation erfolgreich die Differenzierung zu Plasmazellen, die IgM- und IgG-Antikörper bildeten, induziert. Als Referenz wählte ich die stimulierten B-Zellen, denen ich zusätzlich noch DMSO, das Lösungsmittel der Substanzen, beigefügt hatte und normalisierte auf diese Werte.

Ich evaluierte ebenfalls, zu welchem Zeitpunkt die Kulturen für die Untersuchung der Plasmazell- und Antikörperbildung am besten gestoppt werden sollte, also zu welchem Zeitpunkt der Plasmazellanteil und die Antikörperkonzentrationen am größten sind, da hier ein potentieller Effekt der Wirkstoffe am deutlichsten zu Tage treten sollte. Weil die Isolation von B-Lymphozyten sowohl sehr kosten- als auch zeitaufwendig ist, suchte ich hierbei auch nach einem Kompromiss, um gleichzeitig die Zellen am Gefäßboden und die Ig-Konzentrationen im Überstand zu untersuchen. Es stellte sich

heraus, dass dieser Zeitpunkt am sechsten Tag nach der Isolation lag, da hier die Ig-Konzentrationen bereits deutlich angestiegen, die kurzlebigen Plasmazellen aber noch nicht abgestorben waren (siehe Abb. 3.2).

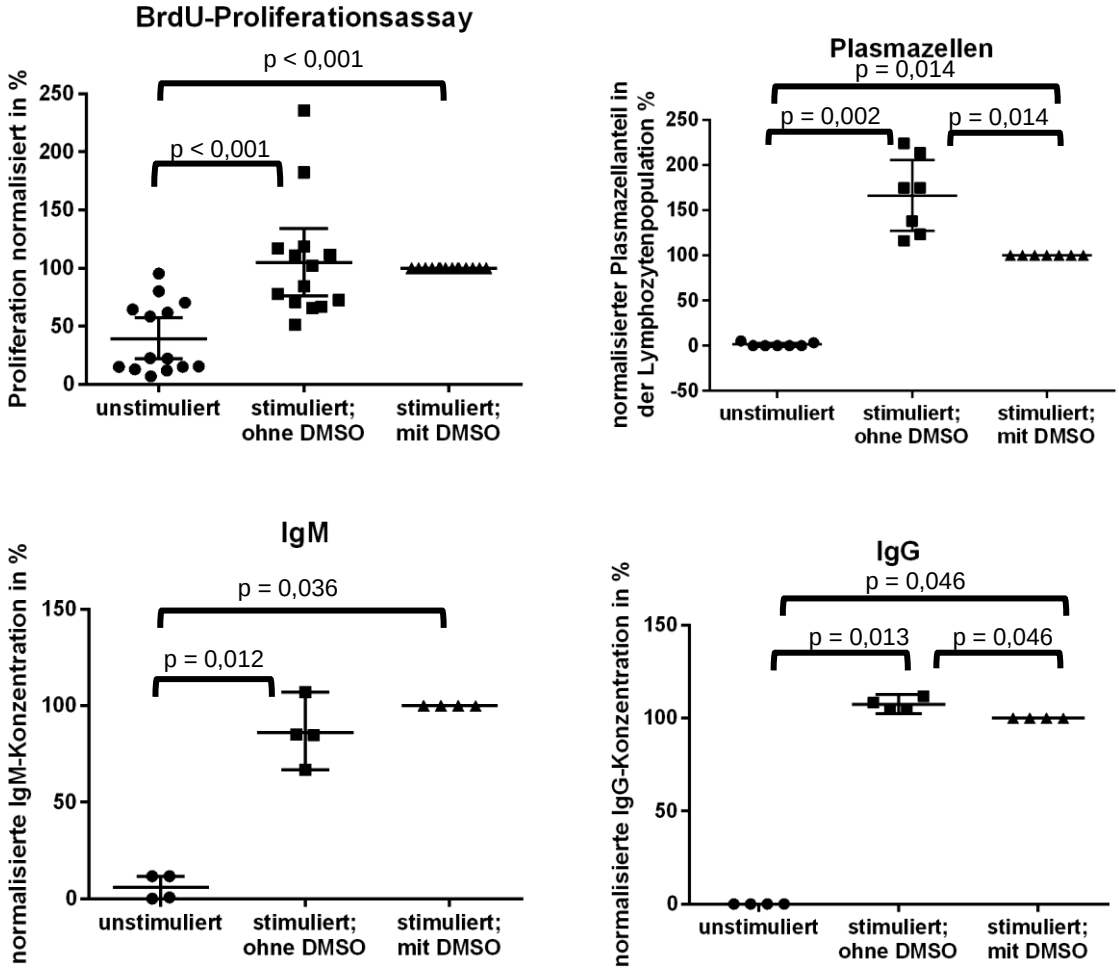


Abb. 3.1: Als Punkte in Streudiagrammen dargestellt sind jeweils normalisiert die Mittelwerte der Doppelbestimmungen der isolierten B-Lymphozyten (n=14) sowie deren Differenzierung zu Plasmazellen (n=7) und die Bildung von IgM- und IgG-Antikörpern (je n=4) mit Mittelwert und 95%-Konfidenzintervall als Linien, verglichen werden jeweils unstimulierte Zellen mit stimulierten Zellen ohne DMSO-Zusatz und mit stimulierten Zellen mit DMSO-Zusatz, auf deren Werte zur besseren Vergleichbarkeit jeweils normalisiert wurde. Die Stimulation mit anti-CD40-Antikörpern und IL-21 steigert dabei die Proliferation der B-Lymphozyten und induziert die Bildung von Antikörpern und Plasmazellen, die jeweils in unstimulierten Kulturen kaum nachweisbar sind. Ich wandte hier den Friedmann-Test für verbundene, nicht-normalverteilte Daten mit multiplen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls an.

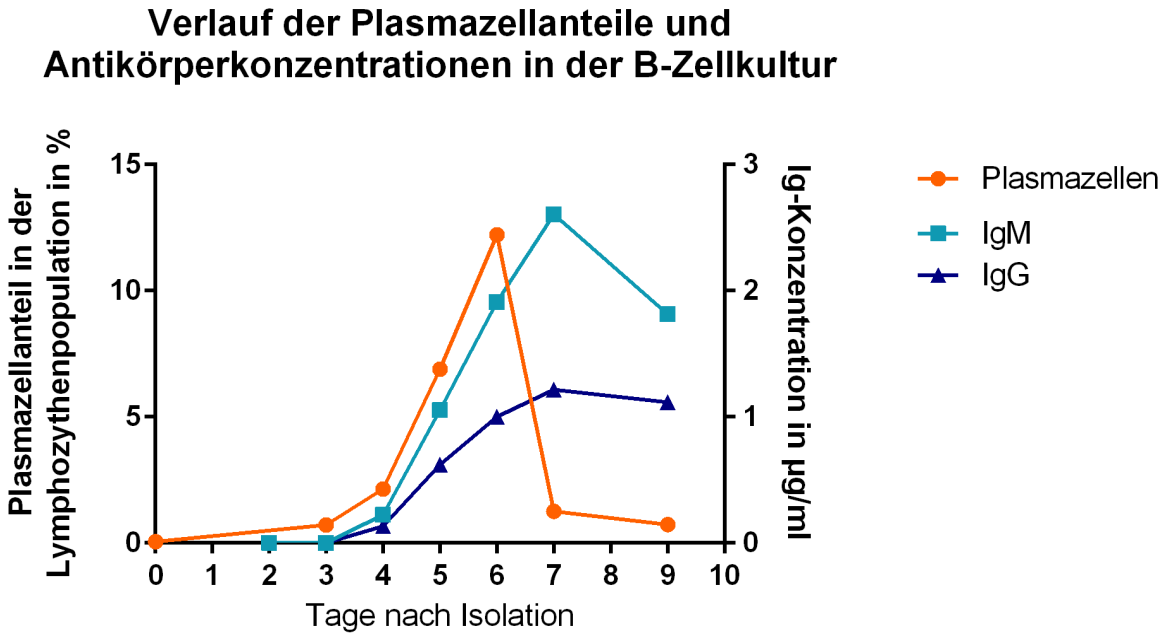


Abb. 3.2: Dargestellt sind gemessenen Werte der IgM- und IgG-Konzentrationen (rechte Hochachse) sowie der Anteil an Plasmazellen in der Lymphozytenpopulation (linke Hochachse) (je n=1) jeweils an verschiedenen Tagen nach Isolation der Zellen. Angezeigt ist jeweils der Mittelwert der Doppelbestimmung. Am sechsten Tag war der Plasmazellanteil am höchsten, während die Antikörperkonzentrationen am siebten Tag noch etwas anstiegen. Danach blieben die IgG-Konzentrationen konstant, während sich die IgM-Menge verringerte. Aufgrund des starken Abfalls des Plasmazellanteils am siebten Tag und der auch schon am Vortag deutlich erhöhten Antikörpermengen wählte ich den sechsten Tag als Endpunkt der B-Zellinkubation für die Plasmazell- und Antikörperversuche aus.

3.1.2 Ceforanid, Itoprid und Progesteron steigern die Proliferation isolierter humaner B-Zellen

Für die Validierung des im ersten Screening aufgefallenen proliferationssteigernden Effekts der acht Substanzen stimulierte ich aus humanem Blut isolierte B-Lymphozyten von bis zu 15 Spendern und inkubierte sie jeweils für fünf Tage mit den Wirkstoffen in drei Konzentrationen (1µM. 0,1µM und 0,01µM) sowie deren Lösungsmittel DMSO (siehe Kapitel 2.4), wobei ich die Ergebnisse mit unstimulierten Zellen und unbehandelten, stimulierten Zellen derselben Kultur verglich. Proliferierende Zellen bauen angebotenes BrdU in ihre DNA ein, wobei dieser Einbau mit der Proliferationsrate ansteigt. Ein Anstieg der B-Zellproliferation lässt darauf schließen, dass das aktivierende Signal verstärkt wurde und lässt eine Steigerung der Immunantwort, also eine durch den Wirkstoff verursachte Wirkung, vermuten.

Die vollständigen Ergebnisse der BrdU-Proliferationsassays sind in Abbildung 3.3. dargestellt. Die im Assay gemessen Werte wurden jeweils gegen die zugehörige Kontrollmessung (stimulierte Zellen mit DMSO ohne Medikamente) normalisiert. Das bedeutet, dass der Kontrollwert als 100% definiert wurde und die übrigen Werte ins Verhältnis zu diesem gesetzt wurden. Dies ermöglicht es, die Messwerte untereinander besser zu vergleichen.

Ich konnte zeigen, dass die Medikamente Ceforanid und Itoprid (je 0,1µM und 1µM) sowie das Hormon Progesteron (1µM) in der Lage sind, die B-Zell-Proliferation in vitro signifikant gegenüber der Kontrolle zu steigern (berechnet wurde eine Varianzanalyse, siehe Kapitel 2.17). Im Mittel betrug diese Steigerung 23-43%, wobei die Einzelwerte individuell variierten. Mit steigender Konzentration stieg jeweils auch die Zellproliferation. Die übrigen Substanzen konnten zwar im Mittelwert die Proliferation ebenfalls steigern, dies konnte ich jedoch nicht ausreichend statistisch untermauern. Diese Ergebnisse schließen die Ergebnisse der Kombinationstestungen (siehe unten) sowie drei Vorversuche von Kazuko Matsumoto mit ein, die im gleichen Labor nach gleichem Protokoll durchgeführt wurden. Es kam zu unterschiedlichen Anzahlen der Versuchsdurchführungen, da ich nicht immer genügend Zellen von jedem Spender isolieren konnte, um jedes Medikament zu testen, außerdem wurde nicht jeder Wirkstoff in die später beschriebenen Kombinationsuntersuchungen übernommen. Diese Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass sich die im ursprünglichen Screening erhobenen Befunde für einige Wirkstoffe erfolgreich validieren lassen und dass eine dosisabhängige Steigerung der mit anti-CD40-Antikörpern und IL-21 erwirkten Proliferation möglich ist.

3.1.3 Alle Wirkstoffe haben in den untersuchten Konzentrationen keine toxische Wirkung auf isolierte humane B-Zellen

Parallel führte ich Zytotoxizitätsassays durch, die die Freisetzung intrazellulären LDHs messen. Diese lässt Rückschlüsse auf die Menge der abgestorbenen Zellen im Reaktionsgefäß und damit auf einen möglichen toxischen Effekt eines Wirkstoffs zu.

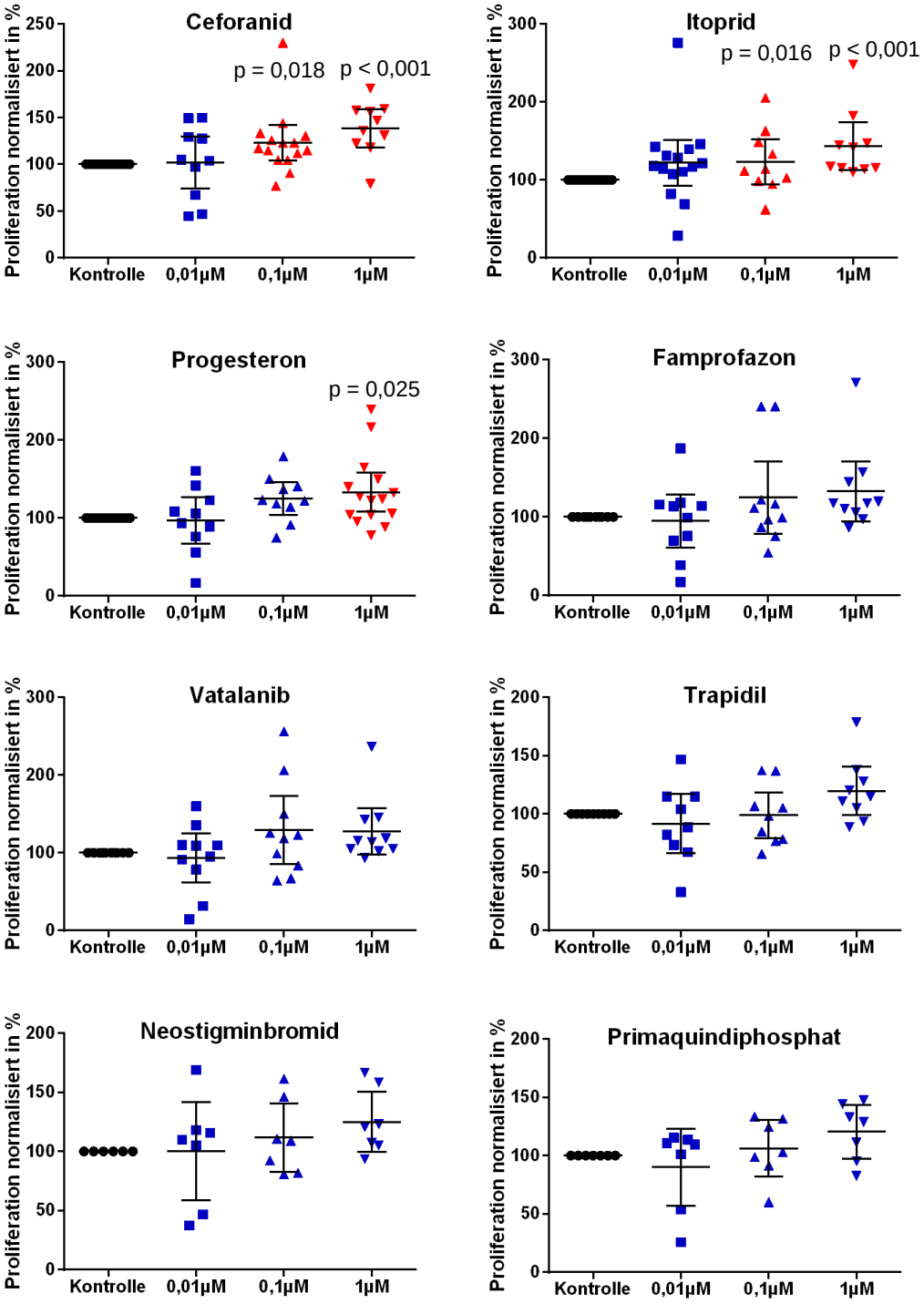


Abb 3.3: Gezeigt sind Streudiagramme der Ergebnisse der BrdU-Proliferationsassays (n = 7-15), wobei jeder Punkt dem Mittelwert einer Doppelbestimmung entspricht. Je höher ein Punkt, desto stärker proliferierten die Zellen in dieser Kultur nach fünf Tagen Inkubation. Ich testete acht Wirkstoffe in je drei Konzentrationen. Die schwarzen Punkte entsprechen der Kontrollkultur (stimulierte Zellen mit DMSO ohne Medikament) auf die normalisiert wurde, blau sind die mit Medikamenten versetzen Kulturen, während diejenigen, die eine statistisch signifikante Steigerung der Proliferation gegenüber der Kontrollkultur (in einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen nach Dunn) aufwiesen, rot dargestellt sind. Dies ist bei Ceforanid, Itoprid und Progesteron der Fall. Die Linien zwischen den Punkten zeigen jeweils den Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall.

Hätte eine Substanz einen derartigen Effekt, spräche das gegen weitere Untersuchungen in Tierversuchen und würde einen möglichen B-Zell-Funktions-steigernden Effekt in Frage stellen. Um einen möglichen toxischen Effekt nicht mit falsch-positiven Befunden durch die natürliche Apoptose „verbrauchter“ aktivierter Zellen zu verdecken, führte ich diesen Test bereits am Folgetag der Isolation durch. Wie die Abbildung 3.4 zeigt, wies keine der Substanzen in den getesteten Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt auf. Für die meisten Substanzen lag der Mittelwert der normalisierten LDH-Freisetzung geringfügig unter dem Kontrollwert. Einzig Neostigminbromid zeigte in Konzentrationen von 0,1µM und 1µM sogar eine signifikante Reduktion der freigesetzten LDH-Menge, also weniger tote Zellen als in der Kontrollkultur. Für die statistische Berechnung kam eine einfaktorielle Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen (Methode nach Dunn) zur Anwendung (Siehe 2.17).

3.1.4 Die Kombination der wirksamen Substanzen steigert die Proliferation nicht stärker als die Einzelsubstanzen

Des Weiteren untersuchte ich, ob sich der gezeigte proliferationssteigernde Effekt durch Kombination der Einzelsubstanzen verstärken lässt. Dies wäre therapeutisch bedeutsam, sollte sich hieraus eine Dosisreduktion der einzelnen Wirkstoffe ermöglichen, was eine Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen mit sich bringen könnte. Zu diesem Zweck kombinierte ich Ceforanid (0,1µM), Itoprid (0,01µM) und Progesteron (1µM). Ich wählte die jeweilige Konzentration, da diese zum Zeitpunkt des Experiments knapp keinen signifikanten proliferationsfördernden Effekt zeigte. Getestet habe ich die drei möglichen Kombinationen, eine Kombination aller drei Substanzen sowie die Substanzen allein im BrdU-Proliferationsassay und im LDH-Zytotoxizitätsassay.

Das Ergebnis ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Keine der Kombinationen konnte die Einzelsubstanzen im BrdU-Proliferationsassay übertreffen, die Mittelwerte liegen im gleichen Bereich wie die der Einzelsubstanzen oder sogar etwas niedriger. Im LDH-Zytotoxizitätsassay zeigten sich ebenfalls keine statistisch (siehe Kapitel 2.17) signifikanten Abweichungen zwischen den Testgruppen.

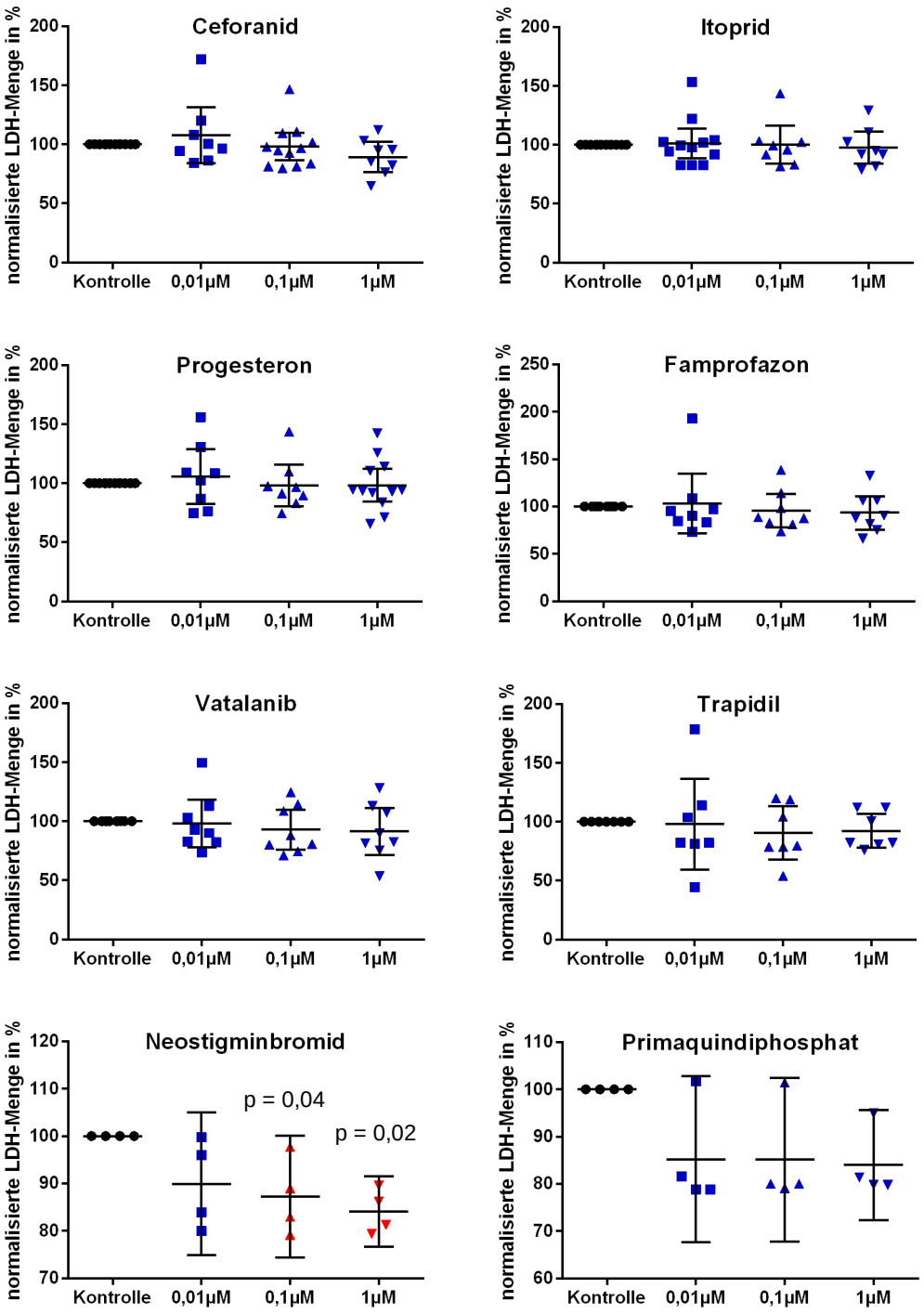
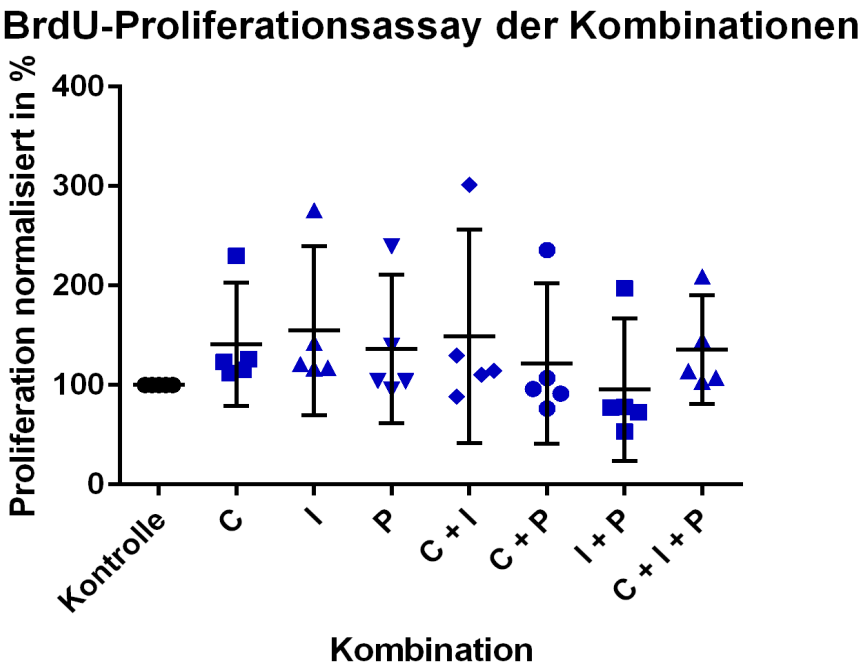


Abb 3.4: Gezeigt sind Streudiagramme der Ergebnisse der LDH-Zytotoxizitätsassays (n= 4-12) nach einem Tag Inkubation, wobei jeder Punkt dem Mittelwert einer Doppelbestimmung entspricht. Je höher ein Punkt, desto mehr tote Zellen waren in der Kultur. Die Linien zwischen den Punkten zeigen den Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall. Ich testete acht Wirkstoffe in je drei Konzentrationen. Die schwarzen Punkte entsprechen der Kontrollkultur (stimulierte Zellen mit DMSO ohne Medikament) auf die normalisiert wurde, blau sind die mit Medikamenten versetzen Kulturen, während diejenigen, die eine statistisch signifikante Abweichung vom Kontrollwert (in einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen nach Dunn) aufwiesen, rot dargestellt sind. Dies ist bei Neostigminbromid der Fall. Keine der Substanzen wirkte auf die B-Zellen toxisch.



