

Neue Anwendungsmethoden der Durchflusszytometrie
in der Biotechnologie

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität
Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Chem. Peter Arne Burzlaff
geboren am 23.01.1973 in Lehrte

2005

Referent Prof. Dr. T. Scheper
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Korreferent Prof. Dr. Dr. h. c. K. Schügerl
Institut für Technische Chemie
Universität Hannover

Tag der Promotion 14.04.2005

Danksagung

Für die sehr gute Betreuung während meiner Dissertation danke ich Herrn Prof. Dr. T. Scheper.

Für die Übernahme des Korreferates danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. K. Schügerl.

Für die sehr gute Betreuung danke ich Frau Dr. C. Kasper.

Ein Dank an die Professoren Kalesse und Kirschning des Instituts für Organische Chemie der Universität Hannover für die Überlassung der Zytostatika.

Ganz viel „Danke, Danke, Danke“ für die viele Hilfe, das Korrektur lesen, die kritischen Anmerkungen etc. gehen an Alex Gierse, Alex Tappe, Christian, Kirstin, Maren, Mike und Sven. An meine liebe Diplomanden und Praktikanten Alex, Mike und Fabienne ein Dankeschön für die ergebnisreiche Arbeit. An alle weiteren Kollegen vom AK Scheper geht ein Dank für die gute Arbeitsatmosphäre, besonders an Olli, der mit missionarischem Eifer dafür gesorgt hat, dass alle Bioreaktoren mit der nötigen Effizienz laufen. Den Bewohnern der Neubaus sei an dieser Stelle die Bewunderung ausgesprochen, dass sie (wenn auch nicht immer ohne einen bissigen Kommentar) meinen Kaffee trotz des ausgefallenen Wasser:Pulver-Verhältnisses getrunken haben.

Danke Maren, für die engelsgleiche Geduld, die aufbauende Unterstützung und die energischen Hinweise, dass diese Arbeit fertig werden muss.

Ein Dank an meinen Vater und Christel für die viele moralische und finanzielle Unterstützung.

Inhalt

Kurzzusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung und Zielsetzung	5
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Durchflusszytometrie	7
2.2 In situ-Mikroskopie	12
2.3 Oszillierende Hefen	13
2.4 Säugerzellkultivierung	15
2.4.1 Microcarrier	16
2.4.2 In-vitro-Methoden	19
2.4.3 Zellwachstum und Zelltod	20
3 DNA-Bindungsstudien an Hydrotalcit	25
3.1 Aufbau und Verwendung von Hydrotalcit	25
3.2 Fließinjektionssysteme für die Durchflusszytometrie	26
3.3 Methoden	27
3.3.1 Messung der statischen Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit .	27
3.3.2 Entwicklung eines durchflusszytometrischen Messverfahrens	28
3.3.3 Entwicklung einer Messapparatur zur Ermittlung schneller Bindungs- vorgänge	29
3.4 Ergebnisse	30
3.4.1 Bestimmung der statischen Bindungskapazität	31
3.4.2 Durchflusszytometrische Messung der Bindungskapazität	31
3.5 Diskussion	36
4 Messung oszillierender Hefen	39
4.1 Methoden	39
4.1.1 Kultivierung oszillierender Hefe	39
4.1.2 Durchflusszytometrische Detektion morphologischer und biochemischer Parameter	41
4.2 Ergebnisse	43
4.2.1 Verlauf der Zellzyklusanteile	43
4.2.2 Verlauf des Gesamtproteingehalts	45
4.2.3 Verlauf des Neutrallipidgehalts	45

4.2.4	Populationsanalyse	47
4.2.5	Erstellung von PLS-Modellen	48
4.3	Diskussion	49
5	Gewinnung von pluripotenten Stammzellen	53
5.1	Anwendung der Stammzelltherapie	53
5.2	Methoden	53
5.2.1	Aufreinigung der pluripotenten Stammzellen	53
5.2.2	Aufreinigung der eGFP-positiven Stammzellen	54
5.3	Ergebnisse	55
5.4	Diskussion	58
6	In-vitro-Testung neuartiger Wirkstoffe	61
6.1	Zytostatika	61
6.2	Unterscheidung Vitalität, Viabilität und Proliferationsinhibierung	63
6.3	Methoden	64
6.3.1	Säugerzellkultivierung	64
6.3.2	Etablierung verschiedener Vitalitätstests	66
6.3.3	Zellzyklusanalyse	68
6.3.4	Bestimmung der Apoptose-auslösenden Konzentration	68
6.4	Ergebnisse	69
6.4.1	Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen	69
6.4.2	Zellzyklus-Arretierung	71
6.4.3	Apoptose-auslösende Konzentration	72
6.5	Diskussion	73
7	Entwicklung eines online Messsystems für Microcarrier-Kultivierungen	75
7.1	Methoden	75
7.1.1	Kultivierung von Säugerzellen auf Microcarriern	75
7.1.2	Optische Verfahren zur Ermittlung der Zelldichte auf Microcarriern	77
7.1.3	Bestimmung der Lebend-Zelldichte auf Microcarriern mittels Impedanz-Spektroskopie	79
7.1.4	Bioreaktor-Microcarrier Kultivierung	79
7.2	Ergebnisse	80
7.2.1	Adaption der Zellen und Versuche zum Intervallrühren	80
7.2.2	Wachstumsverhalten der NIH-3T3-Zellen auf Microcarriern	82
7.2.3	Auswertung der optischen Analysen	85
7.2.4	Bioreaktor-Microcarrier Kultivierung	89

7.3	Diskussion	89
7.3.1	Wachstumsverhalten der NIH-3T3-Zellen auf Microcarriern	89
7.3.2	Optische Analysen	91
7.3.3	Bioreaktor-Microcarrier Kultivierung	92
8	Zusammenfassung und Ausblick	93
A	Anhang	97
A.1	Abbildungen	97
A.2	Abkürzungsverzeichnis	102
A.3	Geräte	104
A.4	Reagenzien	107
A.4.1	Medien und Puffer	108

Abbildungsverzeichnis

2.1	Flüssigkeitssystem eines Durchflusszytometers	9
2.2	Einfluss des Probendrucks auf den Probenstrom	9
2.3	Strahlengang eines Durchflusszytometers	10
2.4	Prinzip des Gating anhand einer Maus-Stammzellanalyse	11
2.5	Schematischer Verlauf eines Tropfenstroms in einem FACS	12
2.6	Schematischer Aufbau des In-situ-Mikroskops	13
2.7	Lebenszyklus der Sprosshefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.8	Schematischer Ablauf der Zelladhäsion auf einer Kulturoberfläche	18
2.9	Schematische Darstellung des Zellzyklus in vier Phasen	21
3.1	Schichtstruktur von Hydrotalcit	25
3.2	Messapparatur zur Messung schneller Bindungsvorgänge	30
3.3	Vorwärtsstreulicht-Histogramm der 1,43 und 4,5 µm Partikel, sowie der Hydro- talcite	32
3.4	Bestimmung der nötigen PI-Lösungsmenge für eine quantitative Färbung	32
3.5	Kinetik-Dotplot: Sorbacid 701-Suspension mit PI- bzw. DNA-Lösung	34
3.6	Kinetik-Dotplot: HT-Granulat und Sorbacid 701 mit PI-markierter DNA-Lösung	35
4.1	Schematischer Aufbau des BioView-Sensors	40
4.2	CO ₂ -Anteil im Abgas und Zellzyklusanteile für H1	44
4.3	CO ₂ -Anteil im Abgas und Zellzyklusanteile für H2	44
4.4	CO ₂ -Anteil im Abgas und Gesamtproteingehalt für H1	46
4.5	CO ₂ -Anteil im Abgas und Gesamtproteingehalt für H2	46
4.6	G1- und G2- Zellzyklusanteile und Lipidgehalt für H1	47
4.7	G1- und G2- Zellzyklusanteile und Lipidgehalt für H2	47
4.8	CO ₂ -Anteil im Abgas und Populationsanalyse für H1	48
5.1	Dotplots der c-kit/sca-1-Zellsortierung	57
5.2	Histogramme der eGFP-Zellsortierung	58
6.1	Strukturformel von Ratjadon	62
6.2	Strukturformel von Callystatin	62
6.3	Strukturformel von JJ34	63
6.4	Vergleich der Lungenzellen im In-vitro-Test	70
6.5	Vergleich der geschlechtstypischen Krebszellen im In-vitro-Test	71
7.1	SSC/FL3-Dotplot zur Bestimmung des Bedeckungsgrades der PMMA Micro- carrier	79
7.2	Wachstumskurve der NIH-3T3-Zellen in DMEM und RPMI-Medium	81

7.3	Wachstumskurven der NIH-3T3-Zellen auf den Biosilon-, Cytodex 1-, PMMA- und Plastic plus-Microcarriern	83
7.4	Wachstumskurve der NIH-3T3-Zellen auf den Glas-Microcarriern	84
7.5	Mit NIH-3T3-Zellen bewachsene Cytodex 1- und Plastic plus-Microcarrier, 200fache Vergrößerung im Phasenkontrast	85
7.6	Phasenkontrast-Aufnahmen von Cytodex 1 mit Grauwert-Histogrammen . . .	86
7.7	In-situ-Mikroskop-Bilder der verwendeten Microcarrier	87
7.8	In-situ-Mikroskop-Bilder von Cytodex 1 mit Grauwert-Histogrammen	87
7.9	Durchflusszytometrische Analyse der PMMA-Microcarrier-Kultivierungen . .	88
7.10	Glucose- und Lactat-Werte der Microcarrier-Bioreaktor-Kultivierungen	90
A.1	Absorptionswerte der kinetischen In-vitro-Messungen der Zelllinien HCC15 und HCC366	97
A.2	Absorptionswerte der kinetischen In-vitro-Messungen der Zelllinien HeLa und LNCAP	98
A.3	Aminosäure-Konzentrationen im Medium der Microcarrier-Kultivierungen . .	99
A.4	REM-Aufnahmen von normalem Sorbacid 701	100
A.5	REM-Aufnahmen von normalem HT-Granulat	100
A.6	REM-Aufnahmen von normalem HT-Granulat	101

Tabellenverzeichnis

2.1	Fluoreszenzfarbstoffe in der Durchflusszytometrie	8
2.2	Reduktion oder vollständiger Ersatz von Tierversuchen in der Toxikologie . .	20
2.3	Morphologische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose bei Säugerzellen.	23
3.1	Verwendete Hydrotalcite	27
3.2	Statische Bindungskapazitäten der Hydrotalcite für DNA-Säure	31
3.3	Messung der Adsorptionskapazität von DNA an Hydrotalcit mittels Durchfluss- zytometrie	33
3.4	Auswertung der Kinetik-Dotplots	35
3.5	Auswertung der Kinetik-Dotplots (frisches Hydroatalecit)	36
4.1	Kultivierungsparameter der kontinuierlichen <i>S. cerevisiae</i> Kultivierungen . . .	40
4.2	Anregungs- und Emissionswellenlängen der gemessenen Biomoleküle	41
5.1	Laufzeitparameter für den sca-1-Sort	54
5.2	Laufzeitparameter für den eGFP-Sort	55
5.3	Zelldichten der Stammzellen nach Isolierung und nach autoMACS	56
5.4	Ergebnisse der c-kit/sca-1-Zellsortierung	56
5.5	Ergebnisse der eGFP-Zellsortierung	57
5.6	Gegenüberstellung: Theoretische gegen praktische Ausbeute nach c-kit/sca-1-Sort	59
6.1	Verwendete Zelllinien	65
6.2	Zelllinien für die In-vitro-Testung	66
6.3	Konzentrationen der Testsubstanzen	67
6.4	Zellzyklusanalyse nach Inkubation mit Callystatin, Ratjadon und JJ34	71
6.5	Detektion von apoptotischen Zellen nach Behandlung mit Ratjadon, Callysta- tin und JJ34	72
7.1	Verwendete Microcarrier	76
7.2	Rührergeschwindigkeiten und Methoden zur Zellzahlbestimmung für die unter- schiedlichen Microcarrier	77
7.3	Kultivierungsparameter der Microcarrier Kultivierungen	80
7.4	Zelldichte im Überstand und Plattierungseffizienz der Cytodex 1- und Pla- stic Plus-Microcarrier 3–5 h nach Inokulation	81
7.5	Plattierungseffizienzen der Microcarrier	82

Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Anwendungen für die Durchflusszytometrie entwickelt und bereits bestehende Messmethoden erweitert. Von besonderem Interesse war die Messung zeitabhängiger Phänomene in biotechnologischen Systemen.

DNA kann als anionisches Biomolekül an kationische Schichthydroxide binden. Durch statische Messungen wurde die Bindungskapazität bestimmt und mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Zur Untersuchung der schnellen Bindungsvorgänge wurde ein Injektionssystem entwickelt, welches es ermöglichte während der laufenden Messung Analyten in die vorgelegte Suspension zu geben. Somit konnte die Bindungszeit und die relative Menge an adsorbierter fluoreszenz-markierter DNA an das suspendierte Hydrotalcit bestimmt werden. Auf diesem Weg konnte eine Aussage über das Bindungsverhalten von DNA an verschiedene Hydrotalcite gemacht werden

Synchrone *S. cerevisiae*-Kulturen wurden über einen Zeitraum von mehreren, aufeinanderfolgenden Oszillationen durchflusszytometrisch untersucht, um nähere Informationen über die biochemischen Veränderungen innerhalb der Hefezelle während der Oszillation zu erhalten. Durch die Verwendung des Lipid-Fluoreszenzfarbstoffs BODIPY, der im Gegensatz zu anderen Lipidfarbstoffen eine höhere Sensitivität aufweist, war eine verbesserte Lipidanalyse möglich. In Kombination mit weiteren Multiparameteranalysen, war es möglich, Modelle zur Vorhersage des Oszillationsverhaltens zu erstellen.

Die Transplantation von Stammzellen des Knochenmarks in einen durch Herzinfarkt abgestorbenen Herzmuskel können seine Regeneration induzieren. Aus Spendermäusen wurde Knochenmark isoliert und durch FACS wurden die *lin^{neg}*-Stammzellen angereichert. Nach Transduktion mit einem eGFP-Gen und nochmaliger FACS Anreicherung wurden die eGFP-exprimierenden Stammzellen in Empfängerermäuse transplantiert (für weitere Informationen sei auf die laufende Dissertation von D. Kotlarz, MH-Hannover verwiesen).

Der als 2-Punkt-Messung etablierte Resazurin-Toxizitätstest wurde als kontinuierliche Messung durchgeführt. Dadurch konnte die Reaktion der vier eingesetzten Zelllinien auf die drei Testsubstanzen (Ratjadon, Callystatin, JJ34) detaillierter überwacht werden. Durch Einsatz von jeweils zwei getrennt geschlechtlichen Zelllinien (Gebärmutter-Prostat; Lungenkrebs männlich-weiblich) konnten Aussagen über die geschlechtsspezifischen Reaktionen der Zellen auf die Wirkstoffe gemacht werden. Anschließend wurde mithilfe von durchflusszytometrischen Messungen auf das Auslösen von Apoptose und die Beeinflussung des Zellzyklus untersucht. Alle Substanzen zeigten einen Effekt auf den Zellzyklus, Ratjadon und JJ34 verursachten eine Arretierung in G₁- und Callystatin in G₂-Phase. Ratjadon und JJ34 lösten zudem Apoptose aus.

Die Untersuchung von großen Teilchen ist bereits gängige Praxis in der durchflusszytometrischen Analytik. Durch die Verwendung eines FACS mit einem Düsendurchmesser von 400 µm war es möglich, zellbewachsene Microcarrier zu untersuchen. Der Bedeckungsgrad der Microcarrier konnte anhand des Streulicht/Fluoreszenzlicht-Verhältnis bestimmt werden. Mithilfe dieser Methode war es möglich den Bedeckungsgrad schnell und reproduzierbar zu bestimmen. Eine neuartige Bildauswertung erlaubte es, In-situ-Mikroskop-Bilder einer Cyto-dex 1-Microcarrier-Fermentation nach dem Bedeckungsgrad der Microcarrier zu bewerten. Durch die Grauwertverteilung innerhalb der abgebildeten Microcarrier konnte auf den Bedeckungsgrad zurückgeschlossen werden.

Stichworte: Durchflusszytometrie, FACS, In-vitro-Toxizität, Microcarrier, DNA Adsorption, kinetische Messung, synchrone *S. cerevisiae*

Abstract

In the present study the improvement of established methods and the development of new applications in flow cytometric analysis was achieved. Especially time dependent phenomena in biological systems were monitored.

As an anionic biomolecule DNA is believed to bind onto cationic exchange matrices like layered double hydroxides (LDH). To examine the binding kinetics of the DNA-LDH interaction a new flow cytometer injection chamber was developed. The new setup allowed to inject sample and/or analyte into the running analysis. By injecting fluorescent labelled DNA into a LDH-suspension the binding kinetics and the relative amount of bound DNA was determined.

In this work synchronous *S. cerevisiae* cultivations were examined by flow cytometry to gain information about the biochemical processes in the yeast cell during oscillation. By using the lipid dye BODIPY, which has a higher sensitivity compared with eg. Nile red an improved lipid-analysis was established. With the combination of several multiparameter analysis a mathematical model for the prediction of oscillating biological systems could be introduced.

By transplantation of bone marrow stem cells it could be possible to rebuild the necrotic areas of a cardiac infarction by induction of cardiomyocyte regeneration. Mouse bone marrow cells were enriched by FACS, the gained stem-cells were transfected with an eGFP-gene and after additional FACS purification transplanted into mice (for further information refer to the thesis of D. Kotlarz, MH-Hannover).

The widely used resazurin cytotoxicity-test was extended from a 2-point measurement towards a kinetic measurement. By this extension a more detailed observation of cytotoxic effects of new natural substances was possible. Three different substances (Ratjadon, Callystatin, JJ34) were used for the in vitro toxicity testing on four human cell lines. After the determination of the dose-effect relationship and the selection of the cell line with the highest sensitivity this cell line was chosen for further experiments. It was shown that two substances cause apoptotic death. Furthermore, all substances showed a significant effect on the cell cycle. Ratjadon and JJ34 with a G₁ and Callystatin with a G₂ arrest.

The analysis of large particles is widely used in routine analysis of flow cytometry. By using a FACS with a nozzle-orifice of 400 µm the analysis of cell-covered microcarriers was possible. By plotting scattered light vs. fluorescent light four defined regions were selected within the dotplot. The setup allowed the differentiation of microcarriers with small, medium and maximum number of cells on the carrier and of single cells and cell clusters. By choosing this method the determination of the cell inoculum was performed fast and reliable.

In addition to the flow cytometric determination of the cell inoculum a new image analysis for microcarrier fermentations was developed. The system based on the microscopic images generated by either a standard phase-contrast microscope or an in-situ-microscope. The images of cytodex 1-microcarriers proved to be an ideal model for the image analysis. The microcarriers in the image were isolated and analysed according to their greyscale pattern. It was found that with increasing cell inoculum the part of mid-grey colours increased. After automating this image analysis and calibration of the cell number/greyscale pattern-relationship it could be possible to analyse microcarrier fermentations on-line.

keywords: flow cytometry, FACS, in vitro toxicity, microcarrier, DNA adsorption, kinetic measurements, synchronous *S. cerevisiae*

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Verwendung von humanen und tierischen Zellen ist in den letzten 20 Jahren in vielen Bereichen der Lebenswissenschaften zur Routineanwendung geworden. Dabei werden die Zellen nicht nur in der Grundlagenforschung verwendet, sie werden zur Produktion pharmazeutisch wirksamer Substanzen, zur Bestimmung der Zytotoxizität/Biokompatibilität von Materialien und als Primärkultur (autogene, syngene, allogene Zellen) im Bereich der Medizin eingesetzt. Für die erfolgreiche Durchführung von biotechnologischer Forschung und Produktion ist die Zellanalytik von entscheidender Bedeutung. Nur eine kontinuierliche Kontrolle der physischen und biochemischen Parameter der Zelle garantiert Ergebnissicherheit und ermöglicht es, die Kultivierungsbedingungen gezielt zu beeinflussen.

Seit der Entwicklung der Durchflusszytometrie hat sich ihr Anwendungsspektrum erheblich ausgeweitet; entwickelt wurde sie zu Beginn der 70er Jahre für die medizinische Diagnostik. Mittlerweile hat sich die Durchflusszytometrie als analytisches und präparatives Verfahren in vielen Bereichen der Biologie, Biotechnologie und Medizin etabliert. Von entscheidender Bedeutung war dabei nicht nur die Entwicklung von leistungsfähigeren Geräten sondern auch die Entwicklung und Validierung neuer Färbemethoden. Ziel dieser Arbeit ist es, bestehende durchflusszytometrische Verfahren auszubauen und neue Methoden zu entwickeln.

In-Vitro-Testung

In In-vitro-Untersuchungen sollen neuartige Wirkstoffe auf ihre proliferationshemmende Wirkung hin untersucht werden. Drei synthetisch hergestellte Wirkstoffe sollen dazu an vier Zelllinien getestet werden. Dazu sollen jeweils zwei Zelllinien männlicher und weiblicher Herkunft verwendet werden; zwei gleicher Herkunft (Lunge) und zwei von geschlechtsspezifischen Tumoren (Gebärmutter, Prostata). Mögliche geschlechtsspezifische Reaktionen auf die Wirkstoffe sollen dabei offengelegt werden. Zunächst soll die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Wirkstoffe mithilfe eines Resazurin-Schnelltests aufgenommen werden. Dieser Test soll als kontinuierliche/kinetische Messung durchgeführt werden, um ein Wirkungsprofil zu erhalten. Nach Bestimmung der Zelllinie mit der höchsten Sensitivität gegenüber der Wirkstoffe sollen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Mithilfe durchflusszytometrischer Messungen soll untersucht werden, ob die Substanzen in der Zelllinie Apoptose auslösen und ob eine Störung des Zellzyklus stattfindet.

Online-Analyse von Microcarriern

Die Analyse von Zellverbänden ist für die Durchflusszytometrie ein noch wenig etabliertes Analysenverfahren. Bei der Kultivierung von Microcarriern mit der Fibroblastenzelllinie NIH-3T3 soll untersucht werden, ob sich die Durchflusszytometrie eignet, den Bedeckungsgrad der Carrier zu bestimmen. Weiterhin soll ein In-Situ-Mikroskop zur offline und online Beobachtung der Microcarrierkultivierungen eingesetzt werden. Ziel ist es dabei ein Verfahren zur Aus-

wertung der Microcarrieraufnahmen zu entwickeln, welches es erlaubt den Bedeckungsgrad abzuschätzen. Nach Auswahl eines geeigneten Microcarriers sollen die Ergebnisse aus den Laborversuchen in einen 5 l Bioreaktor übertragen werden. Die Ergebnisse der zytometrischen und In-situ-Mikroskop-Messungen sollen mit den Messungen der manuellen Zählung verglichen werden.

Stammzell Aufreinigung

Die Durchflusszytometrie dient als präparatives Verfahren mit dem Zellen mit definierten Charakteristika aus einer inhomogenen Zellsuspension isoliert werden können. In dem vorliegenden Projekt sollen Maus-Knochenmarksstammzellen aufgereinigt werden. Nach In-vitro-Expansion sollen die eGFP-transformierten Zellen erneut aufgereinigt werden, um eine Reinheit von > 90 % zu erreichen.

DNA-Bindung an Hydrotalcit

Aufgrund der hohen Messgeschwindigkeit von mehreren tausend detektierbaren Ereignissen pro Sekunde eignet sich die Durchflusszytometrie für kinetische Bindungsstudien. Als anorganisches System sollen zwei Hydrotalcite in calcinierter und uncalcinierter Form auf ihre DNA-Bindungseigenschaften durchflusszytometrisch untersucht werden. Zunächst soll die statische Bindungseigenschaft photometrisch bestimmt werden. Ziel ist es diese Ergebnisse mittels Durchflusszytometrie zu verifizieren. Weiterhin soll die Probenhalterung so verändert werden, dass während der Messung eine Lösung von fluoreszenz-markierter DNA zugegeben werden kann. Ziel ist es diese Messung über einen Zeitraum von mehreren Minuten durchzuführen. Somit sollen sich Aussagen über die Bindungsmenge und -kinetik der Hydrotalcite treffen lassen.

oszillierende Hefen

Das Oszillationsverhalten von *S. cerevisiae* ist bereits Gegenstand mehrerer Forschungsarbeiten. In diesem Teil der Arbeit soll untersucht werden, welche biochemischen Parameter an dem Oszillationsverhalten beteiligt sind. Dazu sollen aus einer synchronen Hefe-Fermentation in kurzen zeitlichen Abständen Proben gezogen werden und durchflusszytometrisch untersucht werden. Relevante Messgrößen sind dabei Morphologie, Protein- und Lipidgehalt sowie der Zellzyklus. Diese Daten sollen zunächst mit Online-Messwerten und 2-D-Fluoreszenz-Daten verglichen und anschließend in ein Modell zur Vorhersage des Oszillationsverhaltens übertragen werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Durchflusszytometrie

In der Zytologie beschäftigt man sich mit dem Bau und der Funktion von pflanzlichen, tierischen und menschlichen Zellen und ihrer Organellen. Durch die Verwendung der Fluoreszenzmikroskopie im Zusammenspiel mit Färbetechniken erhält man schnell Informationen über die Proliferation, Differenzierung und die Viabilität der Zelle. Jedoch ist diese Form der Analyse von dem persönlichen Eindruck des Beobachters geprägt, es fehlt eine reproduzierbare numerische Angabe; zudem lässt sich mit der Mikroskopie nur eine kleine Anzahl von Zellen beobachten. Der Bedarf viele Zellen in kurzer Zeit zu messen führte zur Entwicklung der Durchflusszytometrie. Dabei werden die Zellen in Suspension an einem Objektiv vorbei geführt und von einem fokussierten Lichtstrahl getroffen [105]. Die emittierte Lichtmenge wird mithilfe von Photomultipliern und -dioden gemessen. Die Durchflusszytometrie ist ein bereits seit vielen Jahren etabliertes System in der diagnostischen Medizin, mit dessen Hilfe spezifische Tumor-Antigene, Proliferationsaktivität und Zellzyklusanomalien schnell und zuverlässig analysiert werden können. Neue Durchflusszytometer können, bis zu zehn verschiedene Messgrößen (Streu- und Fluoreszenzlicht) für jede erfasste Zelle messen. Als Ergebnis einer Messung erhält man deren Verteilung über die Zellpopulation. Sie lassen sich in morphologische und Fluoreszenz-Messgrößen einteilen. Die morphologischen Messgrößen werden durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wiedergegeben, wobei das Vorwärtsstreulicht mit der Größe und das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität bzw. internen Komplexität der untersuchten Partikel korreliert. Die Fluoreszenzintensitäten hängen in erster Linie von den eingesetzten Farbstoffen ab. Mittlerweile existieren eine Vielzahl von Farbstoffen für zahlreiche Fragestellungen. In Tabelle 2.1 auf der folgenden Seite sind einige Farbstoffe mit den spektroskopischen Charakteristika und mit Anwendungsbeispielen aufgelistet¹.

Zytometer

Durchflusszytometer gliedern sich in das Flüssigkeitssystem zum Transport der Zellen zur Detektionskammer, das optische System zur Bestrahlung und Detektion der Zellen und das elektronische System zur Datenerfassung und Steuerung [37, 105].

Flüssigkeitssystem

Der schematische Aufbau des Flüssigkeitssystems ist in Abbildung 2.1 auf Seite 9 wiedergegeben. Die gefärbten Zellen werden durch Überdruck von dem Probenröhrchen in die Flusszelle gedrückt. Dabei ist es notwendig, dass die Zellen den Analysepunkt einzeln und nacheinan-

¹ Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden hier die Abkürzungen der Farbstoffe verwendet. Die systematischen Namen sind im Anhang A.4 auf Seite 107 wiedergegeben.

Farbstoff	Ex [nm]	Em [nm]	Anwendung
BODIPY [®] * [31]	493	503	Neutrallipide
Nil Rot* [34]	552	636	Neutrallipide
Annexin V/FITC [‡] [120]	494	518	Apoptose (Phosphatidylserine)
Indo-1 AM* [14]	330–346	401 (hohe [Ca ²⁺]) 475 (niedrige [Ca ²⁺])	intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
BCECF-AM* [63, 95, 103]	494	518	intrazellulärer pH-Wert
DAPI [‡] [75]	358	461 (DNA) 500 (RNA)	DNA/RNA-Anfärbung
Hoechst 33342* [6]	350	461	DNA-Anfärbung
PI [‡] [123]	535	617	DNA-Anfärbung
Sytox [®] Grün [‡] [69]	504	523	DNA-Anfärbung
DiOC ₆ (3)* [105]	484	501	Mitochondriales Potential
CFDA-AM* [96, 125]	492	517	Langzeit-Zellverfolgung

Tab. 2.1: In der Durchflusszytometrie verwendete Fluoreszenzfarbstoffe. Das * kennzeichnet zellpermeable, das [‡] kennzeichnet zellimpermeable Fluoreszenzfarbstoffe. Angegeben sind die Wellenlängen mit der höchsten Extinktion/Emission sowie der Anwendungsbereich.

der passieren. Dies wird durch die hydrodynamische Fokussierung erreicht [51], bei der der Probenstrom in einen partikelfreien Hüllstrom aus isotonischer Lösung injiziert wird. Dieser Flüssigkeitsstrom fließt anschließend durch eine Küvette (geschlossenes Zytometer) oder Düse (offenes Zytometer). Vom Funktionsprinzip werden zwei Systeme unterschieden, zum einen analytische Durchflusszytometer, bei denen die Probe nach der Messung verworfen wird, und zum anderen Fluoreszenz-aktivierte Zell-Sorter (FACS = **F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orter), bei denen eine gewünschte Zellpopulation durch elektrostatische Ablenkung herausortiert werden kann.

Üblicherweise ist der Küvettendurchmesser bei geschlossenen Zytometern nicht veränderbar, wobei bei offenen Zytometern Düsen-Durchmesser von 50–400 µm Anwendung finden. Die kritischen Parameter bei einer Messung sind die Einstellungen des Hüllstromdruckes (sheath pressure) und der Druckdifferenz zwischen Hüllstrom und Probe (sample differential). Die Einstellung des Hüllstromdruckes ist in der Regel fest eingestellt und wird nur beim Austausch der Düse verändert. Die Erhöhung der Druckdifferenz zwischen Hüllstrom und Probe beeinflusst den Durchmesser des Probenstroms. Eine breitere Verteilung der Partikel innerhalb des Laserfokus führt zu einem Signal mit einer höheren Varianz (siehe Abbildung 2.2).

Optisches System

In allen Zytometern ist die Optik so angeordnet, dass das einfallende Licht, der Probenstrom und das Seitwärtsstreulicht jeweils senkrecht zueinander stehen. Das optische System besteht aus der Lichtquelle, den Detektionseinheiten für das Vorwärts- und das Seitwärtsstreulicht

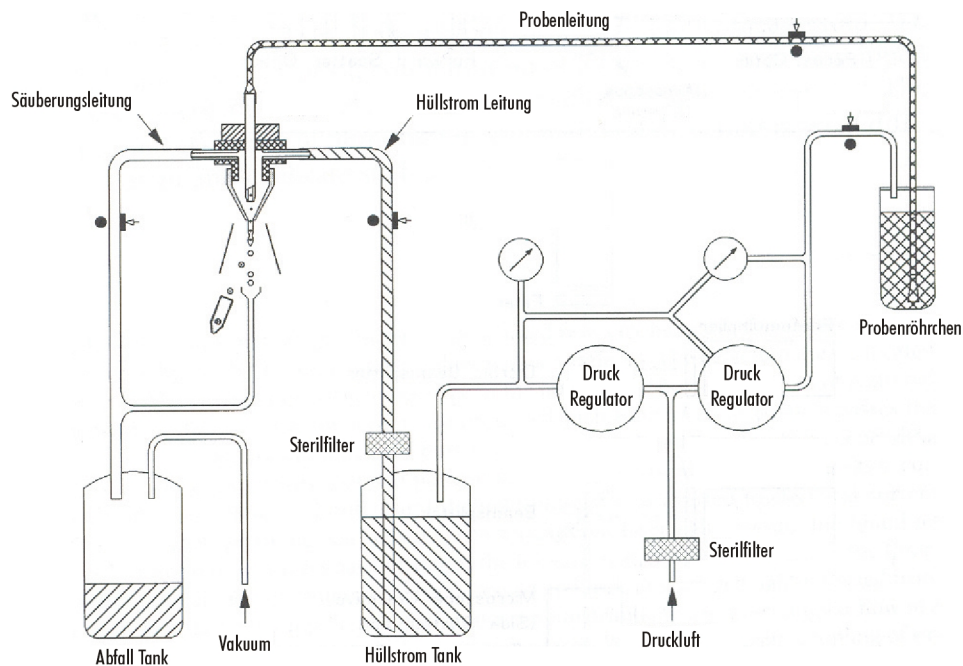


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau des Flüssigkeitssystems in einem Durchflusszytometer.