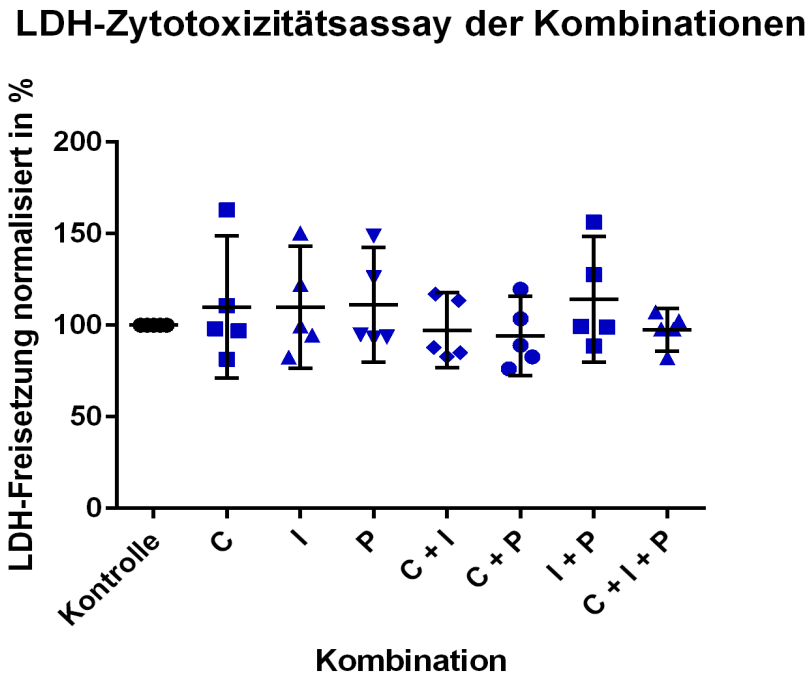


Abb. 3.5: Dargestellt sind die Ergebnisse des BrdU-Proliferationsassays (obere Abb.) und des LDH-Zytotoxizitätsassays (untere Abb.) (n = 5) für Kombinationstestung der Wirkstoffe Ceforanid (C), Itoprid (I) und Progesteron (P). Die Werte sind jeweils zu der Kontrollkultur (Zellen stimuliert mit anti-CD40-Antikörpern und IL-21 mit Zusatz von DMSO, aber ohne Medikamente) des jeweiligen Spenders, die 100% entspricht, in Bezug gesetzt. Keine Kombination konnte die Proliferationssteigerung durch die Einzelsubstanzen weiter steigern. Keine Kombination hatte in den untersuchten Konzentrationen einen signifikanten toxischen Effekt auf die isolierten B-Zellen. Für die statistische Berechnung kam eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) mit multiplen Vergleichen (Methode nach Dunn) gegen die Kontrollkultur und die Einzelsubstanzen zum Einsatz.

3.1.5 Sieben der getesteten Wirkstoffe erhöhen den Plasmazellanteil in der B-Zellkultur am sechsten Tag nach Isolation

Der entscheidende Schritt zur Entwicklung einer effizienten Antikörperantwort ist die Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen. Daher führte ich durchflusszytometrische Untersuchungen an isolierten humanen B-Lymphozyten durch, die ich wie in Kapitel 2.4 beschrieben stimulierte und für sechs Tage mit den acht Wirkstoffen inkubierte. In Kapitel 1.4 und 1.5 habe ich beschrieben, dass Plasmazellen sowohl den Rezeptor CD27 als auch das Enzym CD38 exprimieren, aber im Gegensatz zu B-Lymphozyten nicht mehr CD19 aufweisen. Dies kommt hier zum Tragen: Plasmazellen sind demnach die Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation, die sich gleichzeitig über CD27 und CD38 anfärben lassen, aber nicht über CD19. Zunächst evaluierte ich in Vorversuchen ohne die zu testenden Substanzen, dass der optimale Zeitpunkt hierfür um den sechsten Tag nach Isolation der Zellen liegt (siehe 3.1.1). Im Anschluss inkubierte ich isolierte, stimulierte B-Zellen auf die gleiche Weise wie zur Vorbereitung auf die zuvor beschriebenen Assays (siehe 2.4) und führte nach sechs Tagen die FACS-Analyse durch (siehe Abb. 2.5). In Abbildung 3.6 sind die normalisierten Ergebnisse der FACS-Analyse hinsichtlich der Plasmazell-Entwicklung dargestellt. Die statistische Berechnung entspricht der zuvor beschriebenen (siehe 2.17).

Ceforanid, Vatalanib und Neostigminbromid bewirkten jeweils in Konzentrationen von 0,1µM und 1µM eine statistisch signifikante Steigerung der Plasmazellbildung gegenüber der Kontrolle. Mit Itoprid, Progesteron, Famprofazon, und Trapidil gelang dies sogar in allen getesteten Konzentrationen. Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, sind dabei oftmals mehr als doppelt so viele Plasmazellen wie in der Kontrollkultur nachweisbar. Die Einzelwerte schwankten dabei jedoch deutlich, vor allem in den niedrigeren Konzentrationen. Die Mittelwerte in den 1µM-Kulturen liegen zwar etwas niedriger, jedoch fällt die Standardabweichung hier deutlich stärker ab. Keine statistisch signifikante Steigerung der Plasmazellbildung findet in den mit Primaquindiphosphat behandelten Kulturen statt.

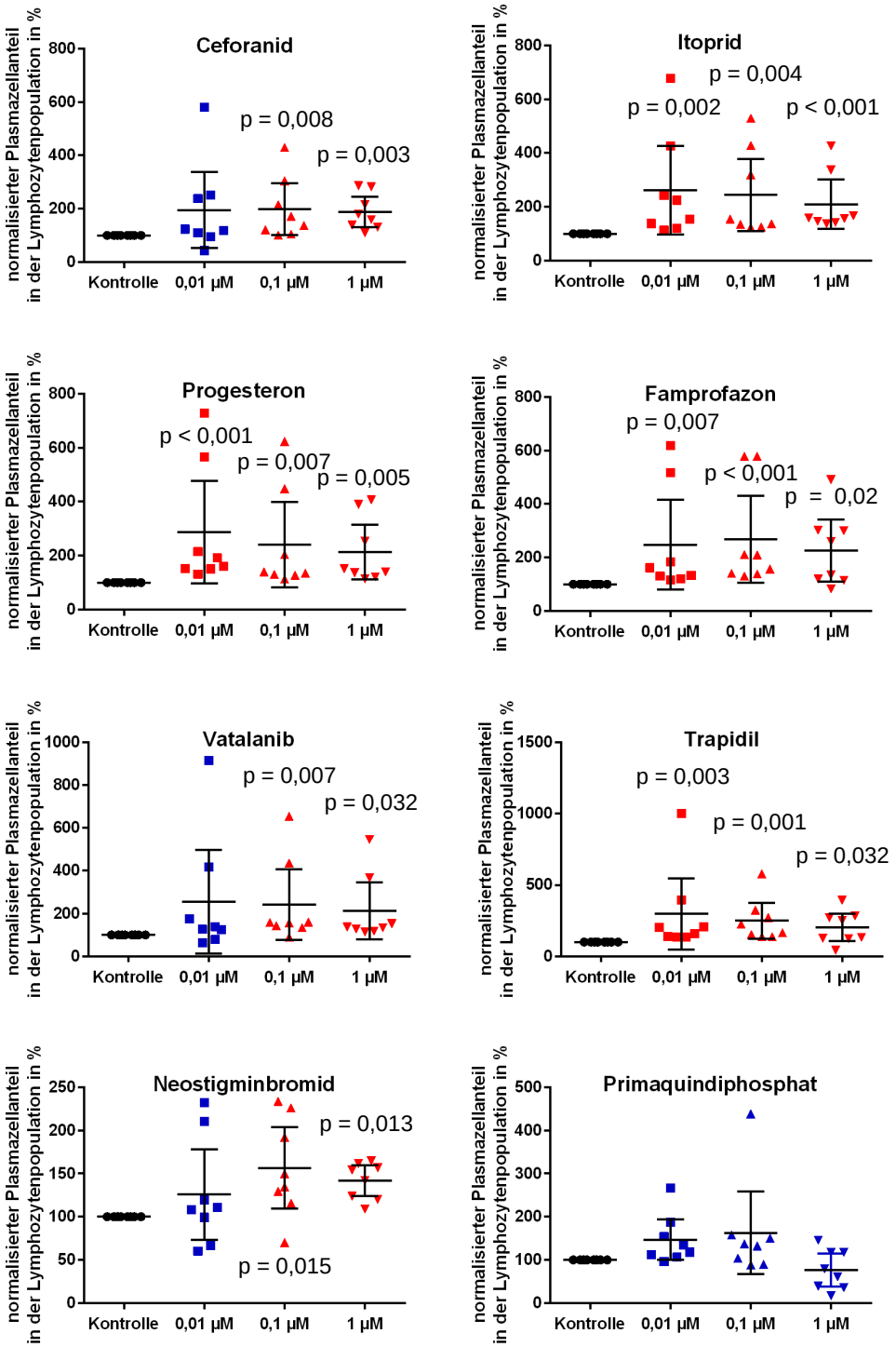


Abb 3.6: Gezeigt sind Streudiagramme der Ergebnisse der FACS-Analyse der B-Lymphozytenkultur hinsichtlich der Plasmazellbildung (n = 8). Je höher ein Punkt, desto größer war der Anteil an Plasmazellen ($CD19^-CD27^+CD38^+$-Zellen) in der betrachteten Lymphozytenpopulation nach sechs Tagen Inkubation. Ich testete acht Wirkstoffe in je drei Konzentrationen. Die schwarzen Punkte entsprechen der Kontrollkultur (stimulierte Zellen mit DMSO; ohne Medikament), auf die normalisiert wurde, blau sind die mit Medikamenten versetzen Kulturen, während diejenigen, die eine statistisch signifikante Steigerung des Plasmazellanteils gegenüber der Kontrollkultur (in einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen nach Dunn) aufwiesen, rot dargestellt sind. Dies ist nur bei Primaquindiphosphat nicht der Fall. Die Linien zeigen jeweils den Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall.

3.1.6 Ceforanid, Itoprid, Progesteron, Famprofazon und Trapidil steigern sowohl die Produktion von IgM- als auch die von IgG-Antikörpern *in vitro*

Das zentrale Element der B-Zell-Funktion ist die Produktion von Antikörpern, die im Immunsystem eine Schlüsselrolle einnehmen, indem sie einerseits direkt Krankheitserreger bekämpfen und andererseits als Kommunikationsmittel zum unspezifischen Immunsystem fungieren. IgM-Antikörper werden dabei zu Beginn der Immunantwort produziert und im Verlauf von den langanhaltenden IgG-Antikörpern abgelöst. Diese werden daher als Parameter zur Evaluation des Impferfolges herangezogen. Ich prüfte deshalb, ob sich durch die Zugabe der Substanzen auch die Antikörperproduktion durch die entwickelten Plasmazellen steigern lässt. Dazu entnahm ich am sechsten Tag nach Isolation der Zellen den Überstand, bevor ich die Zellen für die zuvor beschriebene FACS-Analyse (siehe 3.1.5) färbte, und maß die IgM- und IgG-Konzentration mittels ELISA. Mehrere Proben konnten dabei aufgrund sehr geringer Antikörperkonzentrationen oder zu spät erkannter Erkrankung der Spender nicht ausgewertet werden. Die statistische Berechnung erfolgte wie unter 2.17 beschrieben.

Die Abbildungen 3.7 und 3.8 zeigen die Ergebnisse getrennt nach IgM und IgG. Ceforanid (1µM), Itoprid (0,1µM und 1µM), Progesteron (0,01µM und 0,1µM), Famprofazon (0,1µM) sowie Trapidil und Neostigminbromid (jeweils 1µM) steigerten signifikant die Menge der IgM-Antikörper im Überstand durchschnittlich auf etwa das Doppelte der Kontrollkultur. Nicht ganz so deutlich fiel der Effekt für die IgG-Antikörper aus. Jeweils in der höchsten getesteten Konzentration (1µM) konnten Ceforanid, Itoprid und Progesteron (zusätzlich bei 0,01µM) die produzierte IgG-Menge im Überstand durchschnittlich auf das Anderthalbfache der Kontrolle steigern. Ebenfalls gelang dies durch Beigabe von Famprofazon (0,01µM und 0,1µM) und in etwas schwächerem Ausmaß für Trapidil (0,01µM). Diese fünf Wirkstoffe bewirkten also sowohl eine Steigerung der IgG- als auch der IgM-Produktion, während die Neostigminbromidbeigabe nur die IgM-Menge erhöhte. In Kulturen, die mit Vatalanib oder Primaquindiphosphat versetzt wurden, konnte ich keine statistisch signifikante Steigerung der Antikörperproduktion feststellen.

.

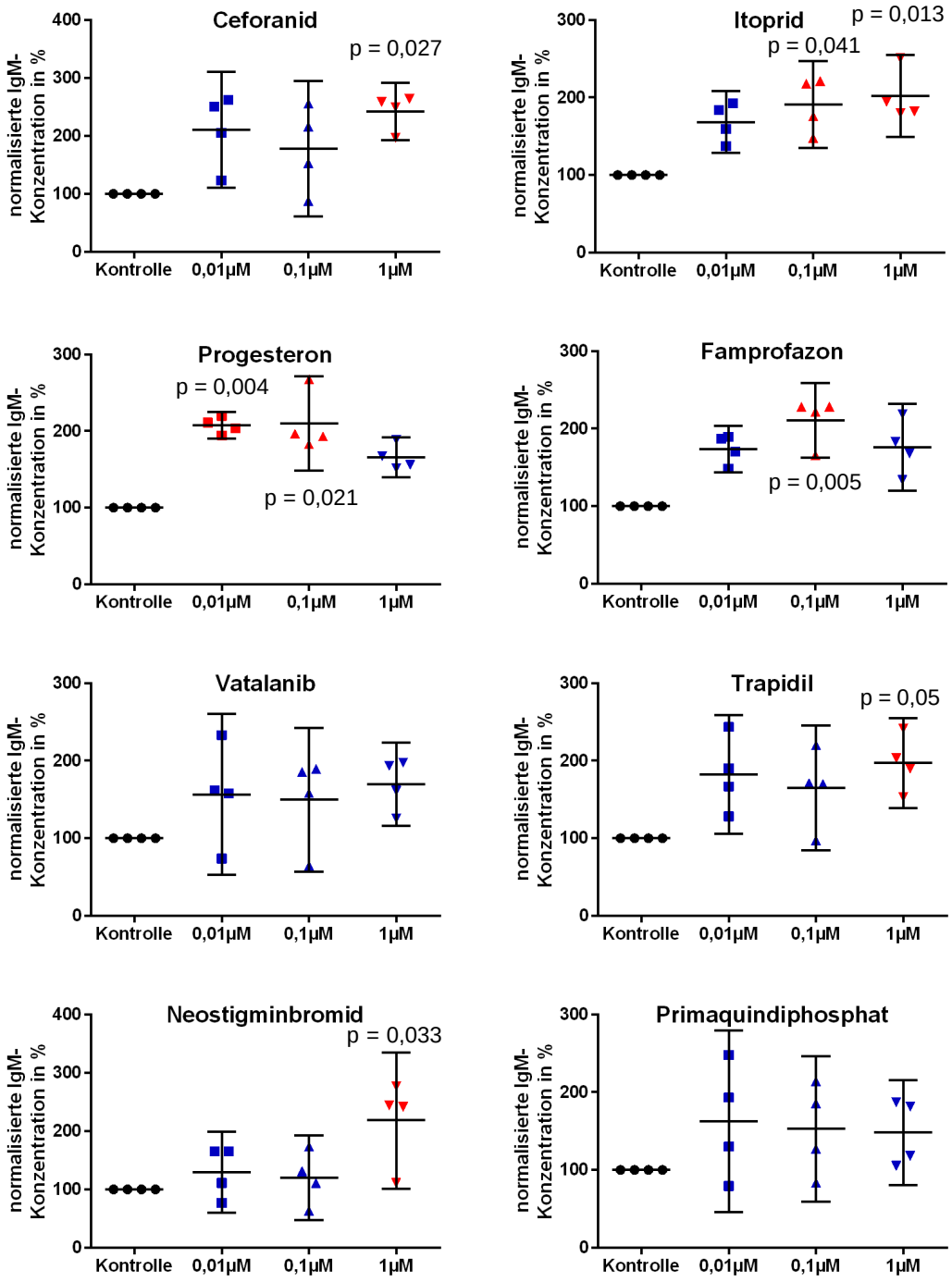


Abb 3.7: Gezeigt sind Streudiagramme der normalisierten Ergebnisse der IgM-Quantifizierungs-ELISAs der B-Lymphozytenkultur (n = 4). Je höher ein Punkt, desto größer war die Menge produzierten IgMs im Überstand nach sechs Tagen Inkubation. Ich testete acht Wirkstoffe in je drei Konzentrationen. Die schwarzen Punkte entsprechen der Kontrollkultur (stimulierte Zellen mit DMSO ohne Medikament) auf die normalisiert wurde, blau sind die mit Medikamenten versetzen Kulturen, während diejenigen, die eine statistisch signifikante Steigerung der IgM-Konzentration gegenüber der Kontrollkultur (in einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen nach Dunn) aufwiesen, rot dargestellt sind. Ceforanid, Itoprid, Progesteron, Famprofazon sowie Trapidil und Neostigminbromid steigerten signifikant die Menge der IgM-Antikörper im Überstand. Die Linien zwischen den Punkten zeigen jeweils den Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall.