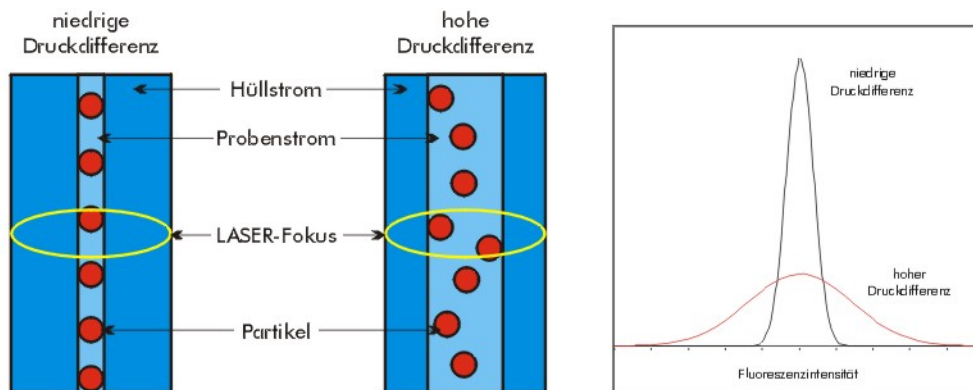


Abb. 2.2: Die Erhöhung des Probendrucks hat Einfluss auf den Durchmesser des Probenstroms und somit auf die Varianz der Signale

sowie aus Strahlenteilern und Filtern. Ein bis drei Laser bilden dabei die Lichtquelle, hauptsächlich wird der Argon-Ionen-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm als Primärlaser eingesetzt. Die Detektionseinheiten für Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sind jeweils aus einem Objektiv und den Detektionseinheiten aufgebaut. Durch ein Diodenarray wird das Vorwärtsstreulicht in einem Winkel von 2–20° detektiert. Das Seitwärtsstreulicht wird durch dichroitische Spiegel in bis zu zehn spektrale Bereiche aufgespalten und durch Photomultiplier (PMT) detektiert. Der schematische Aufbau des optischen Systems ist in Abbildung 2.3 auf der folgenden Seite wiedergegeben.

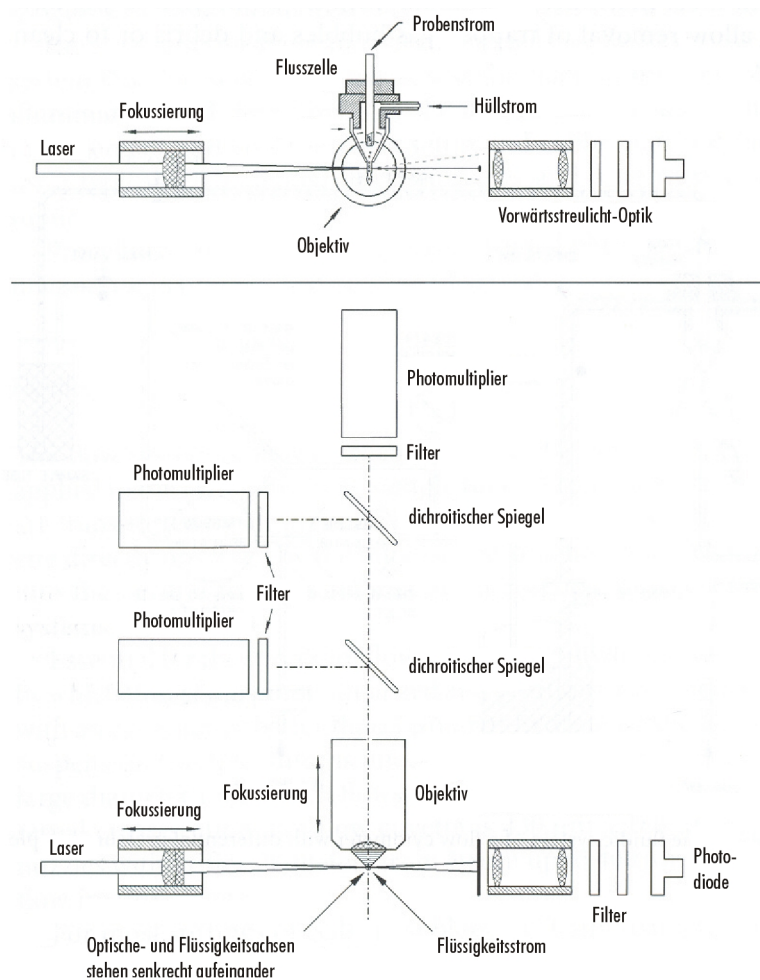


Abb. 2.3: Schematischer Aufbau des Strahlengangs in einem Durchflusszytometer. Bei einem geschlossenen Zytometer sind die Fokussierungen nicht einstellbar.

Elektronisches System

Das elektronische System besteht aus Photomultipliern, die die Lichtsignale in elektrische Signale umwandeln. Mithilfe eines Computers wird die Verstärkungsspannung der PMTs (i. d. R. 50–1000 V) sowie die Drücke des Flüssigkeitssystems und die Laserleistung gesteuert. Die Auftragung der Messdaten erfolgt ein- oder zweidimensional. Bei der eindimensionalen Auftragung werden Streulichtparameter oder Fluoreszenzintensitäten gegen die Partikelzahl aufgetragen (Histogramm), wohingegen bei einer zweidimensionalen Auftragung z. B. Vorwärts- (FSC) gegen Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgetragen werden können (Dotplot). In diesen Auftragungen können Bereiche markiert werden und durch Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen bei weiterführenden Untersuchungen näher untersucht werden (Gating). In Abbildung 2.4 ist das Prinzip des Gating wiedergegeben; durch ein Gate im FSC/SSC-Dotplot werden die lebenden Zellen ausgewählt und in dem Histogramm nach ihrer Grün-Fluoreszenz hin ausgewertet.

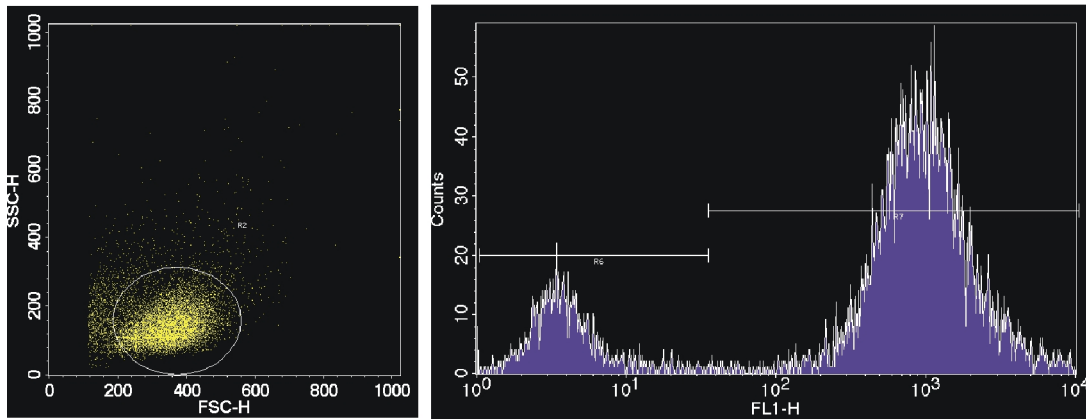


Abb. 2.4: Dotplot der Vorwärts- (FSC) gegen die Seitwärtsstreulichtsignale (SSC) von Maus-Stammzellen (links). Die ovale Region zeigt das Vitalitätsgate; die hier ausgewählten Zellen sind in dem rechten Histogramm nach ihrer Fluoreszenzintensität aufgetragen.

Zellsorter

Die Implementierung der Sortier-Möglichkeit in Durchflusszytometern ermöglicht es, Zellen mit definierten Charakteristika in reiner Form zu isolieren. Dabei kann jeder gemessene Parameter als Triggergröße für die Selektion dienen. Anhand der Bauweise können Zellsorter in zwei Gruppen eingeteilt werden. Das erste System basiert darauf, dass der Flüssigkeitsstrom durch ein Ventil auf zwei Abflussleitungen aufgespalten wird und somit die Zellen je nach gemessenem Wert sortiert werden. Durch das mechanische Umschalten des Flüssigkeitsstroms sind solche Zellsorter sehr langsam und werden nur noch selten verwendet.

Das zweite System basiert darauf, dass geladene Flüssigkeitstropfen in einem elektrischen Feld abgelenkt werden. Zur Erzeugung eines stabilen Tropfenstroms wird die Düse in einem offenen Zytometer über ein Piezoelement in Schwingung versetzt. Die angelegte Schwingung richtet sich nach dem Durchmesser des Flüssigkeitsstroms und der gewünschten Sortiergeschwindigkeit. Durch die Schwingung reißt der Flüssigkeitsstrom nach einer konstanten Strecke (Tropfenabriss-Abstand) in Tropfen ab. Die Bestimmung des Tropfenabriss-Abstands und seine Konstanz sind entscheidend für den Erfolg des Sortierens [105]. Der schematische Verlauf des Tropfenstroms ist in Abbildung 2.5 auf der folgenden Seite wiedergegeben.

Nach dem Verlassen der Düsenöffnung passieren die Zellen den Detektionspunkt, die Streulicht- und Fluoreszenzsignale werden an die Zytometer-Software übertragen. Wurde eine Zelle innerhalb des Sortier-Gates detektiert, so wird der Flüssigkeitsstrom, an dem Zeitpunkt zu dem die Zelle den Tropfenabrisspunkt erreicht hat, mit einer Ladung versehen. Die elektrostatische Ladung des Tropfens (100–200 V) bewirkt eine Ablenkung innerhalb des elektrischen Feldes zwischen den Ablenkplatten (500–1000 V). Werden die Tropfen mit positiver oder negativer Ladung mit zwei unterschiedlichen Ladungsdichten versehen, können bis zu vier Po-

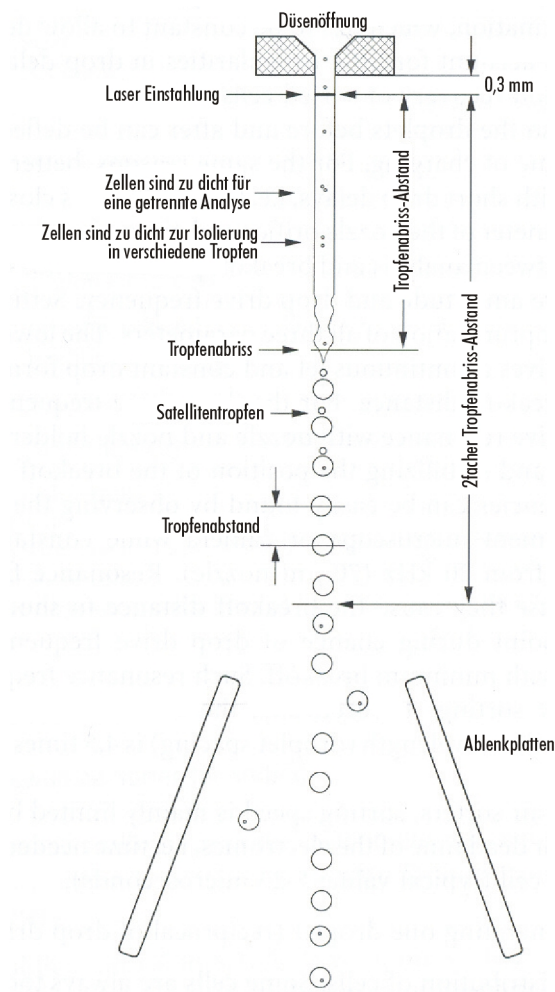


Abb. 2.5: Schematischer Verlauf eines Tropfenstroms in einem FACS

pulationen sortiert werden [72]. Der dritte, bzw. fünfte Tropfenstrom (Zentralstrom) enthält die unerwünschten Zellen und wird verworfen.

2.2 In situ-Mikroskopie

Das In-situ-Mikroskop ist ein optisches Analysensystem zur Bildaufnahme von Mikroorganismen (Bakterien, Hefe) und Säugerzellen während der Reaktorkultivierung [111]. Es eignet sich dabei sowohl für kurze batch-Versuche als auch für langfristige Perfusionenkulturen. Die Detektionskammer des Mikroskops ist dabei direkt in dem Bioreaktor positioniert und auf zwei Seiten von Saphirscheiben begrenzt, deren Abstand man den Kultivierungsbedingungen anpassen kann. Die Bildaufnahme erfolgt im Hellfeld als Durchlichtbild, wobei die Primärstrukturen das Licht schwächen und so Helligkeits- und Farbunterschiede zu erkennen sind [26]. Durch austauschbare Objektive lässt sich die Vergrößerung von 80 bis 400fach variieren. Eine Digitalkamera nimmt in periodischen Abständen Aufnahmen von der Zellsuspension

auf, und eine Bildauswertung errechnet daraus die resultierende Zelldichte pro Volumen [11]. Durch die Analyse der Morphologie der Objekte werden Luftblasen oder Zellaggregate für die Bildauswertung automatisch verworfen. Der modulare Aufbau des Mikroskops erlaubt es, dass zur Sterilisation nur der mechanische Teil (Detektions- und Reinigungskammer) im Reaktor verbleibt. Gegenüber alternativen Verfahren zur Bestimmung der Zelldichte, wie Kapazitätsmessung (Biomass Monitor, Aber Instruments) oder optische Dichte (Photometer mit kontinuierlicher Flusszelle), bietet das In-situ-Mikroskop die Möglichkeit, die Zelldichte ohne vorherige Kalibration direkt zu bestimmen. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich bei Hefe- und Säugerzellkultivierungen angewendet [50]. Der schematische Aufbau des In-situ-Mikroskops ist in Abbildung dargestellt 2.6.

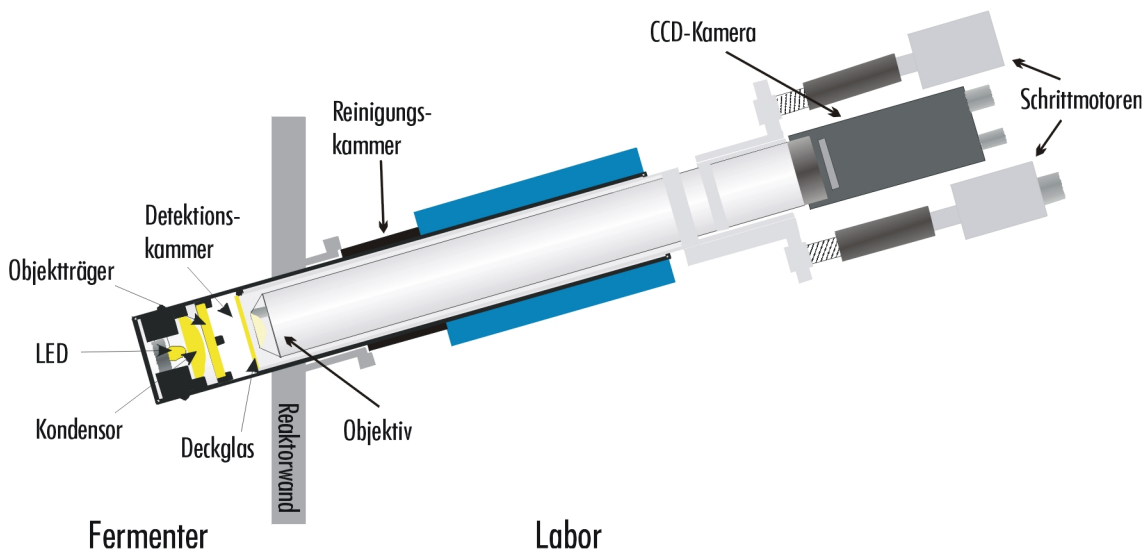


Abb. 2.6: Schematischer Aufbau des In-situ-Mikroskops (Abbildung nach [26]).

2.3 Oszillierende Hefen

Die Sprosshefe *Saccharomyces cerevisiae* [lat. saccharum: Zucker-; griech. mykes: Pilz] gehört zu der Gattung der echten Hefen (ascosporogene Hefen) und wird den Schlauchpilzen zugeordnet. Sie ist der am besten untersuchte eukaryontische Organismus. Er hat inzwischen breite Anwendung in der Biotechnologie gefunden, was nicht zuletzt auf die einfache Kultivierbarkeit zurückzuführen ist. *S. cerevisiae* wird aufgrund ihrer geringen Komplexität (5885 Protein-kodierende Gene [32]) und einfachen Handhabbarkeit als Modellsystem für eukaryontische Zellen bei molekularbiologischen Arbeiten eingesetzt. Hefen sind wie menschliche Zellen Eukaryonten und sind somit besser geeignet, komplexere Moleküle zu produzieren als Bakterien. Dazu kann auf gentechnischem Weg die gewünschte Erbinformation in das Hefe-Genom integriert werden, so dass das entsprechende Protein von der Hefezelle exprimiert wird.

Hefezellen können sich sowohl im diploiden als auch im haploiden Zustand vermehren, bei der Meiose durchlaufen die diploiden Zellen zwei aufeinanderfolgende Zellteilungen und bilden haploide Zellen. Diese haploiden Zellen können sich weiter teilen und wieder haploide Zellen ergeben, aber auch durch Paarung (Konjugation) diploide Zellen bilden [2]. Der Prozess der diploiden und haploiden Zellvermehrung ist in Schema 2.7 dargestellt.

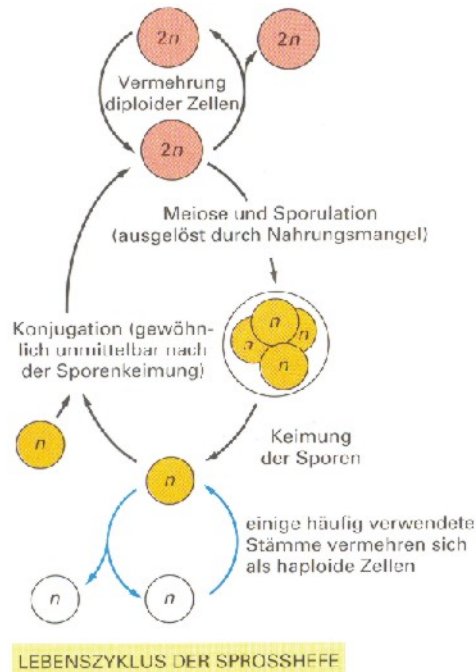


Abb. 2.7: Der Lebenszyklus einer Sprosshefe (*Saccharomyces cerevisiae*) [2].

Zu welchem Anteil der diploide und haploide Zustand im Lebenszyklus der Hefezelle vorliegt, ist von der Art der Hefe und von dem Nahrungsangebot abhängig. Bei ausreichendem Nahrungsangebot vermehrt sich die Wildtypform als diploide Zelle. Bei reduziertem Nahrungsangebot durchlaufen die Zellen die Meiose, und es bilden sich haploide Zellen. Auf den Verlauf der diploiden Zellteilung wird in Kapitel 2.4.3 auf Seite 20 eingegangen. Die Zellteilung erfolgt über eine Knospung. Die Knospe wird in der G_1 -Phase initiiert und wächst während des Zellzyklus heran. Nach der Mitose trennt sie sich von der Mutterzelle, an der eine so genannte Sprossnarbe zurückbleibt; die Tochterzelle hat nach der Teilung noch nicht die Größe der Mutterzelle erreicht.

Eine besonders hervorzuhebende Eigenschaft von Hefen zeigt sich bei kontinuierlichen Kultivierungen, bei der die Zellen in der Lage sind, ihren Zellzyklus zu synchronisieren. Dieses Phänomen ist bereits vielfach untersucht worden, jedoch steht die Aufklärung des Mechanismus über das Oszillationsverhalten noch aus. Es hat bereits mehrere Erklärungsansätze für das Oszillationsverhalten gegeben. Die meisten Modelle gehen hierbei von einem Substrat-initiierten Mechanismus aus, bei denen durch Zugabe oder Entfernen eines Substrates ein oszillie-

rendes Wachstum bei den Hefen zu beobachten ist. Unter Berücksichtigung des Lebenszyklus einer Sprosshefe haben Elliott und McLaughlin das „Modell der Übergangswahrscheinlichkeit“ entwickelt, bei dem die Zellen in zwei Klassen eingeteilt werden (Wartezustand: G_1 -Phase, Wachstumsstadium: S-, G_2 /M-Phase) [24]. Der Übergang erfolgt irreversibel und ist von den Umweltbedingungen abhängig. Basierend auf diesem Modell wurden verschiedene Substrate zum Auslösen einer Oszillation in *S. cerevisiae* Kultivierungen angewendet: Glucosepulse [82], Substratpulse von Ethanol, Glycerol, Essigsäure, Pyruvat [78, 83].

2.4 Säugerzellkultivierung

Bei der Säugerzellkultivierung unterscheidet man zwischen verankerungsabhängigen (adhärenten) und -unabhängigen Zellen. Verankerungsabhängige Zellen haften an der Oberfläche der Kulturschalen an, wachsen in Monolayern und werden in der Regel mithilfe proteolytischer Enzyme (z. B. der Serin-Protease Trypsin) abgelöst. Nicht verankerungsabhängige Zellkulturen werden in sog. Spinner-Flaschen kultiviert und durch ständiges Rühren in Suspension gehalten.

Die Anwendungsbereiche für die Säugerzellkultivierung erstrecken sich von reinen Forschungsarbeiten zur Struktur und Funktion der Zelle und deren Differenzierung über den Einsatz in der toxikologischen und pharmazeutischen Diagnostik (siehe Kapitel 2.4.2 auf Seite 19) bis hin zur Produktion von wichtigen Biomolekülen, wie z. B. Impfstoffen, Hormonen, Antikörpern und Enzymen.

Gewebeproben bestehen in der Regel aus mehreren unterschiedlichen Zelltypen, deren biochemische Analyse würde zu einer Vermischung der Fragmente und somit zu einer nicht eindeutigen Aussage führen. Aus diesem Grund wurden die einzelnen Zelltypen vereinzelt und isoliert weiter kultiviert. Auf diesem Weg wurden aus den homogenen Zellkulturen die Informationen der individuellen Zelltypen bewahrt [3]. Zur Trennung der Zellen können unterschiedliche Verfahren angewendet werden, wie z. B. bei unterschiedlich großen Zellen die Trennung mittels Zentrifugation. Das leistungsstärkste Verfahren zur Trennung inhomogener Zellpopulationen ist die elektrische Zellsortierung in einem FACS. Zur Erläuterung dieses Verfahrens siehe Kapitel 2.1 auf Seite 7.

Zellkulturen, die direkt aus den Geweben eines Organismus hergestellt werden, nennt man Primärkulturen. Durch die Entnahme kleiner Zellmengen und deren Züchtung werden aus der Primärkultur Sekundärkulturen erzeugt, die wiederum über einen längeren Zeitraum subkultiviert werden können. Diese Zellen besitzen noch viele Eigenschaften des Ursprungsgewebes, aus dem sie entnommen worden sind, so scheiden z. B. Fibroblasten weiterhin Kollagen aus. Die meisten Zellen, die so gewonnen worden sind, stellen nach einer endlichen Wachstumsphase ihre Proliferation ein oder sterben ab. Um Zellen zu erhalten, die sich beliebig oft subkultivieren lassen, werden entweder Krebszellen verwendet oder normale Zellen durch Transformation

mit einem Tumor-induzierenden Virus immortalisiert [57]. Bei solchen Kulturen spricht man von Zelllinien.

In der Bioprozesstechnik finden Säugerzellen eine breite Anwendung. Dabei werden sie hauptsächlich für die Produktion von Human-Proteinen eingesetzt, die einer post-translatorischen Modifikation bedürfen, wie z. B. hydrolytische- (z. B. Abspaltung einer N-terminalen Methioningruppe) oder Gruppenübertragungsreaktionen (z. B. Glycosylierung) [81]. Durch den einfacheren Aufbau sind Prokaryonten dazu meist nicht in der Lage.

Die Zellen können dabei auf zwei Arten ex vivo kultiviert werden. Die Kultivierung als permanente Zellkultur setzt das Vorliegen einer Zelllinie voraus. Die Kultivierung als Organ- oder Gewebekultur (Primärkultur) findet in der medizinischen Praxis häufig Anwendung, z. B. die Züchtung von Haut zur Transplantation für Verbrennungsoffer. Diese Anwendung bezeichnet man als „Tissue Engineering“. Zur Entwicklung eines industriellen Prozesses werden zunächst Ansätze in Labor- und Technikums-Maßstab durchgeführt. Für kleine Produktionschargen eines hochpreisigen Produktes wird weiterhin in kleineren Bioreaktoren produziert, so wurde z. B. eine EPO-Produktion in Roller Bottles 1989 von Amgen in den USA zertifiziert. Für größere Ansätze finden hauptsächlich Bioreaktoren im 100–10 000 Liter Maßstab Anwendung, die als Batch-, Fed-batch- oder Perfusionsreaktor betrieben werden [66].

2.4.1 Microcarrier

In den vergangenen Jahren hat sich die Säugerzellkultivierung zu der wichtigsten Quelle für rekombinant hergestellte Biopharmaka entwickelt. 40 % dieser pharmazeutischen Produkte werden auf diesem Weg gewonnen. Dabei sind viele der verwendeten Zellen verankerungsabhängige oder zumindest bevorzugt auf Oberflächen wachsende Zellen. Im Labormaßstab werden sie in Petrischalen, T-Flaschen oder Roller-Bottles gezüchtet. Für den Produktionsbetrieb ist diese Kultivierungsform zu teuer und zu aufwändig. Der Bedarf nach einer Methode, diese verankerungsabhängigen Zellen in Suspension, effektiver und weniger aufwändig zu kultivieren, führte zu der Entwicklung der Microcarrier. Das Konzept besteht darin, die Zellen zusammen mit Partikeln (Durchmesser 80–350 μm) in Suspension zu rühren, so dass sich die Zellen an der Oberfläche der sphärischen Partikel anheften und sich so in einem konventionellen Rührkesselreaktor kultivieren lassen. Auf diese Weise ist es möglich, höhere Zelldichten als bei einer Suspensionszellen-Kultur zu erreichen; das Verhältnis aus Wachstumsoberfläche zu Volumen ist sehr groß (z. B. 30 $\text{cm}^2 \cdot \text{ml}^{-1}$ bei Cytodex 1 mit einer Konzentration von 5 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$). Um einen Microcarrier in der Säugerzellkultivierung einzusetzen, müssen mehrere Kriterien erfüllt werden:

Oberfläche: Verankerungsabhängige Zellen wachsen auf unterschiedlich funktionalisierten Oberflächen, wobei die Hydrophilie der Beschichtung und die richtige Ladung entscheidend

ist. Alle Zellen aus Wirbeltieren weisen eine unregelmäßig verteilte negative Ladung auf [13] und können somit auf positiv oder negativ geladenen Oberflächen kultiviert werden [35, 118]. Geeignete Oberflächen sind z. B. Glas, Kunststoff (negativ geladen), Poly-L-Lysin beschichtete Oberflächen [48] und derivatisierte Polydextrine (positiv geladen). Da Zellen auf positiv und negativ geladenen Oberflächen anwachsen, ist die Ladungsverteilung und -dichte das entscheidende Merkmal [43].

Material und Dichte: Das Material darf keine Zytotoxizität aufweisen, hier finden Polydextrin, Polystyrol, Polymethylmethacrylat, Glas beschichtete Körper und Polyacrylamid Anwendung. Die Dichte ($1,02\text{--}1,1\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) sollte gleich oder etwas höher als die des verwendeten Kulturmediums sein, damit die Suspension bei geringen Rührwerkdrehzahlen aufrecht erhalten werden kann und die Microcarrier nicht zu Boden sinken oder auf der Oberfläche schwimmen.

Größe und Größenverteilung: Je kleiner die suspendierten Partikel bei gegebener Konzentration ($2\text{--}6\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) sind, desto mehr Wachstumsfläche steht den Zellen zur Verfügung. Jedoch sollten die Microcarrier noch hinreichend Platz aufweisen, um das Zellwachstum über mehrere Zyklen aufnehmen zu können. Hier hat sich eine Größe von $100\text{--}300\text{ }\mu\text{m}$ etabliert. Damit die Zellen homogen auf den Microcarriern anwachsen, ist eine enge Größenverteilung notwendig, mit einer maximalen Abweichung von $25\text{ }\mu\text{m}$ vom Durchschnitt. Eine zu große Varianz in der Größe führt zu einer inhomogenen Animpfung auf den kleinen Microcarriern.

Transparenz: Eine hohe Transparenz ist wünschenswert, um die Microcarrier lichtmikroskopisch untersuchen zu können.

Elastizität: Bei einer Suspensionskultur kommt es zu Stößen zwischen den gerührten Partikeln. Damit die Stöße nicht zu Schädigungen der Zellen führen, ist ein komprimierbares Material wünschenswert.

Die Anhaftung von verankerungsabhängigen Zellen auf einer Oberfläche ist Voraussetzung für die Funktion und das Wachstum der Zellen [35] und ist somit in der traditionellen Monolayer-Kultivierung als auch bei der Microcarrier-Kultivierung ein kritischer Schritt. Der Anhaftungsprozess läuft über mehrere Schritte ab:

1. Adsorption von Anheftungsfaktoren aus dem Medium an die Oberfläche
2. Kontakt zwischen Zelle und Oberfläche
3. Anhaftung der Zelle an die Oberfläche
4. Ausbreitung der Zelle, bis sie ihre normale Größe erreicht hat

Die für den ersten Schritt nötigen Anheftungsfaktoren sind Verbindungen wie Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin, die zusammen mit bivalenten Kationen die Anhaftung der Zelle

ermöglichen. Der Kontakt der Zelle mit der Oberfläche findet durch einen zufälligen Stoß statt. Durch eine Bindung zwischen den zellulären Glycoproteinen und den Anheftungsfaktoren an der Wachstumsfläche, die durch zelluläres Heparin vermittelt werden, kommt es zu einer festen Bindung der Zelle an die Oberfläche (siehe Abbildung 2.8)

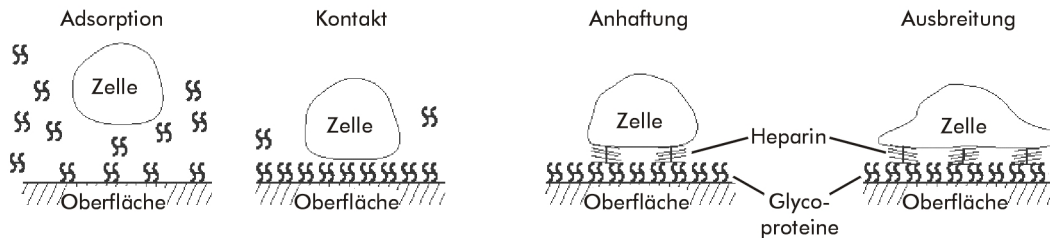


Abb. 2.8: Schematischer Ablauf der Zelladhäsion auf einer Kulturoberfläche.

Das Konzept zur Kultivierung von verankerungsabhängigen Zellen auf kleinen Partikeln in Suspension wurde erstmals 1967 von van Wezel angewendet [117]. Dabei wurden Partikel eines Ionen-Austauscher-Gels (DEAE-Sephadex[®] A-50) verwendet. Diese Partikel wiesen eine geladene Oberfläche auf und hatten ein vorteilhaftes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Erste Versuche zeigten, dass sich Microcarrier-Kulturen für den Einsatz in der Virus-Produktion eignen und ein scale-up möglich war [116, 119]. Die Anwendungsmöglichkeiten der Microcarrier-Kultivierung lassen sich in drei Bereiche einteilen:

1. Produktion großer Zellmengen
2. Produktion von Viren und Proteinen
3. In-vitro-Zellstudien

Die Messung der Biomasse liefert Aussagen über die Wachstumsrate und die maximale Zellkonzentration; sie ist somit eine wichtige Prozessvariable für fed-batch oder kontinuierliche Kulturen [23]. Die Methoden zur Bestimmung der Biomasse lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Bei der direkten Technik wird die Zellkonzentration meist über die Zellmasse, Zellzahl oder das Zellvolumen bestimmt. Indirekte Techniken beziehen sich meist auf die Messung von Stoffwechselraten und/oder Metabolitenkonzentrationen [23].

Zur direkten Bestimmung der Biomasse werden zum größten Teil optische Verfahren angewendet. Eine Betrachtung der Microcarrier im Mikroskop lässt nur eine qualitative Aussage über den Bedeckungsgrad zu. Eine quantitative Aussage lässt das manuelle Auszählen in einem Haemozytometer zu, dazu können die Zellen von den Microcarriern mit proteolytischen Enzymen, wie z. B. Trypsin abgelöst werden, oder es werden die Zellkerne aus den Zellen herausgelöst [97]. Alternativ zu dem manuellen Auszählen kann auch ein Coulter-Counter zur Konzentrationsbestimmung der abgelösten Zellen verwendet werden. Weiterhin können zwei

modernere Verfahren zur Zellmassenbestimmung eingesetzt werden. Das In-situ-Mikroskop ermöglicht es, während einer Kultivierung Aufnahmen der Microcarrier zu machen (weiteres siehe Kapitel 2.2 auf Seite 12). Die Radio-Impedanz-Spektroskopie ermöglicht es, die Lebendzellmasse einer Zellsuspension zu messen. Dazu wird in den Zellen über ein elektrisches Wechselfeld ein Dipol induziert und anschließend die elektrische Kapazität der Zellen gemessen. Der gemessene Wert in $\text{pF}\cdot\text{cm}^{-1}$ ist linear zur Zelldichte.

Indirekte Messmethoden werden häufig in der Bioprozesstechnik eingesetzt, da sie meist durch eine komfortable Online-Messung realisiert sind. Dabei wird die Annahme getroffen, dass die Stoffwechselrate für das gemessene Substrat mit der Zelldichte korreliert. Ein Nachteil dieser Verfahren ist, dass sie für jeden Bioprozess kalibriert werden müssen. Für die Säugerzellkultivierung werden häufig die Glucoseverbrauchsrate und Lactatproduktionsrate als indirekte Messparameter aufgenommen.

2.4.2 In-vitro-Methoden

In-vitro-Versuche werden außerhalb eines Organismus in einer Nährlösung durchgeführt. In-vitro-Versuche lassen sich in die toxikologische und die pharmakologische Prüfung unterteilen [108].

In der pharmazeutischen Forschung wird die In-vitro-Testung neuer Wirkstoffe schon seit langem durchgeführt. Erst nach erfolgreicher Wirkungsprüfung eines neuen Arzneistoffes in In-vitro-Tests wird dieser im Tierversuch und anschließend in klinischen Tests am Menschen auf Wirksamkeit und auf seine Einsatzmöglichkeit in der Therapeutik geprüft [113, 114]. Anwendung findet hier vornehmlich menschliches Operationsmaterial, weil diese Primärzellkulturen noch die organspezifischen Eigenschaften aufweisen. Weiterhin wird die In-vitro-Testung zur Erstellung von Metabolismusprofilen und der Metabolismuskinetik von Therapeutika verwendet. Anwendung finden hier hauptsächlich Mikrosomen von Leberzellen, da diese P450-Monooxygenasen tragen, die für den oxidativen Metabolismus der Wirkstoffe verantwortlich sind [100].

In der toxikologischen Forschung werden Untersuchungen an Zell- und Gewebekulturen nur für bestimmte Fragestellungen durchgeführt. Dazu zählen z. B. Mutagenitätsuntersuchungen oder Untersuchungen zur Schaffung von Grundlagen zur Risikoabschätzung. Die am häufigsten in der Toxikologie angewendete In-vitro-Methode ist die Züchtung von Zellen aus unterschiedlichen Organen. Dabei werden frisch isolierte Primärzellen oder Zelllinien verwendet. Seit einigen Jahren werden Kulturen von Zellaggregaten eingesetzt, um die Komplexität von Organen nachzustellen [49]. In der Toxikokinetik werden Leberzellen aus verschiedenen Spezies für Metabolismusstudien verwendet, dabei spielt die Gentechnik eine zunehmende Rolle. So wurden die fremdstoffmetabolisierenden P450-Isoenzyme des Menschen in permanente Zelllinien eingebaut, so dass diese P450-abhängige menschliche Metaboliten erzeugen können [90, 94].

Um die Anzahl der für die toxikologische Beurteilung vorgeschriebenen Tierversuche zu reduzieren, wurden von der OECD Richtlinien zur Durchführung veröffentlicht [88]. Es wird dabei angestrebt, dass alle Tierversuche, die nach den OECD-Richtlinien durchgeführt werden, international vergleichbar sind und von den OECD-Mitgliedstaaten anerkannt werden. Ausgenommen ist hierbei die Prüfung von Arzneimitteln. In Tabelle 2.2 sind In-vitro-Verfahren genannt, die bereits zu einer Reduktion oder zum vollständigen Ersatz von Tierversuchen geführt haben.

Testbezeichnung <i>In-vitro-Methode</i>	Tierversuch	Ersatzmöglichkeit
Vitamin- und Hormonbestimmungen <i>Zelllinien mit spez. Rezeptoren</i>	Bioassays an Hühnern, Ratten und Mäusen	vollständiger Ersatz
Augenreizung <i>bebrütetes Hühnerei, HET-CMA Test</i>	Draize-Test am Kaninchen- auge	teilweiser Ersatz für stark reizende oder ätzende Stoffe
Hautreizung <i>künstl. menschl. Hautkulturen</i>	ätzende Wirkung an der Haut des Kaninchens	teilweiser Ersatz für stark reizende oder ätzende Stoffe
verzögerte Neurotoxizität von Organophosphaten <i>NTE-Esterasenbestimmung an Neuroblastomen</i>	Neurotoxizität von Organophosphaten am Huhn	teilweiser Ersatz möglich

Tab. 2.2: Reduktion oder vollständiger Ersatz von Tierversuchen in der Toxikologie.

2.4.3 Zellwachstum und Zelltod

Zellzyklus

Die Vermehrung von Zellen durch Zellteilung wird nicht nur während der Entwicklungs- und Wachstumsphase eines Organismus benötigt, die Aufrechterhaltung der Funktionen von Organen (Gewebehomöostase) erfordert auch bei Erwachsenen stetig ablaufende Zellteilungen. Da die Vorgänge der Zelldifferenzierung und der Proliferation gegenläufig sind, nimmt die Proliferationsrate mit wachsendem Differenzierungsgrad ab; die Zellen „bezahlen“ ihre Spezialisierung mit dem Verlust der Proliferationsfähigkeit [68]. Der Zeitraum, der zwischen zwei Zellteilungen liegt, wird Zellzyklus genannt. Der Zellzyklus wird in eine Sequenz von irreversiblen Phasen unterteilt, in G₁-, S-, G₂- und M-Phase (siehe Abbildung 2.9).

In der G₁-Phase (engl. gap = Lücke, Pause) stellt die Zelle das biochemische Milieu für die Replikation der DNA bereit, das betrifft insbesondere die Expression der Gene, deren Produkte für die DNA-Replikation und die Zellzyklusprogression benötigt werden. Weiterhin findet in der G₁-Phase das Größenwachstum statt; die Zelle muss vor der Zellteilung nicht nur den DNA-Gehalt, sondern auch ihr Volumen und die Anzahl der Organellen verdoppelt haben. In der S-Phase (Synthese) findet die Verdopplung des diploiden Chromosomensatzes statt. Die DNA-Synthese startet an den so genannten Replikons, die alle 30 000 bis 300 000

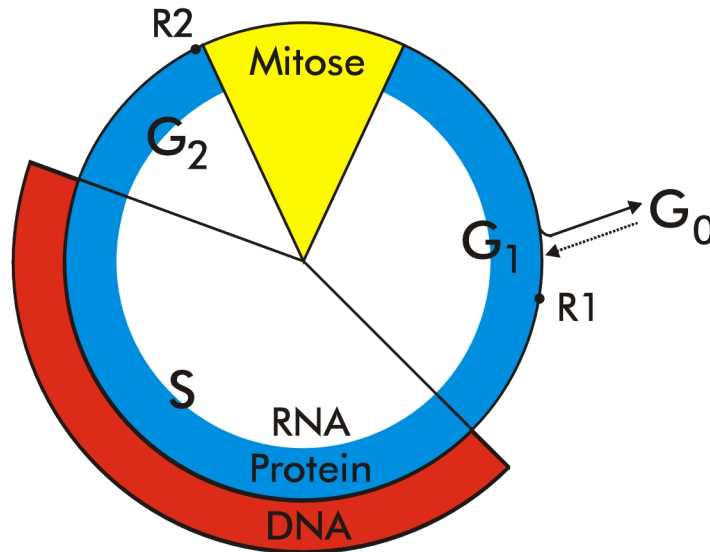


Abb. 2.9: Einteilung des Zellzyklus in vier Phasen. Aus der G₁-Phase zweigt die Arbeits- oder G₀-Phase ab. Während der S-Phase findet die Produktion der DNA statt. R1 und R2 kennzeichnen die Restriktionspunkte.

Basenpaare auftreten, wobei die Helicase zunächst die Helix-Struktur der DNA entwindet und die einzelnen DNA-Stränge voneinander trennt. DNA-Polymerasen benutzen die zwei entstandenen Stränge als Matrize zur Synthese der neuen Stränge; die Replikation findet in 5'-3'-Richtung statt. Der Abschnitt zwischen der DNA-Synthese und der Mitose-Phase wird G₂-Phase genannt. Sie stellt eine Sicherheitspause dar, die die Überprüfung der Vollständigkeit der DNA-Replikation zum Ziel hat [2]. Durch eine quantitative Färbung der DNA mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen (siehe Kapitel 2.1 auf Seite 7) ist es möglich die einzelnen Zellzyklusphasen voneinander zu unterscheiden; die Fluoreszenzintensität korreliert mit dem DNA-Gehalt der Zelle [75, 76, 104].

In der Mitose, dem Prozess der Kernteilung, wird aus der Chromatinmasse des duplizierten Genoms jeweils ein kompletter Chromosomensatz an die zwei Tochterzellen weitergegeben. Dieser Vorgang kann in vier Schritte eingeteilt werden, die unter dem Mikroskop beobachtet werden können. Nach dem Abschnüren der beiden Tochterzellen in der Cytokinese ist die Zellteilung beendet. Die beiden Tochterzellen befinden sich nun wieder in der G₁-Phase, aus der die Zellen in den nächsten Zellzyklus eintreten können, oder sich in die G₀-Phase zurückziehen (wie z. B. sich differenzierende Zellen) [4].

Die Dauer der einzelnen Phasen ist abhängig von der betrachteten Zelle sehr variabel. Die größte zeitliche Dehnbarkeit besitzt die G₁-Phase; sich differenzierende Zellen können in der G₁-Phase verharren, sie befinden sich in der Arbeits- oder G₀-Phase.

Die Regulierung des Zellzyklus ist außerordentlich komplex und wird durch eine Vielzahl von Regulationsproteinen gesteuert. Restriktionspunkte bilden innerhalb des Zellzyklus so genannte Checkpoints. Sie dienen dazu, dass ein komplexes Kontrollsystem den korrekten Abschluss der Zellzyklusphase sicherstellt. Die zwei wichtigsten Restriktionspunkte liegen am Ende der G₁- und G₂-Phase. Bei Hefen wird der Restriktionspunkt am Ende der G₁-Phase als START bezeichnet. Eine Zelle, die den ersten Restriktionspunkt passiert hat, ist für die Zellteilung programmiert und kann nur noch an dem zweiten Restriktionspunkt gestoppt werden. Wird ein Regulationsprotein in der Zelle irreversibel blockiert, z. B. durch einen selektiv wirkenden Stoff, kann es zum Stillstand der Teilungsphase kommen, die Zelle ist somit in einer Zellteilungsphase arretiert.

Apoptose/Nekrose

Die Entwicklung eines mehrzelligen Organismus von der Befruchtung bis zur Geschlechtsreife (Ontogenese) hängt nicht nur von der regulierten Proliferation und Differenzierung von Zellen ab, sondern auch von dem geordneten Absterben bestimmter Zellpopulationen. Die Charakterisierung dieses geordneten Absterbens als programmierter Zelltod (programmed cell death, PCD) wurde nach Beobachtungen des Wurmes *Caenorhabditis elegans* gemacht. Bei diesem Fadenwurm, der aus 1090 somatischen Zellen besteht, sterben während seiner Entwicklung 131 Zellen ab. Dabei ist die Position und Zeit des Absterbens bei jedem Wurm identisch [68]. Dieses genetisch festgelegte Suizidprogramm wird als Apoptose bezeichnet.

Im Vergleich zu der Nekrose, dem Absterben einer Zelle in Folge z. B. einer akuten Verletzung, ist die Apoptose an einen fest programmierten Ablauf gebunden. Die Nekrose ist ein passiver und degenerativer Prozess und führt in Vielzellern meist zu Entzündungen [21]. Die unterschiedlichen Erscheinungen zwischen Apoptose und Nekrose sind in Tabelle 2.3 zusammengefasst. Die hier aufgeführten Erscheinungen müssen nicht notwendigerweise bei jeder betrachteten Zelle während der Apoptose auftreten [27], sie können je nach Auslöser oder Zelltyp variieren [115].

Eine Reihe der hier aufgeführten Erscheinungen lässt sich durch geeignete Färbemethoden durchflusszytometrisch nachweisen; weit verbreitet ist die Detektion des Phosphatidylserins auf der Membranoberfläche. Dazu wird das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Protein Annexin V zu der Zellsuspension gegeben. Annexin V ist ein Ca²⁺-abhängiges Protein, welches mit einer sehr hohen Affinität selektiv an Phosphatidylserin bindet. Da ebenfalls nekrotische Zellen mit fehlender Membranintegrität Annexin V binden, müssen diese mit einem weiteren Farbstoff markiert werden. Dies geschieht in der Regel mit einem Ausschlussfarbstoff (siehe Tabelle 2.1 auf Seite 8), der durch die permeabilisierte Zellmembran diffundiert.

Der Vorgang der Apoptose lässt sich durch eine Reihe von Stimuli auslösen, durch Zugabe von Chemikalien wie Tri-n-butylzinn [36], Verringerung der Zn²⁺-Konzentration in Zellen [64],

Apoptose	Nekrose
Translokation von Phosphatidylserinen von der zytoplasmischen auf die Außenseite der Zellmembran [7, 22, 126]	im späteren Stadium Riss der Zellmembran
Zusammenbruch des Membranpotentials in den Mitochondrien [33]	dito
Chromatin-Kondensation	ungleichmäßige Kondensation des Chromatins
Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [79]	durch Riss der Zellmembran Angleichung von $[\text{Ca}^{2+}]$ im Zytosol und Medium
Zellschrumpfung durch Dehydratisierung [12]	Anschwellen der Zelle und des Zellkerns
Absinken des pH-Wertes im Zytoplasma [47]	durch Riss der Zellmembran pH_i gleich dem äußeren pH-Wert
Bildung von apoptotischen Vesikeln an der Zellmembran (apoptotic bodies)	Zerplatzen der Zelle
Fragmentierung der DNA in definierte Bruchstücke (30–500 kBp und Vielfache von 180 Bp) [58]	Auflösung der DNA in unterschiedlich lange Bruchstücke

Tab. 2.3: Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose bei Säugerzellen.

Zugabe des Topoisomerase-I-Inhibitors Camptothecin [60], Strahlung (insbesondere UV- und γ -Strahlung) [107], durch Zugabe eines Fas-Liganden (bindet an den CD95-Rezeptor) [27], oder durch Hitzeschock bei 42 °C [7].

3 DNA-Bindungsstudien an Hydrotalcit

3.1 Aufbau und Verwendung von Hydrotalcit

Hydrotalcite gehören ihrer Struktur nach zu der Klasse der Schichtdoppelhydroxide (layered double hydroxides, LDH), die sich von der Struktur des Brucits ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) ableiten (Isomorphie). Der Kristall besteht aus einer hexagonal dichtesten Kugelpackung von OH^- -Ionen, in der jede zweite Oktaederlückenschicht mit Mg^{2+} besetzt ist, wobei eine Schichtspaltung zwischen den OH^- -Schichten erfolgt. Diese Schichten werden von elektrostatischen Wechselwirkungen zusammengehalten [46].

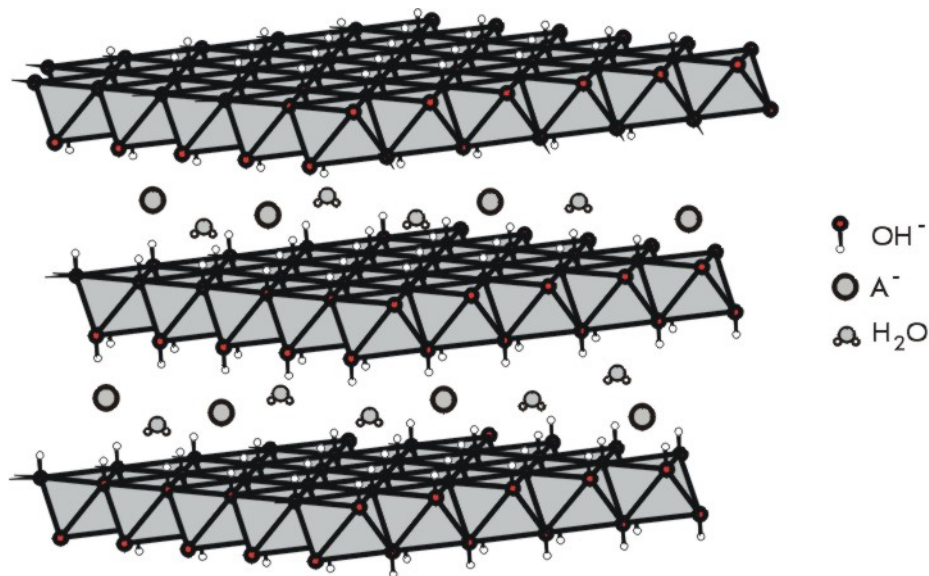
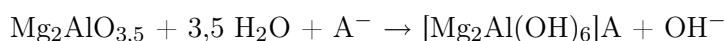


Abb. 3.1: Schichtstruktur von Hydrotalcit. Abgebildet sind drei Schichten der OH^- -Ionen, in die die Mg^{2+} - und Al^{3+} -Ionen eingelagert sind, in der Schichtfolge AB. In den Zwischenschichten sind Anionen und Wasser eingelagert.

Hydrotalcite werden durch die allgemeine Formel $[\text{M}_{1-x}^{2+}\text{N}_x^{3+}(\text{OH})_2]^{x+}[\text{A}^{n-}]_{\frac{x}{n}} \cdot y\text{H}_2\text{O}$ beschrieben, bei der M^{2+} ein Erdalkali- oder Übergangsmetallion (Mg^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), N^{3+} ein Übergangsmetallion (Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+}), A^- ein Anion (NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^-) und x eine rationale Zahl zwischen 0 und 1 darstellt.

Das in dieser Arbeit verwendete Hydrotalcit $[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6](\text{CO}_3)_{0,5}$ besteht aus Magnesium-, Aluminium- und Carbonationen, wobei der maximal mögliche Aluminiumanteil von 1 vorliegt. Reine Hydrotalcitstrukturen erhält man, wenn x zwischen 0,17 und 0,33 liegt [18]. Da im Hydrotalcit im Vergleich zum Brucit ein Mg^{2+} gegen ein Al^{3+} ausgetauscht wurde, ist die Schichtstruktur positiv geladen. Diese positive Ladung wird durch interkalierte Anionen ausgeglichen; Kristallwasser wird ebenso zwischen die Hydroxidschichten eingelagert (siehe Abbildung 3.1).

Aufgrund der kationischen Schichtstruktur, der feinen Verteilung und der Austauschbarkeit der interkalierten Anionen, eignet sich die Carbonatform des Hydrotalcits als Austauscher für eine Vielzahl von Kationen. Allerdings lassen sich nicht alle Kationen mit gleicher Effizienz austauschen; je härter das Anion, desto fester ist die Bindung zwischen den Schichten. Durch Calcination der Carbonatform erhält man die aktivierte Form des Hydrotalcits. Nach Resuspension in Wasser bildet sich aus dem erhaltenen Mg/Al-Mischoxid die Hydroxid-Form zurück, dieser Prozess wird als Memory-Effekt bezeichnet. Enthält die wässrige Hydratisierungslösung Fremd-Anionen, werden diese in die Schichtstruktur des Hydroxids eingelagert.



Durch die Aktivierung können negativ geladene Moleküle wie z. B. DNA zwischen die Schichten unter Bildung eines DNA-LDH-Nanohybrids eingelagert werden [55, 56]. Weitere Anwendungen von Hydrotalciten finden sich in der Katalysatortechnik, wo es als Katalysator für z. B. Hydrierung, Polymerisation oder zur Synthesegas-Erzeugung eingesetzt wird. Bei der Herstellung von Kunststoffen wird es als Stabilisator gegen die dort herrschenden Temperaturen von 180 bis 200 °C und zum Binden des entstehenden HCl-Gases eingesetzt. Diese Fähigkeit als Absorbens macht man sich auch bei der Abwasserreinigung [121] oder bei der Entfernung organischer Säuren aus dem Herstellungsprozess von Cyclohexanon zu Nutze.

3.2 Fließinjektionssysteme für die Durchflusszytometrie

Probeninjektionssysteme werden in der Durchflusszytometrie schon seit ca. 10 Jahren angewendet. Sie erlauben während der laufenden Messung die Zugabe von bis zu drei weiteren Analyten [89], oder die kontinuierliche Zugabe von neuem Material, z. B. zur Etablierung einer kontinuierlichen Analytik aus einem laufenden Bioprozess [128]. Standardmäßig vorhandene Probeninjektionssysteme von Durchflusszytometern beruhen auf einem Druck-Differenz-System. Das Probenröhrchen wird mit einem höheren Druck versehen als der Hüllstromdruck. Der anliegende Überdruck ($7 \cdot 10^2 - 2 \cdot 10^3$ Pa) gewährleistet einen kontinuierlichen Probenstrom in die Flusszelle und bewirkt bei Entfernung der Probe ein Spülen der Probenleitung mit Hüllstromflüssigkeit. Der Nachteil dieses Systems besteht darin, dass die Zugabe der Probe nicht in definierten Volumina erfolgen kann, bzw. die Volumina nicht präzise bestimmt werden können. Zur Adaption als Fließinjektionssystem wird die Probenhalterung mit einer Zugabeleitung versehen [89], diese erlaubt die Zugabe von Probenlösung oder Reagenzien während der laufenden Messung. Ein weiteres Fließinjektionssystem basiert auf der kontinuierlichen Zufuhr von Probenlösung durch eine Spritzenpumpe. Hier werden die Probenlösung und die Reagenzien in einer vorgeschalteten Kammer vermischt und anschließend in das Zytometer injiziert. Der Vorteil dieses Aufbaus liegt in den gut zu dosierenden Volumina [70, 71, 109]. Alle bisher vorgestellten Systeme basieren auf Standard-Durchflusszytometern, bei denen die

Probenzufuhr durch aufwändigere Systeme ersetzt wurde, was jeweils mit einem hohen apparativen Aufwand verbunden ist. Um diesen Aufwand zu umgehen, wurden in dieser Arbeit die Probenröhrchen mit einem Septum versehen, das die Zugabe weiterer Lösungen während der Messung erlaubt. Das Messprinzip basiert auf einer ähnlichen Apparatur, wie sie von Hart-ridge und Roughton 1923 entwickelt wurde. Mit dieser Continous-Flow-Methode konnte die Bindung von Kohlenmonoxid an Hämoglobin studiert werden [10].

3.3 Methoden

Verwendete Hydrotalcite

Zur Messung der Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit wurden zwei unterschiedliche Hydrotalcit-Typen in ihrer calcinierten und nicht calcinierten Form eingesetzt (siehe Tabelle 3.1). Alle verwendeten Hydrotalcite besitzen ein Mg/Al-Verhältnis von 2,2 : 1, unterscheiden sich jedoch in ihrer Größenverteilung, Oberfläche und dem Anwendungsbereich. Die Daten zur Größenverteilung und Oberfläche sind den Stoffdatenblättern der Firma Süd-Chemie entnommen; die Daten zum calciniertem HT-Granulat fehlen.

Material	Größenverteilung	Oberfläche
Sorbacid 701	D50=20 μm	74 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
Sorbacid 701 calciniert	D50=20 μm	>180 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
HT-Granulat	D50<1 μm	<15 $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$
HT-Granulat calciniert	N. A.	N. A.

Tab. 3.1: Verwendete Hydrotalcite

3.3.1 Messung der statischen Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit

Photometrische Messung von DNA

DNA weist ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf, wobei das Verhältnis der DNA-Konzentration in einer verdünnten Lösung und die Adsorption bei 260 nm durch das Lambert-Beersche Gesetz gegeben ist. Der Absorptionskoeffizient ist stark von dem pH-Wert, der Ionenstärke des Puffers und der Temperatur abhängig sowie vom Typ der DNA (Doppel- oder Einzelstrang). Die in den vorliegenden Versuchen verwendete doppelsträngige DNA-Säure weist einen Absorptionskoeffizient von $A_{260} \cong 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ auf [39]. Die Reinheit einer DNA-Probe lässt sich über eine Differenzmessung ermitteln, bei der auch die Absorption bei 280 nm gemessen wird. Liegt der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0, so liegt reine DNA vor [122].

Calcination von Hydrotalcit

Zur Aktivierung von Hydrotalcit mittels Calcination wurde das Hydrotalcit für vier Stunden

im Muffelofen bei 600 °C gebrannt, um Wasser und Carbonat aus dem Material zu vertreiben. Um eine Verunreinigung durch CO₂ und Luftfeuchtigkeit zu verhindern, wurde das calcinierte Hydrotalcit im evakuierten Exsikkator gelagert und jeweils für jede Versuchsreihe neu calciniert.

Messung der statischen Bindungskapazität

Zur Wiedergewinnung der Hydroxidform wurden vor Versuchsbeginn die Hydrotalcite ca. 5 min in Wasser suspendiert. Anschließend wurde 5 min mit 800-g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Ermittlung der statischen Bindungskapazität wurden 0,1 g des jeweiligen Hydrotalcits mit 5 ml der DNA-Lösung (2,5 mg·ml⁻¹ DNA-Säure in TE-Puffer) für 1 bzw. 16 h auf einem Probenschüttler (250 min⁻¹) bei RT inkubiert, dann die Suspension 15 min mit 800-g zentrifugiert und anschließend die DNA-Konzentration des Überstandes photometrisch bestimmt. Mit Lösungen bekannter DNA-Konzentration wurde eine Kalibrationsgerade aufgenommen, mit der die Konzentration im Überstand bestimmt werden konnte. Aus der Differenz zwischen eingesetzter DNA-Konzentration und gemessener Konzentration des Überstandes ließ sich die Kapazität errechnen.

3.3.2 Entwicklung eines durchflusszytometrischen Messverfahrens

Zum Nachweis der DNA wurde der selektiv-bindende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) eingesetzt (siehe Tabelle 2.1 auf Seite 8). Dieser bindet an DNA durch Interkalation zwischen den Basenpaaren, mit einer Stöchiometrie von einem Farbstoffmolekül pro 4–5 Basenpaaren, dadurch erhöht sich die Fluoreszenzintensität um den Faktor 20–30.

Erstellung eines Größengates

Zunächst wurde untersucht, ob mithilfe der Durchflusszytometrie die Ergebnisse der statischen Methode reproduziert werden konnten. Die eingesetzten Hydrotalcite wiesen eine breite Größenverteilung (siehe Tabelle 3.1 auf der vorigen Seite) sowie einen großen Anteil an Kleinstpartikeln (<1 µm) auf. Um die Ergebnisse zur Bindungskapazitätsmessung vergleichbar zu machen, war es notwendig nur über einen definierten Größenbereich zu messen. Mithilfe von Polystyrolpartikeln mit einem Durchmesser von 1,43 und 4,5 µm konnte ein Gate (siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 7) im Vorwärtsstreulicht-Histogramm gezogen werden.

Bestimmung der PI-Menge

Zunächst wurde untersucht, wieviel PI zu den beladenen Hydrotalcit-Proben gegeben werden musste, um eine quantitative Färbung zu erhalten. Dazu wurden 21 Probenröhrchen mit je 10 mg der Hydrotalcite eingewogen und wie in Abschnitt 3.3.1 auf der vorigen Seite beschrieben vorbehandelt. Drei Probenröhrchen wurden mit je 1 ml Wasser versetzt und als Kontrolle vermessen. Die restlichen Proben wurden mit je 1 ml DNA-Lösung (2,5 mg·ml⁻¹ in TE-Puffer) versetzt und 1 bzw. 16 h bei RT auf einem Schüttler bei 250 min⁻¹ inkubiert. Anschließend

wurden die Proben 5 min bei 800·g zentrifugiert, jeweils drei Proben mit 100, 500 und 1 000 µl PI-Lösung ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in 0,9%iger NaCl-Lösung) versetzt und mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 1 ml aufgefüllt. Die Proben wurden 5 min bei RT auf einem Schüttler bei 250 min^{-1} inkubiert, 5 min bei 800·g zentrifugiert, in 1 ml Wasser resuspendiert und im Zytometer vermessen.

Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit in einer Langzeitkinetik

In einer Langzeitkinetik wurde ermittelt, in welchem Zeitraum der Großteil der DNA an die Hydrotalcite bindet. Dazu wurden 300 mg des Hydrotalcits eingewogen und, wie in Abschnitt 3.3.1 auf Seite 27 beschrieben, vorbehandelt. Wieder wurden je drei Probenröhrchen als Kontrolle vermessen. Das restliche Hydrotalcit wurde in 270 ml DNA-Lösung resuspendiert und bei RT auf einem Schüttler bei 250 min^{-1} inkubiert. Im Abstand von 30 min wurden jeweils drei Proben abgenommen (1 ml der Suspension) 5 min bei 800·g zentrifugiert, in 1 ml PI-Lösung resuspendiert und erneut 5 min inkubiert. Nach Resuspension in 1 ml Wasser wurden die Proben im Zytometer vermessen.

3.3.3 Entwicklung einer Messapparatur zur Ermittlung schneller Bindungsvorgänge

Zur Ermittlung sehr schneller Bindungsvorgänge wurde der Messablauf dahingehend geändert, dass eine Detektion schon nach wenigen Sekunden möglich war. Dazu wurde ein spezielles Probenröhrchen entwickelt, welches die gleichen Abmessungen der Standard-Probenröhrchen aufwies. Eine seitliche Zuleitung (Länge 40 mm, Innendurchmesser 2 mm) endete in einer Bördelung, die mit einem Standard-Quetsch-Septum verschlossen werden konnte (siehe Abbildung 3.2 auf der folgenden Seite). Mithilfe einer Kanüle konnten während der Messung bis zu 1 ml Probe oder Reagenz zu der Probe gespritzt werden.

Während der laufenden Messung wurde Analysenlösung zu der Hydrotalcitsuspension gegeben:

Vorlage	Hydrotalcit+H ₂ O	Hydrotalcit+DNA (gewaschen)	Hydrotalcit+DNA (ungewaschen)	Hydrotalcit+H ₂ O
Zugabe	PI	PI	PI	PI+DNA

Zunächst wurde untersucht, ob durch die Anlagerung von PI an Hydrotalcit eine erhöhte Fluoreszenzintensität festzustellen war und sich somit ein falsch positives Signal ergäbe. Dazu wurden 10 mg Hydrotalcit in 1 ml Wasser suspendiert und 10 s nach Beginn der Messung 500 µl PI-Lösung ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 0,9%iger NaCl) zugegeben. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich noch in Lösung befindliche DNA störend auf die Messung auswirkt. Dazu wurden 10 mg Hydrotalcit in 1 ml DNA-Lösung ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in TE-Puffer) suspendiert und für 60 min bei RT auf einem Schüttler bei 250 min^{-1} inkubiert. Die zentrifugierte Probe (5 min bei 800·g)

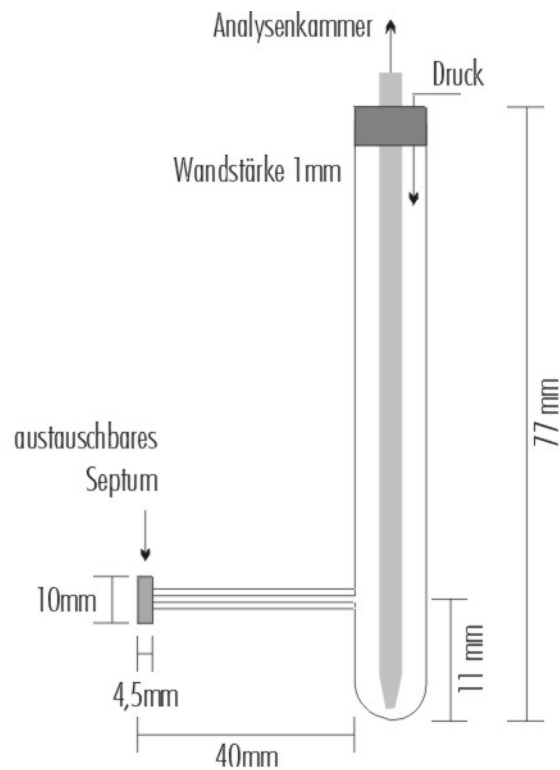


Abb. 3.2: Messapparatur zur Messung schneller Bindungsvorgänge. Die Zuleitung ab Septum hat einen Innendurchmesser von 2 mm. Die Röhrcchen wurden einzeln aus Glas gefertigt.

wurde in 1 ml Wasser resuspendiert und im Zytometer gemessen; 10 s nach Beginn der Messung wurden 500 μ l PI-Lösung zugegeben. Die Messung wurde wiederholt, wobei das Waschen der Probe ausgelassen wurde. Zudem sollte untersucht werden, ob bereits PI-markierte DNA an die Hydrotalcite bindet. Dazu wurden 10 mg Hydrotalcit in 1 ml Wasser suspendiert und 10 s nach Beginn der Messung 500 μ l PI-markierte DNA-Lösung (Mischungsverhältnis 1 : 1) zugegeben.