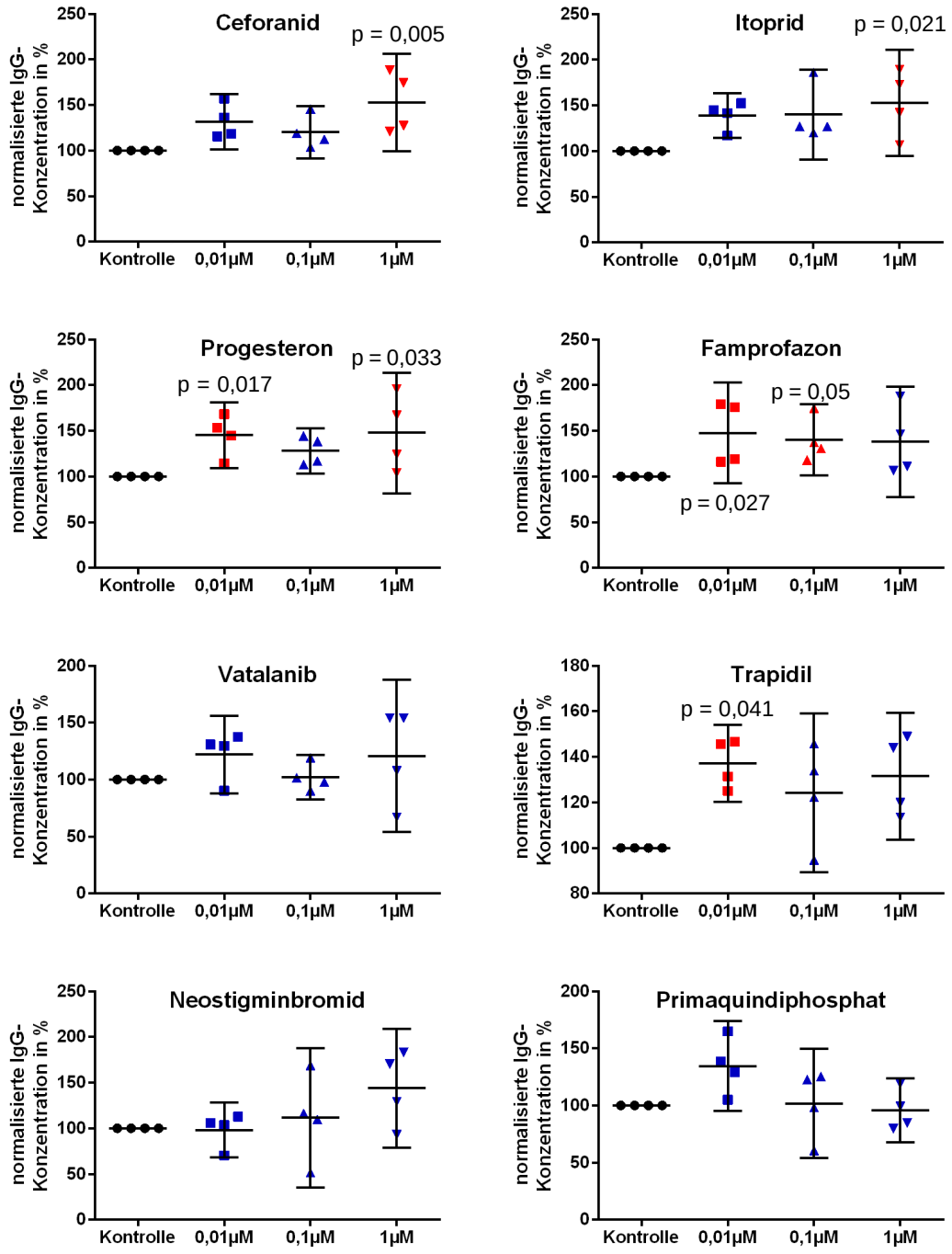


Abb 3.8: Gezeigt sind Streudiagramme der normalisierten Ergebnisse der IgG- Quantifizierungs-ELISAs der B-Lymphozytenkultur (n = 4). Je höher ein Punkt, desto größer war die Menge produzierten IgGs im Überstand nach sechs Tagen Inkubation. Ich testete acht Wirkstoffe in je drei Konzentrationen. Die schwarzen Punkte entsprechen der Kontrollkultur (stimulierte Zellen mit DMSO ohne Medikament) auf die normalisiert wurde, blau sind die mit Medikamenten versetzen Kulturen, während diejenigen, die eine statistisch signifikante Steigerung der IgG-Konzentration gegenüber der Kontrollkultur (in einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit multiplen Vergleichen nach Dunn) aufwiesen, rot dargestellt sind. Dies war bei fünf der getesteten Wirkstoffe der Fall. Die Linien zwischen den Punkten zeigen jeweils den Mittelwert sowie das 95%-Konfidenzintervall.

3.2 *In vivo* Validierung der *in vitro* beobachteten B-Zellfunktionssteigernden Wirkungen von Ceforanid und Progesteron

Die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse zeigen bisher unbekannte Wirkungen etablierter Pharmaka. Diese gehen jedoch auf isolierte B-Lymphozyten und eine künstliche Stimulation mit nur zwei Elementen der komplexen B-Zell-Aktivierung (siehe Kapitel 1.4 und 2.4) zurück. Bindeglied zwischen der künstlichen B-Zell-Aktivierung im Reagenzglas und der Anwendung bei Impfungen am Menschen ist hier der Tierversuch. Ein murines Modell einer aktiven Immunisierung bringt gegenüber den *in-vitro*-Experimenten die zusätzlichen Vorteile der Aktivierung durch ein Antigen und der umfangreichen Stimulation durch das Zusammenspiel der Immunzellen, sodass die neu entdeckten Wirkungen der Substanzen viel realitätsgetreuer untersucht werden können. Die aufwendige *in vitro*-Untersuchung war jedoch unbedingt notwendig, um eine Vorauswahl der vielversprechendsten Substanzen zu treffen und dadurch möglichst wenig Tiere verwenden zu müssen.

Heraus stachen hierbei Ceforanid, Itoprid und Progesteron, die jeweils in allen *in vitro*-Versuchen die B-Zell-Funktion signifikant steigerten. Die Umstände ermöglichten die *in vivo*-Testung zweier Medikamente gegen eine Kontrollgruppe, also wählte ich Ceforanid und 17α-Hydroxyprogesteron (als physiologische, hydrophile Form des Steroidhormons) für die Anwendung im Tierversuch aus, da für beide die intraperitoneale Applikation mit PBS als Lösungsmittel bereits beschrieben war (Joiner et al. 1981, Veillon et al. 2009), sodass nur eine Kontrollgruppe, die nur das Lösungsmittel PBS erhielt, benötigt wurden. Da ich aufgrund des gänzlich anderen Versuchsaufbaus von einer geringeren benötigten Wirkstoffmenge, bei gleichzeitiger Gabe über einen längeren Zeitraum ausging, verringerte ich die beschriebenen Dosen, um etwaige Nebenwirkungen zu reduzieren und Kosten zu sparen. Gewählt wurde das unter 2.10 beschriebene Modell der aktiven Immunisierung zur Induktion der Epidermolysis bullosa acquisita, welches den Vorteil aufweist, bei den verwendeten BALB/cJ-Mäusen zwar eine Antikörperbildung auszulösen, ohne dabei aber die klinischen Symptome auszuprägen. Eine mögliche Steigerung der Immunreaktion würde demnach nicht zwangsläufig mit einer Leidensvergrößerung einhergehen.

Die Mäuse erhielten über drei Wochen täglich das jeweilige Medikament respektive nur PBS (Kontrollgrupppe), ich entnahm wöchentlich Blut und bei Versuchsende zusätzliche Milz und Lymphknoten (inguinal und popliteal). Der Versuch wurde

zweimal hintereinander mit insgesamt sechs Tieren pro Gruppe durchgeführt, deren Ergebnisse hier zusammengeführt dargestellt werden. Aus der Kontrollgruppe der letzten Woche des ersten Versuchs konnten nur drei der ursprünglichen sechs Mäuse ausgewertet werden. Es traten keine Nebenwirkungen der Medikamente auf oder Symptome der EBA wie Blasen, Kusten oder andere Läsionen auf.

3.2.1 Die Immunisierung mit mCol7-vWFA2 bewirkt eine Immunreaktion, die mit einer Steigerung der Plasmazellanteile und Antikörperproduktion, aber nicht der B-Lymphozyten, einhergeht

Nur wenn das Immunsystem der Mäuse dieses Antigen als solches erkennt und dementsprechend bekämpft, wäre das Modell zur Betrachtung einer etwaigen Steigerung der B-Zell-Funktion geeignet. Um zu prüfen, ob die Immunisierung mit mCol7-vWFA2 tatsächlich die beabsichtigte Immunreaktion auslöst, betrachtete ich zunächst die Kontrollgruppe, die täglich nur PBS ohne weiteres Medikament enthielt. Die Daten (siehe Abb 3.9) sind den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analysen und den Antikörperkonzentrationsbestimmungen mittels ELISA entnommen.

Zwar stiegen die Anteile der B-Lymphozyten innerhalb der Lymphozytenpopulation nicht an, zwei Wochen nach der Immunisierung waren aber statistisch signifikant mehr Plasmazellen sowie IgM- und IgG-Antikörper (jeweils sowohl in der Gesamt-konzentration als auch nur die Menge mCol7-spezifischer Antikörper) nachweisbar, sodass ich von einer adäquaten Immunreaktion ausgehe.

3.2.2 Weder Ceforanid noch Progesteron haben einen Einfluss auf die Menge der B-Lymphozyten, Plasmablasten und Plasmazellen

In vitro konnte ich zeigen, dass die beiden getesteten Substanzen die Proliferation humaner, isolierter B-Lymphozyten erhöhen und darüber hinaus die Differenzierung zu Plasmazellen zu steigern vermögen. Um zu überprüfen, ob dieser Befund *in vivo* anhält, führte ich FACS-Analysen des entnommenen Blutes in zwei Färbungen durch. Die erste Färbung ermöglichte es, $CD3^+$ T-Lymphozyten, $CD19^+$ B-Lymphozyten und Ly-$6G^+$-Neutrophile Granulozyten voneinander zu unterscheiden. Die Durchführung und Analyse der Färbung ist in Kapitel 2.13 beschrieben. In Abbildung 3.10 ist der prozentuelle Anteil der B-Lymphozyten innerhalb der Lymphozytenpopulation dargestellt.

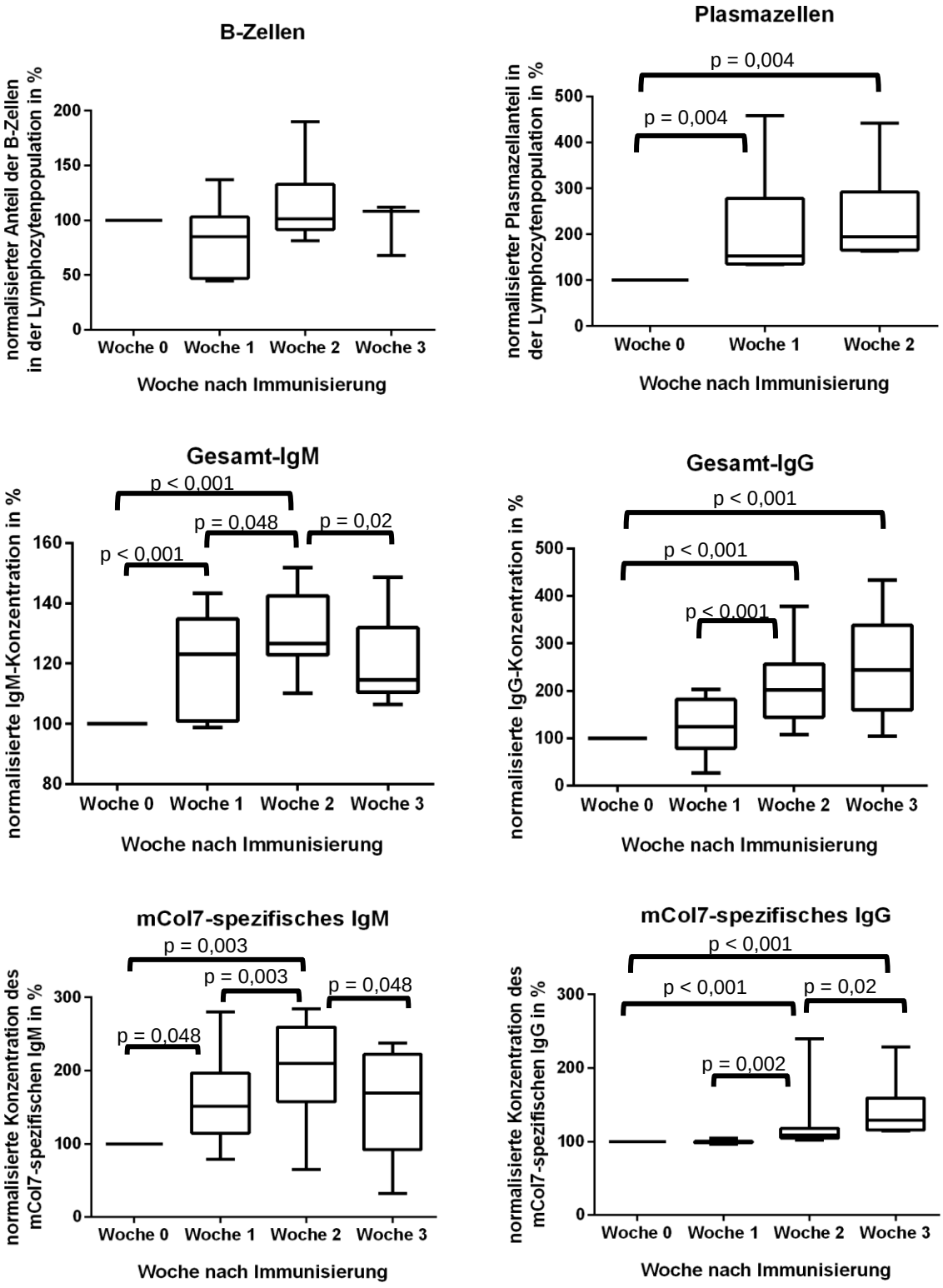


Abb. 3.9: Gezeigt sind die Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der jeweiligen Messungen innerhalb der Kontrollgruppe (nur PBS) für die durchflusszytometrische Bestimmung der Anteile der B-Lymphozyten und Plasmazellen in der Lymphozytenpopulation sowie der Konzentrationen des jeweils gesamten und mCol7-spezifischen IgM und IgG. Die Plasmazell- und Antikörperkonzentrationen steigen nach der Immunisierung jeweils statistisch signifikant an, der B-Zell-Anteil bleibt etwa konstant. Zur Berechnung wurde der Friedmann-Test mit multiplen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls angewandt.

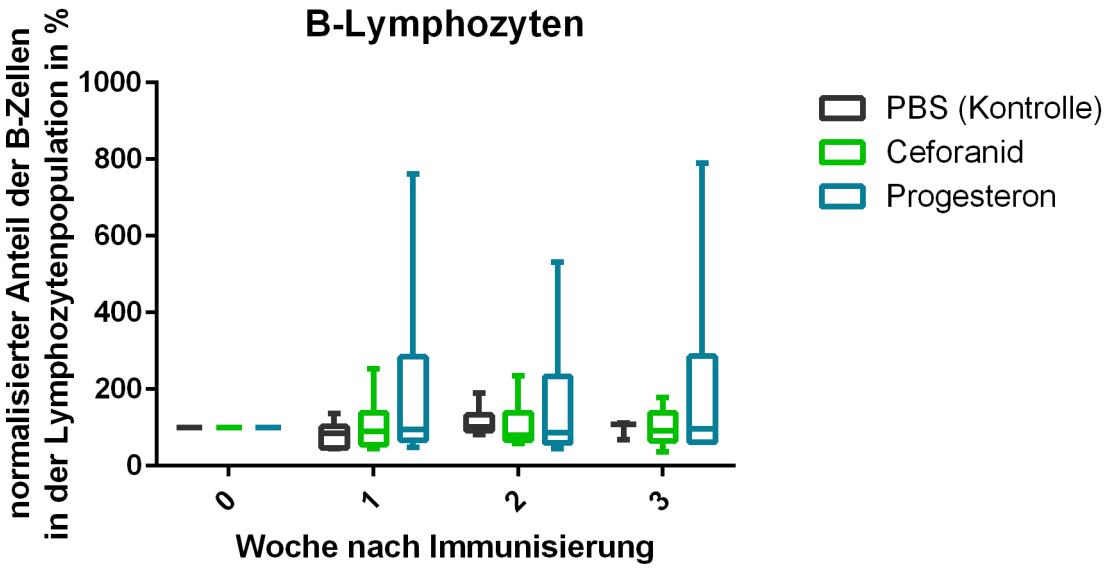


Abb. 3.10: Dargestellt sind jeweils die Medianwerte, Quartile und 90%-Perzentile der Kontrollgruppe (PBS) und der beiden Behandlungsgruppen (Ceforanid und Progesteron) (je n=6, außer Woche 3 PBS, hier ist n = 3) für die jeweiligen normalisierten Anteile der B-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation über die Zeit. Zur Analyse wurde CellQuest™ Pro 5.2.1 verwendet. Während die Werte besonders in der Progesteron-Gruppe deutlich schwanken, bleiben die Medianwerte konstant und ohne deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Dementsprechend ließ sich auch mittels zweifaktorieller Varianzanalyse und multiplen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls keine statistische Signifikanz nachweisen.

Der Anteil der B-Lymphozyten bleibt weitestgehend konstant. Zwischen den Behandlungsgruppen lassen sich keine starken Unterschiede ausmachen, wobei die Messwerte sich besonders innerhalb der Progesteron-Gruppe deutlich unterscheiden. Inerhalb keiner Gruppe steigen die B-Zellen mit der Zeit an.

Die zweite Färbung zeigt die Expression der Oberflächenmoleküle CD19, CD138 und B220 (eine CD45 Isoform). Dies ermöglicht die Identifizierung muriner Plasmazellen ($CD19^{-}CD138^{+}B220^{-}$) und muriner Plasmablasten $CD19^{+}CD138^{+}B220^{+}$) (zur Auswertung siehe 2.13). Deren Anteil im zeitlichen Verlauf ist in Abbildung 3.11 gezeigt. Zu sehen ist, dass in allen Gruppen die Plasmazellanteile innerhalb der Lymphozytenpopulation nach der Immunisierung ansteigen. Dies ist statistisch signifikant und spricht dafür, dass die Immunisierung eine adäquate Immunantwort auszulösen vermag. Zwischen den Behandlungsgruppen lassen sich jedoch keine Unterschiede feststellen.

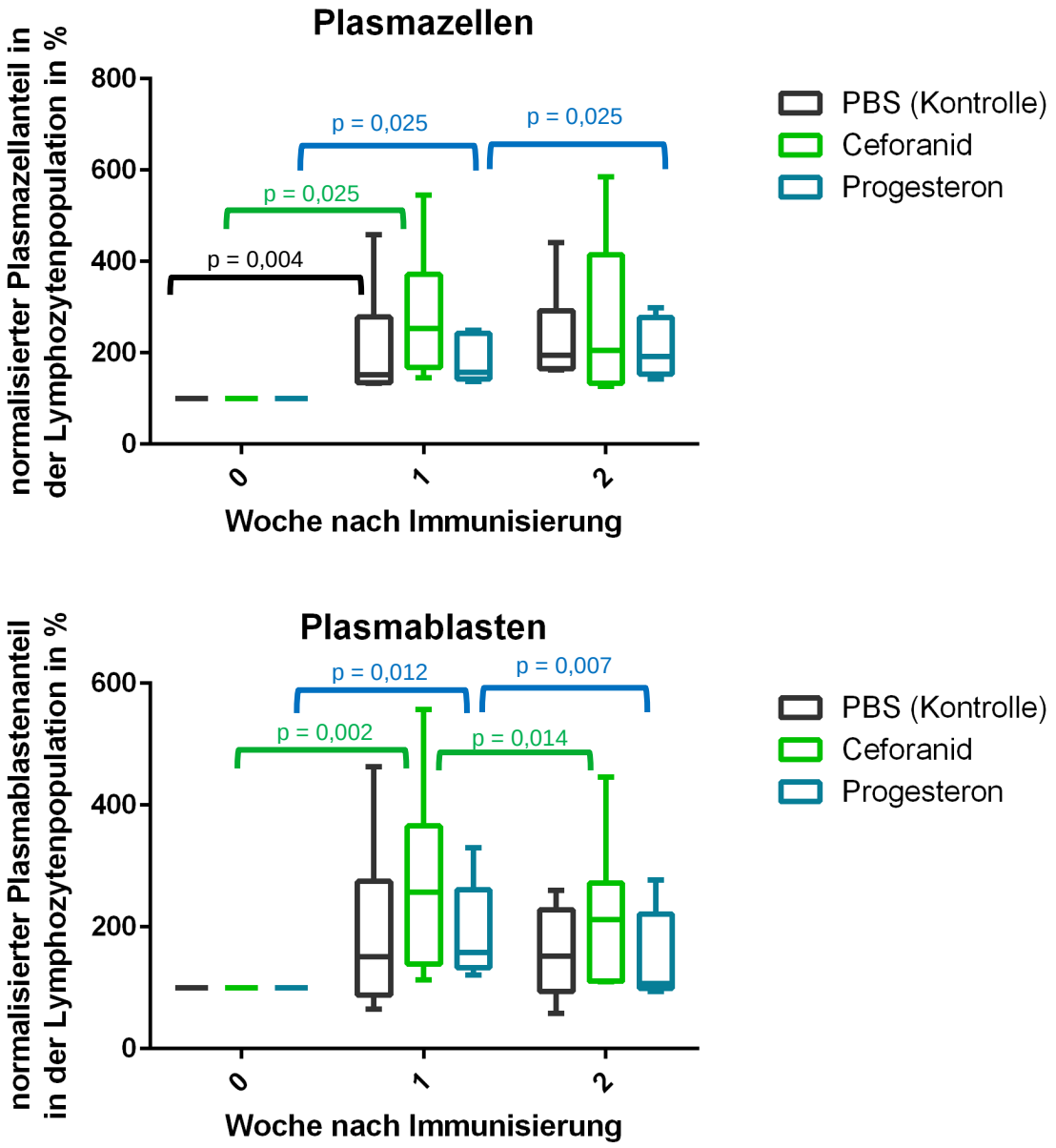


Abb. 3.11: Dargestellt sind jeweils die Medianwerte, Quartile und 90%-Perzentile der Kontrollgruppe (PBS) und der beiden Behandlungsgruppen (Ceforanid und Progesteron) (je n=6, nur Progesteron n=5) für die jeweiligen normalisierten Anteile der Plasmazellen (obere Abb.) ($CD19^{-}CD138^{+}B220^{-}$) (siehe 2.13) und die Plasmablasten (untere Abb.) ($CD19^{+}CD138^{+}B220^{+}$) (siehe 2.13) innerhalb der Lymphozytenpopulation über die Zeit. Die Auswertung erfolgte mit CellQuest™ Pro 5.2.1. Nach der Immunisierung steigen die Plasmazellanteile jeweils statistisch signifikant an, was für den Erfolg der Immunisierung spricht. Bei den Plasmablasten ist nur innerhalb der Ceforanid- und der Progesteron-Gruppe ein statistischer Anstieg über die Zeit zu beobachten. Auch durch die deutlichen Schwankungen innerhalb der einzelnen Gruppen lässt sich zwischen der Kontrolle und den behandelten Mäusen statistisch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Plasmazell- und Plasmablastenanteile feststellen. Angewandt wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse für die Vergleiche zwischen den Gruppen und der Friedmann-Test für die Vergleiche innerhalb einer Gruppe, jeweils mit multiplen Vergleichen nach Student-Newman-Keuls als Post-hoc-Test.

Auch die Plasmablasten als Vorstufen der ausdifferenzierten Plasmazellen steigen mit dem zeitlichen Verlauf an. Statistisch signifikant ist dieser Anstieg aber nur innerhalb der Ceforanid- und der Progesterongruppe.

Neben der FACS-Analyse der Blutproben entnahm ich am Versuchsendpunkt (entspricht Zeitpunkt „Woche 3 nach Immunisierung“) im Rahmen der Tötung inguinale und popliteale Lymphknoten sowie die Milz. Beide Organe wurden nach gleichem Schema gefärbt und analysiert. Die CD19/CD138/B220-Färbung wurde für die Woche 3-Blutproben sowie Milz und Lymphknoten durch eine weitere Färbung zum Nachweis antigenspezifischer Plasmazellen in den entnommenen Milzen und Lymphknoten ersetzt. Diese Färbung (siehe Kapitel 2.15) war gegen extra- und intrazelluläre Zellbestandteile gerichtet und färbte CD138, B220, vWFA2 und die Kappa-Kette. Zellen mit dem Muster $CD138^{+}B220^{-}vWFA2^{+}$ entsprechen dabei Plasmazellen, die spezifisch für mCol7-vWFA2 sind Die Ergebnisse aus Milz und Lymphknoten sind jeweils in Abbildung 3.12 dargestellt.