3.4 Ergebnisse

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass HT-Granulat und Sorbacid 701 DNA binden. Die statische Bindungskapazität wurde für die calcinierten und nicht calcinierten Formen der Hydrotalcite in Abhängigkeit von der Bindungsdauer photometrisch bestimmt. Durch Binden des DNA-selektiven Fluoreszenzfarbstoffs PI an die mit DNA beladenen Hydrotalcite konnten diese Ergebnisse mithilfe eines Durchflusszytometers bestätigt werden. Hiermit konnte die Bindung von DNA an Hydrotalcit direkt nachgewiesen werden.

Die ersten Messungen haben gezeigt, dass ein großer Teil der DNA bereits in den ersten 60 s nach Zugabe der DNA-Lösung an das Hydrotalcit bindet. Da die etablierten Messverfahren diese schnelle Bindungsreaktion nicht erfassen konnten, wurde eine Messapparatur entwickelt,

mit deren Hilfe es möglich war, die Bindung von PI-markierter DNA an Hydrotalcit direkt zu messen.

3.4.1 Bestimmung der statischen Bindungskapazität

In den vorliegenden Versuchen wurde die statische Bindungskapazität für die calcinierte und nicht calcinierte Form von Sorbacid 701 und HT-Granulat bestimmt. Vorbehandlung und Durchführung der Versuche sind im Kapitel 3.3.1 auf Seite 27 beschrieben. Die Ergebnisse in Tabelle 3.2 bilden jeweils das statistische Mittel aus drei Messungen.

Material	Kapazität 1 h	Kapazität 16 h
Sorbacid 701	N. A.	42,8 mg·g ⁻¹
Sorbacid 701 calciniert	84,9 mg·g ⁻¹	122,7 mg·g ⁻¹
HT-Granulat	N. A.	14,4 mg·g ⁻¹
HT-Granulat calciniert	57,6 mg·g ⁻¹	209,1 mg·g ⁻¹

Tab. 3.2: Statische Bindungskapazitäten der Hydrotalcite für DNA-Säure. Die Kapazitäten sind auf das Trockengewicht bezogen.

Anhand der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die Calcination die Kapazität der verwendeten Hydrotalcite um ein Vielfaches steigert. Die Bindungskapazitäten nach 16 h Einwirkzeit steigen bei Sorbacit 701 calciniert um den Faktor 2,9 und bei HT-Granulat calciniert um den Faktor 14,5. Diese größere Bindungskapazität ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass die Hydrotalcite beim calcinieren ca. 40 Gewichts% durch Abgabe von Wasser und CO₂ verlieren. Da die Bindungskapazität auf die Masse des Hydrotalcits bezogen wird, macht sich dieser Effekt bemerkbar. Jedoch kann dieses Phänomen nicht allein für den starken Anstieg der Bindungskapazität verantwortlich sein. Das ausgetriebene Wasser und CO₂ gibt zwischen den Hydroxidschichten neue Bindungsstellen frei, an die sich die DNA anlagern kann, worauf die erhöhte Bindungskapazität zurückzuführen ist.

3.4.2 Durchflusszytometrische Messung der Bindungskapazität

Zur Übertragung der Ergebnisse der statischen Kapazitätsmessung auf die Durchflusszytometrie wurden die Versuchsbedingungen angepasst. Zur Detektion der gebundenen DNA wurde der selektiv-bindende Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid eingesetzt. Ein Vorteil ist, dass sich PI in die Struktur der DNA einlagert und somit den sterischen Anspruch der DNA bei Einlagerung in das Hydrotalcit nicht weiter erhöhen sollte. Als weiterer Vorteil ist die Tatsache anzusehen, dass PI sich nicht mit einer Basenpräferenz in die DNA einlagert. Somit kann auch bei inhomogenen Basensequenzbruchstücken von einer gleichmäßig, quantitativen Färbung der DNA ausgegangen werden.

Erstellung eines Größengates

Um der unterschiedlichen Größenverteilung und somit dem unterschiedlichen Adsorptionsverhalten in Abhängigkeit von der Korngröße Rechnung zu tragen, war es notwendig, bei der durchflusszytometrischen Messung ein Größengate einzuführen. Durch Vermessung von Polystyrolpartikeln mit $1,43\ \mu\text{m}$ und $4,5\ \mu\text{m}$ konnte ein Gate im Vorwärtsstreulicht-Histogramm gesetzt werden, um nur Partikel in diesem Größenbereich auf PI-Fluoreszenz zu untersuchen (siehe Abbildung 3.3).

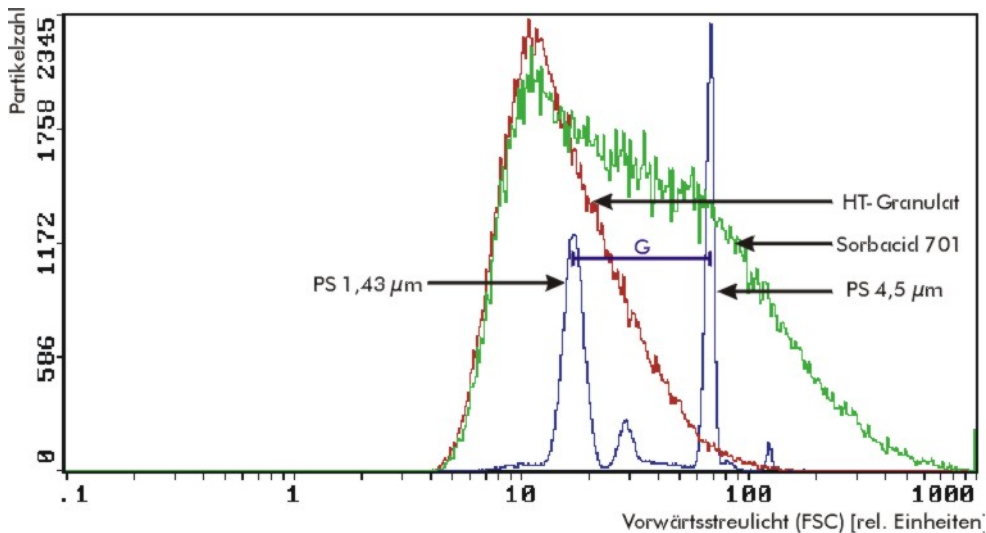


Abb. 3.3: Vorwärtsstreulicht der $1,43$ und $4,5\ \mu\text{m}$ Polystyrolpartikel mit den Vorwärtsstreulicht-Histogrammen von Sorbacid 701 und HT-Granulat. Die horizontale Linie **G** kennzeichnet das Größengate.

Bestimmung der PI-Menge

Zur Ermittlung der nötigen PI-Menge zur quantitativen Färbung der gebundenen DNA wurden mit DNA-Lösung inkubierte Hydrotalcit Proben mit unterschiedlichen Mengen PI-Lösung versetzt und durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 3.4 zeigt den Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender PI-Menge.

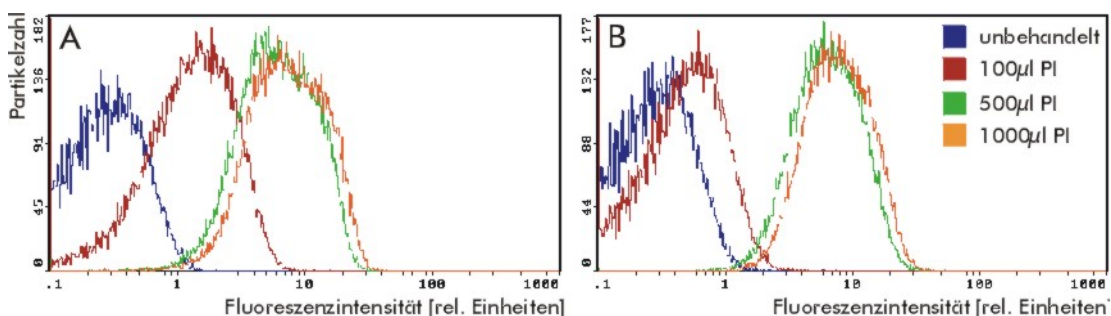


Abb. 3.4: Fluoreszenzhistogramme nach Zugabe der angegebenen Menge PI-Lösung zu einer DNA beladenen **A:** HT-Granulat- **B:** Sorbacid 701-Suspension.

Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit in einer Langzeitkinetik

Zunächst wurden die Ergebnisse aus den statischen Bindungsstudien durchflusszytometrisch verifiziert. Die Durchführung der durchflusszytometrischen Messungen ist in Abschnitt 3.3.2 auf Seite 28 beschrieben. Die statischen Bindungsstudien zeigten einen Kapazitätsunterschied zwischen HT-Granulat calciniert und Sorbacid 701 calciniert nach 1 h Inkubation mit DNA-Lösung um den Faktor 1,47. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung sind in Tabelle 3.3 wiedergegeben.

Material	Fluoreszenzintensität [rel. Einheiten]			
	unbeladen	PI	DNA	DNA+PI
Sorbacid 701 calciniert	0,31	0,43	0,79	24,5
HT-Granulat calciniert	0,31	0,48	0,52	16,0

Tab. 3.3: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messung der Adsorptionskapazität von DNA an Sorbacid 701 und HT-Granulat nach einstündiger Inkubation.

Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach einstündiger Inkubation mit DNA-Lösung von 0,31 auf 0,79 für calciniertes Sorbacid 701 und von 0,31 auf 0,52 für calciniertes HT-Granulat war zu verzeichnen. Diese Ergebnisse korrelierten mit der Beobachtung, dass die Partikelgröße mit zunehmender Inkubationsdauer und somit mit steigender adsorbierter DNA-Menge zunahm (Daten nicht gezeigt). Beim Vergleich der relativen Fluoreszenzintensitäten der markierten Hydrotalcite zeigte sich bei Sorbacid 701 ein Wert von 24,5 und bei HT-Granulat von 16,0, was einem Faktor von 1,53 zwischen den beiden Stoffen entspricht.

Durchflusszytometrische Messungen der Bindungsversuche nach 16 h waren nicht möglich. Durch die lange Inkubationszeit hatten sich große Hydrotalcit-Aggregate gebildet, die z. T. einen Durchmesser von $>50 \mu\text{m}$ aufwiesen und die Kapillare des Durchflusszytometers verstopften. Nach Zertrennung der Aggregate mittels Ultraschall konnte kein Unterschied in der Fluoreszenzintensität zu den Proben nach einstündiger Inkubation festgestellt werden. Der Effekt der Aggregation ließ sich durch Erhöhung der DNA-Konzentration noch steigern.

Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit in einer Kurzzeitkinetik

Für die Messung der schnellen Bindungsvorgänge wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgenommen. Die Messungen liefen jeweils 300 s wobei nach 10 s die Zugabe des Adsorbats erfolgte. Die Kontrollmessungen haben gezeigt, dass die Zugabe der PI- bzw. der DNA-Lösung zu einer wässrigen Hydrotalcitsuspension keine Auswirkung auf die Fluoreszenzintensität hatte (siehe Abbildung 3.5 auf der folgenden Seite). In der Abbildung wird exemplarisch der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von DNA- bzw. PI-Lösung zur Sorbacid 701-Suspension gezeigt. Da die Kinetik-Dotplots für HT-Granulat und für die calcinierten Materialien den gleichen Verlauf zeigten, wurde auf ihre Darstellung verzichtet.

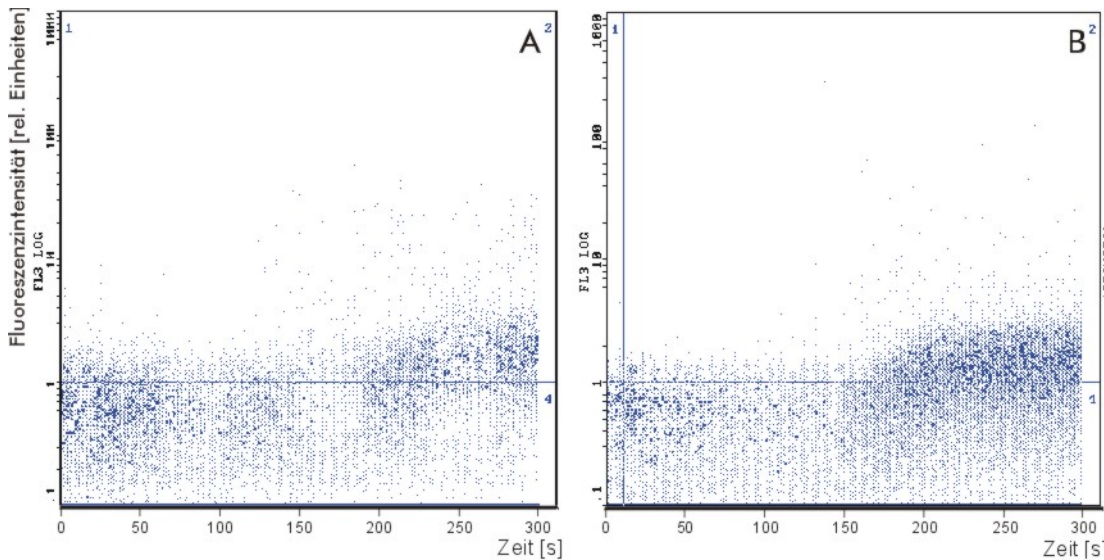


Abb. 3.5: Kinetik-Dotplot: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von **A:** DNA- **B:** PI-Lösung zu einer Sorbacid 701-Suspension.

Die Auswertung der Kurzzeitkinetik erfolgte durch Ausmessen der Kinetik-Dotplots. Im Dotplot ist die Abszisse in 1000 und die Ordinate in 1024 Kanäle unterteilt, wobei an der Abszisse die Zeit und an der Ordinate die Fluoreszenzintensität aufgetragen wurde. Die Messungen liefen jeweils 300 s, das entsprach 300 ms für jeden Kanal. Der Verlauf der Fluoreszenz gegen die Zeit vor und nach Bindung der markierten DNA an das Hydrotalcit ist nahezu linear, somit wurden für die Abschätzung der Menge an gebundener DNA die statistischen Auswertungen der Zytometer-Software verwendet. Da der Verlauf der Fluoreszenzintensität parallel zur Ordinate an jedem Zeit-Kanal einer gaußschen Verteilung entspricht, wird der gemittelte Y-Wert für die Abschätzung der Bindungskapazität verwendet. Abbildung 3.6 zeigt die Auswertung eines solchen Kinetik-Dotplots.

Die für die Auswertung relevanten Punkte sind als F1 und F2 bzw. T1 und T2 gekennzeichnet. F1 und F2 sind jeweils die Werte für die durchschnittliche Fluoreszenzintensität, T1 ist der Zeitpunkt der Zugabe der markierten DNA-Lösung und T2 markiert den Zeitpunkt, von dem an Anlagerung der markierten DNA an die Hydrotalcit-Partikel detektiert werden konnte. Der Quotient F aus F2 durch F1 ließ somit eine Aussage über die relative Menge gebundener DNA zu, und die Differenz T aus T2 und T1 ließ eine Aussage über die Adsorptionsgeschwindigkeit zu. Diese Werte wurden für Sorbacid 701 und HT-Granulat in der jeweils calcinierten und nicht calcinierten Form bestimmt und sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Nach Auswertung der Kinetik-Dotplots zeigte sich ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten der Hydrotalcite. Bei den unbehandelten Materialien zeigte Sorbacid 701 mit einem Quotienten F von 39,2 ein höheres Adsorptionsvermögen als HT-Granulat (29,7). Bei der Adsorptionsgeschwindigkeit zeigte sich jedoch ein anderes Verhalten, hier band das unbehandelte

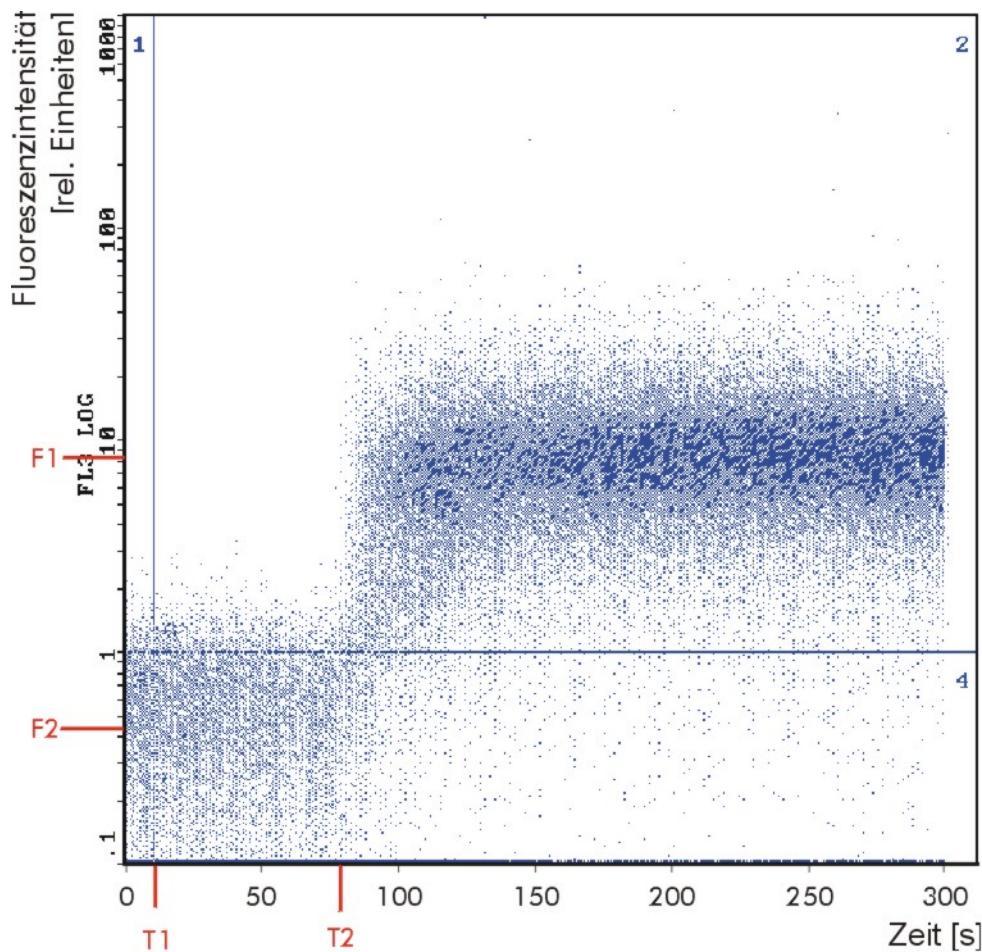


Abb. 3.6: Kinetik-Dotplot: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von PI-markierter DNA-Lösung zu einer HT-Granulat calciniert-Suspension. F1 und F2 sind jeweils die Werte für die durchschnittliche Fluoreszenzintensität, T1 ist der Zeitpunkt der Zugabe der markierten DNA-Lösung und T2 markiert den Zeitpunkt, ab dem die Anlagerung der markierten DNA an die Hydrotalcit-Partikel detektiert werden konnte.

	Sorbacid 701	Sorbacid 701 calciniert	HT-Granulat	HT-Granulat calciniert
F [rel. Einheiten]	39,2	91,3	21,6	29,7
T [s]	94	94	84	73

Tab. 3.4: Auswertung der Kinetik-Dotplots.

HT-Granulat nach 84 s, somit 10 s schneller als das Sorbacid 701. Nach Calcination erhöhte sich die Absorptionskapazität beider Hydrotalcite; für Sorbacid 701 stieg sie von 39,2 auf 91,3 und für HT-Granulat von 21,6 auf 29,7. Die Adsorptionsgeschwindigkeit für Sorbacid 701 wurde durch die Calcination nicht beeinflusst, sie blieb bei 94 s. Für HT-Granulat verringerte sich die Adsorptionsgeschwindigkeit von 84 auf 73 s.

Während der Durchführung hatte sich gezeigt, dass die verwendeten Hydrotalcite einem Alterungsprozess unterlagen, der sich auf die DNA-Bindungs Kapazität auswirkte. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen und den Verlust an Bindungs Kapazität quantitativ zu bestimmen, wurden die Kurzzeitkinetik-Messungen mit frischem Material wiederholt. Hier wurden wiederum die normale und die calcinierte Form von Sorbacid 701 und HT-Granulat verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.5 wiedergegeben.

	Sorbacid 701	Sorbacid 701 calciniert	HT-Granulat	HT-Granulat calciniert
F [rel. Einheiten]	88,2	123,6	20,4	63,6
T [s]	89	94	85	160

Tab. 3.5: Auswertung der Kinetik-Dotplots. Die Messungen wurden mit frischem Hydrotalcit durchgeführt.

Es zeigte sich, dass Sorbacid 701 eine deutlich erhöhte Adsorptionskapazität aufwies, der Quotient F stieg von 39,2 auf 88,2 für die normale und von 91,3 auf 123,6 für die calcinierte Probe. Die Bindungszeiten wichen nur geringfügig von den ersten Messungen ab. Für HT-Granulat konnten keine Änderungen in den Adsorptionseigenschaften festgestellt werden, weder der F -Wert (Änderung von 21,6 auf 20,4), noch die Bindungsgeschwindigkeit (Änderung von 84 auf 85 s) hatte sich nennenswert verändert. Für die calcinierte Form des HT-Granulats zeigte sich eine Änderung sowohl in der Bindungs Kapazität mit einem Anstieg von 29,7 auf 63,6, als auch in der Bindungsgeschwindigkeit mit einer Verzögerung von 73 auf 160 s.

3.5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hydrotalcit als Adsorbens für DNA dienen kann, wobei hier als Modell-DNA die Heringssperma-DNA Säure eingesetzt wurde. Die verwendeten Hydrotalcite wiesen dabei eine unterschiedliche Bindungs Kapazität auf, die davon abhingen, ob die Hydrotalcite in der calcinierten Form vorlagen.

Statische Bindungs Kapazität von DNA an Hydrotalcit

Anhand statischer Bindungsversuche wurde gezeigt, dass Sorbacid 701 in der calcinierten Form eine Bindungs Kapazität von $122,7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, im Gegensatz zu $42,8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in der normalen Form und HT-Granulat in der calcinierten Form von $209,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, im Gegensatz zu $14,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ in der normalen Form nach 16 h Inkubation aufwiesen. Bei einer Reduktion der Bindungszeit auf 1 h führt dies zu einer deutlichen Abnahme der Bindungs Kapazität. Hier wies Sorbacid 701 in der calcinierten Form eine Bindungs Kapazität von $84,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ und HT-Granulat von $57,6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ auf. Die erhöhte Bindungs Kapazität der calcinierten Form nach 16 h ist zu einem Teil darauf zurückzuführen, dass die Angaben der Kapazitäten auf mg DNA

pro g Trockenmasse Hydrotalcit bezogen sind. Bei der Calcination werden CO₂ und Wasser aus der Schichtstruktur verdrängt woraus eine Gewichtsabnahme von ca. 40 % resultiert.

Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit in einer Langzeitkinetik

Werden die Ergebnisse der statischen Kapazitätsmessungen mit den durchflusszytometrischen Messungen verglichen, so zeigt sich eine gute Korrelation. Für die Kapazitäten von Sorbacid 701 und HT-Granulat in der jeweils calcinierten Form wurden für die statischen Messungen ein Kapazitätsunterschied um den Faktor 1,47 gemessen. Die durchflusszytometrischen Messungen haben hier einen Kapazitätsunterschied um den Faktor 1,53 ergeben. Dies entspricht einer Abweichung zwischen den beiden Methoden von 4 %. Die durchflusszytometrischen Messungen nach 16-stündiger Inkubation mit DNA-Lösung konnten nicht durchgeführt werden, da eine zu starke Verklumpung der Hydrotalcitpartikel zu beobachten war. Durch die Zugabe von DNA zu einer Hydrotalcitsuspension findet zunächst eine Adsorption an der Teilchenoberfläche statt (Physisorption). Mit zunehmender DNA-Menge lagern sich die Hydrotalcitpartikel zusammen und bilden Aggregate mit einem Durchmesser von >50 µm. Eine Zerteilung der Klumpen mittels Ultraschall führte bei der anschließenden Messung zu keiner erhöhten Bindungskapazität. Hier liegt die Vermutung nahe, dass sich bei längerer Inkubationsdauer die DNA in mehreren Schichten um die Hydrotalcitpartikel lagert und sich durch die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der anionischen DNA und des kationischen Hydrotalcits mehrere Partikel zusammenlagern. Nach Aufbrechen dieser Aggregate dissoziiert die locker gebundene DNA wieder in die Lösung (Desorption).

Bindungskapazität von DNA an Hydrotalcit in einer Kurzzeitkinetik

Mithilfe der Durchflusszytometrie war es möglich, die Bindungsvorgänge von markierter DNA an das Hydrotalcit in einer Kurzzeitkinetik zu messen. Hierzu wurde ein Probenröhrchen so verändert, dass es möglich war, während der Messung Probe oder Reagenz zu der Vorlage zu spritzen. Hierbei wurde in Vorversuchen ermittelt, ob nach Zugabe von PI- oder DNA-Lösung zu einer Hydrotalcit-Suspension bereits eine erhöhte Fluoreszenz zu messen ist (siehe Abbildung 3.5 auf Seite 34). Es hat sich gezeigt, dass nach ca. 150 s ein leichter Anstieg der Fluoreszenzintensität zu beobachten ist. Im Fall von PI dürfte dies mit der Fluoreszenz des ungebundenen Farbstoffs zu erklären sein. Im Fall von DNA liegt die Vermutung nahe, dass nach Zugabe ein verändertes Streulichtverhalten der Hydrotalcitpartikel vorliegt.

Die Messung der Kurzzeitkinetik hat gezeigt, dass die erste Bindung an die Hydrotalcitpartikel nach 73 s für das HT-Granulat und nach 94 s für das Sorbacid 701 detektiert werden konnte. Die Messungen haben die erwarteten Werte für die Bindungskapazität bestätigt. Auch in den Kurzzeit-Messungen wiesen die calcinierten Hydrotalcite eine höhere Bindungskapazität auf. Bei Sorbacid 701 stieg sie von 39,2 auf 91,3 und für HT-Granulat von 21,6 auf 29,7. Hier spiegelt sich das Ergebnis aus den Vorversuchen wieder; Sorbacid 701 besitzt eine höhere

Bindungskapazität als HT-Granulat. Hierbei ist hervorzuheben, dass HT-Granulat zwar eine geringere Bindungskapazität als Sorbacid 701 aufweist, jedoch eine um 20 s schnellere Bindungskinetik zeigt. Dies könnte mit der poröseren Struktur von HT-Granulat zu erklären sein. Ein Aggregat ist aus einer Vielzahl kleiner Kristalle mit einem Durchmesser von 250–600 μm aufgebaut (siehe Abbildungen A.4, A.5 auf Seite 100, A.6 auf Seite 101).

Bemerkenswert sind die Änderungen der Bindungskapazitäten zwischen den frischen Hydrotalcit-Proben und den Proben nach längerer Lagerung. Anhand der kinetischen Messungen konnte gezeigt werden, dass sich die Bindungskapazität für Sorbacid 701 in der calcinierten und nicht calcinierten Form um den Faktor 1,35 bzw. 2,25 erhöht hat. Das HT-Granulat zeigte in der nicht calcinierten Form keine Änderung der Bindungskapazität, jedoch erhöhte sich die Kapazität nach dem Calcinieren um den Faktor 2,15. Zudem stieg die Bindungszeit von 73 auf 160 s an. Die erhöhte Bindungskapazität könnte mit einer Strukturveränderung der Schichtstruktur bei längerer Lagerung zu erklären sein, bei der sich die Zahl der freien Bindungsstellen irreversibel verringert.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hydrotalcit in hohem Maß DNA bindet. Die Bindungskapazität wurde sowohl photometrisch als auch durchflusszytometrisch mithilfe des selektiv DNA-bindenden Farbstoffs Propidiumiodid bestimmt. Eine Messung der absoluten Bindungskapazität ist mithilfe der Durchflusszytometrie allerdings nicht möglich, da nur relative Fluoreszenzintensitäten gemessen werden können. Zur Ermittlung von schnellen Bindungsvorgängen wurde eine Apparatur entwickelt, die es ermöglicht, während der Messung Probe und/oder Reagenzien zu der vorgelegten Probe zu spritzen. Auf diesem Weg konnte die Bindungsgeschwindigkeit von DNA an Hydrotalcit in einem Zeitfenster von 300 s bestimmt werden.

4 Messung oszillierender Hefen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Bioreaktor-Kultivierungen von *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Die Prozessgrößen wurden online mittels 2D-Fluoreszenzspektroskopie (BioView), In-situ-Mikroskopie und Abgasanalytik aufgenommen; Offline-Prozessgrößen waren die durchflussszytometrische Messungen des Neutrallipid- und Gesamtproteingehaltes sowie der Zellzyklusphasen.

Durch Auswertung der 2D-Fluoreszenzdaten mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA: Principal Component Analysis) oder multilinearer Regression und Übertragung in ein PLS-Modell (Partial Least Squares) konnten schwer zugängliche Prozessgrößen indirekt verfügbar gemacht werden. Die Validierung der Ergebnisse erfolgte dabei über die online und offline ermittelten Prozessgrößen. Für weitere Informationen zu den hier verwendeten Modellen sei auf die laufende Dissertation von K. Hantelmann verwiesen [40].

4.1 Methoden

4.1.1 Kultivierung oszillierender Hefe

Die Kultivierung erfolgte in einem 2 l-Edelstahlreaktor, über dessen seitliche 25 mm Ports das In-situ-Mikroskop und der BioView-Sensor installiert wurden. Weitere Prozessdaten wurden über pH-, pO₂-Elektrode und Thermoelement aufgenommen. Über Zu- und Abläufe für Medium, Glucoselösung, Säure und Base wurden die Verdünnung und der pH-Wert der Kultur geregelt, die Abgasanalytik war über einen Abgaskühler mit dem Reaktor verbunden.

Der Bioreaktor-Kultivierung gingen eine Vorkultur und eine batch Kultivierung voraus. Für die Kultivierung wurde der Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*, Wildstamm H620 eingesetzt. Die Vorkultur wurde aus einer Schrägagar-Kultur in einen 300 ml-Schüttelkolben überimpft, mit 50 ml Schatzmann-Medium (zusätzlich mit Na-Citrat 5,8 g·l⁻¹) aufgefüllt und 24 h im Schüttelschrank bei 120 min⁻¹ und 30 °C inkubiert. Für die batch Kultivierung wurde die Vorkultur in einen 2 l-Reaktor überimpft. Vorher wurde der Reaktor mit 1 800 ml Schatzmann-Medium befüllt, zur Sterilisierung 20 min bei 121 °C autoklaviert und anschließend mit Glucose-, Vitamin- und Antibiotikalösung versetzt. Die Kultivierung erfolgte über 21 h bei 800 min⁻¹.

Zur kontinuierlichen Reaktionsführung wurde eine Feed-Lösung aus 22 l Schatzmann-Medium mit einer Glucosekonzentration von 30 g·l⁻¹ steril filtriert und in ein steriles Vorratsgefäß gepumpt. Die kontinuierliche Zugabe der Feed-Lösung erfolgte über eine Schlauchpumpe. Die Kultivierungsparameter von zwei durchgeführten Bioreaktor-Kultivierungen sind in Tabelle 4.1 auf der folgenden Seite zusammengefasst. Die Oszillation der Hefen wurde durch eine Hungerphase über 1–2 h und anschließende schrittweise Erhöhung der Verdünnungsrate initiiert.

Verdünnungsrate	0,15 h ⁻¹	0,16 h ⁻¹
Medium	Schatzmann-Medium mit 30 g·l ⁻¹ Glucose	
pH-Wert	5,6 (±0,1)	
Temperatur	30 °C (±0,1 °C)	
Rührerdrehzahl	1 200 min ⁻¹	
Begasungsrate	5 l·min ⁻¹	

Tab. 4.1: Übersicht der Kultivierungsparameter für die kontinuierlichen *S. cerevisiae* Kultivierungen

Als online Messsystem zur spektroskopischen Untersuchung der Zellsuspension wurde der BioView-Sensor verwendet. Abbildung 4.1 zeigt den schematischen Aufbau; Anregungs- und Emissionsstrahlung werden durch Filterräder mit 16 Filtern in definierte Wellenlängenbereiche unterteilt. Als Lichtquelle dient eine Xenonlampe und zur Detektion des Emissionslichts wird ein Photomultiplier eingesetzt.

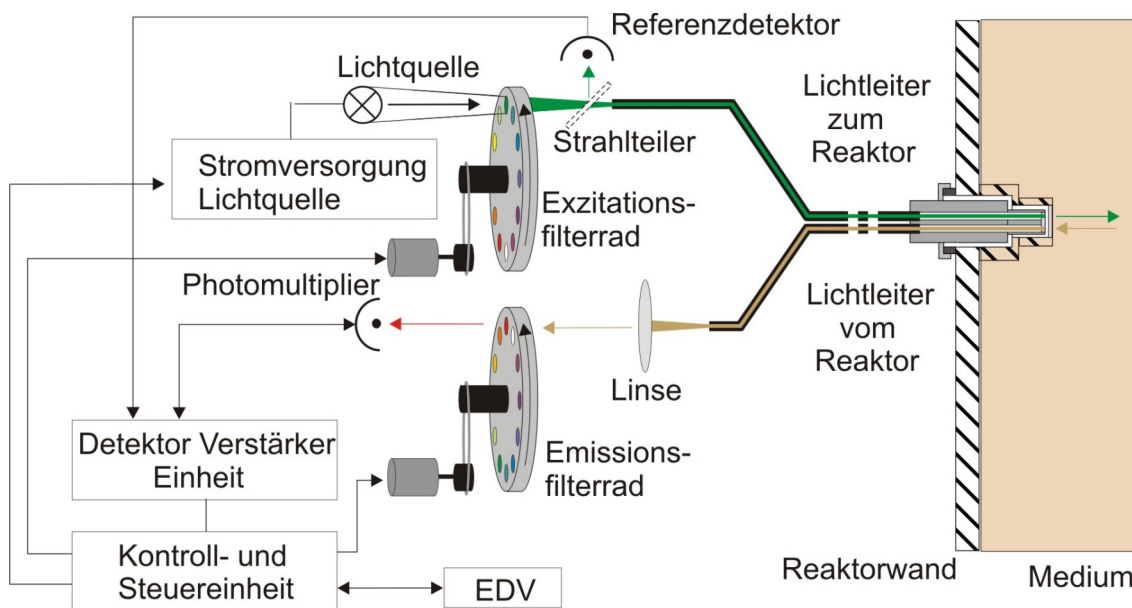


Abb. 4.1: Schematischer Aufbau des BioView-Sensors.

Die durch das Filterrad festgelegten Anregungswellenlängen decken einen Bereich von 270 bis 550 nm und die Emissionswellenlängen einen Bereich von 310 bis 590 nm jeweils in 20 nm Schritten ab. Bei den Filtern handelt es sich um Bandpassfilter mit einer Breite von 20 nm. In Tabelle 4.2 sind die gemessenen Biomoleküle mit den entsprechenden Anregungs- und Emissionswellenlängen zusammengefasst.

Durch Auftragung der Anregungs- gegen die Emissionsspektren wird ein dreidimensionales Fluoreszenzspektrum erhalten. Die Angabe der Fluoreszenzintensität erfolgt als relative

Biomolekül		Ex [nm]	Em [nm]
NADH [38]		340	460
Pyridoxin [25]		324	390
Tryptophan, Tyrosin [127]		287	348
Flavine [127]	FAD	370	520
	FMN	450	520

Tab. 4.2: Anregungs- und Emissionswellenlängen der gemessenen Biomoleküle

Fluoreszenzintensitäten (RFI), da sie unter anderem von gerätespezifischen Größen abhängig ist [77].

4.1.2 Durchflusszytometrische Detektion morphologischer und biochemischer Parameter

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden in unregelmäßigen Abständen Proben aus dem Reaktor entnommen. Das Probenintervall richtete sich dabei nach der Wachstumsphase der Hefezellen; bei einer hohen CO₂-Freisetzung wurden Proben im 3–5 min Abstand entnommen, bei geringerer CO₂-Freisetzung im 5–15 min Abstand. Um den Metabolismus der Hefezellen möglichst schnell zu unterbrechen, wurden die Zellen in eiskaltem Ethanol fixiert. Dazu wurden bei jeder Probennahme drei parallele Proben von 300 µl genommen, mit 600 µl Ethanol (-18 °C) vermischt und bei -18 °C gelagert.

Zellzyklusanalyse

Die quantitative Anfärbung der DNA wurde mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Sytox Grün durchgeführt. Sytox Grün ist ein selektiv DNA-bindender Farbstoff, der besonders für Mikroorganismen mit kleinem Genom geeignet ist. Im Vergleich zu anderen DNA-Farbstoffen weist Sytox Grün nach Bindung an DNA eine um Faktor 500 höhere Fluoreszenz auf.

Stoffdaten für Sytox Grün

Molekulargewicht	600 g·mol ⁻¹
Lösemittel	DMSO (Stammlösung), PBS (Arbeitslösung)
Anregungswellenlänge	504 nm
Emissionswellenlänge	523 nm
QY	0,53
Absorptionskoeffizient	67 000 cm ⁻¹ M ⁻¹

Für die Analyse des Zellzyklus wurden 100 µl der mit Ethanol fixierten Zellen in 1 000 µl PBS suspendiert, zentrifugiert (5 min bei 800·g), in 200 µl PBS resuspendiert und mit 100 µl RNase-Lösung (2 mg·ml⁻¹ in PBS) versetzt. Die Zellsuspension wurde bei RT im Dunkeln

über Nacht inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 900 μl PBS resuspendiert und mit 100 μl Sytox Grün-Lösung (5 μM) versetzt. Die Zellsuspension wurde 15 min im Dunkeln inkubiert, mit PBS gewaschen, in 1000 μl PBS resuspendiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

Lipidgehalt

Neutrallipide (z. B. Cholesterol-Ester, Triglyceride) sind ein Bestandteil der Zellmembran und der Zellorganellen, außerdem reichern sie sich in intrazellulären Lipidtröpfchen an. Es hat sich gezeigt, dass der Neutrallipid-Gehalt von der Zellzyklusphase abhängt. Zur Detektion der Neutrallipide wird der Fluoreszenzfarbstoff BODIPY eingesetzt. Im Vergleich zu dem Lipid-Farbstoff Nil Rot weist BODIPY eine höhere Selektivität für Neutrallipide und ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis auf [31].

Stoffdaten für BODIPY

Molekulargewicht	262,11 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Lösemittel	DMSO (Stammlösung), PBS (Arbeitslösung)
Anregungswellenlänge	493 nm
Emissionswellenlänge	503 nm
QY	0,9
Absorptionskoeffizient	80 000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

Zur Messung der Neutrallipide wurden 100 μl der mit Ethanol fixierten Zellen in 1000 μl PBS resuspendiert, zentrifugiert (5 min bei 800-g), in 1000 μl PBS resuspendiert und mit 100 μl BODIPY-Lösung (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ in PBS) versetzt. Die Zellsuspension wurde 20 min im Thermomixer (800 min^{-1}) bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wurde zweimal mit PBS gewaschen, in 1000 μl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Proben der Lipid-Messung wurden ebenfalls für die Messung der Morphologie verwendet.

Proteingehalt

Proteine besitzen eine Vielzahl an reaktiven Gruppen; zur Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen werden fast ausschließlich Amin-reaktive Stoffe eingesetzt. In dieser Arbeit wurde das Isothiocyanat-Derivat von Fluorescein eingesetzt, das mit primären Aminen unter Bildung eines Thioharnstoff-Derivats reagiert. Bei der Färbung mit FITC kann nicht von einer homogenen Färbung aller Proteine ausgegangen werden, aus diesem Grund ist diese Methode nicht für eine quantitative Bestimmung geeignet, jedoch bietet sie die Möglichkeit, Proben gleicher Herkunft miteinander zu vergleichen. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu vermeiden, dürfen keine Puffer verwendet werden, die primäre Amine enthalten (z. B. Tris).

Die Färbung muss direkt vor der Messung erfolgen, da die NN'-Thioharnstoffverbindungen nicht stabil sind.

Stoffdaten für FITC

Molekulargewicht	389,38 g·mol ⁻¹
Lösemittel	DMSO (Stammlösung), PBS (Arbeitslösung)
Anregungswellenlänge	494 nm
Emissionswellenlänge	518 nm
QY	0,9
Absorptionskoeffizient	68 000 cm ⁻¹ M ⁻¹ (bei pH 8,0)

Zur Messung des Gesamtproteingehalts wurden 100 µl der mit Ethanol fixierten Zellen in 1 000 µl PBS resuspendiert, zentrifugiert (5 min bei 800·g), in 1 000 µl PBS resuspendiert und mit 100 µl FITC-Lösung (10 µg·ml⁻¹ in DMSO) versetzt. Die Zellsuspension wurde 20 min im Thermomixer (800 min⁻¹) bei RT inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen, in 1 000 µl PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

4.2 Ergebnisse

Es wurden zwei kontinuierliche Kultivierungen mit unterschiedlichen Verdünnungsraten durchgeführt. Für die erste Kultivierung mit einer Verdünnungsrate von 0,15·h⁻¹ (im folgenden als H1 bezeichnet) wurde eine stabile Oszillation über 49 h beobachtet; die Länge des Zyklus betrug 3 h 30 min mit einer Abweichung von ±10 min. Für die zweite Kultivierung mit einer Verdünnungsrate von 0,16·h⁻¹ (im folgenden als H2 bezeichnet) wurde eine stabile Oszillation über 13 h beobachtet; die Länge des Zyklus betrug 3 h 50 min mit einer Abweichung von ±10 min.

Für die Auswertung der Oszillationen wurden die Zeiträume zwischen der 94. und 101. Kultivierungsstunde für die erste Kultivierung und zwischen der 260. und 268. Kultivierungsstunde für die zweite Kultivierung herangezogen. Beide betrachteten Zeiträume decken jeweils zwei vollständige Oszillationszyklen ab.

4.2.1 Verlauf der Zellzyklusanteile

Für die Gegenüberstellung der Daten wurde jeweils ein direkter Vergleich mit dem CO₂-Gehalt des Abgas vorgenommen, weil diese Prozessgröße die Metabolismusaktivität der Hefezellen direkt widerspiegelt. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 4.2 auf der folgenden Seite und 4.3 auf der folgenden Seite die Anteile der Zellzyklusphasen gegen den CO₂-Gehalt des Abgases abgebildet. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Zellzyklusphasenanteile in farbigen Balken skizziert.

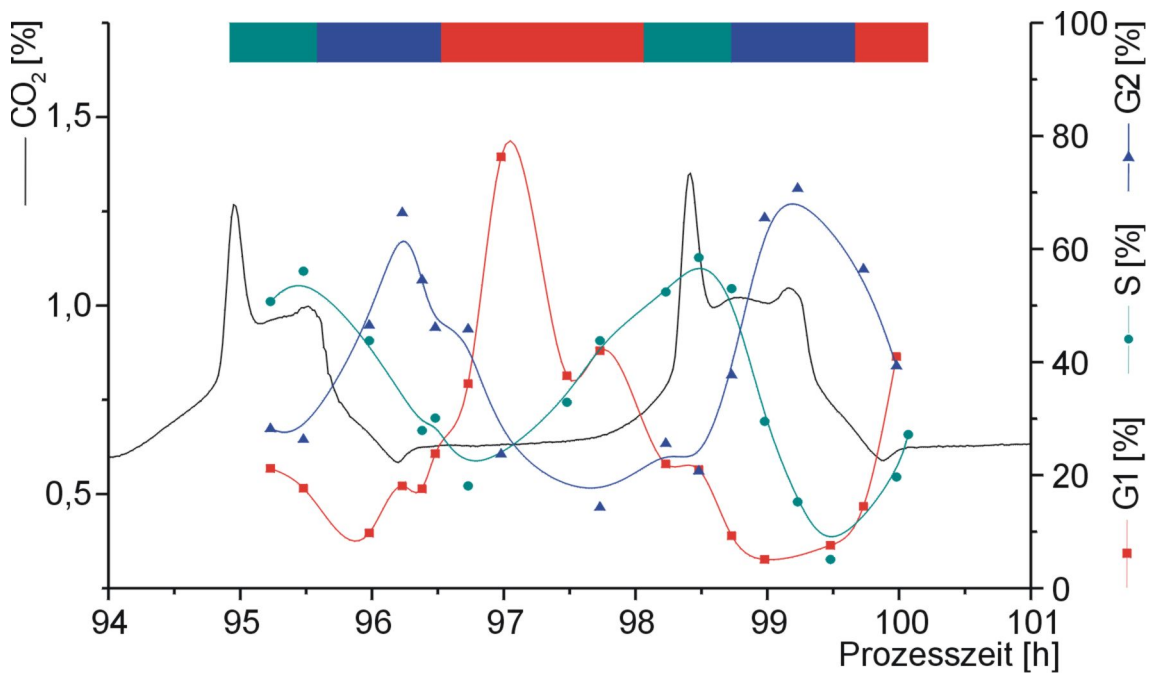


Abb. 4.2: CO₂-Gehalt des Abgases und Zellzyklusanteile der Kultivierung von *S. cerevisiae* mit einer Verdünnungsrate von 0,15·h⁻¹ (H1) gegen die Prozesszeit. Der Zellzyklusverlauf ist über Trendkurven wiedergegeben.

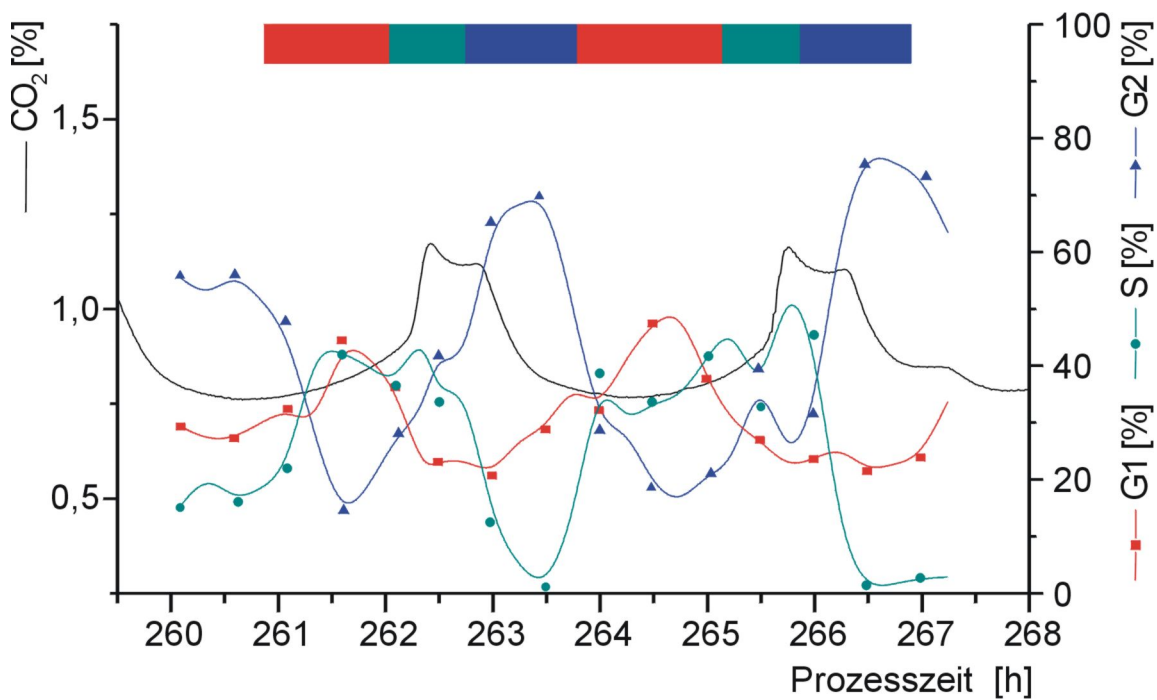


Abb. 4.3: CO₂-Gehalt des Abgases und Zellzyklusanteile der Kultivierung von *S. cerevisiae* mit einer Verdünnungsrate von 0,16·h⁻¹ (H2) gegen die Prozesszeit. Der Zellzyklusverlauf ist über Trendkurven wiedergegeben.

In beiden Abbildungen ist zu erkennen, dass beim Durchlauf eines Oszillationszyklus die einzelnen Zellzyklusphasen periodisch durchlaufen wurden. Bei der H1-Kultivierung war für die G1-Phase der CO₂-Gehalt mit 0,6 % für ca. 90 min konstant. Im weiteren Verlauf stieg die Stoffwechselaktivität, was sich durch einen Anstieg des CO₂-Gehalts äußerte. Hat die Zelle die Vorbereitungen für die Zellteilung abgeschlossen, wird der Restriktionspunkt (START) überschritten und die Zelle tritt in die S-Phase ein; hier erreichte der CO₂-Gehalt ein Maximum von 1,3 %. Während der S-Phase fällt der CO₂-Gehalt auf einen Plateauwert von 0,9 % ab. Nach der Verdopplung der DNA überschreitet die Zelle einen weiteren Restriktionspunkt, was sich in einem lokalen Maximum von 1,0 % im CO₂-Gehalt äußerte und geht in die G2/M-Phase über. Während des Ablösens der Tochterzelle kommt die Stoffwechselaktivität nahezu zum Erliegen; der CO₂-Gehalt erreichte wieder sein Minimum bei 0,6 %.

Für die H2-Kultivierung war ein ähnlicher Verlauf zu verzeichnen, jedoch mit unterschiedlichen Phasenlängen im Vergleich zu der H1-Kultivierung. Hier wurde in der S-Phase ein CO₂-Gehalt von 1,17 % erreicht; ein lokales Maximum konnte nicht beobachtet werden. Nach der Zellteilung fiel der CO₂-Gehalt wieder auf einen konstanten Wert von 0,77 % ab.

4.2.2 Verlauf des Gesamtproteingehalts

Der Verlauf der Proteinkonzentration ist ebenfalls periodischen Schwankungen unterworfen. In Abbildung 4.4 auf der folgenden Seite und 4.5 auf der folgenden Seite ist der Verlauf des durchflusszytometrisch gemessenen Gesamtproteingehalts mit dem CO₂-Gehalt des Abgases sowie der BioView-Spektren von Tryptophan und Tyrosin gegen die Prozesszeit aufgetragen. Auffällig bei beiden Kultivierungen war der asynchrone Verlauf der BioView- und der durchflusszytometrischen Messung der Proteine. Die BioView-Messung wies ein Maximum gegen Ende der G1-Phase auf und sank in der G2-Phase auf ein Minimum ab. Die durchflusszytometrische Messung wies einen steilen Anstieg zu Beginn der G2-Phase auf und sank dann während der G1-Phase auf ein Minimum ab. Der Verlauf des durchflusszytometrisch gemessenen Gesamtproteingehalts lief synchron mit dem G2-Zellzyklusanteil.

4.2.3 Verlauf des Neutrallipidgehalts

Um eine zellzyklusabhängige Schwankung des Lipidgehalts der Hefezellen leichter erkennen zu können, wurde der Lipidgehalt mit den G1- und G2-Zellzyklusanteilen gegen die Prozesszeit aufgetragen (siehe Abbildung 4.6 auf Seite 47 und 4.7 auf Seite 47). Für beide Kultivierungen zeigte sich ein mit der G2-Phase synchroner Lipidgehalt. Während H1 zeigte sich ein Anstieg über den gesamten Verlauf, das Maximum in der ersten Oszillationsphase lag bei 11,4 und das Maximum in der zweiten Oszillationsphase bei 13,2. Für den Verlauf von H2 konnte nur ein Maximum bei 8,9 aufgenommen werden. Hier war weiterhin auffällig, dass sich die Amplitude

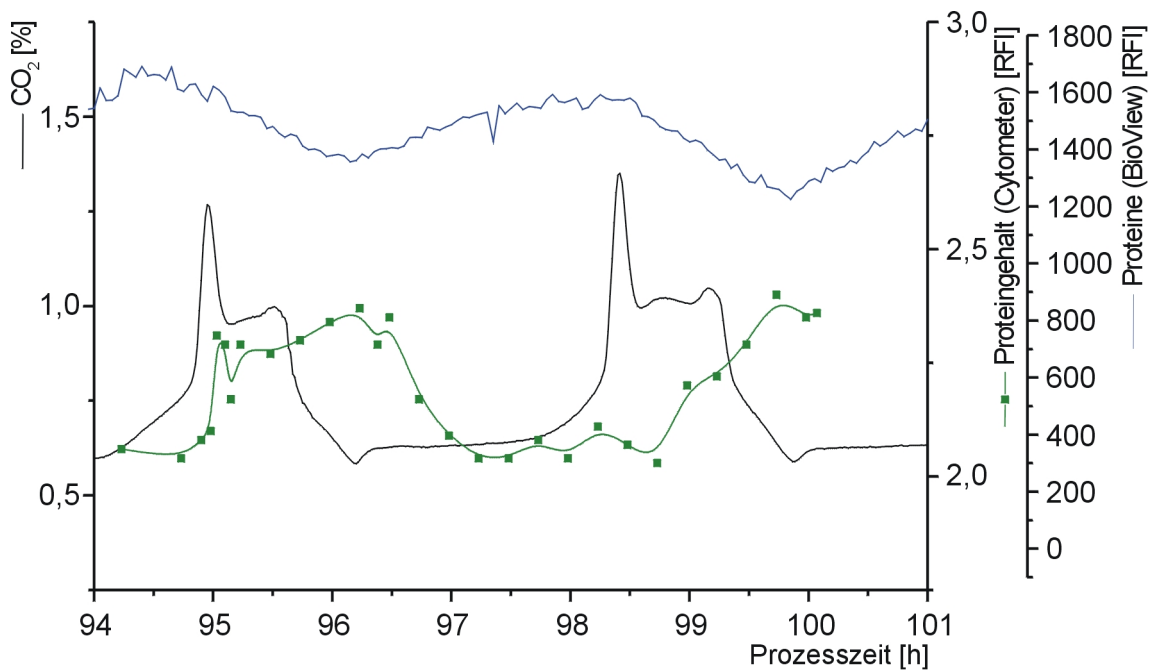


Abb. 4.4: CO₂-Gehalt des Abgases und der Gesamtproteingehalt der Kultivierung von *S. cerevisiae* mit einer Verdünnungsrate von $0,15 \cdot \text{h}^{-1}$ (H1) gegen die Prozesszeit. Der Gesamtproteinverlauf ist über Trendkurven wiedergegeben.

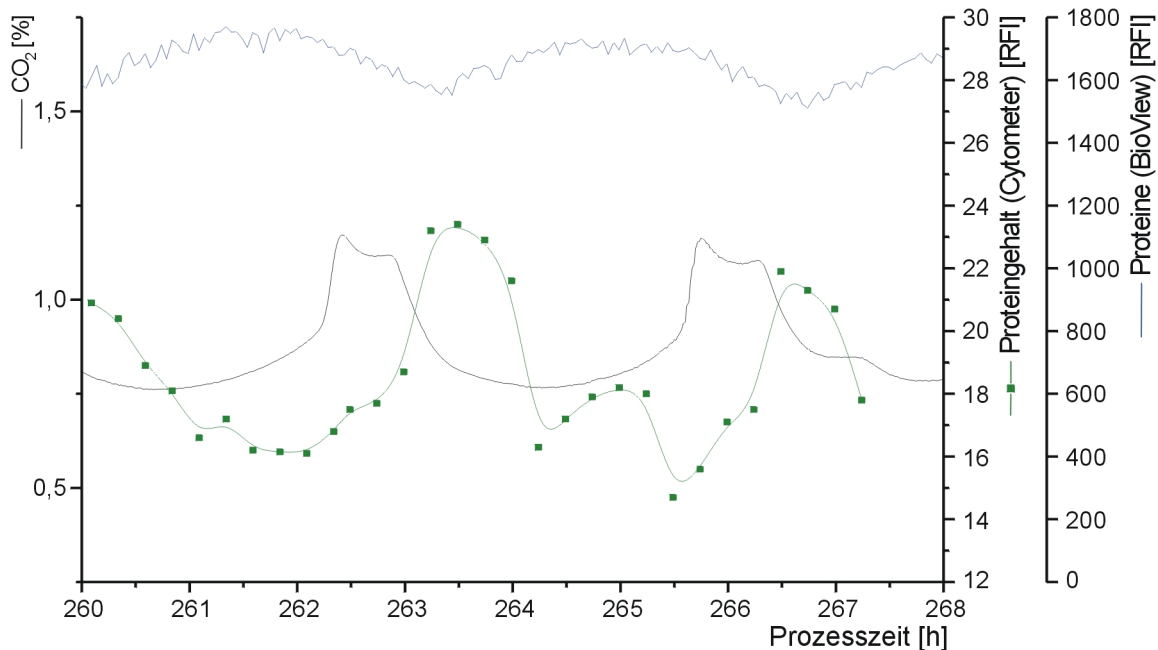


Abb. 4.5: CO₂-Gehalt des Abgases und der Gesamtproteingehalt der Kultivierung von *S. cerevisiae* mit einer Verdünnungsrate von $0,16 \cdot \text{h}^{-1}$ (H2) gegen die Prozesszeit. Der Gesamtproteinverlauf ist über Trendkurven wiedergegeben.

während der H2 Kultivierung über 5,9 RFI-Einheiten und während der H1 Kultivierung über 8,0 RFI-Einheiten ausdehnte.

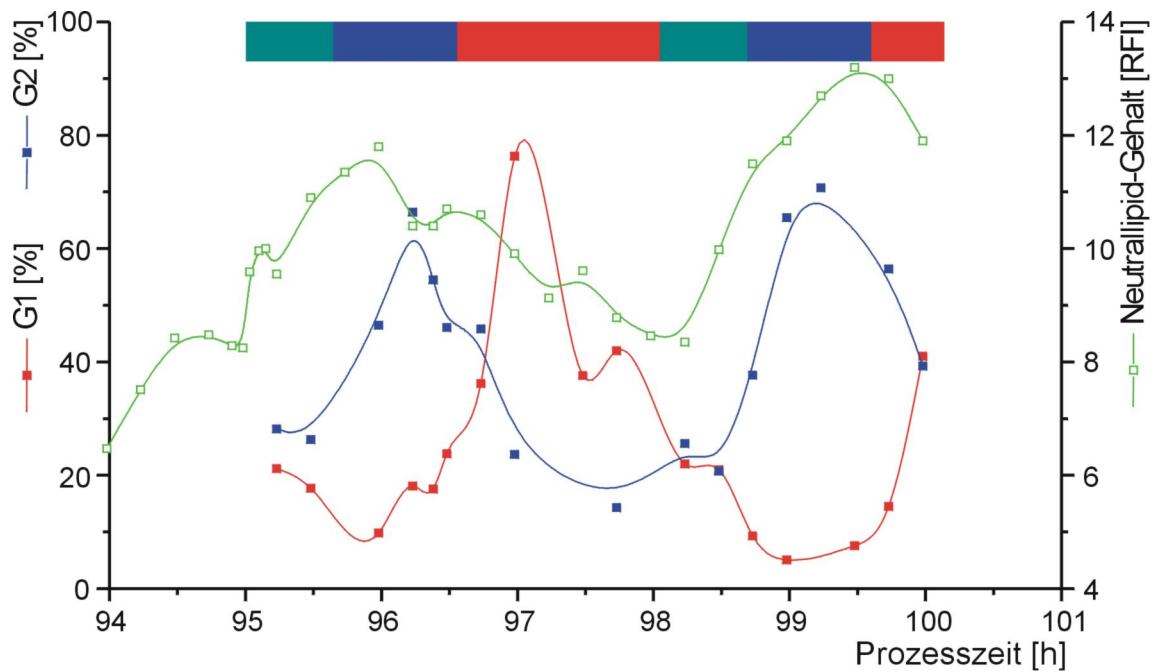


Abb. 4.6: G1- und G2- Zellzyklusphasenanteile und Lipidgehalt der Kultivierung von *S. cerevisiae* mit einer Verdünnungsrate von $0,15 \cdot h^{-1}$ (H1) gegen die Prozesszeit. Der Zellzyklusverlauf und Lipidgehalt sind über Trendkurven wiedergegeben.

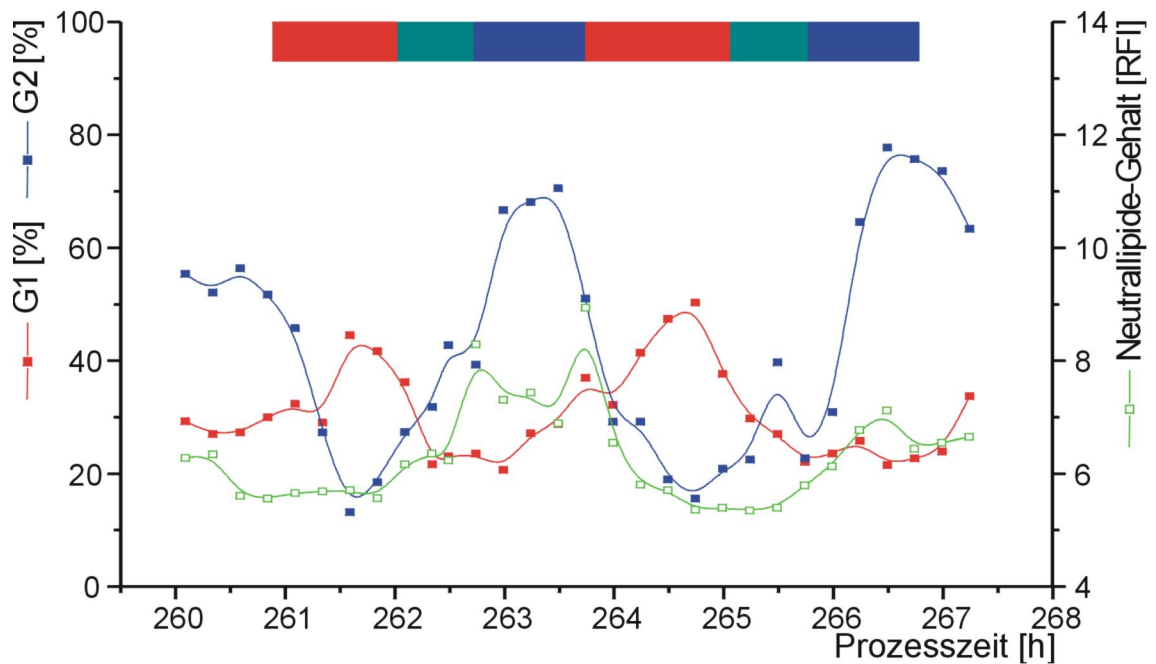


Abb. 4.7: G1- und G2- Zellzyklusphasenanteile und Lipidgehalt der Kultivierung von *S. cerevisiae* mit einer Verdünnungsrate von $0,16 \cdot h^{-1}$ (H2) gegen die Prozesszeit. Der Zellzyklusverlauf und Lipidgehalt sind über Trendkurven wiedergegeben.

4.2.4 Populationsanalyse

Mithilfe der Bildauswertungssoftware des In-situ-Mikroskops war es möglich, Einzelzellen von sprossenden Zellen und Zellaggregaten zu unterscheiden. Mithilfe des Durchflusssytometers

war es ebenso möglich, die Hefezellpopulationen anhand ihrer Morphologie zu unterscheiden. Im Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht-Dotplot konnten die Einzelzellen anhand ihres geringen FSC/SSC-Anteils identifiziert und zur Auswertung durch ein Gate isoliert werden. Der Anteil an Einzelzellen ist in Prozent der Gesamtpopulation angegeben. Hierbei wurde vereinfacht angenommen, dass die Zellen, die sich nicht im Einzelzellstadium befanden, sprossende Zellen waren; Zellaggregate wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Auswertung ist in Abbildung 4.8 wiedergegeben; zum direkten Vergleich wurden die Ergebnisse des In-situ-Mikroskops mit angegeben. Der Verlauf der beiden Analysen zeigte einen Anstieg des Einzelzell-Anteils während der G1-Phase, der mit Beginn der S-Phase absinkt und zum Beginn der G2-Phase ein Minimum durchlief. Zur Besseren Übersicht wurden hier die Farbbalken zur Zellzyklus-Identifizierung eingefügt.