Zwar erhöhten sich bei Ceforanidgabe im Mittel die Anteile der B-Lymphozyten und Plasmazellen im Lymphknoten, die mCol7-spezifischen Plasmazellen fielen hier jedoch ab. In der Progesterongruppe ist das ebenso in schwächerer Ausprägung zu beobachten. Hingegen findet sich in der Milz ein umgekehrter Effekt: Bei im Mittel jeweils etwas geringerem Anteil der Plasmazellen an den Lymphozyten finden sich in der Milz bei Ceforanid- oder Progesterongabe durchschnittlich etwas mehr antigenspezifische Plasmazellen. An keiner Stelle konnte jedoch ein solcher Unterschied mit statistischer Signifikanz belegt werden.

Verglichen mit den *in vitro* erhobenen Ergebnissen (siehe 3.1.2 und 3.1.5) lässt sich der Einfluss der beiden Substanzen auf die B-Zellproliferation und die Plasmazelldifferenzierung *in vivo* nicht in diesem Ausmaß nachweisen. Ausgehend von den mittels Durchflusszytometrie erhobenen Daten gehe ich nicht davon aus, dass Ceforanid oder Progesteron in einem Immunisierungsmodell einen Einfluss auf die Proliferation der B-Zellen oder ihre Differenzierung hin zu Plasmazellen haben.

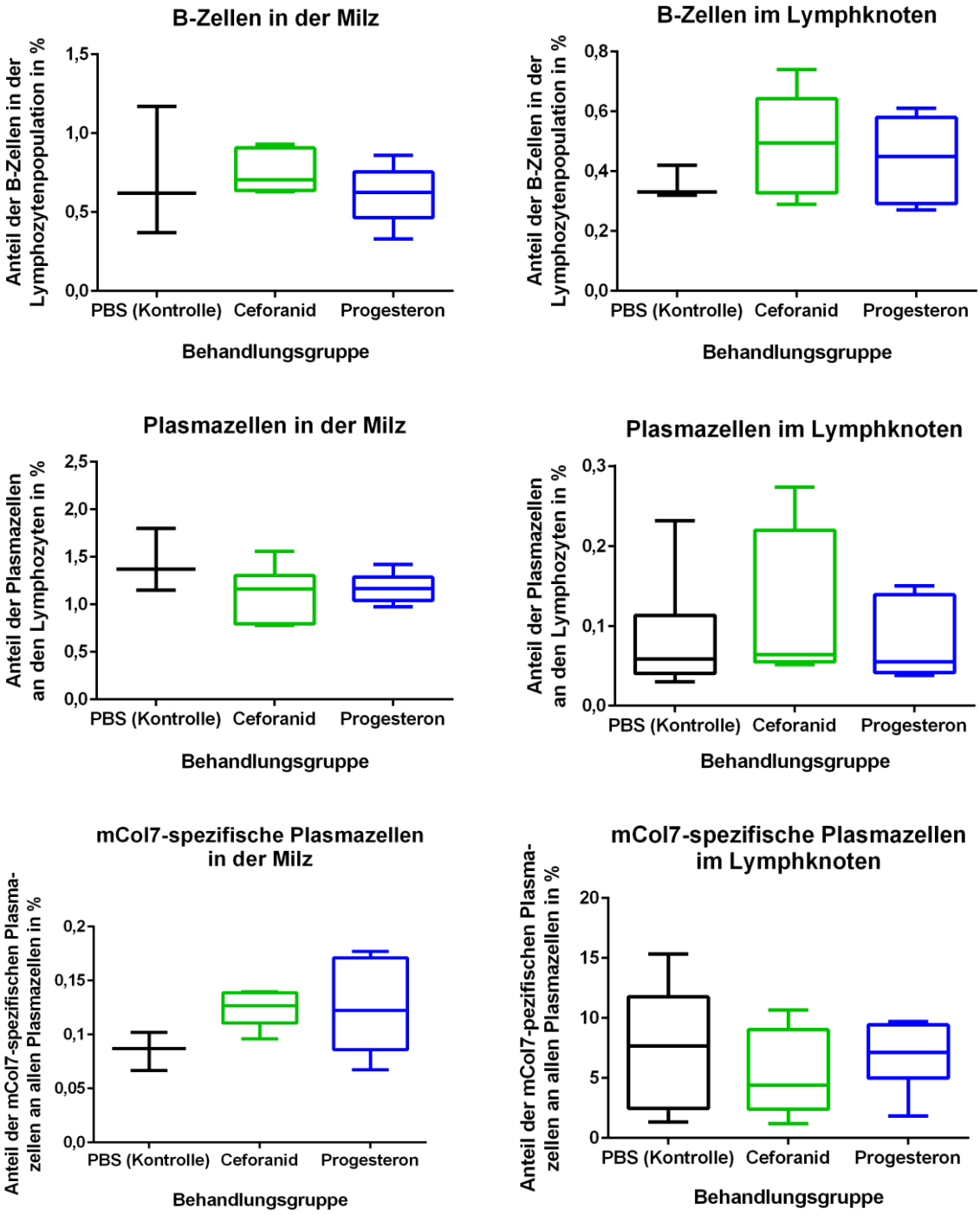


Abb. 3.12: Gezeigt sind Medianwerte, Quartile und 90%-Perzentile der normalisierten Ergebnisse der Kontrollgruppe (PBS) und der beiden Behandlungsgruppen (Ceforanid und Progesteron) (je n = 3 - 6) für die jeweiligen normalisierten Anteile der B-Zellen und Plasmazellen an der Lymphozytenpopulation sowie der mCol7-spezifischen an den übringen Plasmazellen. Links sind jeweils die Zellen aus der Milz, rechts die aus den inguinalen und poplitealen Lymphknoten dargestellt. Die Analyse erfolgte mittels CellQuest™ Pro 5.2.1 (B-Zellen) und FlowJo 10 (Plasmazellen).

Zwischen den Behandlungsgruppen ist kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen, auch da innerhalb der Gruppen teils deutlich Schwankungen der Messwerte auftraten. Geprüft wurde dies mit dem Kruskal-Wallis-Test.

3.2.3 Ceforanid und Progesteron steigern die Produktion antigenspezifischer Antikörper gegenüber der Kontrollgruppe *in vivo*

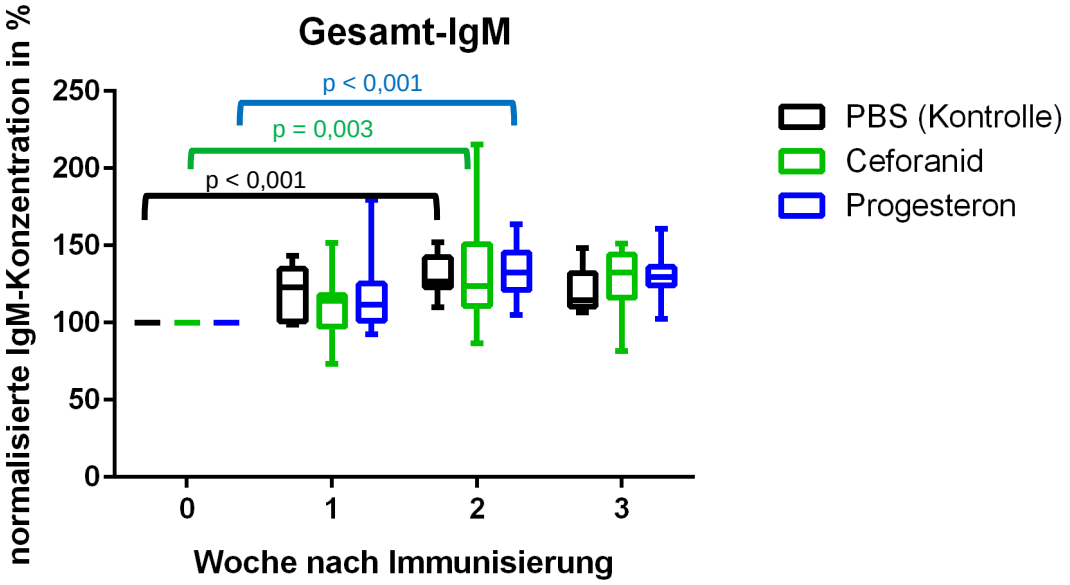
Ziel dieser Arbeit war die medikamentöse Steigerung der Immunantwort auf eine Immunisierung, wie sie auch bei Impfungen benötigt wird. Diese wird an der Menge der produzierten Antikörper gegen das Immunogen gemessen, an der sich unabhängig von der B-Zell-Zahl die Aktivität langlebiger Plasmazellen und damit auch der Impferfolg beziffern lässt (Jack et al. 1999, Zaffina et al. 2014). Ein Wirkstoff muss, um in diesem *in vivo*-Versuch erfolgreich zu sein, vor allem die Konzentration der Antikörper erhöhen.

Um zu prüfen, ob die Menge an Antikörpern im Serum der Mäuse ansteigt, quantifizierte ich zunächst die Konzentration des gesamt-IgM und gesamt-IgG im Serum wie schon bei den in vitro-Versuchen (siehe Kapitel 2.8 und 3.1.6). Wie zuvor sind diese Daten aus zwei nacheinander durchgeführten Mausversuchen zusammengeführt worden und in Abbildung 3.13 bis 3.16 dargestellt. Gezeigt sind hierbei jeweils die Werte zu den vier Messpunkten und die Fläche unter der Kurve (AUC für *area under the curve*), also die Gesamtmenge über die Zeit.

Betrachtet man die Konzentrationen des gesamten IgM im Serum (Abb. 3.13), erkennt man zunächst, dass in allen Behandlungsgruppen die IgM-Konzentrationen nach der Immunisierung ansteigen, was sich mit dem in 3.2.2 beschriebenen Plasmazellanstieg deckt und dafür spricht, dass die Immunisierung in allen Behandlungsgruppen erfolgreich war. Dieser Anstieg ist statistisch signifikant und betrug zwischen dem Startzeitpunkt und der zweiten Woche nach Immunisierung für die Kontrolle und die Progesterongruppe je $p < 0{,}001$, für die Ceforanidgruppe $p = 0{,}003$ unter Verwendung des Friedmann-Tests. Vergleicht man hingegen die Verläufe der Behandlungsgruppen oder die normalisierte AUC gegeneinander, so erkennt man, dass die mit Ceforanid oder Progesteron behandelten Mäuse durchschnittlich eine etwas höhere IgM-Konzentration im Serum aufwiesen, dies war jedoch nicht von statistischer Signifikanz.

Für die Konzentrationen des Gesamt-IgG (siehe Abb. 3.14) bietet sich ein ähnliches Bild. In allen Behandlungsgruppen stiegen die gemessenen IgG-Konzentrationen signifikant (für Woche 0 gegen Woche 3 ist jeweils $p < 0{,}001$ in allen Gruppen). Im Verlauf findet sich aber zwischen den Gruppen ebenso wie bei Betrachtung der AUC kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen.

A



B

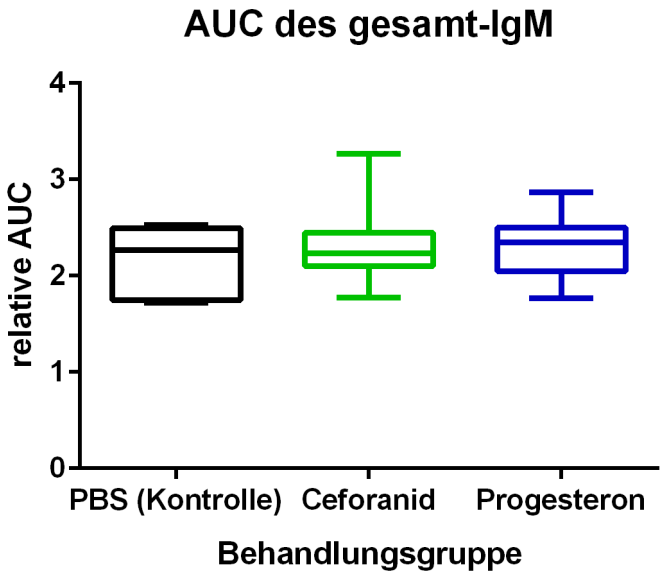


Abb. 3.13: A zeigt Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der im Serum gemesseren Gesamt-IgM-Konzentrationen in den drei Behandlungsgruppen (PBS: n = 9, Ceforanid und Progesteron je n = 12). Über die Zeit ist hier in jeder Gruppe ein statistisch signifikanter Anstieg der IgM-Konzentrationen zu erkennen. Zwischen den Behandlungsgruppen besteht ein solcher Unterschied nicht. Die Berechnung erfolgte mittels Friedmann-Test innerhalb der Gruppen respektive zweifaktorieller Varianzanalyse für die Gruppen gegeneinander. In beiden Fällen folgten multiple Vergleiche nach Student-Newman-Keuls als Post-hoc-Test.

B zeigt Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der normalisierten relativen AUC der Gesamt-IgM-Konzentrationen in der jeweiligen Behandlungsgruppen. Auch hier sind, unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests, keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen.

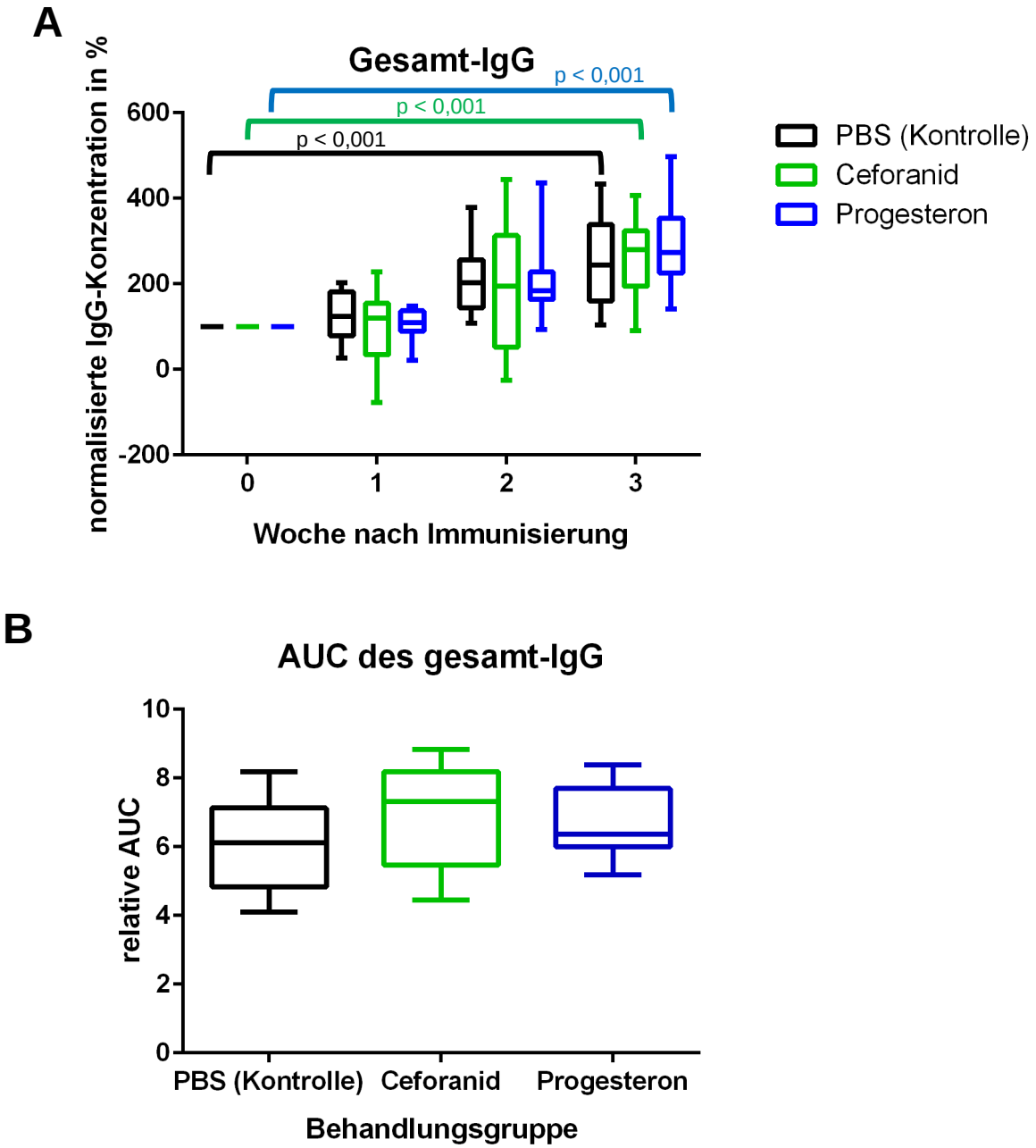


Abb. 3.14: A zeigt Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der im Serum gemesseren Gesamt-IgG-Konzentrationen in den drei Behandlungsgruppen (PBS: n = 9, Ceforanid und Progesteron je n = 12). Über die Zeit ist hier in jeder Gruppe ein statistisch signifikanter Anstieg der IgG-Konzentrationen zu erkennen, zwischen den Behandlungsgruppen besteht ein solcher Unterschied nicht. Die Berechnung erfolgte mittels Friedmann-Test innerhalb der Gruppen respektive zweifaktorieller Varianzanalyse für die Gruppen gegeneinander. In beiden Fällen folgten multiple Vergleiche nach Student-Newman-Keuls als Post-hoc-Test.

B zeigt Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der normalisierten relativen AUC der Gesamt-IgG-Konzentrationen in der jeweiligen Behandlungsgruppen. Auch hier sind, unter Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests, keine statistisch signifikanten Unterschiede festzustellen.

Neben der Quantifizierung der Gesamt-Antikörperkonzentrationen gelang mir die Messung spezifischer IgM- und IgG-Antikörper gegen mCol7-vWFA2 in einem weiteren ELISA (siehe Kapitel 2.16) über die Relation zu einem Fixpunkt in einem Serum-Pool. Während die spezifischen IgM-Antikörper die akute humorale Immunantwort darstellen, sind spezifische IgG-Antikörper erst etwas später messbar. Dafür persistieren diese länger und sind für den langanhaltenden Schutz durch die Impfung mitverantwortlich.

Die Ergebnisse für die Messung der spezifischen IgM-Antikörper gegen mCol7 sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Zunächst ist auch hier ein statistisch signifikanter Anstieg der mCol7-IgM-Konzentrationen innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen festzustellen (z.B. zwischen Woche 0 und Woche 2 ist $p = 0{,}003$ für die Kontrollgruppe und $p < 0{,}001$ in der Ceforanid- und der Progesterongruppe). Anders als bei der Gesamt-IgM-Messung liegt hier jedoch außerdem ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen vor: Über die gesamte Behandlung sind die mCol7-spezifischen IgM-Antikörper im Serum der mit Ceforanid oder Progesteron behandelten Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (jeweils $p = 0{,}002$). Der gleiche Befund ergibt sich bei Betrachtung der Messwerte in der zweiten Woche nach Immunisierung. Hier sind die Konzentrationen ebenfalls gegenüber der Kontrolle um ein Drittel bis die Hälfte der Kontrolle erhöht ($p = 0{,}006$ für Ceforanid und $p = 0{,}004$ für Progesteron), in der dritten Woche ist dies bei Ceforanid noch immer der Fall ($p = 0{,}028$).

Betrachtet man die AUC, ergibt sich ein ähnliches Bild mit einer Erhöhung innerhalb der mit Ceforanid oder Progesteron behandelten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe. Dieser Unterschied ist hier allerding nur zwischen der Progesteron- und der Kontrollgruppe signifikant ($p = 0{,}027$, für Ceforanid gegen die Kontrollgruppe ist $p = 0{,}083$).

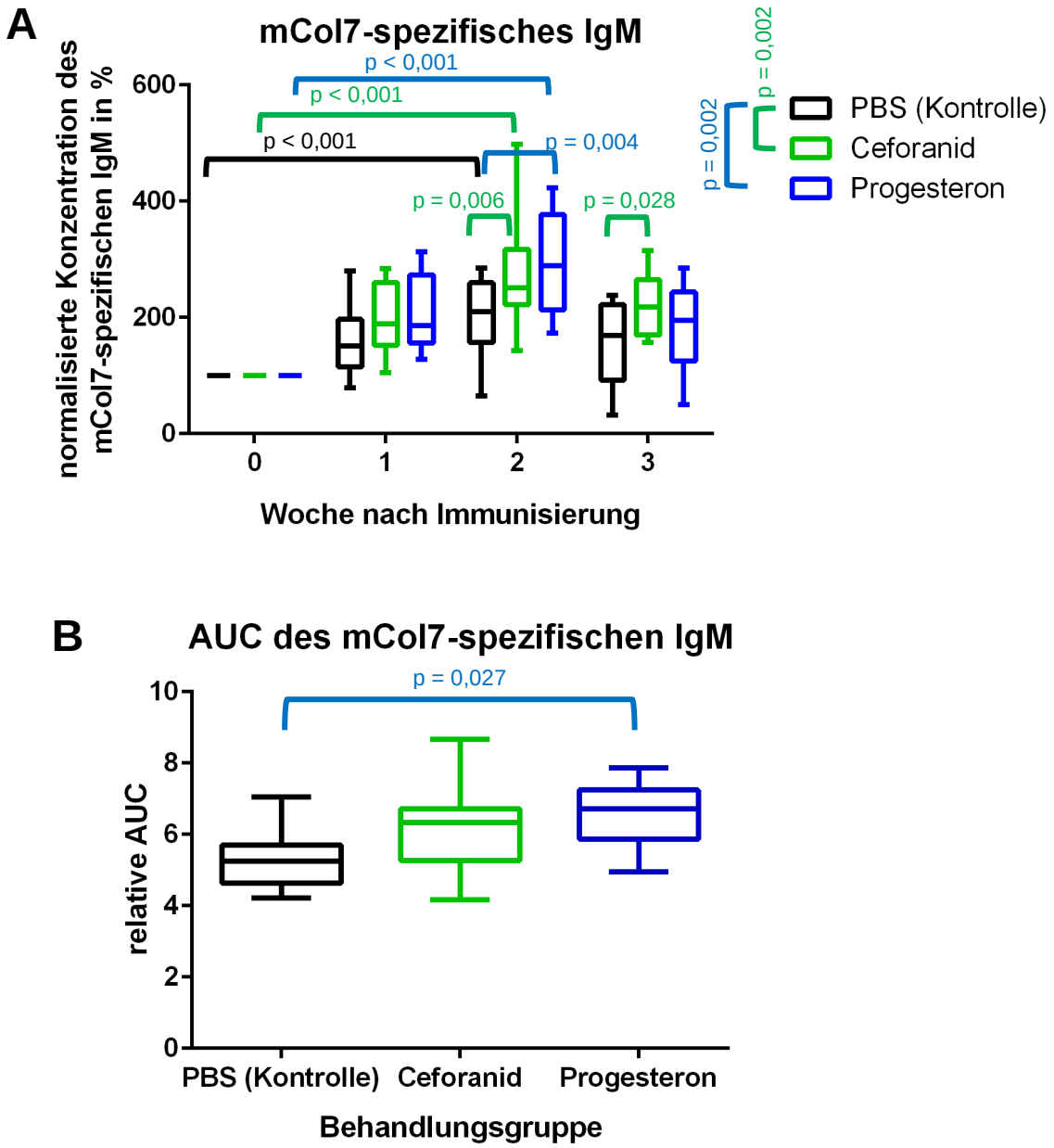


Abb. 3.15: A zeigt normalisierte Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der im Serum gemesseren mCol7-spezifischen-IgM Konzentrationen in den drei Behandlungsgruppen (PBS: n = 9, Ceforanid und Progesteron je n = 12). Über die Zeit ist hier in jeder Gruppe ein statistisch signifikanter Anstieg der mCol7-IgM-Konzentrationen zu erkennen. Auch zwischen den Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied: So sind die Mengen an spezifischen IgM-Antikörpern in mit Ceforanid oder Progesteron behandelten Mäusen jeweils insgesamt (je p = 0,002) und an Woche 2 allein erhöht. Für Ceforanid trifft dies auch noch in der dritten Woche nach Immunisierung zu. Die Berechnung erfolgte mittels Friedmann-Test innerhalb der Gruppen respektive zweifaktorieller Varianzanalyse für die Gruppen gegeneinander. In beiden Fällen folgten multiple Vergleiche nach Student-Newman-Keuls als Post-hoc-Test. **B** zeigt Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der normalisierten AUC der mCol7-IgM-Konzentrationen in der jeweiligen Behandlungsgruppen. Auch hier zeigt sich eine Erhöhung in der Ceforanid- und der Progesterongruppe, wobei nur letztere das Signifikanzniveau erreicht (p = 0,027 in einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit paarweisen t-Test-Vergleichen mit gepoolter Standardabweichung).