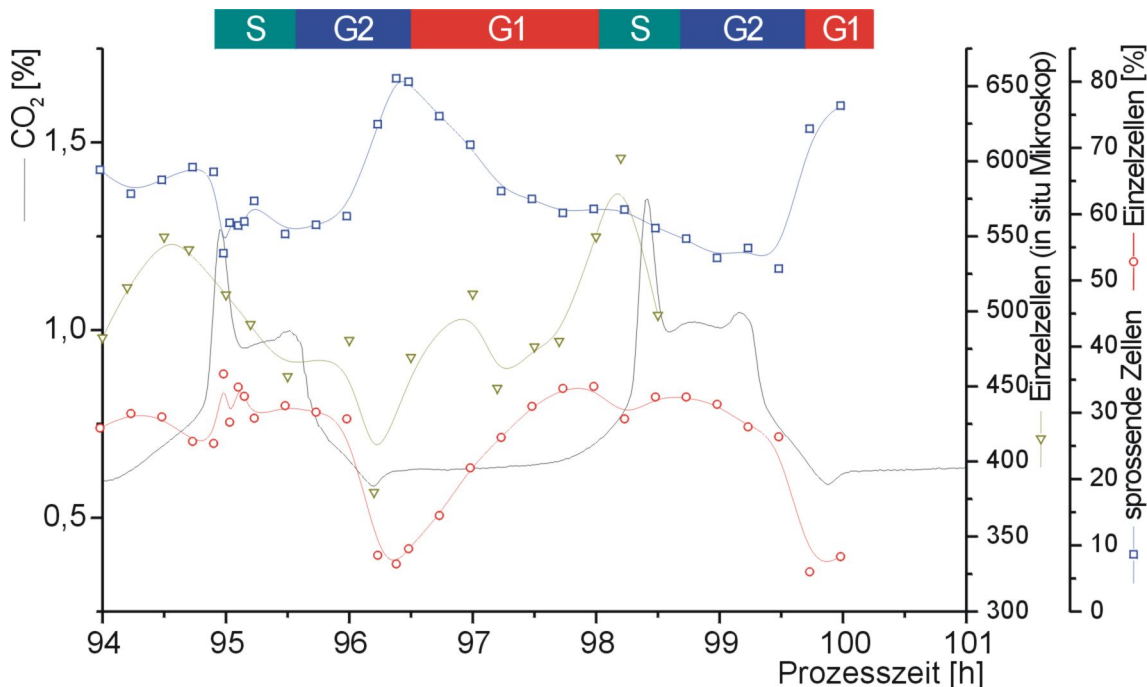


Abb. 4.8: CO_2 -Gehalt des Abgases und Populationsanalyse durch das In-situ-Mikroskop und das Durchflusszytometer der Kultivierung von *S. cerevisiae* mit einer Verdünnungsrate von $0,15 \cdot \text{h}^{-1}$ (H1) gegen die Prozesszeit. Die Verläufe sind über Trendkurven wiedergegeben.

4.2.5 Erstellung von PLS-Modellen

Für die Erstellung von PLS-Modellen zur Vorhersage des Kultivierungsverlaufs mussten die durchflusszytometrischen Messwerte durch Trendfunktionen wiedergegeben werden. Im Fall der Zellzyklusanalysen wurden die Verläufe der Zellzyklusanteile durch polynomische Funktionen 4. Grades für die G1- und 5. Grades für die S- und G2-Phase wiedergegeben. Durch Anwendung eines Savitzky-Golay Filters konnte das Rauschen eliminiert werden. Für die Qua-

lität des rechnerischen Ergebnisses wurde die Summe der Zellzyklusphasen-Anteile als Prüfsumme bestimmt; zu jedem Zeitpunkt musste diese 100 % (± 5 %) betragen. Die Korrelation der Messwerte mit dem Rechenmodell betrug 0,92–0,99. Der Verlauf des Lipidgehalts wurde durch eine polynomische Funktion 5. Grades wiedergegeben. Die Korrelation der Messwerte mit dem Rechenmodell betrug 0,995. Für die Messwerte der Proteinbestimmung konnte keine geeignete Funktion ermittelt werden, somit erfolgte die Modellerstellung mit den Originalwerten mit einer Korrelation zwischen den Messwerten und dem Rechenmodell von 0,984. Durch die Funktionen der durchflusszytometrischen Messwerte und der in dem Zeitraum aufgenommenen 2D-Fluoreszenzspektren konnten PLS-Modelle zur Vorhersage dieser Prozessgrößen erstellt werden.

Die Vorhersage der Prozessgrößen (Zellzyklusanteile, Proteine, Lipide) mithilfe der erstellten PLS-Modelle wurde innerhalb einer Kultivierung mit konstanter Verdünnungsrate ($D=0,15\cdot h^{-1}$) erreicht. Die Vorhersage dieser Prozessgrößen auf eine andere Kultivierung mit einer verschiedenen Verdünnungsrate ($D=0,16\cdot h^{-1}$) konnte nicht realisiert werden.

Für eine weitere Erläuterung und Auswertung der PLS-Modelle wird an dieser Stelle auf die laufende Dissertation von K. Hantelmann verwiesen [40].

4.3 Diskussion

Anhand der aufgenommenen Kultivierungsparameter während der Kultivierung von oszillierenden *Saccharomyces cerevisiae* konnten Abhängigkeiten verschiedener Prozessgrößen vom Zellzyklus erkannt und erläutert werden.

Verlauf der Zellzyklusanteile

Oszillationszyklen mit gut voneinander getrennten Phasen weisen zwei Maxima im CO_2 -Abgas für die zwei Restriktionspunkte am Ende der G1- und zu Beginn der G2-Phase auf sowie zwei nahezu konstante Plateau-Werte im CO_2 -Abgas für die S- und G1-Phase. Bei der Auswertung der Prozessparameter für die zweite Hefe-Kultivierung konnten zwei Maxima im Verlauf des CO_2 -Gehalts des Abgases identifiziert werden, jedoch konnten keine Plateau-Werte identifiziert werden. Dies ist vermutlich auf einen größeren Anteil von asynchronen Hefezellen zurückzuführen. Diese Vermutung wurde durch die Zellzyklusanalyse untermauert, bei der ein Anstieg des S-Phasen-Anteils zu einem sehr frühen Zeitpunkt zu beobachten war. Für die H1-Kultivierung wurden G1- und S-Phasen-Anteile von maximal 76 bzw. 59 % beobachtet, für die H2-Kultivierung betragen diese Maximalwerte 50 % bzw. 55 %. Hohe Anteile und die saubere Trennung der G1- und S-Phasen sind ein Zeichen für ein hohes Maß an Synchronität.

Verlauf des Proteingehalts

Der Proteingehalt der Hefezellen wurde mit zwei unterschiedlichen Verfahren bestimmt, zum einen durch die BioView-Analyse der Emissionsspektren von Tryptophan und Tyrosin und

zum anderen durch kovalente Kopplung des Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein an primäre Amingruppen der zellulären Proteine und anschließende durchflusszytometrische Messung. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse für den Proteingehalt der Hefezellen verliefen asynchron, was bereits bei Vorversuchen beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen kann anhand der beiden Messverfahren erklärt werden. Durch die BioView-Analyse werden zwei aromatische Aminosäuren anhand ihres Absorptions-/Emissionsverhaltens detektiert; zur Vereinfachung wurde bisher davon ausgegangen, dass die beiden Aminosäuren statistisch in den zellulären Proteinen verteilt sind. Durch die durchflusszytometrische Analyse werden alle intrazellulären Substanzen analysiert, die eine primäre Amingruppe tragen, da diese kovalent mit dem Fluoreszenzfarbstoff verbunden werden. Hier wurde ebenso vereinfacht davon ausgegangen, dass alle Proteine eine statistische Verteilung an primären Amingruppen aufweisen und somit gleichmäßig von dem Farbstoff angefärbt werden. Eine asymmetrische Verteilung von Tryptophan/Tyrosin bzw. der primären Amingruppen würde zu dem beobachteten Phänomen führen. Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens reichen die bisher erhaltenen Daten jedoch nicht aus, so dass weitere Untersuchungen nötig sind.

Verlauf des Lipidgehalts

Die Speicherung von Lipiden stellt für die Zelle eine zentrale Rolle in der Energiespeicherung dar. Als intrazelluläre Reservestoffe werden sie bei guter Ernährungslage aus dem Überschuss der Nährstoffe synthetisiert und bei Bedarf wieder abgebaut. Die Analyse des Lipid-Gehalts während eines Oszillationszyklus hat gezeigt, dass dieser periodischen Schwankungen unterworfen ist. Auffällig ist hierbei, dass der Lipidgehalt während der H2-Kultivierung eine geringere Schwankung aufweist als während der H1-Kultivierung. Dies könnte damit zu begründen sein, dass der Oszillationsverlauf während des betrachteten Zeitraums ein kleineres Maß an Synchronität aufwies. Es ist zu erwarten, dass bei einer asynchron wachsenden Kultur der Lipidgehalt aufgetragen gegen die Prozesszeit einen linearen Verlauf zeigt.

Populationsanalyse

Die Populationsanalysen mittels In-situ-Mikroskopie und Durchflusszytometrie zeigten eine gute Korrelation bei der Identifizierung der Einzelzellen. Die Werte der In-situ-Mikroskop-Auswertung zeigten eine starke Streuung, was auf die ungünstige Prozessführung zurückgeführt werden kann. Während der Bioreaktor-Kultivierung wurde die Kultur mit 1200 min^{-1} gerührt, jedoch ist die automatische Bildaufnahme und -auswertung auf eine maximale Rührergeschwindigkeit von 800 min^{-1} optimiert, so dass eine hohe Zahl an unbrauchbaren Aufnahmen generiert wurde. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine gute Abgrenzung der einzelnen Populationen während eines Oszillationszyklus. Eine gut zu identifizierende Einzelzellpopulation konnte zum Ende der G1-Phase beobachtet werden, diese Population wurde durch ein Gate isoliert, welches im weiteren Verlauf nicht mehr verändert wurde. Hierbei

sei angemerkt, dass der Übergang von der G1- zur S-Phase mit einer Zunahme des Zellvolumens und somit mit einem höheren FSC/SSC-Anteil einhergeht. Aufgrund dieses Phänomens besteht die Möglichkeit, dass größere Einzelzellen aus dem Gate gefallen sind und nicht als Einzelzellen identifiziert wurden.

Erstellung von PLS-Modellen

Die Vorhersage der einzelnen Prozessgrößen durch die erstellten PLS-Modelle lieferte innerhalb der gleichen Kultivierung reproduzierbare Ergebnisse. Eine Übertragung des so erstellten PLS-Modells auf eine Kultivierung mit geänderter Verdünnungsrate war jedoch nicht möglich. Hier konnte zwar der periodische Verlauf der Oszillation nachgestellt werden, jedoch mit fehlerhafter Amplitude und Länge der Oszillation.

Die Durchflusszytometrie liefert bei der Analyse und Erstellung von Modellen für das Zellwachstum wertvolle Informationen. Es hat sich gezeigt, dass nach Kombination der 2D-Fluoreszenzspektroskopie und der Durchflusszytometrie Modelle erstellt wurden, mit deren Hilfe das Oszillationsverhalten der Hefezellen vorhergesagt werden konnte. Eine Übertragbarkeit der Modelle auf eine Kultivierung mit geänderten Prozessparametern war bisher noch nicht möglich. Eine Verbesserung der Übertragbarkeit wäre durch die Anwendung von Filtern auf die Fluoreszenzdaten, die ein hohes Signal/Rausch-Verhältnis hatten, möglich.

5 Gewinnung von pluripotenten Stammzellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Verfahren entwickelt werden, mit dessen Hilfe es möglich ist pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen aufzureinigen.

5.1 Anwendung der Stammzelltherapie

Beim akutem Herzinfarkt kommt es durch Verschluss einer Herzkranzarterie zur irreversiblen Nekrose von Teilen des Herzmuskels [45]. Der daraus resultierende Verlust an kontraktiver Substanz führt bei Patienten, die den akuten Infarkt überlebt haben, zu Umbauprozessen des Herzmuskels, der in einer chronischen Herzschwäche (Herzinsuffizienz) enden kann [92]. Die Nekrose des Herzmuskels beginnt beim Menschen etwa 15 bis 20 Minuten nach Verschluss der Herzkranzarterie [42]. Die erste therapeutische Maßnahme nach einem Infarkt ist, diese verschlossene Arterie wieder zu öffnen, um die Nekrose des Muskels zu stoppen. Maßnahmen zur Regeneration nekrotischer Areale nach Herzinfarkt stehen bislang nicht zur Verfügung.

Da im Gegensatz zu anderen Organen eine Regeneration durch im Herzmuskel lokalisierte Stammzellen nicht in relevantem Maße stattfindet [8], wurden in der Vergangenheit in Tierversuchen embryonale Stammzellen, Skelettmuskelmeyoblasten und fötale bzw. neonatale Herzmuskelzellen zur Therapie von abgestorbenem Herzmuskelgewebe eingesetzt [59, 61, 80, 93, 112]. In weiteren Untersuchungen anhand eines Mausmodells wurde durch die Injektion von autologen und pluripotenten Knochenmarkstammzellen in das nekrotische Gebiet des Herzmuskels eine Regeneration des abgestorbenen Muskels erzielt [91]. Diese Stammzellen können leicht gewonnen werden und ihre Anwendung in der humanen Therapie weist im Vergleich zur Therapie mit embryonalen Stammzellen und fötalen bzw. neonatalen Herzmuskelzellen keine ethischen und juristischen Probleme auf; der Anteil der pluripotenten Stammzellen im Knochenmark beträgt 0,01–0,001 % [44]. Die pluripotente Stammzelle durchläuft bei der Blutbildung mehrere Stadien bis zur Differenzierung in bestimmte Typen von Blutzellen. Die pluripotente, lymphoide und myeloide Stammzelle wird als Lineage-negative Zelle (lin^{neg}) und die folgenden Vorläuferzellen als Lineage-positive Zellen (lin^{pos}) bezeichnet. Die Differenzierungsstufen der Blutzellen lassen sich anhand von Membranmolekülen charakterisieren. Sie werden in CD-Nummern (cluster of differentiation) eingeteilt und lassen sich mithilfe monoklonaler Antikörper nachweisen.

5.2 Methoden

5.2.1 Aufreinigung der pluripotenten Stammzellen

Isolierung der pluripotenten Stammzellen

Die Knochenmarkszellen wurden aus den Oberschenkel- und Schienbeinknochen von Do-

nor-Wildtyp-Mäusen isoliert. Anschließend wurden die Zellaggregate mittels Filtration durch ein Nylonsieb (80 μm Maschenweite) entfernt und die zentrifugierten Einzelzellen in PBS resuspendiert.

Zur Entfernung der differenzierten hämatopoetischen Stammzellen (lin^{pos} -Zellen), wurde die Zellsuspension mit dem lineage cell depletion kit für Mäuse behandelt. Diese mit Biotin-markierten Antikörper (gegen CD3e, CD4, CD8, CD11b, CD45R, GR-1, NK1.1 und Ter-119) machten eine Bindung an die Avidin-markierten magnetischen Teilchen möglich. Während des MACS (magnetic activated cell sorting) wurden so die lin^{pos} -Zellen aus der Zellsuspension entfernt.

FACS der pluripotenten Stammzellen

Die Zelldichte der erhaltenen lin^{neg} -Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die pluripotenten Stammzellen wurden mit FITC-konjugierten c-Kit- (CD117) und PE-konjugierten sca-1-Antikörpern (stem cell antigen-1) markiert. Dazu wurden von der Zellsuspension drei Aliquote von ca. 10^4 Zellen abgenommen, die jeweils ohne, mit c-Kit oder sca-1-Antikörpern markiert wurden. Anschließend wurden die restlichen Zellen mit c-Kit- und sca-1-Antikörpern markiert. Dazu wurde die Zellsuspension mit jeweils 1 μl Antikörperlösung pro 10^6 Zellen versetzt und für 15 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert.

Vor dem Sortieren der sca-1 positiven Zellen war eine Voranalyse von lin^{pos} -Zellen notwendig, um diese anhand des unterschiedlichen Streulichtverhaltens bei der Analyse der lin^{neg} -Zellen auszuschließen. Weiterhin wurden die drei Einzelproben der unmarkierten, c-Kit und sca-1- markierten Zellen vermessen, um die Einzelpopulationen anhand der Streulicht- und Fluoreszenzwerte unterscheiden zu können und das Sorter-Setup entsprechend vorzunehmen. Durch die Analyse dieser Einzelproben konnten die Werte für die Verstärkung und Kompensation (FITC gegen PE) ermittelt werden. Die Selektionierung der vitalen Zellen wurde anhand des Streulichtverhaltens im Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht-Dotplot vorgenommen. Die Laufzeitparameter des FACS für die Sortierung der sca-1-positiven Zellen sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

	Sort-Modus	Envelope	Analysenfrequenz
Vorsortierung	Enrich	1,5	2500 Zellen $\cdot\text{s}^{-1}$
Anreicherung	Normal-C	1,5	1500 Zellen $\cdot\text{s}^{-1}$

Tab. 5.1: Laufzeitparameter für den sca-1-Sort.

5.2.2 Aufreinigung der eGFP-positiven Stammzellen

FACS der eGFP-positiven Stammzellen

Die aus dem c-kit/sca-1-Sort erhaltenen Stammzellen wurden direkt nach der Sortierung in

Stammzell-Medium aufgenommen und unter Zugabe von Zytokinen (mSCF, hFlt-3, hIL-11) über 36 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen viral über Nacht transduziert. Die Viruspartikel enthielten das Vektorsystem SF91-GFP_wPRE [99]. Die Zellen wurden bei 1000 min^{-1} für 5 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend in frischem Medium für 1–2 d bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Der Erfolg der Transduktion wurde durch das in die Zellen integrierte eGFP unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beurteilt.

Die so erhaltenen transgenen Zellen wurden einer FACS-Sortierung unterzogen, um für die Transplantation eine Reinheit von $>90 \%$ an eGFP-positiven Zellen zu erhalten. Vor dem Sort der eGFP-positiven Zellen wurden untransfizierte Zellen analysiert, um die Werte für die Verstärkung zu ermitteln. Die Selektionierung der vitalen Zellen wurde anhand des Streulichtverhaltens im Vorwärts- gegen Seitwärtsstreulicht-Dotplot durchgeführt. Die Laufzeitparameter des FACS für den Sort der eGFP-positiven Zellen sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Für Probe 2 wurde die Analysenfrequenz von $2500 \text{ Zellen}\cdot\text{s}^{-1}$ auf $1000 \text{ Zellen}\cdot\text{s}^{-1}$ verringert.

	Sort-Modus	Envelope	Analysenfrequenz
Vorsortierung	Enrich	1,5	$2500 \text{ Zellen}\cdot\text{s}^{-1}$
Anreicherung	Normal-C	1,5	$1500 \text{ Zellen}\cdot\text{s}^{-1}$

Tab. 5.2: Laufzeitparameter für den eGFP Sort

Transplantation der eGFP-positiven Stammzellen

Die eGFP-positiven Zellen wurden 24 h nach Infarkt (durch Koronarligatur) mit $3\text{--}6\cdot 10^5$ Zellen pro 200 μl PBS bei den Tieren intravenös transplantiert. Kontrolltiere erhielten ein gleiches Volumen an PBS. Nach der Applikation der *sca-1^{pos}/c-kit^{pos}/lin^{neg}*-Knochenmarkzellen wurden die eGFP-exprimierenden Zellen 24 h nach Applikation im Herzmuskel nachgewiesen. Dazu wurden Paraffinschnitte ($7 \mu\text{m}$) angefertigt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Die Tierversuche (Isolierung der Knochenmarkszellen, intravenöse Transplantation) und der retrovirale Gentransfer wurden in der Abteilung für Kardiologie und Angiologie, Prof. Dr. med. H. Drexler der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. K. Wollert von D. Kotlarz und Dr. med. C. Templin durchgeführt. Für die dabei angewendeten Methoden sei auf die laufende Dissertation von D. Kotlarz verwiesen [65]

5.3 Ergebnisse

Isolierung der pluripotenten Stammzellen

Die Isolierung der Knochenmarkszellen wurde in zwei aufeinanderfolgenden Versuchen an jeweils 25 Mäusen durchgeführt, im Folgenden als Probe 1 und Probe 2 bezeichnet. Die erhaltene Zelldichte variierte dabei erheblich, was zum Teil auf das Alter der Mäuse sowie auf den Allge-

meinzustand der Zellen zurückzuführen war. Die Zelldichte nach Filtration sowie die Zelldichte der lin^{neg} und lin^{pos} Fraktionen nach MACS ist in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

	Probe 1	Probe 2
Zellzahl nach Filtration	$1,17 \cdot 10^9$ Zellen	$1,33 \cdot 10^9$ Zellen
Zellzahl nach MACS lin^{neg} -Fraktion	$5,45 \cdot 10^7$ Zellen	$3,37 \cdot 10^7$ Zellen
Zellzahl nach MACS lin^{pos} -Fraktion	$6,78 \cdot 10^8$ Zellen	$8,62 \cdot 10^8$ Zellen

Tab. 5.3: Zelldichten nach Isolierung und Filtration der Stammzellen sowie nach auto-MACS-Trennung in lin^{pos} - und lin^{neg} -Fraktion.

Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass durch die Anreicherung mittels MACS ein großer Verlust an Zellen zu verzeichnen war. Für Probe 1 wurde eine Wiederfindungsrate von 62,6 % und für Probe 2 von 55,1 % errechnet. Von diesen wiedergewonnen Zellen ergab sich ein Anteil für lin^{neg} -Zellen von 7,5 % für Probe 1 und von 3,8 % für Probe 2.

FACS der pluripotenten Stammzellen

In Tabelle 5.4 sind die Ergebnisse der c-kit/sca-1-Zellsortierung zusammengefasst. Beim Vergleich der im FACS analysierten Zellen mit der Anzahl der lin^{neg} -Zellen nach MACS, zeigte sich eine Wiederfindungsrate von 51 % für Probe 1. Für Probe 2 wurde kein Verlust errechnet. Beim Vergleich der Ergebnisse der Zellsortierung ergab sich für Probe 1 eine Reinheit der gegateten Zellen von 21,0 %. Nach Vorsortierung und Anreicherung wurde eine Gesamtausbeute von 17,5 % der analysierten Zellen mit einer Reinheit von 91,4 % erreicht. Für Probe 2 ergab sich eine Reinheit der gegateten Zellen von 19,4 %. Nach Vorsortierung und Anreicherung wurde eine Gesamtausbeute von 15,2 % der analysierten Zellen mit einer Reinheit von 93,2 % erreicht. In Abbildung 5.1 sind exemplarisch zwei FACS-Dotplots der Zellen vor und nach der c-kit/sca-1-Zellsortierung gezeigt.

	Probe 1	Probe 2
Anteile c-kit/sca-1 positive Zellen	21,0 %	19,4 %
Sorting Ergebnisse		
Anzahl analysierte Zellen	$2,8 \cdot 10^7$ Zellen	N. A.
Anzahl sortierte Zellen	$4,9 \cdot 10^6$ Zellen	$2,5 \cdot 10^6$ Zellen
Reinheit		
Nach Vorsortierung	72,2 %	66,1 %
Nach Anreicherung	91,4 %	93,3 %

Tab. 5.4: Ergebnisse der c-kit/sca-1-Zellsortierung. Anteile c-kit/sca-1 positive Zellen bezieht sich auf die Zellen innerhalb des Sort-Gates. Anzahl analysierte Zellen bezieht sich auf die Vorsortierung und Anzahl sortierter Zellen auf die Anreicherung.

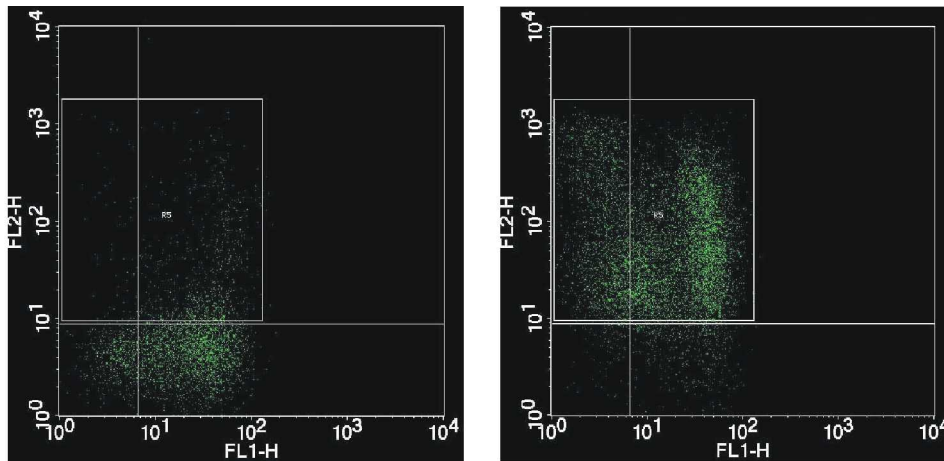


Abb. 5.1: FACS-Dotplots der *c-kit/sca-1* markierten Zellen vor (links) und nach (rechts) der Sortierung. Aufgetragen sind die Fluoreszenzkanäle: FL1 (FITC: *c-kit*-Antikörper) gegen FL2 (PE: *sca-1*-Antikörper). Die rechteckige Region markiert das Sort-Gate mit 5,5 % und 91,9 % Anteil an der Gesamtpopulation vor bzw. nach dem Sortieren.

FACS der eGFP-positiven Stammzellen

In Tabelle 5.5 sind die Ergebnisse der eGFP-Zellsortierung zusammengefasst. Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass die virale Transduktion eine unterschiedliche Effizienz aufwies. Die Analyse der Transduktionseffizienz ergab 18,4 % für Probe 1 und 41,8 % für Probe 2. Nach Vorsortierung und Anreicherung wurde eine Reinheit von 78,9 bzw. 97,0 % für Probe 1 erreicht. Für Probe 2 wurde bereits nach Vorsortierung eine Reinheit von 93,2 % erreicht, aus diesem Grund wurde auf die Anreicherung verzichtet. In Abbildung 5.2 auf der folgenden Seite sind exemplarisch zwei FACS-Histogramme der Zellen vor und nach der eGFP-Zellsortierung gezeigt.

	Probe 1	Probe 2
Anteil der eGFP-positiven Zellen	18,4 %	41,8 %
Sorting Ergebnisse		
Anzahl sortierte Zellen	$5,7 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$
Reinheit		
Nach Vorsortierung	78,9 %	93,2 %
Nach Anreicherung	97,0 %	N. A.

Tab. 5.5: Ergebnisse der eGFP-Zellsortierung. Anteile der eGFP-positiven Zellen bezieht sich auf die Zellen innerhalb des Sort-Gates. Für Probe 2 wurde auf eine Anreicherung verzichtet.

Transplantation der eGFP-positiven Stammzellen

Die angereicherten eGFP produzierenden Zellen wurden direkt nach der Sortierung den Empfänger-mäusen in die Schwanzvene transplantiert. Die Stammzellen wurden in den Paraffin-

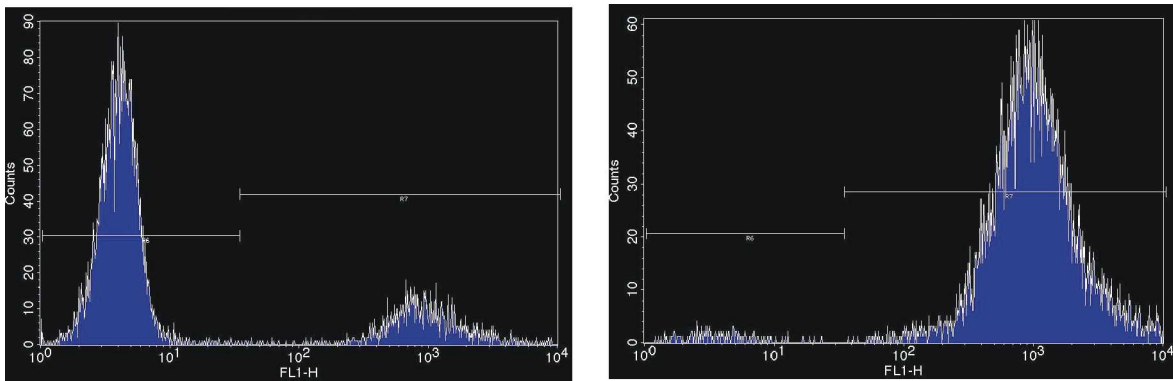


Abb. 5.2: FACS-Hitogramme der eGFP-exprimierenden Zellen vor (links) und nach (rechts) der Sortierung. Aufgetragen ist die Fluoreszintensität gegen die Zellzahl. Die rechte Region markiert das Sort-Gate mit 20,0 % und 98,1 % Anteil an der Gesamtpopulation vor bzw. nach dem Sortieren.

schnitten des betroffenen Herzmuskels 24 h nach Transplantation durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen.

5.4 Diskussion

Für einen erfolgreichen Einsatz von hämatopoetischen Stammzellen in der In-vivo-Therapie bei Mäusen ist die Reinheit der Stammzellen ein entscheidendes Kriterium. Erst nach Isolierung der undifferenzierten Stammzellen (lin^{neg}) kann von einem erfolgreichen Einsatz ausgegangen werden, da bereits vordifferenzierte Zellen sich in vivo nicht mehr in einen anderen Zelltyp umwandeln. Die Isolierung der Stammzellen aus 25 Mäusen stellte für jeden Versuchsdurchlauf die praktikable Obergrenze dar.

Isolierung der pluripotenten Stammzellen

Auf der einen Seite zeichnete sich die MACS-Methode durch eine gute Handhabbarkeit aus, auf der anderen Seite ist diese Anreicherung mit einem starken Verlust an Zellmaterial behaftet. Für beide Proben wurden Wiederfindungsraten von nur 62,6 % bzw. 55,10 % festgestellt. Der hohe Verlust könnte auf die mehrfach ablaufenden Waschstapen bei dem MACS-Lauf zurückzuführen sein.

FACS der pluripotenten Stammzellen

Nach MACS wurden die Zellen mit c-kit- und sca-1-Antikörpern behandelt und anschließend im FACS sortiert. Beim Vergleich der Zellzahlen lin^{neg} gegen analysierte Zellen im FACS wurde ein Verlust von 49 % für Probe 1 festgestellt. Da für Probe 2 kein Wert für die analysierten Zellen im FACS vorlag, konnte keine Verlustrechnung durchgeführt werden. Der hohe Verlust kann zum Teil auf die Zahl der Arbeitsschritte zurückgeführt werden, die zum Markieren der Zellen nötig sind.

Zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit des FACS, wurden die Zellausbeuten und die Reinheit der erhaltenen Proben gegenübergestellt. Das Verhältnis von analysierten zu sortierten Zellen ergab einen Anteil von 17,5 % für Probe 1. Für Probe 2 konnte die Anzahl der analysierten Zellen nicht ermittelt werden. Wird für die Ausbeute-Berechnung von dem gleichen Verlust wie bei Probe 1 von 49 % ausgegangen, so betrug die Zellzahl zur Analyse $1,65 \cdot 10^7$, was einer Ausbeute von 15,2 % nach Sortierung entsprechen würde, bei einer Reinheit der sortierten Zellen von 93,3 %. In Tabelle 5.6 sind die praktisch erreichten Ausbeuten nach dem Sortieren den theoretisch möglichen Ausbeuten gegenübergestellt.

	Probe 1	Probe 2
Anteile c-kit/sca-1 positive Zellen	21,0 %	19,4 %
Analysierte Zellen	$2,8 \cdot 10^7$ Zellen	$1,7 \cdot 10^7$ Zellen*
theoret. Ausbeute	$5,9 \cdot 10^6$ Zellen	$3,3 \cdot 10^6$ Zellen
Analysierte Zellen	$2,8 \cdot 10^7$ Zellen	$1,7 \cdot 10^7$ Zellen*
Sortierte Zellen	$4,9 \cdot 10^6$ Zellen	$2,5 \cdot 10^6$ Zellen
praktische Ausbeute	17,5 %	15,2 %
praktische Ausbeute	17,0 %	14,2 %
Nach Einbeziehung der Reinheit	$4,8 \cdot 10^6$ Zellen	$2,4 \cdot 10^6$ Zellen
Ausbeute der Theorie	80,7 %	72,7 %

Tab. 5.6: Gegenüberstellung theoretische gegen praktische Ausbeute unter Einbeziehung der erhaltenen Reinheit nach dem Sortieren. Die mit * gekennzeichneten Werte sind unter Annahme eines Zellverlustes von 49 % errechnet worden.

Die Abweichung der theoretischen von der praktischen Ausbeute ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die Zellzahl der analysierten Zellen auch jene beinhaltet, die außerhalb des Vitalitäts-Gates lagen und somit für eine Analyse nach c-kit/sca-1 verworfen wurden. Als weiterer Grund für die Abweichung ist der Anreicherungsschritt zu sehen. Durch wiederholtes Sortieren werden die Zellen einem hohen Scherstress ausgesetzt. Während der Analyse war zu beobachten, dass die Vitalität um 5–10 % abnahm. Durch Einstellen einer geringeren Sortier-Rate könnte eine höhere Reinheit erreicht werden, jedoch würde sich die Sortier-Zeit dadurch stark erhöhen was sich wiederum negativ auf die Zellvitalität auswirken würde. Durch die Wahl eines anderen Sort-Modus (Counter-Mode) könnte die Reinheit ebenfalls erhöht werden, jedoch auf Kosten der Ausbeute.

FACS der eGFP-positiven Stammzellen

Für die Sortierung der eGFP-positiven Zellen hat sich gezeigt, dass die Verringerung der Analysenfrequenz von $2500 \text{ Zellen} \cdot \text{s}^{-1}$ auf $1000 \text{ Zellen} \cdot \text{s}^{-1}$ einen massiven Einfluss auf die Reinheit der erhaltenen Probe hatte. Die Reinheit konnte so von 78,9 % für Probe 1 auf 93,2 % für Probe 2 gesteigert werden. Da für die Transplantation der eGFP-positiven Zellen eine Reinheit

von > 90 % als ausreichend angesehen wurde, konnte auf einen weiteren Anreicherungsschritt verzichtet werden.

Beim Vergleich der Anreicherungssysteme von Zellen, MACS und FACS, zeigte sich, dass eine Sortierung per MACS einfach in der Handhabung ist, jedoch mit hohen Verlusten behaftet ist. Für die MACS-Versuche wurden Wiederfindungsraten von 62,6 bzw. 55,1 % errechnet. Beim Vergleich dieser Wiederfindungsraten mit den Ergebnissen der FACS-Versuche, hier wurden Wiederfindungsraten von 80,7 bzw. 72,7 % erzielt, zeigte sich ein um ca. 20 % besseres Ergebnis. Als Vorteil des MACS-Verfahrens ist jedoch die Möglichkeit zu sehen, sehr große Zellmengen in kurzer Zeit aufzureinigen. Eine FACS-Aufreinigung der frisch isolierten Stammzellen wäre wirtschaftlich nicht zu vertreten gewesen, da eine größere Menge an c-kit- und sca-1-Antikörpern hätte eingesetzt werden müssen.

Anhand der Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Anreicherung von Stammzellen aus dem Knochenmark nur unter Benutzung eines FACS bewerkstelligt werden konnte, um die benötigten, hochreinen Zellen für die Transplantationsversuche zur Verfügung zu stellen.

Transplantation der eGFP-positiven Stammzellen

Die Versuche zur Detektion der transplantierten Stammzellen im betroffenen Herzmuskel der Empfängermaüse erwies sich aufgrund der starken Eigenfluoreszenz des Gewebes als schwierig, so dass keine eindeutige Zuordnung möglich war. Aus diesem Grund laufen weitere Versuche, die Stammzellen nach viraler Transduktion und Sortierung mit TAMRA,SE zu markieren. Dieser intrazellulär freigesetzte Fluoreszenzfarbstoff hat die Anregungswellenlänge 546 nm und die Emmissionswellenlänge 579 nm, liegt damit ausserhalb der Eigenfluoreszenz des Gewebes und ist somit leichter zu detektieren. TAMRA,SE eignet sich als Cell Tracker, um Zellen länger verfolgen zu können. Er diffundiert dabei durch die Zellmembran und wird intrazellulär durch unspezifische Esterasen gespalten, die dadurch aktivierte Gruppe koppelt den Farbstoff (Rhodamin) kovalent an zelluläre Proteine.

6 In-vitro-Testung neuartiger Wirkstoffe

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung drei synthetisch hergestellter Wirkstoffe mithilfe eines Resazurin-Schnelltests aufgenommen werden. Um ein detaillierteres Wirkungsprofil der Wirkstoffe zu erhalten wird dieser Test als kontinuierliche/kinetische Messung durchgeführt. Dabei werden die Tests von drei Zytostatika an vier Zelllinien durchgeführt. Hierbei sollte überprüft werden, ob Wirkstoffe mit bekannter zytostatischer Wirkung bei Zelllinien unterschiedlich geschlechtlicher Herkunft eine differenzierte Wirkung aufweisen. An der Zelllinie mit der höchsten Sensitivität gegenüber den Wirkstoffen werden anschließend weitergehende Untersuchungen bezüglich der Apoptoseinduktion und der Zellzyklusarretierung durchgeführt.

6.1 Zytostatika

Der Begriff Zytostatika (griech. Cyto-: Zelle, statikos: zum Stillstand bringend) bezeichnet eine Klasse von Stoffen, die toxisch auf körpereigene Zellen wirken. Insbesondere sind schnellwachsende Zellen, wie sie in Tumoren anzutreffen sind, davon betroffen; aus diesem Grund werden Zytostatika auch häufig als Chemotherapeutika eingesetzt. Eine einheitliche Wirkungsweise konnte bisher nicht gefunden werden, daher werden sie in die folgenden Gruppen eingeteilt:

alkylierende Verbindungen	greifen hauptsächlich die DNA des ruhenden Zellkerns an, wie Cyclophosphamid, Methansulfonate, Epoxide
zytostatische Naturstoffe	als Mitosehemmer wirkende Stoffe aus Mikroorganismen und Pflanzen, wie Colcemid, Mithramycin, Azaserin
Antimetaboliten	wirken hemmend auf wichtige Enzyme, wie Pyrimidin- und Purin-Derivate, Methotrexat
sonstige Verbindungen	Procarbacin, Hydroxyharnstoff-Derivate, Hydrazone

Die in dieser Arbeit verwendeten Stoffe Ratjadon, Callystatin A und JJ34 gehören in die Klasse der zytostatischen Naturstoffe.

Ratjadon

Ratjadon wurde erstmals 1994 aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* gewonnen. In ersten Screening Tests wurde eine sehr hohe Wirksamkeit gegenüber der humanen Krebszelllinie HeLa KB 3.1 mit einem IC_{50} -Wert von $40 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$ [28, 102] detektiert. Bei verschiedenen Krebszelllinien konnte ein ähnlich niedriger IC_{50} -Wert festgestellt werden [15, 16, 17]. Der Wirkmechanismus konnte noch nicht näher bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das synthetisch hergestellte Ratjadon verwendet (siehe Abbildung 6.1) [9, 53].

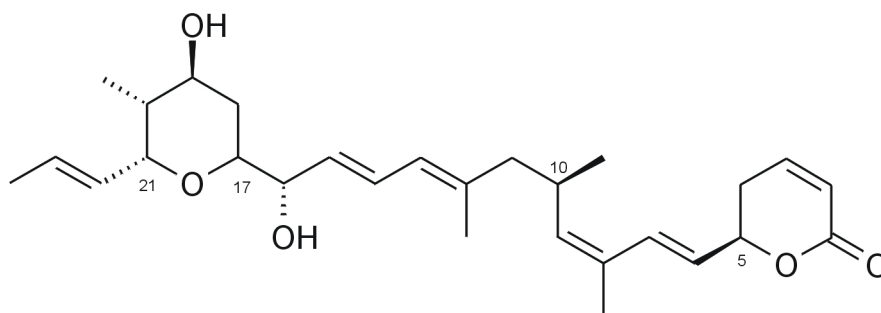


Abb. 6.1: Strukturformel von Ratjadon.

Callystatin A

In jüngster Vergangenheit wurden verstärkt Verbindungen aus Meeresorganismen auf ihr pharmakologisches Potential hin untersucht. Aus dem Meeresschwamm *Callyspongia truncata* konnte das Polyketid Callystatin A isoliert werden (siehe Abbildung 6.2) [62]. Dieser Wirkstoff zeigt eine hohe Zytotoxizität gegenüber der humanen Krebszelllinie KB mit einem IC_{50} -Wert von $10 \text{ pg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Seine große Strukturverwandtschaft mit Leptomycin B, einem bekannten Anti-Tumor-Wirkstoff, trug zur Identifizierung des Wirkmechanismus bei [67]. Die wachstumshemmende Wirkung beruht auf der Inhibierung des signalgesteuerten Transports von Proteinen zwischen Zellkern und Zytoplasma [85, 86]. Nach Etablierung eines Syntheseweges konnte der Wirkstoff in größeren Mengen hergestellt werden, um In-vitro-Toxizitätstests durchzuführen [52, 54, 106].

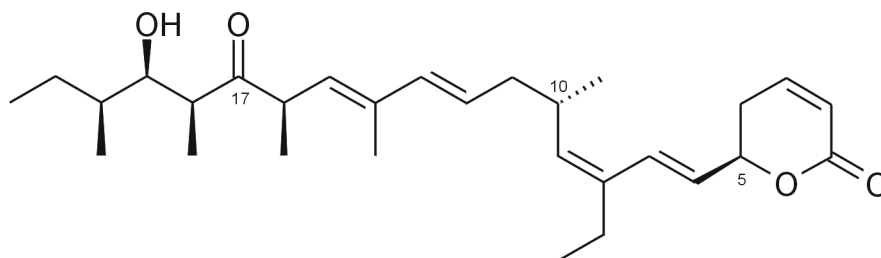


Abb. 6.2: Strukturformel von Callystatin.

JJ34

Die Gruppe der Herzglycoside wird schon seit längerem bei der Behandlung von chronischer Herzinsuffizienz und Herzrhythmusstörungen eingesetzt. Eine bekannte Gruppe der Herzglycoside bilden die Glycoside aus Fingerhutarten (*Digitalis*). Die Struktur besteht jeweils aus einem Steroidgrundgerüst, das in der 3β -Position mit einer Oligosaccharidkette aus 3–4 Zuckern glycosidisch verknüpft ist (siehe Abbildung 6.3). Eine Anti-Tumor-Wirkung der Herzglycoside wurde erstmals 1986 festgestellt [20, 74]. JJ34 wurde bisher noch nicht an humanen Zellen getestet.

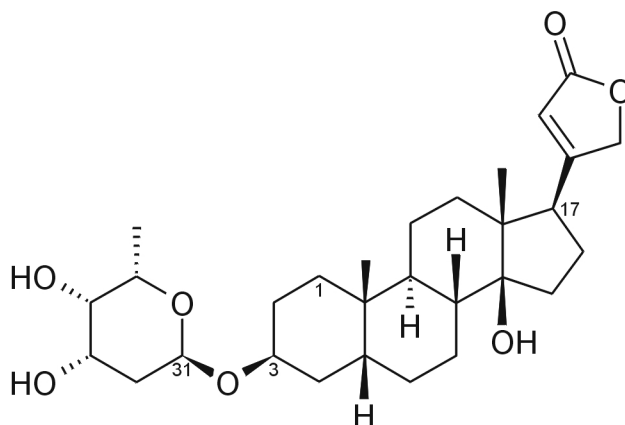


Abb. 6.3: Strukturformel von JJ34.

Ratjadon und Calystatin wurden von Prof. Dr. Kalesse und JJ34 von Prof. Dr. Kirschning vom Institut für Organische Chemie der Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

6.2 Unterscheidung Vitalität, Viabilität und Proliferationsinhibierung

Um Aussagen über die Wirksamkeit eines Zytostatikums machen zu können, muss zwischen Vitalität, Viabilität und Proliferationsinhibierung unterschieden werden. Die Viabilität bezeichnet die Überlebensfähigkeit einer Zelle und wird in der Regel durch das Vorhandensein einer intakten Zellmembran definiert. Die Vitalität einer Zelle bezeichnet deren Metabolismusaktivität. Im Falle von produzierenden Zellen wird die Vitalität in der Regel mit der Produktivität gleichgesetzt; für nicht produzierende Zellen wird die Vitalität mit dem Umsatzverhalten von ausgewählten Enzymsystemen oder mit der Teilungsrate der Zellen gleichgesetzt. Die Proliferationsinhibierung beschreibt den Unterschied zwischen gehemmten und ungehemmten Wachstum der Zellen. Die Viabilität trifft also eine Aussage über tot und lebendig, wohingegen die Vitalität zudem Aussagen über das „Wohlbefinden“ der Zelle macht. Die Proliferationsinhibierung beschreibt um wie viel langsamer eine behandelte Zelle gegenüber einer unbehandelten wächst.

Die Viabilität wird in der Zytologie mithilfe von Ausschlussfarbstoffen gemessen, die durch die defekte Zellmembran diffundieren und in der Zelle entweder unspezifisch färben oder spezielle Zellorganellen anfärben. In der Lichtmikroskopie wird häufig der Ausschlussfarbstoff Trypan Blau verwendet, während für die Durchflusszytometrie in der Regel nukleinsäurebindende Ausschlussfarbstoffe eingesetzt werden. Eine Übersicht der Farbstoffe ist in Tabelle 2.1 auf Seite 8 gegeben.

Die Vitalität einer Zelle kann anhand einer enzymatischen Reaktion verfolgt werden. Dazu werden Substrate eingesetzt, die für ein bestimmtes Enzym oder eine Enzymgruppe spezifisch sind. In der Durchflusszytometrie werden Derivate von Fluoreszenzfarbstoffen verwendet, die

nach intrazellulärer Umsetzung eine höhere Polarität aufweisen und somit länger in der Zelle verbleiben. Weit verbreitet sind die mehrfach veresterten Derivate des Fluoresceins (FDA, CFDA, CFDA-AM) als Substrate für unspezifische Esterasen [5, 96]. Weiterhin finden Fluorescein-Derivate als Substrate für β -Galactosidasen, Glutathion-S-transferasen, Peptidasen und Peroxidasen Verwendung [41]. Charakteristisch für diese Substanzen ist, dass sie erst nach enzymatischer Umsetzung eine Fluoreszenzaktivität aufweisen.

Zur Messung der Proliferationsinhibierung wird jeweils eine Kultur mit Wirkstoff behandelt, zur Kontrolle wird eine Kultur unbehandelt gelassen. Nach der Inkubationszeit wird die Zellzahl beider Kulturen bestimmt und daraus die Proliferationsrate bestimmt. Zur Bestimmung der Zellzahl wird, wie bei der Vitalitätsmessung, eine spezifische Farbreaktion eingesetzt. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Menge an umgesetztem Farbstoff mit der Zellzahl korreliert. Da Vitalität und Proliferationsinhibierung nach dem gleichen Messprinzip bestimmt werden, werden beide Begriffe häufig synonym verwendet [19].

Bei den In-vitro-Screening-Tests, die in der Regel in 96-Loch-Platten ablaufen, werden Farbstoffe eingesetzt, die nach ihrer enzymatischen Umsetzung wieder aus der Zelle geschleust werden. Weit verbreitet sind die Farbstoffe MTT und Resazurin. MTT wird intrazellulär zu einem Formazansalz reduziert, welches kolorimetrisch detektiert werden kann [73, 84]. Das Reduktionsprodukt von Resazurin kann sowohl kolorimetrisch als auch fluorometrisch detektiert werden [87] und ist für Messung bei Säugerzellen und Mikroorganismen [110] geeignet. Bei vielen Untersuchungen an Säugerzellen werden die Screening-Tests als 2-Punkt-Messungen verwendet; nach Zugabe des Farbstoffs wird die Absorption nach einer definierten Zeit (i. d. R. nach 4 h) gemessen. In dieser Arbeit wurde die Absorption nach Zugabe des Farbstoffs über einen Zeitraum von 8 h bzw. 12 h gemessen. Auf diese Weise konnten der Eintritt der Wirkung sowie die folgende Umsetzung des Farbstoffs detailliert untersucht werden.

6.3 Methoden

6.3.1 Säugerzellkultivierung

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Methoden zur Säugerzellkultivierung sind exemplarisch für alle Versuche mit Säugerzellen in den folgenden Kapiteln; sofern Änderungen der Kultivierungsparameter vorgenommen wurden sind sie an der entsprechenden Stelle genannt¹.

Alle eingesetzten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5%iger CO₂-Atmosphäre und 100%iger Luftfeuchtigkeit kultiviert. Da die verschiedenen Zellen unterschiedliche Ansprüche an das Kultivierungsmedium und die Kultivierungsdauer haben, werden diese relevanten Parameter in Tabelle 6.1 zusammengefasst.

¹ Zur besseren Übersichtlichkeit sind alle verwendeten Substanzen und Geräte im Anhang A.3 auf Seite 104 und A.4 auf Seite 107 zusammengefasst.

Name	Zelltyp	Subtyp	
HCC-15 [30]	humanes non-small cell Lungenkarzinom	squamous carc.	
HCC-366 [30]	humanes non-small cell Lungenkarzinom	adeno-squamous carc.	
HeLa [98]	humanes Zervix-Karzinom	N. A.	
Jurkat [101]	humane maligne T-Zellen	N. A.	
LNCAP [29]	humanes Prostata-Karzinom	N. A.	
NIH-3T3 [1]	embryonale Maus-Fibroblasten (kontaktinhibiert)	N. A.	
Name	Kulturmedium	Serumanteil	Verdopplungszeit
HCC-15	RPMI 1640	10 %	30–40 h
HCC-366	RPMI 1640	10 %	72–96 h
HeLa	DMEM	10 %	48 h
Jurkat	RPMI 1640	10 %	25–35 h
LNCAP	RPMI 1640	10 %	60 h
NIH-3T3	DMEM	10 %	20 h

Tab. 6.1: Verwendete Zelllinien mit den wichtigsten Kultivierungsparametern.

Sofern nicht anders angegeben, wurden den Medien die Antibiotika Amphotericin und Gentamycin in $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bzw. $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ zugesetzt.

Zur Etablierung einer Vorkultur wurde eine kryokonservierte Probe im Wasserbad auf 37°C angewärmt, in eine T25-Kulturschale überführt und mit dem entsprechenden Medium auf ca. 20 ml aufgefüllt. Ein Tag nach Inokulation wurde das Medium gewechselt, um zytotoxische Bestandteile aus dem Einfriermedium zu entfernen. Je nach Teilungsrate der Zelle und Länge der Lag-Phase (diese reichte von 1 d im Fall von NIH-3T3 bis zu 5 d im Fall von LNCAP) wurden die Zellen zum Ende der exponentiellen Phase mit 1 ml Trypsin-Lösung ($0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ in 0,9%iger NaCl mit 0,2 % EDTA) von der Oberfläche abgelöst und in einer Dichte von $2\cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 in einer neuen Kulturschale ausgesät (passagiert). Die Zellen wurden nach dem Auftauen über drei Passagen in Vorkultur gehalten, erst dann konnte davon ausgegangen werden, dass eine homogen wachsende Zelllinien-Kultur etabliert war.

Zur Etablierung einer Vorkultur aus einer Suspensions-Zelllinie wurde drei Tage nach Inokulation die Zellsuspension aus der T25-Kulturschale entnommen und in eine 125 ml Spinnerflasche überführt. Die Animpfdichte für die folgenden Passagen betrug $2\cdot 10^5$ Zellen $\cdot\text{ml}^{-1}$. Auch hier wurden die Zellen über drei Passagen in Vorkultur gehalten, um eine homogen wachsende Zelllinie zu etablieren.

Kryokonservierung von Säugerzellen

Zur Etablierung einer Kryokultur wurden Zellen einer stabilen Kultur in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurden adhärent wachsende Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase durch Trypsinieren in Suspension gebracht, 3 min mit 400-g zentrifugiert und im Einfrierme-

dium in einer Konzentration von $2 \cdot 10^6$ Zellen·ml⁻¹ resuspendiert. Die befüllten Kryoröhrchen wurden dann schrittweise innerhalb von 6 h bis auf -196 °C heruntergekühlt. Zur Konservierung einer Suspensionszellkultur sind die gleichen Schritte durchgeführt worden; das Trypsinieren entfiel. Die so erhaltene Kryokultur ist theoretisch unbegrenzt lagerfähig, jedoch sollte einmal jährlich eine Vitalitätskontrolle durchgeführt werden.

6.3.2 Etablierung verschiedener Vitalitätstests

Zellkultivierung

Für die In-vitro-Versuche wurden jeweils zwei Zelllinien männlicher und weiblicher Herkunft verwendet; dabei wurden zwei Zelllinien gleicher Herkunft (Lunge) und zwei Zelllinien von geschlechtsspezifischen Tumoren (Prostata, Gebärmutter) verwendet. Abweichend von den in Tabelle 6.1 auf der vorigen Seite genannten Kultivierungsbedingungen wurden alle verwendeten Zelllinien (siehe Tabelle 6.2) in phenolrotfreiem RPMI 1640-Medium (Phenolrot wirkt sich störend auf die kolorimetrische Resazurin-Messung aus) mit 10 % NKS kultiviert. Aus einer stabilen Vorkultur wurden die Zellen auf ein antibiotikafreies Medium umgestellt, um eine Beeinflussung der Messungen auszuschließen. Die Zellen wurden mit antibiotikafreiem Medium über drei Passagen weiter kultiviert, bevor diese für die In-vitro-Testung verwendet wurden.

Name	Geschlecht	Herkunft	Alter des Spenders	Jahr der Isolierung
HCC-15 [30]	männlich	Lunge	47	1998
HCC-366 [30]	weiblich	Lunge	80	1996
HeLa [98]	weiblich	Gebärmutter	31	1951
LNCAp [29]	männlich	Prostata	50	1977

Tab. 6.2: Zelllinien für die In-vitro-Testung mit ihren Merkmalen.

Zum Ausplattieren wurden je 100 µl der Zellsuspension mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^3$ Zellen·ml⁻¹ in die 45 inneren Kammern einer 96-Loch-Platte gegeben. Die Platte wurde 24 h im Brutschrank inkubiert, um eine Anhaftung der Zellen zu gewährleisten.

Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte in vier aufsteigenden Konzentrationen. Dabei wurden die Arbeitslösungen mit dem Medium so verdünnt, dass nach Zugabe von 100 µl der verdünnten Arbeitslösung in die einzelnen Kammern die gewünschte Konzentration erreicht wurde (die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 6.3 angegeben).

Die Zugabe der Testsubstanzen erfolgte je Konzentration in jeweils drei Kammern. Als Nullprobe wurde je Testsubstanz ein Kammern-Triplett mit 100 µl Medium versetzt. Die äußeren 51 Kammern wurden mit je 300 µl Medium befüllt, um die Verdunstung der inneren Kammern zu minimieren.

	Stammlösung [mM]	Arbeitslösungen [μ M]	Eingesetzte Konzentrationen [nM]
Ratjadon	2,99 in EtOH	5, 100 in PBS	1, 10, 100, 250 in Medium
Callystatin	21,91 in EtOH	5, 100 in PBS	1, 10, 100, 250 in Medium
JJ34	3,96 in PBS	10, 200 in PBS	10, 100, 250, 500 in Medium

Tab. 6.3: Verwendete Testsubstanzen: Angabe der verwendeten Lösemittel und Konzentrationen der Stamm- und Arbeitslösungen sowie die eingesetzten Konzentrationen für die In-vitro-Testung.

Messungen nach enzymatischer Aktivität

Die Vitalitätsmessung erfolgte mithilfe des Farbstoffs Resazurin, der in der oxidierten Form eine minimale Toxizität aufweist. Er wird intrazellulär durch Diaphorase in Anwesenheit von NADH zu Resorufin reduziert, dabei ändert sich die Farbe von schwach rot nach blau. Die Messung des Resorufins erfolgte kolorimetrisch. Zur Messung der Resorufin-Absorption musste Phenolrot-freies Medium verwendet werden, da sich dieses störend auf die kolorimetrische Messung auswirkte.

Resazurin

Molekulargewicht	251 g·mol ⁻¹
Lösemittel	PBS (Stammlösung), PBS (Arbeitslösung)
Anregungswellenlänge	571 nm (Resorufin)
Emissionswellenlänge	585 nm (Resorufin)
Absorptionskoeffizient	58 000 cm ⁻¹ M ⁻¹ (Resorufin)

48 h nach Zugabe der Testsubstanzen wurden die 45 behandelten Kammern mit jeweils 100 μ l Resazurin-Lösung (60 μ M in PBS) versetzt und in einem Platten-Lesegerät eingesetzt. Gemessen wurde bei der Absorptionswellenlänge 570 nm, subtrahiert wurde die Absorption bei der Referenzwellenlänge 630 nm. Die Absorption wurde im 15 min-Abstand über einen Zeitraum von 8 bzw. 12 h bei 37 °C gemessen.

Eine Blindprobe wurde in einer separaten 96-Loch Platte gemessen; dazu wurden 200 μ l Medium in neun innen liegende Kammern gefüllt und mit 100 μ l Resazurin-Lösung versetzt. Die Absorption wurde im 15 min Abstand über einen Zeitraum von 12 h gemessen.

Zusätzlich sollte für alle verwendeten Zelllinien der Einfluss der Antibiotika (AB) auf das Umsatzverhalten der Zellen bezüglich des Resazurins bestimmt werden. Dazu wurden je zwei Platten pro Zelllinie mit je 100 μ l Zellsuspension in AB-haltigen und AB-freien Medium beimpft. Die Zugabe der Testsubstanzen und die photometrische Auswertung wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

6.3.3 Zellzyklusanalyse

Zellzyklusanalysen wurden für alle drei Testsubstanzen mit der Zelllinie HeLa durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 ausplattiert und mit 4 ml Medium überschichtet. Die Testsubstanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (Ratjadon: 10 nM, Callystatin: 50 nM, JJ34: 200 nM) zu je einem Kammern-Triplett zugegeben und für 48 h bei 37°C inkubiert.

Nach Inkubation wurde das überstehende Medium abgesaugt, separat gesammelt und die Zellen mit 500 μl Trypsin-Lösung überschichtet. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurde die Zellsuspension abgesaugt, mit dem Medium vereinigt und 3 min bei 400-g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μl RNase-Lösung resuspendiert und 3 h im Thermomixer bei 37°C und 800 min^{-1} inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml PI-Lösung resuspendiert und 15 min im Thermomixer bei RT und 800 min^{-1} inkubiert. Um eine statistische Sicherheit zu erhalten, wurden bei jeder Messung mindestens 50 000 Zellen vermessen.

PI

Molekulargewicht	668 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$
Lösemittel	0,9%ige NaCl-Lösung (Arbeitslösung)
Anregungswellenlänge	535 nm
Emissionswellenlänge	617 nm
Absorptionskoeffizient	5 400 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$

6.3.4 Bestimmung der Apoptose-auslösenden Konzentration

Die apoptoseauslösende Konzentration wurde für alle drei Testsubstanzen an der Zelllinie HeLa bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^3$ Zellen pro cm^2 ausgesät und mit 4 ml Medium überschichtet. Um eine Anhaftung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen 24 h bei 37°C inkubiert. Die Testsubstanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen (Ratjadon: 10 nM, Callystatin: 50 nM, JJ34: 100 nM) zu je einem Kammern-Triplett zugegeben und für 48 h bei 37°C inkubiert.

Es wurden jeweils 2, 5 und 10 h nach Zugabe Proben genommen. Das überstehende Medium wurde abgesaugt, separat gesammelt, die Zellen mit 500 μl Trypsin-Lösung überschichtet und 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde Zellsuspension abgesaugt, mit dem Medium vereinigt und mit Bindungspuffer gewaschen (3 min bei 400-g). Das Zellpellet wurde in 100 μl Annexin V/PI-Färbelösung resuspendiert, 5 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer vermessen. Annexin V ist mit FITC markiert und emittiert eine Grün-Fluoreszenz (FL1), PI emittiert eine Rot-Fluoreszenz (FL3). Die Auftragung

der beiden Fluoreszenzen resultierte in einem Dotplot, in dem die apoptotischen (Grün-Fluoreszenz), nekrotischen (Rot- und Grün-Fluoreszenz) und vitalen Zellen (Eigenfluoreszenz) als drei Subpopulationen zu erkennen waren. Um eine statistische Sicherheit zu erhalten, wurden bei jeder Messung mindestens 50 000 Zellen vermessen.

6.4 Ergebnisse

6.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen

Vorversuche

In Vorversuchen wurden vergleichende Tests an allen verwendeten Zelllinien mit und ohne antibiotikahaltigem Medium durchgeführt, um deren Einfluss auf die Reduktion des Farbstoffs zu bestimmen. Die Zellen in antibiotikahaltigem Medium zeigten eine reduzierte Reduktionsrate von Resazurin (Daten nicht gezeigt), aus diesem Grund wurde auf die Verwendung von Antibiotika während der Tests verzichtet. Um eine Reduktion des Farbstoffs durch Bestandteile des Mediums ausschließen zu können, wurden Blindproben über 12 h durchgeführt. Eine Reduktion von Resazurin konnte nicht nachgewiesen werden.

Ergebnisse der Absorptionsmessungen des Resazurin-Tests

Gemessen wurde die Konzentration des gebildeten Resorufins in Abhängigkeit von der Zeit bei vier unterschiedlichen Zelllinien und je drei Testsubstanzen. Die Ergebnisse der Messungen sind im Anhang A.1 auf Seite 97 gezeigt. Die Zellen zeigten eine konzentrationsabhängige Reaktion auf die verschiedenen Zytostatika, wobei eine geschlechtsabhängige Proliferationsinhibierung zu erkennen war; eine detaillierte Nennung der Ergebnisse folgt im nächsten Abschnitt. Bei der HeLa- und HCC15-Zelllinie war eine Schwellwertkonzentration zu beobachten, ab der eine proliferationsinhibierende Wirkung einsetzte; zwischen 1 und 10 nM für Ratjadon, zwischen 10 und 100 nM für Callystatin und bei 100 nM für JJ34. Bei allen verwendeten Zelllinien bewirkten geringe Zytostatika-Konzentrationen einen erhöhten Umsatz des Resazurins. Dieser bewegte sich zwischen 105 % für HCC15 mit 1 nM Ratjadon und 120 % für HeLa mit 10 nM JJ34. Zudem zeigte sich bei den Zelllinien HCC15 und HCC366, dass die Absorption nach 400 bzw. 150 min nicht weiter anstieg. Bei den Zelllinien HeLa und LNCAP konnte kein Plateauwert beobachtet werden.

Ergebnisse der Absorptionsmessungen des Resazurin-Tests in relativen Einheiten

Da die Zelllinien einen unterschiedlichen Umsatz bei der Reduktion von Resazurin aufwiesen wurden die Ergebnisse in relative Signalintensitäten angegeben. Dazu wurden die Absorptionswerte des Resazurin-Tests als Anteil der Nullprobe angegeben.

Kinetischen Messungen an HCC15 und HCC366

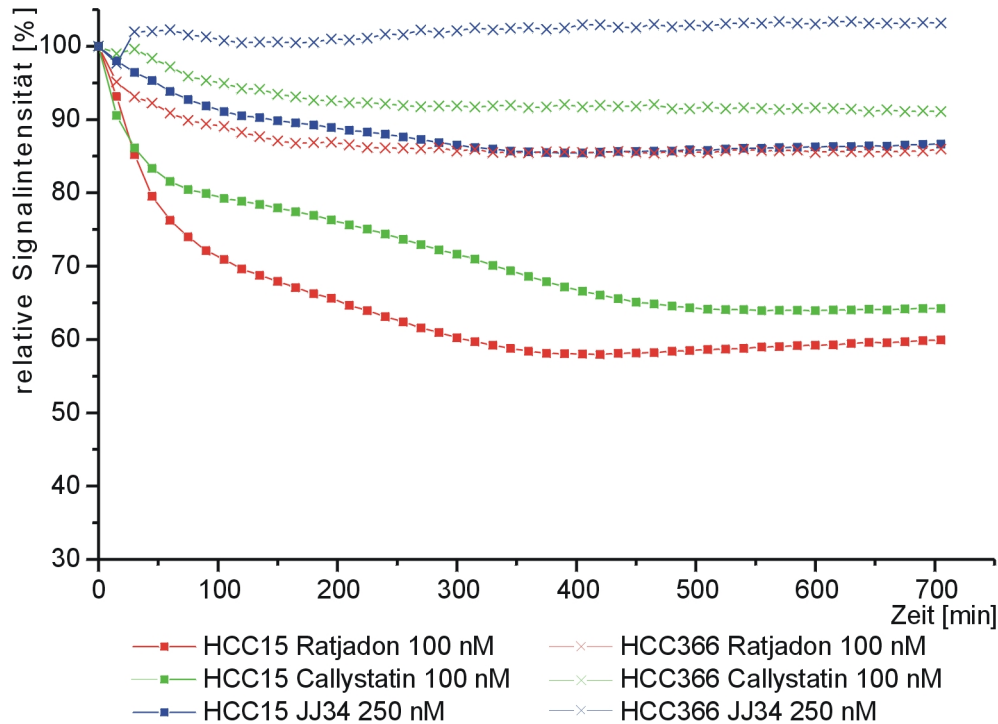


Abb. 6.4: Relative Signalintensität (die Absorptionswerte der Wirkstoffmessungen wurden mit den Absorptionswerten der Nullprobe während der kinetischen Messungen ins Verhältnis gesetzt und als Prozentwert angegeben) für HCC15 und HCC366 mit Ratjadon und Callystatin (100 nM) und JJ34 (250 nM) über 12 h.