Zuletzt betrachtete ich den Effekt von Ceforanid und Progesteron auf die Produktion mCol7-spezifischer IgG-Antikörper. Diese antigenspezifischen IgG-Antikörper entsprechen denen, die auch bei der Evaluation des Impferfolges beim Menschen bestimmt werden, weshalb sie auch hier von besonderem Interesse sind. Eine Steigerung der spezifischen, humoralen Immunantwort spricht dabei für einen erhöhten Schutz vor einer Infektion mit einem Pathogen, das dieses Antigen trägt.

Wie in den zuvor beschriebenen Antikörpermessungen zeigte sich auch für die mCol7-spezifischen IgG-Antikörper (siehe Abb. 3.16) eine statistisch signifikante Steigerung mit der Zeit (z.B. ist zwischen Woche 0 und Woche 3 $p < 0,001$ in allen Gruppen).

Wie schon bei den mCol7-spezifischen IgM-Antikörpern zeigt sich auch für das spezifische IgG jeweils in der Ceforanid- und in der Progesterongruppe ein statistisch signifikanter Anstieg der Konzentration im Serum insgesamt (für die Ceforanidgruppe ist $p = 0,008$, für die Progesterongrupe ist $p < 0,001$). Deutlich ist auch zu erkennen, dass die bei Versuchsende (Woche 3 nach Immunisierung) gemessenen Konzentrationen des spezifischen IgG in beiden Versuchsgruppen mehr als doppelt so hoch, verglichen mit der Kontrollgruppe, sind (in beiden Gruppen ist jeweils $p < 0,001$)

Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der darunter dargestellten AUC wieder, wobei hier vor allem Progesteron eine Steigerung der AUC gegenüber der Kontrollgruppe von durchschnittlich mehr als 100% erreicht. Sowohl die Behandlung mit Progesteron als auch die mit Ceforanid erhöhten die AUC der mCol7-spezifischen IgG Produktion gegenüber der Kontrollgruppe signifikant. Für Ceforanid ist dabei $p = 0,023$ und für die Progesterongruppe ist $p = 0,0052$.

Anders als bei den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zeigen sich hier also die in vitro-Experimente an isolierten, humanen B-Lymphozyten bestätigt. Die medikamentöse Steigerung der B-Lymphozytenfunktion, gemessen an der Produktion spezifischer Antikörper nach Immunisierung *in vivo,* ist gelungen, indem aus den ursprünglich über tausend Substanzen der *Prestwick Chemical Library®* die vielversprechendsten validiert und eingehender untersucht wurden, sodass sich die in vitro aufgetretenen Befunde schlussendlich auch im komplexen Immunsystem der Maus beobachten ließen.

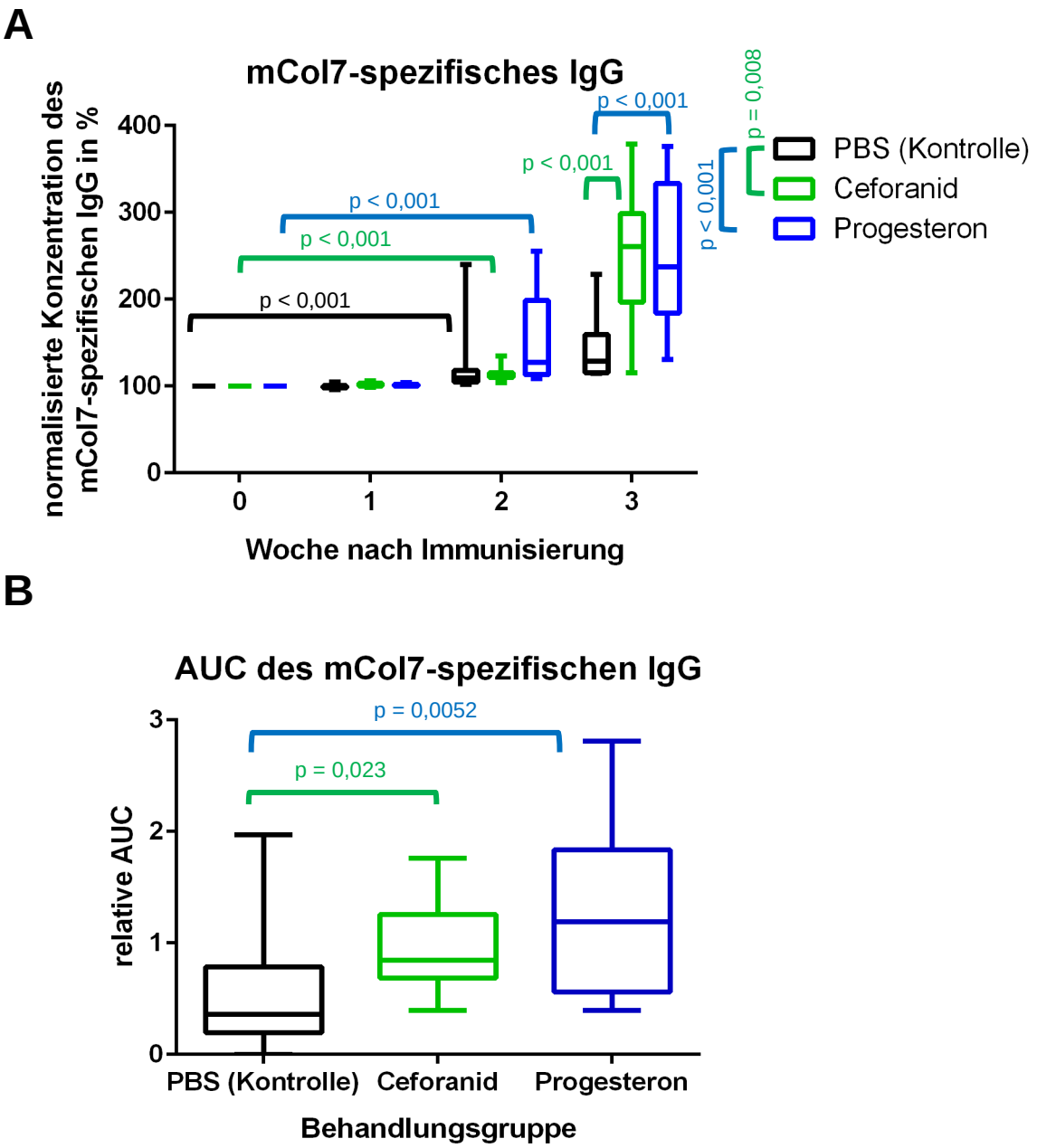


Abb. 3.15: A zeigt normalisierte Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der im Serum gemesseren mCol7-spezifischen-IgG Konzentrationen in den drei Behandlungsgruppen (PBS: n = 9, Ceforanid und Progesteron je n = 12). Über die Zeit ist hier in jeder Gruppe ein statistisch signifikanter Anstieg der mCol7-IgG-Konzentrationen zu erkennen. Auch zwischen den Gruppen besteht ein signifikanter Unterschied: So sind die Mengen an spezifischen IgM-Antikörpern in mit Ceforanid oder Progesteron behandelten Mäusen jeweils insgesamt (Ceforanide: p = 0,008, Progesteron: p < 0,001) und an Woche 3 (je p < 0,001) allein erhöht. Die Berechnung erfolgte mittels Friedmann-Test innerhalb der Gruppen respektive zweifaktorieller Varianzanalyse für die Gruppen gegeneinander. In beiden Fällen folgten multiple Vergleiche nach Student-Newman-Keuls als Post-hoc-Test.

B zeigt Medianwerte, Quartile und die 90%-Perzentile der normalisierten, relativen AUC der mCol7-IgG-Konzentrationen in den jeweiligen Behandlungsgruppen. Auch hier zeigt sich eine Erhöhung in der Ceforanid- und der Progesterongruppe, die jeweils im Kruskal-Wallis-Test mit Dunn´s-post-hoc-Test sowie Benjamini-Hochberg-Vergleich das Signifikanzniveau erreichen (Ceforanide:p = 0,023, Progesteron: p = 0,0052).

4 Diskussion

4.1 Resümee

Ziel dieser Arbeit war die Validierung der in einem vorangegangenen Screening der *Prestwick Chemical Library*® durch einen B-Zellfunktionssteigernden Effekt aufgefallenen acht Substanzen und der Transfer der vielversprechendsten dieser Wirkstoffe in ein *in vivo*-Modell einer aktiven Immunisierung (Abb. 4.1). Ein solcher Ansatz entspricht dem *Drug Repurposing*, einer Zeit und Geld sparenden Alternative zur *de novo*-Entwicklung neuer Medikamente, bei der patentfreie Wirkstoffe, die bereits zur Anwendung am Menschen zugelassen wurden, neue Indikationen erhalten. Substanzen, die die B-Lymphozytenfunktion steigern, könnten sich dabei als Adjuvans bei Impfungen bewähren, die bei immunsupprimierten Patienten und bei *Non-Respondern* oft nicht die gewünschte Immunität erzeugen.

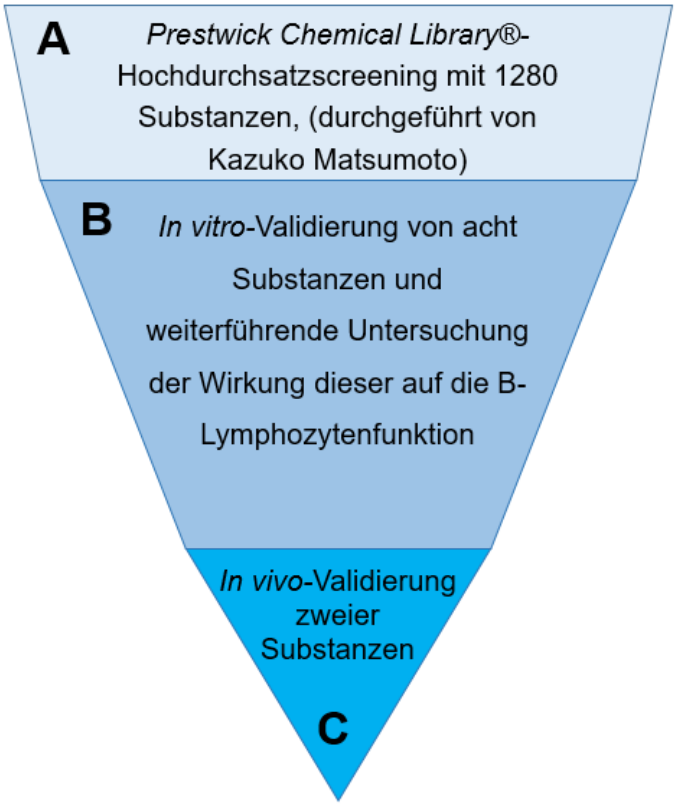


Abb. 4.1: Trichterförmig dargestellt ist hier die Struktur des Screenings durch die PCL. Grundlage (A) war dabei ein von Kazuko Matsumoto durchgeführtes Hochdurchsatzscreening der 1280 patentfreien Medikamente hinsichtlich einer hemmenden oder steigernden Wirkung auf isolierte humane B-Lymphozyten. Hierbei taten sich acht Wirkstoffe mit einem fördernden Effekt auf die B-Zellproliferation hervor, deren Effekt ich zunächst validierte (B). Des Weiteren testete ich ihre Wirkung auf zusätzliche Aspekte der B-Zell-Funktion, wie der Differenzierung zu Plasma-zellen oder der Produktion von Antikörpern. Zwei der nach diesen Ergebnissen vielversprechendsten Substanzen, das Antibiotikum Cefoxanid und das Hormon Progesteron übernahm ich in einen Mausversuch (C), um zu testen, ob sie *in vivo* die Immunantwort auf eine aktive Immunisierung mit dem Antigen mCol7-vWFA2 steigern. Für beide Wirkstoffe konnte ich dabei eine signifikante Steigerung der spezifischen Antikörperproduktion nachweisen.

Ausgangspunkt und Grundlage war dabei ein von Kazuko Matsumoto im gleichen Labor durchgeführtes, nicht-hypothesenbasiertes Hochdurchsatzscreening, in dessen Rahmen sie mehr als tausend patentfreie, zugelassene Wirkstoffe hinsichtlich einer Beeinflussung der B-Zell-Funktion testete. Hierbei fielen acht Substanzen durch eine wiederholte Steigerung der Proliferation isolierter, humaner B-Lymphozyten auf. Ich validierte diesen Effekt und führte darüber hinaus Untersuchungen hinsichtlich einer Wirkung auf die Differenzierung zu Plasmazellen und deren Antikörperproduktion sowie eine weitere Steigerung der Wirkung durch Kombination dieser Wirkstoffe durch. Zwei der acht Substanzen, Ceforanid und Progesteron, kamen auf Grund der *in vitro* erhobenen Ergebnisse für eine Erprobung in einem aktiven Immunisierungsmodell *in vivo* in Betracht. Ich immunisierte BALB/c-Mäuse mit dem Antigen der Epidermolysis bullosa acquisita (EBA), einer blasenbildenden Autoimmunerkrankung, und maß über drei Wochen die Verteilung der Lymphozyten in Blut, Lymphknoten und Milz sowie die Immunglobulinkonzentrationen im Serum. Es zeigte sich, dass beide Wirkstoffe bei täglicher Applikation die Produktion spezifischer IgM- und IgG-Antikörper signifikant steigern, was zum einen bedeutet, dass die verwendeten Substanzen tatsächlich die B-Zell-Funktion mit der humoralen Immunantwort steigern und nach weiterer Prüfung als mögliche Adjuvantien bei Impfungen in Frage kämen, zum anderen zeigt das aber auch, dass sich durch ein solches Screening tatsächlich vielversprechende Wirkstoffe ausmachen lassen, die auch in Tierversuchen bestehen.

4.2 Ergebnisse nach Medikamenten

4.2.1 Ceforanid

Wie alle später genannten Medikamente fiel Ceforanid durch einen proliferations-steigernden Effekt im Screening der *Prestwick Chemical Library*® auf. Diese Wirkung konnte validiert werden: Die Beigabe von Ceforanid zur B-Zellkultur steigert signifikant die Aktivierung in Konzentrationen von 0,1µM und 1µM ohne dabei eine toxische Aktivität zu zeigen. Außerdem kam es zu einer knappen Verdopplung der generierten Plasmazellen und in der Konsequenz einer ebenfalls signifikanten deutlichen Steigerung der produzierten Menge an IgM- und IgG-Antikörpern. Diese Steigerung ist im Mittel die höchste, verglichen mit den übrigen Medikamenten.

Aufgrund dieser Ergebnisse bot es sich an, Ceforanid *in vivo* im Rahmen einer aktiven Immunisierung (ähnlich einer Impfung) zu testen. Hier konnten vor allem die antigenspezifischen IgM- und IgG-Antikörper gegenüber der Kontrollgruppe deutlich

vermehrt werden. Besonders zu beachten ist, dass diese Steigerungen möglich waren, obwohl bereits TiterMax® als Adjuvans eingesetzt wurde.

Wie also kann diese Wirkung erklärt werden? In der STITCH-Datenbank *(„search tool for interacting chemicals“,* http://stitch.embl.de/, Kuhn et al. 2014), einer Suchmaschine für Moleküle und ihre bekannten Interaktionen, wird keine bekannte Interaktionsstelle im menschlichen Körper, sondern nur die Interaktion mit dem Penicillin-bindenden-Protein 2 an der bakteriellen Zellwand beschrieben. Über dieses entfaltet Ceforanid seine ursprünglich angedachte Wirkung als β-Lactam-Antibiotikum der Cephalosporin-Gruppe. Literatur zu diesem Medikament kommt zum überwiegenden Teil aus den 80er-Jahren des letzten Jahrhunderts und betrifft die antibiotische Aktivität *in vitro* und *in vivo*. Im Menschen ist die Sicherheit auch für die systemische Anwendung hoher Dosen sowohl in Erwachsenen als auch für Kinder und Neugeborene belegt, wobei Cephalosporine, wenn keine Allergie gegen sie vorliegt, in der Regel sehr gut verträglich sind (Smyth et al. 1979, Dajani et al. 1982, Thirumoorthi et al. 1983). Dies ist wichtig für eine mögliche klinische Erprobung. Bisher ist für Ceforanid also keinerlei Interaktion mit dem Immunsystem beschrieben. Die von mir zuvor beschriebenen Effekte sind demzufolge bisher unbekannt. Über welche Gene die beobachtete Wirkung entfaltet wird, könnte mittels Genexpressionsanalyse näher untersucht werden.

Für weitere Mitglieder der Cephalosporin-Gruppe lassen sich ähnliche immunmodulatorische Beobachtungen in BALB/c-Mäusen und immunsupprimierten Patienten (Limbert et al. 1984, Labro et al. 1988, Vanholder et al. 1988, Auer et al. 1992) finden. Dies betrifft vor allem phagozytorische Aktivitäten und oxidative Zytotoxizität. Allgemein zeigte sich, dass Antibiotika oft über direkte Wirkung am Bakterium hinaus Einfluss auf das Immunsystem nehmen können (Labro 1993, Kwiatkowska et al. 2013). Der vielversprechendste Vertreter der immunstimulatorischen Substanzen, das Cephalosporin Cefodizim, konnte nicht erfolgreich als Immunantwortmodifikator etabliert werden. Im Vergleich mit der antibakteriellen Wirksamkeit wurde der klinische Nutzen als gering angesehen. (Labro 2005). Die beobachtete Wirkung wird auf einen gemeinsamen Substituenten zurückgeführt, der aber im Ceforanid-Molekül nicht vorliegt (Bryskier 2000), sodass ich davon ausgehe, dass die von mir erfasste Wirkung auf B-Lymphozyten nicht hierin, sondern in einer anderen, bisher unbekannten Ursache begründet ist.

Zusammenfassend stellte sich Ceforanid als eines der beiden erfolgreichsten Medikamente in meinen Versuchsreihen und bezüglich einer klinischen Anwendbarkeit als vielversprechendstes heraus. Gerade die im Tierversuch gezeigte alleinige Steigerung der antigenspezifischen Antikörper ist für die erwünschte Steigerung der Impfwirkung sehr wichtig, da über die gemessenen Impftiter der Impferfolg definiert wird (Jack et al. 1999, Robert-Koch-Institut 2014). Bestätigt sich die Wirksamkeit weiter, sollten erste Versuche unternommen werden, mit Ceforanid die Impfreaktion im Menschen zu steigern.

4.2.2 Progesteron

Progesteron ist wohl die bekannteste und am weitesten erforschte Substanz unter den von mir verwendeten Medikamenten und gehörte neben Ceforanid zu den beiden Substanzen, die ich in den Tierversuch überführte. Diese Entscheidung basierte darauf, dass Progesteron in jedem *in vitro*-Versuch die B-Zell-Funktion steigerte, ohne dabei eine toxische Wirkung zu zeigen. *In vivo* bewirkte es dann ebenfalls eine Steigerung der Konzentration spezifischer Antikörper im Serum.

Zur Wirkung von Progesteron auf B-Lymphozyten und das Immunsystem sind bereits Daten publiziert worden, allerdings mit oft gegenläufigen und teilweise wiedersprüchlichen Ergebnissen. Lymphozyten in BALB/c-Mäusen exprimieren Progesteron-Rezeptoren (Zhang et al. 2014). Auch konnte gezeigt werden, dass Progesteron in murinen B-Lymphozyten die Expression der co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 reduziert, wodurch die B-Zell-Aktivierung gehemmt wird, Untersuchungen hinsichtlich der Differentierung zu Plasmazellen und der Antikörperproduktion zeigten für im Vergleich zu meinen Experimenten zehn- bis tausendfach geringere Konzentrationen keinen Effekt (Zhang et al. 2014). Andere Untersuchungen zeigen, dass Progesteron die Expression der Aktivierungs-induzierten Desaminase, die für die Affinitätsreifung und den Klassenwechsel der B-Zellen unabdingbar ist, deutlich senkt (Pauklin und Petersen-Mahrt 2009) und die Proliferation von Lymphozyten (Wyle und Kent 1977) sowie die B-Lymphopoese vermindert (Medina und Kincade 1994). In an experimentellem ystemischen Lupus erythematodes (SLE) erkrankten Mäusen hatte Progesteron einen protektiven Effekt und verringerte die Menge an IgG-Autoantikörpern (Hughes et al 2009, Hughes und Choubey 2014).

Andererseits fand eine andere Studie ebenfalls in einem murinen SLE-Modell, dass unter Progesteron-Gabe sowohl die Überlebenszeit als auch die Menge an produzierten Autoantikörpern gesteigert sind (Roubinian et al. 1979). Bei Mäusen und Affen zeigt eine lokale Behandlung mit Progesteron einen steigernden Effekt auf die lokale antigenspezifische Antikörperproduktion im cervikovaginalen Trakt, ohne Beeinflussung der Serum-Antikörper oder der Anteile der verschiedenen Immunzellen in der Mukosa (Johansson et al. 1998, Lü et al. 1999, Ma et al 2001). Eine weitere Vermutung ist, dass Progesteron einen stimulierenden Einfluss auf eine anti-inflammatorische Subpopulation der B-Lymphozyten hat, um die Toleranz gegenüber dem semiallogenetischen Fötus während der Schwangerschaft zu gewährleisten (Fettke et al. 2014). In einem murinen Modell der Experimentellen Autoimmunen Encephalitis (EAE), die der Multiplen Sklerose des Menschen ähnelt, konnte gezeigt werden, dass sowohl die regulatorischen B-Zellen durch Produktion von IL-10 (Fillatreau et al. 2002, Matsushita et al. 2008) als auch die Behandlung mit Progesteron allein die Krankheitsaktivität verringern können (Yates et al. 2010). Hier konnte außerdem eine Zunahme der $CD19^{+}$-Zellen beobachtet werden (Yates et al. 2010). Die Proliferation IL-10 produzierender B-Lymphozyten lässt sich insbesondere durch agonistische CD40-Antikörper, wie ich sie zur in-vitro-B-Zell-Stimulation verwendete, provozieren (Evans et al. 2007).

Statt eine konstante, geradlinige Wirkung auf B-Lymphozyten auszuüben, scheint der Einfluss des Progesterons auf diese Zellen komplexer und vielgestaltiger zu sein. Es kommt offenbar auch auf die Umgebung, den Krankheitsstatus und das Zusammenspiel mit anderen Sexualhormonen in einem regulatorischen Netzwerk an (Hughes und Choubey 2014, Muzzio et al. 2014).

Auch aufgrund dieser Komplexität dürfte es im Sinne der eigentlichen Zielsetzung dieser Arbeit schwierig werden, Progesteron medikamentös zur Steigerung der Immunantwort bei Impfungen anzuwenden. Zurzeit wird Progesteron meist zur Schwangerschaftsverhütung respektive zur Schwangerschaftserhaltung angewendet und findet daher vor allem bei Frauen im gebärfähigen Alter Verwendung. Als Nebenwirkungen werden - nicht zuletzt durch eine deutliche Testosteron-Supprimierung bei Männern - Appetitsteigerungen mit Gewichtszunahme, Brustenge, Elektolytverschiebungen, Akne, Depressionen, Libidoverlust und Müdigkeit beschrieben (Oettel und Mukkhopadhyay 2004, Karow und Lang-Roth 2010b). Höher dosierte Progesteronpräparate werden deshalb auch zum Gewichtsaufbau bei

starkem Gewichtsverlust angewendet, bergen aber durch den Eingriff in den empfindlichen Hormonregelkreis auch die Gefahr einer unbehandelt tödlich verlaufenden Nebenniereninsuffizienz (Oettel und Mukkhopadhyay 2004).

In Anbetracht der doch bei Anwendung über einen längeren Zeitraum gravierenden Nebenwirkungen sowie der Diversität der beschriebenen Wirkungen auf die Immunantwort, ist die Verwendbarkeit Progesterons eingeschränkt und nicht zur Erstlinientherapie bei Gesunden geeignet, sondern wenn überhaupt als zweite Wahl bei Patienten mit erhöhtem Infektionsrisiko und dringendem Bedarf an einer schützenden Impfantwort. Weitere Experimente müssen ebenso zunächst zeigen, ob Progesteron tatsächlich den Impfschutz in einem Krankheitsmodell erhöht oder eher eine immunregulatorische Rolle spielt.

4.2.3 Sechs Wirkstoffe, die nur *in vitro* getestet wurden

Aufgrund der zur Verfügung stehenden Ressourcen war es mir nicht möglich, mehr als zwei Substanzen in die *in vivo*-Experimente zu übernehmen. Ich wählte Ceforanid und Progesteron aus, weil sie einerseits beide in sämtlichen Testreihen zuvor eine B-Zell-Funkstionssteigerung gezeigt hatten und andererseits für beide bereits die Lösung in PBS samt intraperitonealer Applikation beschrieben war (Joiner et al. 1981, Veillon et al. 2009), sodass nur eine Kontrollgruppe (PBS ohne weiteres Medikament) benötigt wurde. Die übrigen Wirkstoffe hatten sich entweder *in vitro* als weniger erfolgreich erwiesen oder sie hätten eine andere Kontrollgruppe benötigt. Die Überführung wenig vielversprechender Substanzen in den Tierversuch ist schon aufgrund des wahrscheinlich unnötig entstehenden Leids der Tiere und des zusätzlichen Kosten- und Zeitaufwands abzulehnen. Nichtsdestotrotz zeigten einige dieser Substanzen bisher unbekannte Wirkungen auf isolierte, humane B-Lymphozyten nach künstlicher Stimulation *in vitro*:

So zeigte, wie schon Progesteron und Ceforanid, auch das Prokinetikum **Itoprid** in allen durchgeführten *in vitro*-Versuchen eine signifikante Steigerung der B-Lymphozytenfunktion ohne dabei eine zytotoxische Wirkung zu entfalten. Im BrdU-Proliferationsassay zeigt es sogar die stärkste Wirkung aller getesteten Substanzen.

In klinischen Studien zeigte Itoprid sich inkonsistent in seiner Effektivität (Holtmann et al. 2006, Talley et al. 2007), (Neben-)wirkungen mit Bezug zum Immunsystem oder

gar eine direkte Wirkung von Itoprid auf Lymphozyten wurden bisher aber nicht beschrieben.

Itoprid bindet an den Dopamin-Rezeptor D2 und inhibiert darüber hinaus die Acetylcholinesterase (Iwanga et al. 1996). Der D2-Rezeptor wird auf B-Lymphozyten und anderen Zellen des Immunsystems exprimiert (McKenna et al. 2002). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe Dopamin-Konzentration im Plasma die Proliferation von T-Lymphozyten inhibiert, die durch spezifische Inhibition des Dopamin-Rezeptors D1 nahezu vollständig aufgehoben werden kann (Saha et al. 2001). Mäuse mit erhöhten Dopaminspiegeln im Blut zeigen eine schwächere Reaktion auf Krankheitserreger (Alaniz et al. 1999). Auch der Dopamin D2-Agonist Bromocriptin zeigt immunsuppressive Wirkung sowohl auf B- als auch auf T-Lymphozyten (Morikawa et al. 1993, Morikawa et al. 1994). Es ist also wahrscheinlich, dass der Neurotransmitter Dopamin eine Rolle in der Regulation der lymphozytären Proliferation spielt, die sich medikamentös beeinflussen lässt. Auf Basis der genannten Literatur und der Ergebnisse aus den *in vitro*-Versuchen kann man vermuten, dass auch Itoprid über dieses System an B-Lymphozyten wirkt. Ein Tierversuch könnte weiteren Aufschluss darüber geben, ob sich diese Wirkung nur unter einfachen Bedingungen im Reagenzglas oder auch im vielschichtigen Zusammenspiel der Immunantwort zeigt.

Der Aspekt der Acetylcholinesterase-Inhibition ist Itoprid und **Neostigminbromid** gemeinsam. Beide wirken auf diese Weise parasympathomimetisch. In meinen Versuchen zeigte Neostigminbromid keine Erhöhung der B-Lymphozytenproliferation, wohl aber eine geringe Steigerung der Plasmazellbildung und der Produktion von IgM-Antikörpern. Als einziges der verwendeten Medikamente senkte es im LDH-Zytotoxizitätsassay den Anteil an abgestorbenen Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant. Bisher ist bekannt, dass Neostigmin bei Ratten in Kombination mit Anisodamin antiinflammatorisch wirkt und die Zellregeneration in der Leber fördert (Li et al. 2014). Dies könnte die beobachtete Erhöhung der Überlebensrate der Zellen erklären. Eine direkte stimulierende Wirkung auf Lymphozyten ist bisher nicht beschrieben worden. Neostigmin verlängert, vermutlich über einen antiinflammatorischen Signalweg das Überleben septischer Mäuse (Hofer et al. 2008), für eine wirksame Acetylcholinesterase-Inhibition mit einem anderen Wirkstoff ist allerdings auch eine Erhöhung inflammatorischer Zytokine ohne Beeinflussung der B-Lymphozytenzahl in der Maus belegt (Fernandez-Cabezudo et al. 2010). Für ein

besseres Verständnis der eventuellen Itoprid- unf Neostigmin-Wirkung auf die B-Lymphozyten-Aktivierung durch Inhibition der Acetylcholinesterase sind also zunächst weitere Untersuchungen notwendig.

Famprofazon steigerte in vitro sowohl die Bildung von Plasmazellen als auch die Produktion von IgM-und IgG-Antikörpern, aber nicht die Proliferation der B-Zellen. Sein aktiver Metabolit Metamphetamin, oft missbraucht als gefährliches und suchterregendes Psychostimulanz, verfügt über eine immmunmodulatorische Wirkung (Harms et al. 2012). Für Amphetamin ist eine proliferationshemmende Wirkung auf B- und T-Lymphozyten beschrieben (House und Thomas 1994), allerdings in hundertfach höherer Konzentration als ich sie verwendete. Auch in mehreren Mausmodellen zeigte Metamphetamin eine immunotoxische Wirkung auf B-Lymphozyten (Yu et al. 2002, Wey et al. 2008). Auch daher erprobte ich Famprofazon nicht im Tierversuch. Nimmt man dies alles zusammen, würde ich von *in vivo* Versuchen absehen. Eine Anwendung im Menschen zur Steigerung der Immunantwort halte ich für sehr unwahrscheinlich.

Auch **Trapidil**, eigentlich zur Therapie der koronaren Herzkrankheit zugelassen, zeigte in der B-Zell-Kultur eine signifikante Steigerung der Bildung von Plasmazellen und Antikörpern ohne die Proliferation zu steigern oder zytotoxisch zu wirken. Wenn auch nicht für B-Lymphozyten, ist doch ein Einfluss von Trapidil auf das Immunsystem belegt: Trapidil inhibiert den CD40-CD40L-Signalweg in Monozyten (Zhou et al. 1999, Kato et al. 2001), die wie B-Lymphozyten CD40 exprimieren und ebenfalls durch den CD40-Liganden der T-Helferzellen aktiviert werden. Ob es diese Funktion auch bei B-Zellen ausübt, ist nicht belegt, in der von mir durch geführten Zellkultur war die Aktivierung der B-Lymphozyten durch CD40-Antikörper nicht durch die Beigabe von Trapidil beeinträchtigt. Trotzdem sprach dies für mich ebenfalls gegen eine Übernahme in den Mausversuch.

Der VEGF-Rezeptortyrosinkinase-Inhibitor **Vatalanib** zeigte nur hinsichtlich der Plasmazellbildung einen signifikant steigernden Effekt auf B-Zellen.

Das Malaria-Medikament **Primaquindiphosphat** ist der einzige Wirkstoff, der in meinen Experimenten keinen statistisch zu bekräftigenden Effekt auf die B-Lymphozytenfunktion hatte. Aufgrund dieser Ergebnisse hielt ich eine tatsächliche stimulatorische Wirkung auf B-Lymphozyten für unwahrscheinlich.

4.2.4 Wirkstoff-Kombinationen

Ceforanid, Itoprid und Progesteron zeigten wie beschrieben einen proliferationssteigernden Effekt auf die isolierten B-Lymphozyten. Es interessierte mich, ob sich diese Wirkung durch die Kombination der Wirkstoffe noch weiter verstärken lässt, nicht zuletzt, weil dann durch eine solche Kombination die jeweilige Dosis der Einzelsubstanzen reduziert werden könnte, was die Nebenwirkungen abschwächen sollte. Ich testete hierfür diese drei Wirkstoffe einzeln und in jeder möglichen Kombination (siehe 3.1.4) in einer Konzentration die jeweils zu diesem Zeitpunkt knapp das Signifikanzniveau verpasst hatte, um zu prüfen, ob die Kombination die Wirkung auf die B-Zellproliferation über die der Einzelsubstanzen hinaus würde steigern können. Meine Ergebnisse zeigen jedoch, dass B-Lymphozyten *in vitro* nicht von einer Kombination der drei Substanzen profitieren. Möglicherweise deutet dies an, dass die medikamentöse Stimulation der B-Lymphozytenproliferation mit der Einzelsubstanz-Behandlung bereits voll ausgereizt ist. Ich konnte keine Veröffentlichungen finden, die diese Kombinationen untersuchten. Aufgrund dieser *in vitro*-Ergebnisse führte ich keine Testung der Kombinationen *in vivo* durch. Weitere Versuche mit Kombinationen verschiedener Wirkstoffe könnten sinnvoll werden, sollten sich die Einzelsubstanzen in weiteren Tests als in hohen Konzentrationen schlecht verträglich erweisen.

4.3 Limitationen

Ein Screening von über tausend Substanzen ohne automatisierte Unterstützung muss einfach sein, um praktikabel zu bleiben. Initital wurden die Komponenten der PCL in nur einer Konzentration an B-Lymphozyten je zweier Probanden getestet. Bis zum meiner Experimente hatte sich die Zahl der möglichen B-Zellfunktionssteigernden Wirkstofffe bereits auf ca. 0,6% der Bibliothek verringert (siehe Abb. 4.1). Auch lässt sich, wie in Kapitel 3.1.3 zu sehen ist, eine deutlich Schwankung der Messwerte zwischen den Probanden feststellen. Es kann dabei also nicht ausgeschlossen werden, dass im initialen Screening Substanzen falsch-negativ getestet wurden, allerdings wäre allein aufgrund dieser Möglichkeit eine aufwendige Validierung aller 1280 Substanzen mit den zur Verfügung stehenden Mittel nicht durchführbar.

Mein Interesse galt also vielmehr der Elimination falsch-positiver Ergebnisse. Dies gelang mir einerseits durch die wiederholte Testung in verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich einer Dosisabhängikeit und andererseits durch die Erprobung in weiteren *in vitro* Experimenten wie der Durchflusszytometrie oder der Bestimmung der Antikörperkonzentration. Dies gelang, da am Ende der Validierung zwei Substanzen (25%) übrig blieben, die sich auch *in vivo* in einem aktiven Immunisierungsmodell bewährten (100%). Eine direkte Übernahme aller acht Substanzen hätte eine viel größere Anzahl an Versuchstieren benötigt, jedoch wahrscheinlich nicht die gleiche Erfolgsrate aufgewiesen. So konnte vielen Tieren unnötiges Leid erspart werden. Ein solches Vorgehen wird bei Hochdurchsatzscreenings häufig mit dem Erfolg angewandt, dass die Entdeckungen direkt patentierbar sind (Roehrl et al. 2004, Yip et al. 2006, Stoilov et al. 2008).

Die dargestellten Ergebnisse unterliegen weiteren Limitationen. Hier sind zunächst die teilweise kleinen Gruppengrößen innerhalb der in vitro-Assays zu nennen, die durch die nachträgliche Exklusion der Ergebnisse erkrankter Probanden zustande kommen. Auch in den Tierexperimenten finden sich teilweise kleine Gruppengrößen. Dies optimierte ich im Rahmen der Möglichkeiten durch Umstellung auf 17α-OH-Progesteron und Streichen der Itoprid-Gruppe samt Wasser-Kontrollgruppe. Durch die extern begrenzte Anzahl zur Verfügung stehender Tiere konnten keine größeren Gruppen zusammengestellt werden. Außerdem kam es oft vor, dass die gemessenen Werte zwischen den individuellen Probanden bzw. Mäusen deutlich schwankten.

4.4 Ausblick

Im Rahmen meiner Experimente stellten sich Ceforanid und Progesteron sowohl in vitro als auch in vivo als wirksame Medikamente zur Steigerung der B-Zell-Funktion heraus. Es sollte ermittelt werden, wie häufig die Applikation des Medikaments tatsächlich notwendig ist. Es wäre möglich, dass nur in der ersten Woche nach der Immunisierung die Wirkung auf die B-Lymphozyten-Aktivierung von Nöten ist. Zumindest in den in vitro-Assays zeigten sich deutliche Beeinflussungen der B-Zell-Proliferation und -Differenzierung bereits nach sechs Tagen. Eine Verkürzung des Applikationszeitraums könnte nicht nur Kosten senken, sondern auch den Behandlungsaufwand senken und somit beim Menschen die Compliance und Verträglichkeit weiter verbessern.

Weitere Tierversuche, zum Beispiel in einem Modell mit Immunisierungen unter Immunsuppression (z.B. mit im klinischen Alltag häufig vorkommenden Medikamenten wie Azathioprin oder Etanercept), könnten zusätzliche Einsichten in die tatsächlichen Möglichkeiten dieser Wirkstoffe geben. Sollte es auch hier zu einer Steigerung der Antikörperspiegel kommen, kann ein Versuch am Menschen erwogen werden. Hier bieten sich neben Patienten unter immunsuppressiver Behandlung auch *Non-Responder* im Rahmen einer Hepatitis-B-Impfung an, da diese relativ häufig vorkommen.

Auch durch ein genaues Verständnis der Wirkungsweise der Medikamente könnte eine Behandlung zur Steigerung der Impfantwort weiter optimiert werden. *In vitro*-Experimente mit isolierten B-Zellen und einer anschließenden Genexpressionsanalyse könnten zeigen, über welche Gene die Lymphozytenaktivität gesteigert wird. Diese könnten nützlich für die Entwicklung weiterer B-Zell-Stimulatoren werden oder aber geeignete Zielproteine für die gezielte B-Zell-Inhibition darstellen, sodass diese Arbeit auch als Ausgangspunkt zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten autoimmuner Erkrankungen dienen könnte.

5 Zusammenfassung

B-Lymphozyten sind die Effektorzellen der humoralen Immunantwort und schlagen die Brücke zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Aktivierte Lymphozyten differenzieren sich zu Gedächtniszellen und Plasmazellen, die wiederum Antikörper produzieren. Diese sind essenziell zur Bekämpfung von Krankheitserregern und ihre messbare Konzentration im Blut quantifiziert den Erfolg einer Impfung. Dieser Impferfolg ist bei der Immunisierung gegen Hepatitis B und bei der Impfung immunsupprimierter Patienten oft beeinträchtigt und bisher fehlt die Möglichkeit, mittels Medikamenten die B-Zell-Funktion gezielt zu steigern. Eine vergleichsweise schnelle und kosteneffektive Methode zur Entwicklung von Wirkstoffen ist das sogenannte „*Drug Repurposing*“. Hierbei werden etablierte Medikamente für andere Indikationen als ihre ursprüngliche angewandt.

Grundlage dieser Arbeit ist ein Screening von über eintausend patentfreien, zugelassenen Wirkstoffen. Ich validierte acht aufgefallene Substanzen hinsichtlich ihres Potentials, die B-Lymphozyten-Funktion zu steigern. Hierfür aktivierte ich *in vitro* isolierte B-Zellen gesunder Spender mit IL-21 und aktivierenden CD40-Antikörpern und inkubierte sie über mehrere Tage mit den Wirkstoffen in verschiedenen Konzentrationen. In diesen Versuchen stachen drei Substanzen heraus. Ceforanid, Itoprid und Progesteron konnten in allen Versuchen die B-Zell-Funktion signifikant im Vergleich zur Kontrolle um 33%-43% steigern, sieben Wirkstoffe steigerten die Bildung von Plasmazellen. Um 100% - 200%, wobei die Einzelwerte auch innerhalb einer Gruppe teils deutlich schwankten. Mit dem steigenden Plasmazellanteil stieg auch die Menge an produzierten IgM-Antikörpern. Sechs Substanzen konnten die gemessene IgM-Konzentration verdoppeln, fünf steigerten außerdem die Produktion der IgG-Antikörper um 37%-53% verglichen mit unbehandelten Zellen als Kontrolle. Kein Wirkstoff hatte dabei einen toxischen Effekt.

Ich wählte Ceforanid und Progesteron für die Validierung ihrer Wirkung *in vivo* aus. Im Modell der aktiven Immunisierung mit mCol7-vWFA2 konnte ich an BALB/c-Mäusen zeigen, dass sich durch die tägliche Gabe von Ceforanid oder Progesteron die Konzentration der antigenspezifischen IgM- und IgG-Antikörper im Serum deutlich steigern lässt. Diese Wirkungen waren für die untersuchten Wirkstoffe bisher nicht bekannt und lassen sich durch die Literatur nicht vollständig erklären. Hier sind weitere Experimente notwendig, um die Grundlagen dieser Wirkungen zu entschlüsseln.

6 Literaturverzeichnis

1. Aguayo A, O´Brien S, Keating M, Manshouri T, Gidel C, Barlogie B, Beran M, Koller C, Kantarjian H, Albitar M: Clinical relevance of intracellular vascular endothelial growth factor levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Blood 96, 768-770 (2000)

2. Alaniz RC, Thomas SA, Perez-Melgosa M, Mueller K, Farr AG, Palmitter RD, Wilson CB: Dopamine β-hydroxylase deficiency impairs cellular immunity. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 2274-2278 (1999)

3. Ashburn TT, Thor KB: Drug Repositioning: Identifying and Developing New Uses for Existing Drugs. Nat Rev Drug Discov 3, 673-683 (2004)

4. Auer IO, Hardörfer C, Zimmermann I: Cefodizime Stimulates Subpopulations of Cells Mediating Spontaneous or Antibody-Dependent Cytotoxicity in Patiens with Bacterial Infections. Infection 20, 54-7 (1992)

5. Bach JF: The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Disease. N Engl J Med. 347, 911-920 (2002)

6. Bieber K, Sun S, Ishii N, Kasperkiewicz M, Schmidt E, Hirose H, Westermann J, Yu X, Zillikens D, Ludwig RJ: Animal models for autoimmune bullous dermatoses. Exp Dermatol 19, 2-11 (2010)

7. Bryskier A: Perfecting the ring and extending the antimicrobial spectrum: “The multiple generations”. Clin Microbiol Infect 6, 13-21 (2000)

8. Burgmann H, Wenische C, Haditsch M, Joura E, Kollaritsch H, Marth E, Mutz I, Rieger A, Thalhammer F, Weiss G, Zwiauer K: Impfungen bei Immunschwäche und Immunsuppression. Oe Aerztezeit 4, 1-12 (2010)

9. Calvey TN, Waering M, Wiliams NE, Chan K: Pharmacokinetics and Pharmacological Effects of Neostigmine in Man. Br J Clin Pharmac 7,149-155 (1979)

10. Campoli-Richards DM, Lackner TE, Monk JP: Ceforanide: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Clinical Efficacy. Drugs 34, 411-437 (1987)

11. Cerutti A, Cols M, Puga I: Marginal zone B cells: Virtues of innate like antibody producing lymphocytes. Nat Rev Immunol. 13, 118-32 (2013)

12. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE: Modulatory Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Human B Cell Differentiation. J Immunol. 179, 1634-1647 (2007)

13. Chong CR, Sullivan DJ Jr.: New uses for old drugs. Nature 448, 645-646 (2007)

14. Coffman RL, Sher A, Seder RA: Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. Immunity 33, 492-503 (2010)

15. Dajani AS, Thirumoorthi MC, Bawdon RE, Buckley JA, Pfeffer M, Vanharken DR, Smyth RD: Pharmacokinetics of intramuscular Ceforanide in infants, children and adolescents. Antimicrob Agents Chemother, 21, 282-287 (1982)

16. David MC, Ha SH, Paynter S, Lau C: A systematic review and meta-analysis of management options for adults who respond poorly to Hepatits B vaccination. Vaccine 33, 6564-6569 (2015)

17. Denis F, Mounier M, Hessel L, Michel JP, Gualde N, Dubois F, Barin F, Goudeau A: Hepatitis B vaccination in the elderly. J Infect Dis 149, 1019 (1984)

18. Dezfoli S, Horton HA, Thepyasuwan N, Berel D, Targan SR, Vasiliauskas EA, Dubinsky M, Shih DQ, Kaur M, McGovern DPB, Ippoliti A, Feldman EJ, Melmed GY: Combined Immunosuppression Impairs Immunogenicity to Tetanus and Pertussis Vaccination Among Patiens with Inflammatory Bowel Disease. Inflamm Bowel Dis 21, 1754-1760 (2015)

19. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG: The price of innovation: New estimates of drug development costs. J Health Econ 22, 151-185 (2003)

20. Duan Z, Chen X, Liang Z, Zeng Y, Zhu F, Long L, McCrae MA, Zhuang H, Shen T, Lu F: Genetic polymorphisms of CXCR5 and CXCL13 are associated with non-responsiveness of the hepatitis B vaccine. Vaccine 32, 5316-5322 (2014)

21. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C: Novel Suppressive Function of Transitional B Cells in Experimental Arthritis. J Immunol 178, 7868-7878 (2007)

22. Fernandez-Cabezudo MJ, Lorke DE, Azimullah, Mechkarska M, Hasan MY, Petroianu, Al-Ramadi BK: Cholinergic stimulation of the immune system protects against lethal infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium. Immunology 130, 388-398 (2010)

23. Fettke F, Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC: B cells: The old new players in reproductive immunology. Fron Immunol 5, 1-10 (2014)

24. Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM: B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol 3, 944-950 (2002)

25. Fiorino G, Peyrin-Biroulet L, Naccarato P, Szabo H, Sociale OR, Vetrano S, Fries W, Montanelli A, Repici A, Malesci A, Danese S: Effects of Immunosuppresion on Immune Response to Pneumococcal Vaccine in Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Study. Inflamm Bowel Dis 18, 1042-1047 (2012)

26. Fryauff DJ, Richards AL, Baird K, Richie TL, Mouzin E, Tjitra E, Sutamihardja MA, Ratiwayanto S, Hadiputranto H, Larasati RP, Pudjoprawoto N, Subianto B, Hoffman SL: Lymphocyte Proliferative Response and Subset Profiles during Extended Periods of Chloroquine or Primaquine Prophylaxis. Antimicrob Agents Chemother 40, 2737-2742 (1996)

27. Graefe KH: Protozoeninfektionen. In: Graefe KH, Lutz W, Bönisch H, Hahn JM, Bob A (Hrsg.), Bob K (Hrsg.): Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie.1. Aufl., 634-645, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2011

28. Harder S, Thürmann PA, Hellstern A, Benjaminov A: Pharmacokinetics of Trapidil, an antagonist of platelet derived growth factor in healthy subjects and in patients with liver cirrhosis. Br J Clin Pharmacol. 42, 443-449 (1996)

29. Harms R, Morsey B, Boyer CW, Fox HS, Sarvetnick N: Methamphetamine Administration Targets Multiple Immune Subsets and Induces Phenotypic Alterations Suggestive of Immunosuppression. PLoS ONE 7, 1-15 (2012)

30. Hofer S, Eisenbach C, Lukic IK, Schneider L, Bode K, Brueckmann M, Mautner S, Wente MN, Encke J, Werner J, Dalpke AH, Stremmel W, Nawroth PP, Martin E, Krammer PH, Bierhaus A, Weigand MA: Pharmacologic cholinesterase inhibition improves survival in experimental sepsis. Crit Care Med 36, 404-408 (2008)

31. Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L: Das natürliche Immunsystem In: Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L, Holländer GA (Hrsg.): Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Aufl., 7-38, Urban & Fischer, München, 2006a

32. Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L: Das Komplementsystem. In: Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L, Holländer GA (Hrsg.): Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Aufl., 219-228, Urban & Fischer, München, 2006b

33. Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L: Das T-Zell-System. In: Holländer GA, Barthlott T, Keller MP, Krenger W, Piali L, Holländer GA (Hrsg.): Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Aufl., 82-133, Urban & Fischer, München, 2006c

34. Holtmann G, Talley NJ, Liebregts T, Adam B, Parow C: A Placebo-Controlled Trial of Itopride in Functional Dyspepsia. N Engl J Med 354, 832-840 (2006)

35. House RV, Thomas PT: Comparison of Immune Functional Parameters Following In vitro Exposure to Natural and Synthetic Amphetamines. Immunopharmacol Immunotoxicol 16, 1-21 (1994)

36. Hughes GC, Martin D, Zhang K, Hudkins KL, Alpers CE, Clark EA, Elkon KB: Decrease in Glomerulonephritis and Th1-Associated Autoantibody Production after Progesterone Treatment in NZB/NZW Mice. Arthritis Rheum 60, 1775-1784 (2009)

37. Hughes GC, Choubey D: Modulation of autoimmune rheumatic diseases by oestrogen and progesterone. Nat Rev Rheumatol 10, 740-751 (2014)

38. Iwanga Y, Kimura T, Miyashita N, Morikawa K, Nagata O, Itoh Z, Kondo Y: Characterization of Acetylcholinesterase-Inhibition by Itopride. Jpn J Pharmacol 66, 317-322 (1994)

39. Iwanga Y, Miyashita N, Saito T, Morikawa K, Itoh Z: Gastrokinetic Effect of a New Benzamide Derivative Itopride and its Action Mechanisms in Conscious Dogs. Jpn J Pharmacol 71, 129-137 (1996)

40. Iwata H, Bieber K, Hirose M, Ludwig RJ: Animal Models to Investigate Pathomechanisms and Evaluate Novel Treatments for Autoimmune Bullous Dermatoses. Curr Pharm Des 21, 2422-39 (2015)

41. Iwata H, Bieber K, Tiburzy B, Chrobok N, Kalies K, Shimizu A, Leineweber S, Ishiko A, Vorobyev A, Zillikens D, Köhl J, Westermann J, Seeger K, Manz R, Ludwig RJ: B Cells, Dendritic Cells, and Macrophages Are Required To Induce an Autoreactive CD4 Helper T Cell Response in Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. J Immunol 191 2978-2988 (2013)

42. Jack AD, Hall AJ, Maine N, Mendy M, Whittle HC: What level of hepatitis B antibody is protective? J Infect Dic. 179, 489-492 (1999)

43. Johansson EL, Rask C, Fredriksson M, Eriksson K, Czerkinsky C, Holmgren J: Antibodies and Antibody-Secreting Cells in the Female Genital Tract after Vaginal or Intranasal Immunization with Cholera Toxin B subunit or Conjugates. Infect Immun. 66, 514-520 (1998)

44. Joiner KA, Low BR, Dzink JL, Bartlett JG: Antibiotic Levels in Infected and Sterile Subcutaneous Abcesses in Mice. J Infect Dis. 143, 487.494 (1981)

45. Kapetanovic MC, Saxne T, Sjöholm A, Truedsson L, Jönsson G, Geborek P: Influence of methotrexate, TNF blockers and prednisolone on antibody responses to pneumococcal polysaccharide vaccine in patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology 45, 106-111 (2006)

46. Karow T, Lang-Roth R: Antimikrobielle Pharmaka und Infektionskrankheiten. In: Karow T, Lang-Roth R, Karow T (Hrsg.): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 18. Aufl., 751-902, Thomas Karow, Köln 2010a

47. Karow T, Lang-Roth R: Arzneimittel in Gynäkologie und Geburtshilfe. In: Karow T, Lang-Roth R, Karow T (Hrsg.): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 18. Aufl., 1119-1152, Thomas Karow, Köln 2010b

48. Karow T, Lang-Roth R: Kardiovaskuläre Pharmaka – Kardiologie. In: Karow T, Lang-Roth R, Karow T (Hrsg.): Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 18. Aufl., 49-354, Thomas Karow, Köln 2010c

49. Kato Y, Tsuda T, Hosaka Y, Takahashi T, Shirakawa K, Furusako S, Mizuguchi K, Mochizuki H: Effect of trapidil on effector functions of monocytes related to atherosclerotic plaque. Eur J Pharmacol 428, 371-379 (2001)

50. Klöcker N: Sexualfunktion, Schwangerschaft. In: Gekle M, Wischmeyer E, Gründer S, Petersen M, Schwab A, Marckward F, Klöcker N, Baumann R, Marti H: Taschenlehrbuch Physiologie. 1. Aufl., 546-563, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2010

51. Kobie JJ, Zheng B, Bryk P, Barnes M, Ritchlin CT, Tabechian DA, Anandarajah AP, Looney RJ, Thiele RG, Anolik JH, Coca A, Wei C, Rosenberg AF, Feng C, Treanor JJ, Lee FEH, Sanz I: Decreased influenza-specific B cell responses in rheumatoid arthritis patients treated with anti-tumor necrosis factor. Arthr Res Ther 13, 1-12 (2011)

52. Kotecha RS, Wadia UD, Jacoby P, Ryan AL, Blyth CC, Keil AD, Gottardo NG, Cole CH, Barr IG, Richmond PC: Immunogenicity and clinical effectiveness of the trivalent inactivated influenza vaccine in immunocompromised children undergoing treatment for cancer. Cancer Medicine 5, 285-293 (2016)

53. Kuchen S, Robbins R, Sims GP, Sheng C, Phillips TM, Lipsky PE, Ettinger R: Essential Role of IL-21 in B Cell Activation, Expansion and Plasma Cell Generation during CD4+ T Cell-B Cell Collaboration. J Immunol. 179, 5886-5896 (2007)

54. Kuhn M, Szklarczyk D, Pletscher-Frankhild S, Blicher TH, von Mering C, Jensen LJ, Bork P: STICH 4: Integration of protein-chemical interactions with user data. Nucleic Acids Res 42, 1-7 (2014)

55. Kwiatkowska B, Maslinska M, Przygodzka M, Dmowska-Chabala J, Dabrowska J, Sikorska-Siudek K: Immune system as a new therapeutic target for antibiotics. Adv Biosc Biotech 4, 91-101 (2013)

56. Labro MT, Babin-Chevaye C, Hakim J: Influence of subinhibitory concentrations of ceftriaxone on opsonization and killing of Pseudomonas aeruginosa by human neutrophils. J Antimicrob Chemother 22, 341-352 (1988)

57. Labro MT: Immunomodulation by Antibacterial Agents. Is it Clinically Relevant? Drugs 45, 319-328 (1993)

58. Labro MT: Influence of antibacterial drugs on the immune system. In : Adcock IM, Alber R, Apasov SG, Bachmeier C, Barnes PJ, Blalock JE, Bocci G, Bosio A, Botting JH, Botting RM, Brooks PM, Danesi R, Day RO, Debets R, Del Tacca M, Descotes J, Dickneite G, Di Paolo A, Down JD, Dunne JF, Frew AJ, Graham GC, Gratana JW, Gronski P, Guzik TJ, Hack CE, Hermann K, Houtmann R, Humphery-Smith I, Ito K, Jiskoot W, Kanzy EJ, Kersten GFA, Korbut R, Labro MT, Littlejohn GO, Maecker HT, Masihi KN, McKay S, Morand EF, Nijkamp FP, Ollert MW, O´Sullivan MJ, Parnham MJ, Pieters R, Pile KD, Quesniaux VFJ, Resch K, Rijkers GT, Ring J, Roos D, Schaffrath B, Schuurman HJ, Seiler FR, Sitkovsky MV, Spits HS, Talmadge JE, Van De Corput L, Van Der Laan JW, Van Loveren H, Van Ossterhout AJM, Verbanac D, Verhoed J, Vial T, Vos JG, Weigent DA, Willemsen RA, Williams KM, Nijkamp FP (Hrsg.), Parnham

(Hrsg.): Principles of Immunopharmacology. 2. Aufl., 407-439, Birkhäuser Verlag, Basel, 2005

59. Ledermann HM, Winkelstein JA: X-Linked Agammaglobulinemia: An Analysis of 96 Patients. Medicine 64, 145-156 (1985)

60. Li ZK, Nie JJ, Li J, Zhuang H: The effect of HLA on immunological response to hepatitis B vaccine in healthy people: A meta analysis. Vaccine 31, 4355-4361 (2013)

61. Li CH, Zhang X, Ge XL, Huang X, Zhang AQ, Gu WQ: Effects of Combined Anisodamine and Neostigmine Treatment on the Inflammatory Response and Liver Regeneration of Obstructive Jaundice Rats after Hepatectomy. BioMed Res Int 2014, 1-9 (2014)

62. Limbert M, Bartlett RR, Dickneite G, Klesel N, Schorlemmer HU, Seibert G, Winkler I, Schrinner E: Cefodizime, an Aminothiazolyl Cephalosporin IV. Influence on the Immune System. J Antibiot 37, 1719-1726 (1984)

63. Los M, Roodhart JML, Voest EE: Target Practice: Lessons from Phase III Trials with Bevacizumab and Vatalanib in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer. Oncologist. 12, 443-450 (2007)

64. Lü FX, Ma Z, Rourke T, Srinivasan S, McChesney M, Miller CJ: Immunoglobulin Concentrations and Antigen-Specific Antibody Levels in Cervicovaginal Lavages of Rhesus Macaques Are Influenced by the Stage of the Menstrual Cycle. Infect Immun. 67, 6321-6328 (1999)

65. Ma Z, Lü FX, Torten M, Miller CJ: The number and distribution of immune cells in the cervicovaginal mucosa remain constant throughout the menstrual cycle of rhesus macaques. Clin Immunol. 100, 240-249 (2001)

66. Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chioin R, Fabbri M, Fontanelli A, Monici PA, Repetto S, De Servi S, Varani E: Trapidil (Triazolopyrimidine), a Platelet-Derived Growth Factor Antagonist, Reduces Restenosis After Percutaneus Transluminal Coronary Angioplasty. Circulation 90, 2710-2715 (1994)

67. Mariani SM: Antiangiogenesis Cocktails – Stirred or Shaken? MedGenMed 6,21 (2004)

68. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF: Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. J Clin Invest 118, 3420-3430 (2008)

69. McKenna F, McLaughlin PJ, Lewis BJ, Sibbring GC, Cummerson JA, Bowen-Jones D, Moots RJ: Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: A flow cytometric study. J Neuroimmunol 132, 34-40 (2002)

70. Medina KL, Kincade PW: Pregnancy-related steroids are potential negative regulators of B lymphopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 5382-5386 (1994)

71. Merrick CJ: Transfection with thymidine kinase permits bromodeoxyuridine labelling of DNA replication in the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Malar J 14, 1-12 (2015)

72. Moran M: A Breakthrough in R&D for Neglected Diseases: New Ways to Get the Drugs We Need. PLoS Med 2, 828-832 (2005)

73. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S: Immunosuppressive property of bromocriptine on human B lymphocyte function in vitro. Clin Exp Immunol 93, 200-205 (1993)

74. Morikawa K, Oseko F, Morikawa S: Immunosuppressive activity of bromocriptine on human T lymphocyte function in vitro. Clin Exp Immunol 95, 514-518 (1994)

75. Murphy K: The Induced Responses of Innate Immunity. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 75-125, Garland Science, New York, 2011a

76. Murphy K: The Development and Survival of Lymphocytes. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 275-333, Garland Science, New York, 2011b

77. Murphy K: Antigen Recognition by B-cell and T-cell Receptos. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 127-156, Garland Science, New York, 2011c

78. Murphy K: The Humoral Immune Response. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 387-425, Garland Science, New York, 2011d

79. Murphy K: The Generation of Lymphocyte Antigen Receptors. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 157-200, Garland Science, New York, 2011e

80. Murphy K: Signaling Through Immune-System Receptors. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 239-274, Garland Science, New York, 2011f

81. Murphy K: Basic Concepts in Immunology. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 1-36, Garland Science, New York, 2011g

82. Murphy K: Dynamics of Adaptive Immunity. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 429-464, Garland Science, New York, 2011h

83. Murphy K: Manipulation of the Immune Response. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 669-716, Garland Science, New York, 2011i

84. Murphy K: Failures of Host Defense Mechanisms. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 509-570, Garland Science, New York, 2011j

85. Murphy K: Autoimmunity and Transplantation. In: Murphy K, Moldovan I (Hrsg.): Janeway´s Immunobiology. 8. Aufl., 611-669, Garland Science, New York, 2011k

86. Muzzio D, Zygmunt M, Jensen F: The role of pregnancy associated hormones in the development and function of regulatory B cells. Fron Immunol 5, 1-5 (2014)

87. Neugebauer M, Khedr A, El-Rabbat N, El-Kommos M, Saleh G: Stereoselective Metabolic Study of Famprofazone. Biomed Chromatogr 11, 356-361 (1997)

88. Oettel M, Mukhopadhyay AK: Progesterone: The forgotten hormone in men? Aging Male 7, 236-257 (2004)

89. Overton ET, Sungkanuparph S, Powderly WG, Seyfried W, Groger RK, Aberg JA: Undetectable plasma HIV RNA load predicts success after hepatitis B vaccination in HIV-infected persons. Clin Infect Dis 41, 1045-1048 (2005)

90. Paesler J, Gehrke I, Gandhirajan RK, Filipovich A, Hertweck M, Erdfelder F, Uhrmacher S, Poll-Wolbeck SJ, Hallek M, Kreuzer KA: The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors Vatalanib and Pazopanib Potently Induce Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in vitro and in vivo. Clin Cancer Res 16, 3390-3398 (2010)

91. Pauklin S, Petersen-Mahrt SK: Progesterone Inhibits Activation-induced Deaminase by binding to the Promoter. J Immunol 183, 1238-1244 (2009)

92. Pertea M, Salzberg SL: Between a chicken and a grape: Estimating the number of human genes. Genome Biol 11, 206-213 (2010)

93. Polireddy K, Khan MMT, Chavan H, Young S, Ma X, Waller A, Garcia M, Perez D, Chavez S, Strouse JJ, Haynes MK, Bologa CG, Oprea TI, Tegos GP, Sklar LA, Krishnamurthy P: A Novel Flow Cytometric HTS Assay Reveals Functional Modulators of ATP Binding Cassette Transporter ABCB6. PLoS ONE 7, 1-14 (2012)

94. Porotto M, Orefice G, Yokoyama CC, Mungali BA, Realubit R, Sganga ML, Aljofan M, Whitt M, Glickman F, Moscona A: Simulating Henipavirus Multicycle Replication in a Screening Assay Leads to identification of a Promising Candidate for Therapy. J Virol. 83, 5148-5155 (2009)

95. Prestwick Chemical: Prestwick Chemical Library®. http://www.prestwickchemical.com/prestwick-chemical-library.html (zuletzt aufgerufen am 14.09.2016)

96. Purnama C, Camous X, Larbi A: An Overview of T Cell Subsets and Their Potential Use as Markers of Immunological Ageing. Int Trend Immmunity 1, 21-32 (2013)

97. Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC: Die natürliche Abwehr von Krankheiten. In: Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC, Markl J (Hrsg.): Biologie. 7.Aufl., 435-465, Elsevier, München, 2006

98. Quartier P, Debré M, De Blic J, de Sauverzac R, Sayegh N, Jabado N, Haddad E, Blanche S, Casanova JL, Smith CI, Le Deist F, de Saint Basile G, Fischer A: Early and prolonged intravenous immunoglobulin replacement therapy in childhood agammaglobulinemia: a retrospective survey of 31 patients. J Pediatr, 134, 589-596 (1999)

99. Rahier JF, Moutschen M, Van Gompel A, Van Ranst M, Louis E, Segaert S, Masson P, De Keyser F: Vaccinations in patients with immune-mediated inflammatory diseases. Rheumatology 49, 1815-1827 (2010)

100. Rawstron AC: Immunophenotyping of Plasma Cells. Curr Protoc Cytom 6, 23.1-23.14 (2006)

101. Robert-Koch-Institut: Schutzimpfung gegen Hepatitis B: Häufig gestellte Fragen und Antworten. http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/HepatitisB/FAQ-Liste_HepB_Impfen.html#FAQId2407118 (zuletzt aufgerufen am 14.09.2016)

102. Roehrl MHA, Kangg S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan PG: Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. Proc natl Acad Sci USA. 101, 7554-7559 (2004)

103. Roes J, Rajewsky K: Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. J Exp Med 177, 45-55 (1993)

104. Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Hoberg MD, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijin LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB: β-Lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. Nature 433, 73-77 (2005)

105. Roubinian J, Talal N, Siiteri PK, Sadakian JA: Sex Hormone Modulation of Autoimmunity in NZB/NZW Mice. Arthritis Rheum 22, 1162-1169 (1979)

106. Saha B, Mondal AC, Basu S, Dasgupta PS: Circulating dopamine level, in lung carcinoma patients, inhibits proliferation and cytotoxicity of CD4+ and CD8+ T cells by D1 dopamine receptors: An in vitro analysis. Int Immunopharmacol 1, 1363-1374 (2001)

107. Sardana D, Zhu C, Zhang M, Gudivada RC, Yang L, Jegga AG: Drug repositioning for orphan diseases. Brief Bioinform 12, 346-356 (2011)

108. Schepers RJF, Oyler JM, Joseph RE Jr., Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA: Metamphetamine and Amphetamine Pharmacokinetics in Oral Fluid and Plasma after Controlled Oral Metamphetamine Administration to Human Volunteers. Clin Chem. 49, 121-132 (2003)

109. Sedlacek HH: Die angeborene Immunabwehr. In: Sedlacek HH (Hrsg.): Immunologie – die Immunabwehr des Menschen. 2.Aufl., 17-160, DeGruyter, Berlin, 2014a

110. Sedlacek HH: Die erworbene Immunabwehr. In: Sedlacek HH (Hrsg.): Immunologie – die Immunabwehr des Menschen. 2.Aufl., 161-357, DeGruyter, Berlin, 2014b

111. Sedlacek HH: Arzneimittel und Zubereitungen zur Beeinflussung der Immunabwehr. In: Sedlacek HH (Hrsg.): Immunologie – die Immunabwehr des Menschen. 2.Aufl., 717-760, DeGruyter, Berlin, 2014c

112. Sitaru C, Chiriac MT, Mihai S, Büning J, Gebert A, Ishiko A, Zillikens D: Induction of Complement-Fixing Autoantibodies against Type VII Collagen Results in Subepidermal Blistering in Mice. J Immunol. 177, 3461-3468 (2006)

113. Sitaru C, Mihai S, Otto C, Chiriac MT,Hausser I, Dotterweich B, Saito H, Rose C, Ishiko A, Zillikens D: Induction of dermal-epidermal separation in mice by passive transfer of antibodies specific to type VII collagen. J Clin Invest. 115, 870-878 (2005)

114. Smyth RD, Pfeffer M, Glick A, Van Harken DR, Hottendorf GH: Clinical Pharmacokinetics and Safety of High Doses of Ceforanide and Cefazolin. Antimicrob Agents Chemother 16, 615-621 (1979)

115. STITCH-Database 4.0. http://stitch.embl.de/ , Eingabe “Ceforanide”, (zuletzt aufgerufen am 03.04.2016)

116. Stoilov P, Lin CH, Damoiseaux R, Nikolic J, Black DL: A high-throughput screening strategy identifies cardiotonic steroids as alternative splicing modulators. Proc Natl Acad Sci USA. 105, 11218-11223 (2008)

117. Talley NJ, Tack J, Ptak T, Gupta R, Giguére M: Itopride in functional dyspepsia: Results of two phase III multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trials. Gut 57, 740-746 (2007)

118. Tay L, Leon F, Vratsanos G, Raymond R, Corbo M: Vaccination response to tetanus toxoid and 23-valent pneumococcal vaccines following administration of a single dose of abatacept: A randomized, open-label, parallel group study in healthy subjects. Arthr Res Ther 9, 1-11 (2007)

119. Thirumoorthi MC, Buckley JA, Vincent CV, Kobos D, Dajani A: Efficacy and safety of ceforanide in treatment of childhood infections. Pediatr Infect Dis J 2, 377-380 (1983)

120. Thong YH, Ferrante A, Rowan-Kelly B: primaquine inhibits mitogen-induced human lymphocyte proliferative responses. Trans R Soc Trop Med Hyg 72, 537-539 (1978)

121. Tribouillard-Tanvier D, Bérinque V, Desban N, Gug F, Bach S, Voisset C, Galons H, Laude H, Vilette D, Blondel M: Antihypertensive drug Guanabenz is active in vivo against both Yeast and Mammlian Prions. PLoS One 3, 1-9 (2008)

122. Van den Bijllaardt W, Siers HM, Timmerman-Kok C, Pessers FG, Natrop G, van Baars JF, Nutma N, van der Werf D, Gisolf EH: Seroprotection After Hepatitis A Vaccination in Patients With Drug-Induced Immunosuppression. J Trav Med 20, 278-282 (2013)

123. Vanholder R, Van Landschoot N, Dagrosa E, Ringoir S: Cefodizime: A New Cephalosporin with Apparent Immune-Stimulating Properties in Chronic Renal Failure. Nephrol Dial Transplant 2, 221-224 (1988)

124. Veillon EW Jr., Keiser, SD, Parrish MR, Bennet W, Cockrell K, Fournier L, Granger JP, Martin JN Jr, Larmarca B: 17-OH-Progesterone Blunts the Hypertensive Response Associated with Reductions in Uterine Pressure in Pregnant Rats. Am J Obset Gynecol 201, 1-12 (2009)

125. Wallace RJ Jr., Martin RR, Greenberg SB: Ceforanide (BL-S786) in the Treatment of Community-Acquired Bacterial Pneumonia. Infection 7, 176-179 (1979)

126. Welsch U, Deller T: Immunsystem (lymphatisches System, Abwehrsystem). In Welsch U, Deller T: Lehrbuch Histologie. 3. Aufl., 223-252, Urban & Fischer, München, 2010

127. Wey SP, Wu HY, Chang FC, Jan TR: Methamphetamine and diazepam suppress antigen-specific cytokine expression and antibody production in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. Toxicol Lett 181, 157-162 (2008)

128. Wiesinger H: Kohlenhydrate. In: Arand M, Behrmann I, Blaut M, Brigelius-Flohe R, Dorn-Beineke A, von Eckardstein A, Von Eckardstein S, Eilers M, Friedrich K, Galla HJ, Gessler M, Hersberger M, Hornemann T, Hutterer R, Hüning T, Igo-Kemenes T, Kauppp UB, Klaus S, Koepsell H, Lübben M, Luley C, Müller F, Neumaier M, Rassow J, Roth J, Rentsch K, Schartl M, Stieger B, Wajant H, Wiesinger H, Wintermeyer W, Wirth T, Woehlke G, Schartl M (Hrsg.), Gessler M (Hrsg.), von Eckardstein (Hrsg.): Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. 1.Aufl., 135-179, Urban & Fischer, München, 2009

129. Wyle FA, Kent JR: Immunosuppression by sex steroid hormones. Clin Exp immunol 27, 407-415 (1977)

130. Yates MA, Li Y, Chlebeck, Proctor T, Vandenbark AA, Offner H: Progesterone Treatment Reduces Disease Severity and Increases IL-10 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J Neuroimmunol 220, 136-139 (2010)

131. Yip KW, Mao x, Billie Au PY, Hedley DW, Chow S, Dalili S, Mocanu JD, Bastianutto C, Schimmer A, Liu FF: Benzethonium Chloride: A Novel Anticancer Agent Indentified by Using a Cell-Based Small-Molecule Screen. Clin Cancer Res 12, 5557-5569 (2006)

132. Yoon S, Lee H, Kim TE, Lee SH, Chee DH, Cho JY, Yu KS, Jang IJ: Comparative steady-state pharmacokinetic study of an extended-release formulation of itopride and its immediate-release reference formulation in healthy volunteers. Drug Des Dev Ther 8, 123-128 (2014)

133. Yu Q, Zhang D, Walston M, Zhang J, Liu Y, Watson RR: Chronic methamphetamine exposure alters immune function in normal and retrovirus-infected mice. Int Immunopharmacol 2, 951-962 (2002)

134. Zaffina S, Marcellini V, Santoro AP, Scarsella M, Camisa V, Vinci MR, Musolino AM, Nicolosi L, Rosado MM, Carsetti R: Repeated vaccinations do not improve specific immune defenses against Hepatitis B in non-responder health care workers. Vaccine 32, 6902-6910 (2014)

135. Zhang L, Chang KK, Li MQ, Li DJ, Yao XY: Mouse endometrial stromal cells and progesterone inhibit the activation and regulate the differentiation and antibody secretion of mouse B cells. Int J Clin Exp Pathol 7, 123-133 (2014)

136. Zhou L, Ismaili J, Stordeur P, Thielemans K, Goldman M, Pradier O: Inhibition of the CD40 Pathway of Monocyte Activation by Triazolopyrimidine. Clin Immunol 93, 232-238 (1999)

7 Anhänge

1. Teilnahmebescheinigung „Einführung in die Versuchstierkunde“
2. Votum der Ethikkommission
3. Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

7.1 Kongressbeiträge:

1.) **Zanken J,** Bieber K, Ludwig RJ: Drug repurposing of approved therapeutics regarding the modulation of B cell-proliferation and -differentiation, GRK1727-on-site visit, Lübeck, 2015

2) Bieber K, Samavedam UK, Matsumoto K, Magens M, Veldkamp W, Ghorbanalipoor S, Heimberg L, Krause M, **Zanken J**, Zillikens D, Ludwig RJ: Drug repurposing of approved therapeutics for the treatment of chronic and autoimmune skin diseases, 42. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Ulm, 2015

UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
GEMEINSAME TIERHALTUNG

Leitung
Dr. med. vet. Barthel Schmelting, Ph.D.
Fachtierarzt für Versuchstierkunde
Tierschutzbeauftragter der Universität
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck
Tel. +49 451 500 2875
Fax +49 451 500 4193
schmelting@gth.uni-luebeck.de

Teilnahmebescheinigung

Herr Johannes Zanken

hat vom 30.06. – 07.07.2014 an einem 20-stündigen Kurs der Universität zu Lübeck

„Einführung in die Versuchstierkunde"

erfolgreich teilgenommen (20h Theorie mit abschließender schriftlicher Leistungskontrolle).

Folgende Kursinhalte wurden vermittelt:

Einführung in die Versuchstierkunde /Tierschutz und Tierversuche

Ersatz- und Ergänzungsmethoden

Biologie der wichtigsten Versuchstierarten

(Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schwein, Fische (Zebrabärbling))

Biologie, Anatomie, Physiologie, Verhalten (Maus, Ratte) / Umgang mit Versuchstieren (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Minipig, Schaf, Ziege) / Erkennen von Schmerzen, Leiden und Schäden / Nager: Ernährung und Fütterung / Nager: Zucht und Genetik

Pflege und Haltung

Tierhaltungsräume, Barriere, Haltungseinheiten, Käfigsysteme, Mindestraumbedarf / Fütterung

Hygiene in Versuchstierhaltungen

Reinigung, Desinfektion / Mikrobiologischer Status von Versuchstieren / Gesundheitsüberwachung des Tierbestandes, Verhinderung von Infektionen / Versuchtierkrankheiten (Erkennen, Behandeln, Schutzmaßnahmen / Einflüsse auf Versuchsergebnisse) / Arbeiten, Hygieneprinzip unter Umsetzstationen

Ethische Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

Rechtliche Grundlagen für tierexperimentelles Arbeiten

2010/63EU und Umsetzung durch das Tierschutzgesetz, Tierschutzversuchstierverordnung, Versuchstiermeldeverordnung / Tierschutzbeauftragter / §15 Kommission

Durchführung und Planung von Tierversuchen

Versuchsplanung und Protokollführung / Literaturrecherche / Biometrische Statistik / analoge und digitale Dokumentation / Narkose, Schmerzausschaltung /Abbruchkriterien zur Leidensbegrenzung / Sicheres handling von Nagern / Methoden der Applikation Nager, Kaninchen, Probenentnahme Nager (ip, sc, iv, po, laterale Schwanzvene, retrobulbär, mandibulär, intrakardial / Tierschutzgerechte Tötung von Versuchstieren / 3R-Prinzip / Weiterbildungsmöglichkeiten.

Universität zu Lübeck
Tierschutzbeauftragter
Dr. med. vet. Barthel Schmelting Ph.D.
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

Lübeck, den 26.05.2016 Dr. B. Schmelting, Ph.D.

UNIVERSITÄT ZU LÜBECK
GEMEINSAME TIERHALTUNG

Leitung
Dr. med. vet. Barthel Schmehing, Ph.D.
Fachtierarzt für Versuchstierkunde
Tierschutzbeauftragter der Universität
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck
Tel. +49 451 500 2875
Fax +49 451 500 4193
schmehing@gth.uni-luebeck.de

Teilnahmebescheinigung

Johannes Zanken

hat vom 27.10. – 03.11.2014 an einem 20-stündigen Praxiskurs der Universität zu Lübeck

„Einführung in die Versuchstierkunde"

teilgenommen.

Folgende Kursinhalte mit entsprechender Praxis wurden vermittelt:

Biologie der wichtigsten Versuchstierarten

(Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen)

Anatomie, Physiologie, Verhalten (Maus, Ratte)/ Umgang mit Versuchstieren (Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Schaf) / Erkennen von Schmerzen, Leiden und Schäden

Pflege und Haltung

Tierhaltungsräume, Barriere, Haltungseinheiten, Käfigsysteme

Hygiene in Versuchstierhaltungen

Reinigung, Desinfektion / Verhinderung von Infektionen / Arbeiten, Hygieneprinzip unter Umsetzstationen

Durchführung und Planung von Tierversuchen

Versuchsplanung und Protokollführung / analoge und digitale Dokumentation / Narkose, / Sicheres handling von Nagern und Kaninchen / Methoden der Applikation Nager, Probenentnahme Nager (ip, sc, iv, po, laterale Schwanzvene, retrobulbär, mandibulär, intrakardial) / Tierschutzgerechte Tötung von Versuchstieren / Sektion Maus

Lübeck, den 26.05.2016

Universität zu Lübeck
Tierschutzbeauftragter
Dr. med. vet. Barthel Schmehing, Ph.D.
Ratzeburger Allee 160
23562 Lübeck

Im Focus das Leben
Universität zu Lübeck
Medizinische Fakultät

Ethik-Kommission
Vorsitzender:
Herr Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe
Universität zu Lübeck
Stellv. Vorsitzende:
Frau Prof. Dr. med. M. Schrader
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Sachbearbeitung: Dr. Angelika Hüppe
Tel.: +49 451 500 5854
Fax: +49 451 500 5872
angelika.hueppe@uk-sh.de

Aktenzeichen: 09-140
Datum 13.11.2009

Universität zu Lübeck · Ratzeburger Allee 160 · 23538 Lübeck

Hr. Prof. Dr. Ludwig
Klinik für Dermatologie und Venerologie

im Haus

Sitzung der Ethik-Kommission am 06. Oktober 2009, Nachreichung vom 06.11.2009

Antragsteller: Hr. Prof. Dr. Ludwig

Titel: ***Pathogenese und Therapie Autoantikörper-induzierter Gewebsschädigung***

Sehr geehrter Herr Ludwig,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Die Kommission hat keine Bedenken mehr.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muss die Kommission umgehend benachrichtigt werden. Nach Abschluss des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind. Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß

Prof. Dr. Dr. H. Raspe
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder: ☒

☒ Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe (Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)
☒ Prof. Dr. Schwieger (Psychiatrie)
☒ Prof. Dr. Dendorfer (Pharmakologie)
☒ Frau Prof. E. Stuhbe (Theologie)
Prof. Dr. Berck (Medizin- und Wissenschaftsgeschichte)
Frau H. Müller (Pflege)
Dr. Kaiser (Kinderchirurgie)
☒ Herr Dr. Fieber (Richter am Amtsgericht Ahrensburg)
☒ Prof. Schwinger (Humangenetik)
☒ Herr Prof. Dr. Mönig (Medizinische Klinik I)
☒ Frau Prof. Dr. M. Schrader (Plastische Chirurgie, Stellv. Vors.)
☒ Herr D. Stojan (Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

Schleswig-Holstein
Der echte Norden

Schleswig-Holstein
Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Ihr Antrag vom: 17.09.2014

Mein Zeichen: V 242-7224.122-5 (94-8/14)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

Frau
Dr. Katja Bieber
Klinik für Dermatologie, Allergologie
und Venerologie
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
Campus Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

nachrichtlich:
Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

7. November 2014

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 28. Juli 2014 (BGBl. I S. 1308), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

In vivo Validierung der neu identifizierten B Zell-modulierenden Funktion etablierter Pharmaka

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 667 Mäuse verwendet werden.

2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Oktober 2017 befristet.

3. Ort der Durchführung:
   Universität zu Lübeck, Gemeinsame Tierhaltung

4. Leiterin des Versuchsvorhabens:
   Frau Dr. Katja Bieber

5. Stellvertreter:
   Herr Prof. Dr. Ralf Ludwig

6. Wechselt die Leiterin des Versuchsvorhabens oder ihr Stellvertreter, so ist mir diese Änderung unverzüglich anzuzeigen; die Genehmigung gilt weiter, wenn sie nicht innerhalb eines Monats widerrufen wird.

7. Verantwortlicher Tierarzt nach § 28 der Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125):
   Herr Dr. B. Schmelting

8. Weitere Nebenbestimmungen:
   Die Genehmigung beschränkt sich zunächst auf die Validierungsansätze der ersten Stufe. Anschließend ist ein Zwischenbericht vorzulegen.

Die im Antrag gemachten Angaben sind Bestandteil dieser Genehmigung. Sofern vorstehend abweichende Nebenbestimmungen getroffen wurden, gehen diese den Angaben im Antrag vor.

Die Bestimmungen des § 8 des Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung sowie der §§ 116 und 117 des Landesverwaltungsgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Juni 1992 (GVOBl. Schl.-H. S. 243) sind zu beachten.

Ich weise insbesondere darauf hin, dass Tierversuche nur durch den in § 16 der Tierschutz-Versuchstierverordnung genannten Personenkreis durchgeführt werden dürfen.

Rechtsbehelfsbelehrung
Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Zustellung schriftlich oder zur Niederschrift des Urkundsbeamten der Geschäftsstelle Klage beim Verwaltungsgericht Schleswig-Holstein in 24837 Schleswig, Brockdorff-Rantzau-Straße 13, erhoben werden.

Mit freundlichen Grüßen

Buttchereit

Schleswig-Holstein
Der echte Norden

Schleswig-Holstein
Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume

Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Frau
Dr. Katja Bieber
Institut für Experimentelle Dermatologie
Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

nachrichtlich:
Herrn Dr. B. Schmelting
Gemeinsame Tierhaltung
der Universität zu Lübeck
Ratzeburger Allee 160
23538 Lübeck

Ihre Anzeigen vom: 21.04.2015
Mein Zeichen: V 242.7224.122-5
Herr Buttchereit
Telefon: 0431 988-7128
Telefax: 0431 988-7042

29. April 2015

Durchführung von Tierversuchsvorhaben

Sehr geehrte Frau Dr. Bieber,

gegen die angezeigte Änderung der Versuchsplanung für die genehmigten Tierversuchsvorhaben *„In vivo Validierung der neu identifizierten T Zell-modulierenden Funktion etablierter Pharmaka"* sowie *„In vivo Validierung der neu identifizierten B Zell-modulierenden Funktion etablierter Pharmaka"* erhebe ich keine Einwände.

Mit freundlichen Grüßen

Buttchereit

Dienstgebäude: Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 | poststelle@melur.landsh.de | www.melur.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch verschlüsselte Dokumente.

8 Danksagung

Diese Arbeit ist mit wertvoller Unterstützung durch viele Menschen fertiggestellt worden, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Ich danke den Direktoren des Lübecker Instituts für Experimentelle Dermatologie (LIED) der Universität zu Lübeck und dem Direktor der Klinik für Dermatologie, Allergologie und Venerologie der Universität zu Lübeck, namentlich Herrn Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim, Herrn Prof. Dr. med. Ralf Ludwig und Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Enno Schmidt sowie Herrn Prof. Dr. med. Detlef Zillikens für die Möglichkeit, die Experimente in ihrem Labor durchzuführen, und für die Bereitstellung aller benötigten Materialien.

Hervorzuheben aus dieser Gruppe ist Herr Prof. Dr. med. Ralf Ludwig, der mir ein Thema überließ, an dem ich über die ganze Zeit nie das Interesse verlor. Hierfür und nicht zuletzt für seinen Ideenreichtum sowie die Förderung, die ich durch ihn erfuhr, bin ich ihm sehr dankbar. Die vielen freundlichen Gespräche auf Augenhöhe werde ich stets in guter Erinnerung behalten.

Mein größter Dank gilt Frau Dr. Katja Bieber. Sie begleitete mich als Mentorin über das gesamte Projekt und war mir zu jeder Zeit eine überaus kompetente Ansprechpartnerin. Noch höher schätze ich ihre Fähigkeit, zu motivieren und nie den Spaß an der Sache zu verlieren. Vor ein Problem, das selbst sie nicht lösen kann, möchte ich nie gestellt sein.

Des Weiteren bin ich Herrn Prof. Dr. med. Saleh Ibrahim für die Übernahme des Mentorings dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. Jörg Köhl und Herrn Dr. Tillman Vollbrandt aus dem Institut für systemische Entzündungsforschung (ISEF) danke ich für die Möglichkeit, die *Cell Analysis Core Facility* nutzen zu dürfen.

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitgliedern des LIEDs für die freundliche Atmosphäre im Labor und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Hier möchte ich Frau Malin Krause hervorheben, die mir bei vielen Experimenten zur Seite stand und mit der ich mich jederzeit ehrlich austauschen konnte. Es war mir immer eine besondere Freude mit ihr zusammenzuarbeiten. Für die technische Unterstützung danke ich

Claudia Kauderer, Astrid Fischer und Diana Scheppan sowie Kazuko Matsumoto und Dr. Stefan Tukaj für ihre wichtigen atschläge zur richtigen Zeit. Herrn Dr. Yask Gupta danke ich für seine Unterstützung bei der Auswertung.

Weitere dankenswerte Untersützung erfuhr ich durch Katharina Hofmann, die mir mit Rat und Antikörpern zu helfen wusste, und Simon Eschweiler aus dem Institut für systemische Entzündungsforschung (ISEF).

Ich danke dem Graduiertenkolleg 1727 „Modulation von Autoimmunität“ (GRK1727) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung durch ein Stipendium. Dies ermöglichte es mir, das Medizinstudium für die Dauer der Forschungsarbeit ruhen zu lassen. Das GRK1727 sowie das Excellenzcluster „*Inflammation at Interfaces*“ bildeten ein wissenschaftliches Umfeld, das mir Chancen, meine Ergebnisse zu präsentieren, und immer die Möglichkeit zum Austausch von Informationen gab. Beides habe ich sehr zu schätzen gelernt.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den vielen Probanden bedanken, die sich freundlicherweise bereit erklärten, meine Arbeit mit einer Blutprobe zu unterstützen.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung, die ich während meiner gesamten Studienzeit erfahren durfte.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Johannes Zanken, geboren am 13. Juli 1992 in Münster

Schulbildung

08/2004 – 06/2011	Gymnasium Damme, Abitur

Studium

10/2011	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
09/2013	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
09/2014 – 03/2015	Promotionssemester
seit 04/2015	Wissenschaftliche Mitarbeit im Lübecker Institut für Experimentelle Dermatologie

Promotion

09/2014	Beginn der Promotion unter Prof. Dr. med. Ralf Ludwig im Institut für Experimentelle Dermatologie, Universität zu Lübeck, Mitglied des Graduiertenkollegs 1727 „Modulation von Autoimmunität“
09/2014 – 03/2015	Promotionssemester mit Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft für das im Graduiertenkolleg durchgeführte Projekt MD TP12
09/2014 – 11/2015	Durchführung der Experimente
10/2016	Fertigstellung der Dissertation

Kongressbeiträge

01/2015	Posterpräsentation GRK1727-on-site visit, Lübeck
03/2015	Posterpräsentation, 42. Tagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Ulm