In Abbildung 6.4 ist der Verlauf der relativen Signalintensität der kinetischen Messungen an HCC15 (Lungenkrebs, männlich) und HCC366 (Lungenkrebs, weiblich) gezeigt. Für beide Zelllinien ließ sich eine Reihenfolge der Wirkstoffe hinsichtlich ihrer Wirksamkeit erkennen; Ratjadon zeigte den stärksten Effekt hinsichtlich der Inhibierung der Proliferation, gefolgt von Callystatin und JJ34. Beim Vergleich der beiden Zelllinien zeigte sich, dass alle drei Wirkstoffe bei HCC15 eine stärkere Wirksamkeit aufwiesen als bei HCC366, der größte Unterschied zeigte sich bei Ratjadon zwischen HCC15 mit 60 % rel. Signalintensität und HCC366 mit 86 % rel. Signalintensität. Auffällig war, dass HCC366 bei Behandlung mit JJ34 keine Verringerung der Signalintensität zeigte, die relative Signalintensität stieg auf 103 % an. Für beide Zelllinien zeigte sich nach einer gewissen Inkubationszeit keine weitere Änderung in der Absorption, die relative Signalintensität verblieb auf einem konstanten Wert. Für HCC15 war dieser konstante Wert bei Ratjadon und Callystatin nach 350 min und bei JJ34 nach 450 min erreicht. Im Fall von HCC366 war er für Ratjadon und Callystatin nach 150 min erreicht.

Kinetischen Messungen an HeLa und LNCAP

Der Verlauf der relativen Signalintensität der kinetischen Messungen an HeLa und LNCAP ist in Abbildung 6.5 gezeigt. Hierbei ließ sich keine einheitliche Reihenfolge erken-

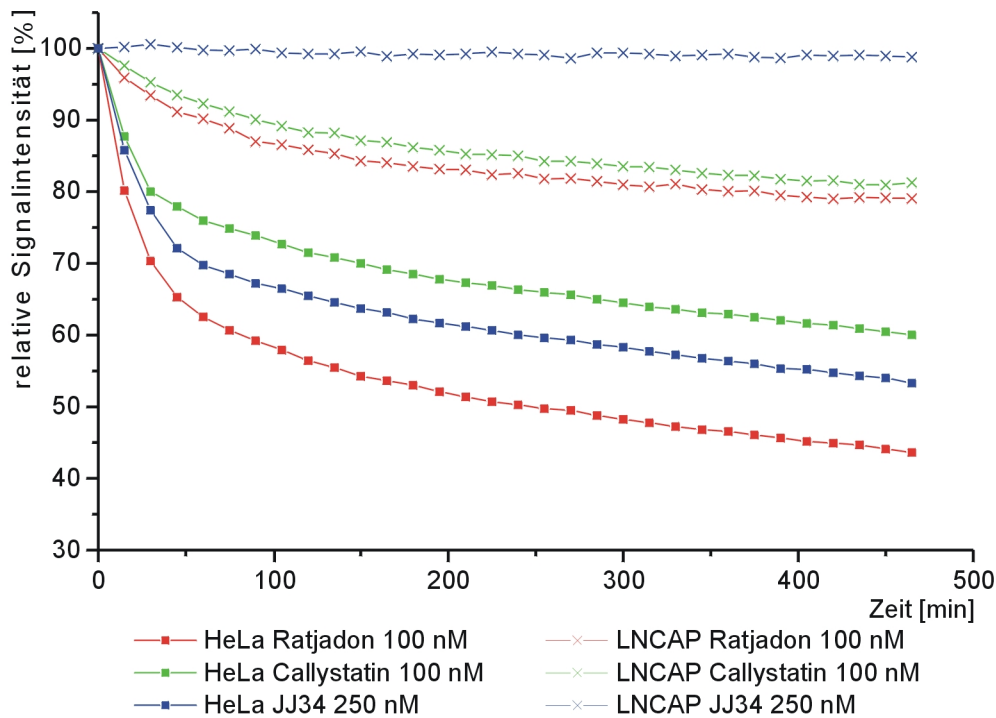


Abb. 6.5: Relative Signalintensität (die Absorptionen der Wirkstoffmessungen wurden mit den Absorptionen der Nullprobe während der kinetischen Messungen ins Verhältnis gesetzt und als Prozentwert angegeben) für HeLa und LNCAP mit Ratjadon und Callystatin (100 nM) und JJ34 (250 nM) über 8 h.

nen, jedoch zeigte auch hier Ratjadon die höchste Wirksamkeit bezüglich der Inhibierung der Proliferation. Beim Vergleich der beiden Zelllinien untereinander zeigte sich, dass alle drei Wirkstoffe bei HeLa eine stärkere Wirksamkeit aufwiesen. Der größte Unterschied zeigte sich bei JJ34 zwischen HeLa mit 53 % rel. Signalintensität und LNCAP mit 99 % rel. Signalintensität. LNCAP zeigte bei der Behandlung mit JJ34 keine Reaktion, die durchschnittliche relative Signalintensität verblieb bei 100 %.

6.4.2 Zellzyklus-Arretierung

Die Zellzyklusanalysen sollten die Beeinflussung des Zellzyklus der HeLa-Zelllinie durch die drei Wirkstoffe aufklären. In Tabelle 6.4 sind die Mittelwerte der Analysen zusammengefasst.

	Nullprobe	Ratjadon [10 nM]	Callystatin [50 nM]	JJ34 [200 nM]
G ₁ -Phase [%]	47,6	81,9	78,5	43,5
S-Phase [%]	38,0	11,5	12,7	28,5
G ₂ -Phase [%]	14,5	6,6	8,9	28,0

Tab. 6.4: Prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen der HeLa-Zellen nach 48stündiger Inkubation mit 10 nM Ratjadon, 50 nM Callystatin und 200 nM JJ34. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus min. drei Messungen.

Für alle verwendeten Substanzen konnte eine Beeinflussung des Zellzyklus beobachtet werden. Der größte Effekt konnte bei Ratjadon beobachtet werden, wobei der G₁-Phasen-Anteil bezogen auf die Nullprobe von 47,6 % auf 81,9 % nach 48stündiger Inkubation mit 10 nM Ratjadon anstieg. Die Anteile der S- und G₂-Phase verringerten sich auf 11,5 % bzw. 6,6 %. Für die mit Callystatin behandelten Zellen konnte der gleiche Effekt beobachtet werden. Hier stieg der G₁-Phasen-Anteil auf 78,5 % nach 48stündiger Inkubation mit 50 nM Callystatin, während sich die S- und G₂-Phasen-Anteile auf 12,7 % bzw. 8,9 % verringerte. Die mit JJ34 behandelten Zellen zeigten einen Anstieg des G₂-Phasen-Anteils von 14,5 % auf 28,0 %. Die Anteile der S- und G₁-Phase verringerten sich auf 28,5 %, bzw. auf 43,5 %.

6.4.3 Apoptose-auslösende Konzentration

Um die reduzierte Zellzahl nach Behandlung mit den Wirkstoffen näher charakterisieren zu können, wurden durchflusszytometrische Tests mit der HeLa-Zelllinie auf das Vorliegen von apoptotischen und nekrotischen Zellen durchgeführt. Die Präparierung der Zellen und die Auswertung der Messung wurde wie in Abschnitt 6.3.4 auf Seite 68 beschrieben vorgenommen.

	Nullprobe	Ratjadon [10 nM]	Callystatin [50 nM]	JJ34 [100 nM]
apoptotische Zellen [%]	n. n.	7,6	n. n.	2,7
nekrotische Zellen [%]	7,3	20,1	21,7	25,3
vitale Zellen [%]	91,2	72,2	76,5	71,3

Tab. 6.5: Prozentuale Populationsanteile von apoptotischen, nekrotischen und vitalen HeLa-Zellen 10 h nach Inkubation mit Ratjadon (10 nM), Callystatin (50 nM) und JJ34 (100 nM); Anfärbung der Zellen mit Annexin V/PI. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus min. drei Messungen.

Die Angaben zu den Populationsanteilen wurden aus den FL1/FL3-Dotplots (siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 7) entnommen. Bei Anwesenheit von apoptotischen Zellen wurde eine FL1-positive/FL3-negative Population identifiziert. Die Populationsanteile wurden durch gaten (siehe Abschnitt 2.1 auf Seite 7) mit der Zytometer-Software errechnet. Populationsanteile von unter 2 % wurden als nicht nachweisbar gewertet, da dieses Ergebnis bereits durch Fehlstreuung bei Populationsüberlappung erreicht werden konnte.

In Tabelle 6.5 sind die Anteile der apoptotischen, nekrotischen und vitalen Zellen nach Behandlung mit 10 nM Ratjadon, 50 nM Callystatin und 200 nM JJ34 der Nullprobe gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass nach Behandlung mit Callystatin keine apoptotischen Zellen zu detektieren waren. Der größte Anteil an apoptotischen Zellen lag nach Behandlung mit 10 nM Ratjadon bei 7,3 %. Nach Behandlung der Zellen mit 200 nM JJ34 wurde ein Anteil von 2,7 % apoptotischer Zellen ermittelt. Der Anteil an nekrotischen Zellen lag bei allen drei Substanzen in der gleichen Größenordnung. Die Proben nach 2 und nach 5 h wiesen dagegen keine apoptotischen Zellen auf.

6.5 Diskussion

Es hatte sich gezeigt, dass die eingesetzten Substanzen eine eindeutig proliferationshemmende Wirkung aufwiesen. Die Wirkung war sowohl von der eingesetzten Dosis, als auch von der jeweiligen Zelllinie abhängig; wobei sich die Zellen weiblichen Ursprungs von den Zellen männlichen Ursprungs in ihrer Reaktion unterschieden.

Vorversuche

Die In-vitro-Tests in antibiotikahaltigem und antibiotikafreiem Medium zeigten eine Beeinflussung des Resazurin-Tests. Durch den Antibiotika-Einsatz wurde eine verringerte Reduktionsrate von Resazurin zu Resorufin gemessen. Um eine möglichst unbeeinflusste Testung durchzuführen wurde auf die Verwendung von Antibiotika verzichtet.

Ergebnisse der Absorptionsmessungen des Resazurin-Tests

Der Vorteil der hier durchgeführten kinetischen Messungen liegt in der Abbildung des gesamten Umsatzverhaltens. Es konnte durch Aufnahme einer Kinetik der optimale Zeitpunkt für folgende Zwei-Punkt-Messungen bestimmt werden. Für HCC15 und HCC366 wäre ein Messzeitpunkt nach Erreichen des Plateau-Wertes nach ca. 400 bzw. 150 min von Vorteil. Bei allen eingesetzten Wirkstoffen zeigte sich, dass bei der kleinsten eingesetzten Konzentration eine Erhöhung der Adsorption zu beobachten war. Dies ist auf den stimulierenden Effekt von geringen Zytostatikakonzentrationen zurückzuführen.

Ergebnisse der Absorptionsmessungen des Resazurin-Tests in relativen Einheiten

Es konnte mithilfe einer kinetischen Messung der Eintritt der Wirkung bestimmt werden. Für alle hier eingesetzten Substanzen trat die Wirkung innerhalb der ersten 30 min ein, besonders bei den Zelllinien, bei denen eine starke Proliferationsinhibierung festgestellt wurde, war in diesem Zeitraum ein starker Abfall der relativen Signalintensität zu beobachten.

Auffällig war, dass diese Reaktion nicht einheitlich war; bei dem Vergleich der Lungenkrebszelllinien hatte diejenige männlichen Ursprungs (HCC15) eine größere Proliferationshemmung gezeigt als die weiblichen Ursprungs (HCC366). Beim Vergleich der geschlechtstypischen Zelllinien hatte die weibliche Zelllinie (HeLa) einen höheren proliferationsinhibierenden Effekt gezeigt als die männlicher Herkunft (LNCAP). Die Wirkung der eingesetzten Substanzen war dementsprechend nicht nur auf die geschlechtliche Herkunft der Zelllinie zurückzuführen; eine Vorhersage der zu erwartenden Inhibierung bei gegebener Herkunft eines Tumors bzw. Zelllinie konnte nicht getroffen werden.

Eine Erklärung für die uneinheitliche Reaktion der Zelllinien könnte in den Unterschieden der Zellen zu finden sein. Bei allen Zelllinien handelte es sich um Endothelzellen, jedoch stammten diese aus unterschiedlichen Organen, bzw. waren die Lungenkrebs-Zelllinien in unterschiedliche Subtypen differenziert. Weitere Unterscheidungsmerkmale waren das Alter der Spenderin/des Spenders, das Alter der Zelllinie sowie unterschiedliche Verdopplungszeiten

(siehe Tabelle 6.1 auf Seite 65 und 6.2 auf Seite 66). Diese Unterscheidungsmerkmale können einen Grund für die unterschiedlichen Umsatzraten von Resazurin darstellen. Besonders die Wachstumsraten waren ein entscheidendes Kriterium, da die Umwandlung von Resazurin in erster Linie von der Zellzahl abhängig war und somit die schneller wachsenden Zellen HeLa und HCC15 eine höhere Umsatzrate aufwiesen. Aus den genannten Gründen musste davon ausgegangen werden, dass die unterschiedlichen Umsatzraten der Zellen in erster Linie von der Zellzahl abhängen.

Zellzyklus-Arretierung

Mithilfe der Zellzyklusanalyse wurde untersucht, welchen Einfluss die Testsubstanzen auf die Wachstumskinetik haben. Viele derzeit im Einsatz befindlichen Zytostatika die zur Tumor-Therapie eingesetzt werden, greifen direkt in den Zellzyklus ein (Colchicin, Taxol). Es hatte sich gezeigt, dass Ratjadon die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert; der Anteil der G₁-Phase stieg von 47,6 % (Nullprobe) auf 81,9 % an. Nach Einsatz von Callystatin zeigte sich ebenfalls eine G₁-Phasen-Arretierung, jedoch stieg hier der Anteil nur auf 78,5 % an. JJ34 zeigte hingegen eine G₂-Phasen-Arretierung, hier stieg der Anteil von 14,5 % (Nullprobe) auf 28,0 % an.

Apoptose-auslösende Konzentration

Für den Einsatz als Therapeutikum ist es relevant, ob das Zytostatikum eine akut toxische Wirkung hat. Um zu überprüfen, ob die Wirkstoffe Zelltod auslösen, wurden Messungen mit behandelten HeLa-Zellen auf apoptotische und nekrotische Zellen durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration der Wirkstoffe richtete sich nach der in den Resazurin-Tests bestimmten Schwellkonzentration. Es konnte gezeigt werden, dass bei allen drei Substanzen ein Anstieg der nekrotischen Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Nullprobe zu beobachten war; der Anstieg des Anteils der nekrotischen Zellen bewegte sich bei 20 %. Apoptotische Zellen konnten nur nach Behandlung mit Ratjadon und JJ34 nachgewiesen werden. Hierbei wurde ein apoptotischer Anteil von 7,6 % nach Behandlung mit Ratjadon und ein Anteil von 2,7 % nach Behandlung mit JJ34 nachgewiesen. Da der Anteil an apoptotischen Zellen gegenüber nicht-apoptotischen Zellen bei dem Annexin V/PI geringer ausfällt, als bei anderen Apoptose-Tests (z. B. Membran-Potential-Analyse, DNA-Fragmentierung) muss davon ausgegangen werden, dass der reale Anteil apoptotischer Zellen höher lag.

Es hat sich gezeigt, dass Ratjadon und JJ34 durch Arretierung der Zellen in der G₁- bzw. der G₂-Phase des Zellzyklus und durch das Auslösen von Apoptose eine vielversprechende Wirksamkeit gegen schnellwachsende Zellen, wie z. B. Tumorzellen besitzen.

7 Entwicklung eines online Messsystems für Microcarrier-Kultivierungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Messsysteme auf die Anwendbarkeit in der Kultivierung von Zellen auf Microcarriern hin untersucht werden. Ziel ist es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe es möglich ist, die durchschnittliche Zelldichte auf den Microcarriern qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Diese neuen Methoden sollten den etablierten Methoden der Zell- bzw. der Zellkernzählung gegenübergestellt werden.

7.1 Methoden

7.1.1 Kultivierung von Säugerzellen auf Microcarriern

Adaption der NIH-3T3-Zelllinie

Zur Kultivierung von verankerungsabhängigen Zellen auf Microcarriern wurde die NIH-3T3-Zelllinie gewählt, da diese eine hohe Toleranz gegenüber verschiedenen Trägermaterialien aufweist [mündliche Mitteilung von Herrn Dr. Drexler, DSMZ Braunschweig]. Zunächst wurde die Zelllinie von DMEM auf RPMI 1640-Medium umgestellt; DMEM weist im Vergleich zum RPMI 1640-Medium eine geringere Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen-Konzentration auf. Diese bivalenten Kationen sind maßgeblich an dem Vorgang des Anhaftens der Zellen auf der Oberfläche beteiligt. Eine Verringerung der Konzentration bewirkt eine Lockerung der Bindung der Zellen an die Oberfläche und eine verminderte Tendenz zur Aggregatbildung. Die Umstellung lief über eine sukzessive Verringerung des DMEM-Anteils bei gleichzeitiger Erhöhung des RPMI 1640-Anteils (DMEM:RPMI 100:0, 75:25, 50:50, 25:75, 0:100). Nach Adaption der Zellen an das neue Medium wurde die Serum-Konzentration in fünf Schritten von 10 auf 5 % abgesenkt. Es wurde jeweils eine Wachstumskurve vor und nach Adaption aufgenommen. Dazu wurden die Zellen in 6-Loch-Platten mit einer Zelldichte von 10^3 Zellen- cm^{-2} ausgesät, mit 5 ml Medium überschichtet und unter den in Abschnitt 6.3.1 auf Seite 64 genannten Bedingungen inkubiert. Es wurden täglich drei Wells geerntet und die Zelldichte, Lactat- und Glucosekonzentration bestimmt.

Vorbehandlung und Kultivierungsbedingungen der Microcarrier

Zur Sterilisation wurden die Microcarrier aus Kunststoffen in einer 0,05%igen NaN_3 -Lösung bei RT über Nacht gelagert, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Die Glas-Microcarrier wurden bei 121 °C für 15 min mit Heißdampf sterilisiert und vor Inokulation in Medium resuspendiert. Die Cytodex 1-Microcarrier wurden zunächst in PBS (20 ml pro 250 g Microcarrier) für 3 h bei Raumtemperatur eingeweicht. Nach dem Quellen wurden die Microcarrier in eine Spinnerflasche überführt und 15 min bei 121 °C mit Heißdampf sterilisiert. Anschließend wurde die überstehende Lösung dekantiert und die Microcarrier in Medium resuspendiert. Tabelle 7.1 auf der folgenden Seite liefert einen Überblick über die eingesetzten Microcarrier.

Die adaptierten Zellen wurden in T75-Flaschen vorkultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase (3. bis 4. Tag nach Inokulation) wurden die Zellen geerntet und mit den Microcarriern in eine 250 ml-Spinnerflasche überführt. Die Zellsuspension wurden so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 10^4 Zellen·ml⁻¹ erreicht wurde. Die Microcarrier wurden in einer Dichte von 2 g·l⁻¹ eingesetzt und nach Sterilisation direkt in das Kulturmedium gegeben. Nach Vorlage der Zellen und der Microcarrier in die Spinnerflasche wurde mit Medium auf 250 ml aufgefüllt.

Microcarrier	Material	Beschichtung/ Funktionalisierung	Hersteller
Glas	Polystyrol	Glas	Cellon S. A., Luxemburg
Plastic plus	Polystyrol	kationisch	Cellon S. A., Luxemburg
Cytodex 1	Polydextrin	kationisch	Amersham, Schweden
PMMA Beads	Polymethylmethacrylat	keine	Bang's Labs, USA
Biosilon	Polystyrol	keine	Nunc, Deutschland
Microcarrier	Größe	Dichte	Oberfläche
Glas	90–125 µm	1,02 g·cm ⁻³	450 cm ² ·g ⁻¹
Plastic plus	125–212 µm	1,02 g·cm ⁻³	390 cm ² ·g ⁻¹
Cytodex 1	147–248 µm	1,03 g·cm ⁻³	4400 cm ² ·g ⁻¹
PMMA Beads	76–90 µm	1,02 g·cm ⁻³	6075 cm ² ·g ⁻¹
Biosilon	160–300 µm	1,05 g·cm ⁻³	255 cm ² ·g ⁻¹

Tab. 7.1: Verwendete Microcarrier mit den wichtigsten physikalischen und chemischen Parametern. Oberfläche bezogen auf das Trockengewicht.

Um eine bessere Anhaftung der Zellen auf den Microcarriern zu gewährleisten war es notwendig, die Durchmischung nach Inokulation für einen gewissen Zeitraum zu unterbrechen. Da in der Literatur unterschiedliche Angaben zum Intervallrühren nach Inokulation zu finden waren, musste durch Vorversuche der optimale Zeitpunkt ermittelt werden. Dazu wurden jeweils zwei parallele Versuche mit Cytodex 1- und Plastic plus-Microcarriern durchgeführt. Die Inokulation wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

Plattierungseffizienz

Die Plattierungseffizienz gibt den Anteil der Zellen an, die nach dem Intervallrühren an den Microcarriern haften. Zur Ermittlung der Plattierungseffizienz wurde 3 h nach Inokulation die erste und anschließend stündlich eine Probe (1 ml) genommen. Mittels Neubauer-Zählkammer wurde die Zahl der nicht anhaftenden Zellen ausgezählt und mit der Animpfdichte ins Verhältnis gesetzt.

Für jeden in Tabelle 7.1 aufgeführten Microcarrier wurden mindestens zwei parallele Versuche durchgeführt, dazu wurden die Microcarrier wie oben beschrieben vorbehandelt und mit der angegebenen Zellmenge inokuliert. Die Microcarrier wurden für 5 h mit einem Intervall von

3 min Rühren und 30 min Pause gerührt. Da die Microcarrier unterschiedliche Sinkgeschwindigkeiten aufwiesen, musste die Rührergeschwindigkeit angepasst werden (siehe Tabelle 7.2). Nach Beendigung des Intervallrührens wurde auf kontinuierliches Rühren umgestellt und die Plattierungseffizienz bestimmt.

Microcarrier	Rührergeschwindigkeit	Zellzahlbestimmung
Glas	30 min ⁻¹	Trypsin-Methode
Plastic plus	30 min ⁻¹	Zellkern-Methode
Cytodex 1	20 min ⁻¹	Zellkern-Methode
PMMA Beads	40 min ⁻¹	Trypsin-Methode
Biosilon	20 min ⁻¹	Zellkern-Methode

Tab. 7.2: Verwendete Rührergeschwindigkeiten und Methoden zur Zellzahlbestimmung für die verschiedenen Microcarrier.

Analytik

Die Probenahme zur Analytik erfolgte im 24-Stunden-Intervall über einen Kultivierungszeitraum von 6 d:

Zellzahl Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen auf den Microcarriern durch Trypsin abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden die gewaschenen Microcarrier in 500 µl Trypsin-Lösung resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Für manche Microcarrier musste die Zellkernmethode [97] angewendet werden (siehe Tabelle 7.2). Dazu wurden die gewaschenen Microcarrier in 1 ml 0,1 M Na-Citratlösung resuspendiert, durchmischt und für 1 h bei RT inkubiert. Die herausgelösten Zellkerne wurden mit 100 µl Trypan-Blau-Lösung angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Glucose/Lactat Die Bestimmung der Glucose- und Lactatkonzentration wurde mithilfe des Gerätes YSI 2700 Select durchgeführt.

Aminosäuren Die Bestimmung der Aminosäurenkonzentration erfolgte mittels reversed-phase HPLC über eine Gradientensteuerung nach Vorsäulen-Derivatisierung mit OPA-M-CE. Die Daten zu den Laufbedingungen und den Eluenten sind in Anhang A.3 auf Seite 104 und A.4 auf Seite 107 wiedergegeben.

Zytometer-Proben Die Microcarrier-Proben für die durchflusszytometrische Analytik wurden mit 70%igem Ethanol fixiert und bei -18 °C gelagert.

7.1.2 Optische Verfahren zur Ermittlung der Zelldichte auf Microcarriern

Die bisher verwendeten direkten Verfahren zur Bestimmung der Zelldichte auf Microcarriern basierten auf Zählung der Zellen nach Ablösung oder bei indirekten Verfahren auf Bestimmung durch Ermittlung der Stoffwechselrate anhand der Glucose-/Lactatkonzentration und Aminosäurekonzentration.

Phasenkontrast-Mikroskopie

Die Phasenkontrast-Mikroskopie wurde zur qualitativen Bestimmung der Zelldichte auf den Microcarriern und zur Kontrolle des Zellzustandes eingesetzt. Da die Microcarrier aus unterschiedlichen Materialien aufgebaut sind, besitzen sie verschiedene Brechungsindizes. Ist der Brechungsindex eines Materials nahe dem des umgebenden Mediums (Wasser $n=1,33$), ist eine mikroskopische Beobachtung des gesamten Microcarriers möglich, da nur geringe Lichtbrechung auftritt. Bei Microcarriern mit höherer optischer Dichte tritt verstärkt ein Lupeneffekt der sphärischen Microcarrier auf, der das Fokussieren von tiefer gelegenen Schichten verhindert. Die Microcarrier wurden mit Phasenkontrast bei 200facher Vergrößerung beobachtet. Die Aufnahmen wurden mithilfe einer Digitalkamera (Olympus C-4040) gemacht.

In-situ-Mikroskopie

Für die Anwendung des In-situ-Mikroskops (III-T) in der Microcarrier-Kultivierung wurden Objektive mit einer Vergrößerung von 4, 10 und 20fach verwendet, was einer Vergrößerung von 80, 200 und 400fach entsprach. Das Mikroskop war mit einer Digitalkamera (Sony XCD-X700) ausgestattet und lieferte 25 Bilder pro Sekunde in einer Auflösung von 1024·768 Bildpunkten. Für die Bildaufnahme wurde eine Belichtungszeit von 0,02 s gewählt. Zunächst wurden Offline-Aufnahmen mit allen Microcarriern gemacht, um abschätzen zu können, ob das In-situ-Mikroskop zur Beobachtung der jeweiligen Microcarrier geeignet ist. Nach Vorauswahl wurde eine Kultivierung von Cytodex 1-Microcarriern für den Zeitraum von 6 d untersucht.

Erstellung von Grauwert-Histogrammen

Die Microcarrier-Aufnahmen des Phasenkontrast- und In-situ-Mikroskops wurden zur Texturanalyse verwendet. Zur Texturanalyse der Microcarrier wurden Grauwert-Histogramme von einzelnen Microcarrieraufnahmen erzeugt. Mithilfe der Software Corel-Photopaint wurden mittels farbempfindlicher Markierung der Hintergrund der Aufnahme entfernt, so dass die Markierung den gewünschten Microcarrier umfasste. Durch anpassen der Empfindlichkeit der Farberkennung ließen sich Störungen durch Schwebstoffe entfernen. Größere Störungen z. B. durch Einzelzellen oder Zell-Aggregate mussten manuell entfernt werden. Die Grauwert-Histogramme wurden anschließend mit der Histogramm-Funktion der Bildbearbeitungssoftware erstellt.

Durchflussszytometrie

Zur Bestimmung des Bedeckungsgrades wurden die Ethanol-fixierten Microcarrier in 900 μ l PBS resuspendiert, mit 100 μ l PI-Lösung versetzt und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die gewaschene Microcarrier-Suspension wurde im FACS analysiert. Um eine statistische Sicherheit zu erhalten, wurden bei jeder Messung mindestens 10 000 Partikel vermessen. Die Auswertung erfolgte im Dotplot mit der Auftragung Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen Rot-Fluores-

zenz (FL3). Zur quantitativen Auswertung der Dotplots wurden die Signale aus vier Regionen ausgezählt (siehe Abbildung 7.1).

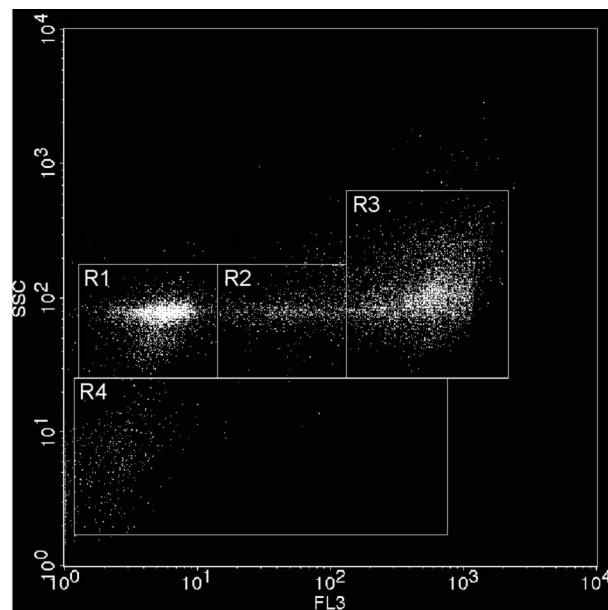


Abb. 7.1: Dotplot mit einer Auftragung von SSC gegen FL3. In dem Dotplot sind die Regionen zur Bestimmung des Bedeckungsgrades der PMMA-Microcarrier eingezeichnet. Die oberen Regionen umfassen die Microcarrier (Region 1: unbewachsene Microcarrier bis Region 3: maximaler Bewuchs, konfluente Microcarrier), Region 4 umfasst Einzelzellen sowie Zell-Aggregate.

7.1.3 Bestimmung der Lebend-Zelldichte auf Microcarriern mittels Impedanz-Spektroskopie

Die Impedanz-Spektroskopie wurde zur Detektion der Lebend-Zellmasse eingesetzt. Das Messprinzip beruht darauf, dass beim Durchtritt der Zelle durch ein elektrisches Wechselfeld an der Membran ein Dipol induziert wird und das daraus resultierende kapazitive Potential gemessen wird. Die Gesamtkapazität ist Zelltyp-abhängig und steigt proportional mit der Zelldichte an.

Um eine Kalibration des Impedanz-Spektroskops (BioMass-Monitor) durchzuführen, wurden unterschiedliche Zellkonzentrationen von suspendierten NIH-3T3-Zellen vermessen. Dazu wurden die eingestellten Zellsuspensionen in einem geeigneten Gefäß kontinuierlich gerührt. Die Sonde des BioMass-Monitors wurde 1,5 cm tief in die Suspension getaucht und nachdem sich ein konstanter Wert eingestellt hatte, der Messwert abgelesen. Dieser Vorgang wurde für jede definierte Zellkonzentration drei mal wiederholt.

7.1.4 Bioreaktor-Microcarrier Kultivierung

Die Microcarrier Kultivierung wurde in einem 5 l-Edelstahl-Bioreaktor durchgeführt. Vor Beginn der Kultivierung wurde der Bioreaktor mit BioMass-Sonde, In-situ-Mikroskop, pH-

und pO₂-Elektrode versehen. Weiterhin wurden die Säure-, Base- und Animpfflasche mit den entsprechenden Eingängen verbunden. Der komplett verschraubte Reaktor wurde anschließend für 60 min bei 121 °C mit Heißdampf sterilisiert.

Um die nötige Zellmenge zu erhalten, wurden NIH-3T3-Vorkulturen in Roller-Bottles durchgeführt (Kultivierungsbedingungen siehe Abschnitt 7.1.1 auf Seite 75). Dazu wurden die Zellen von subkonfluent bewachsenen T150-Monolayer-Flaschen in die Roller-Bottles überimpft und mit 250 ml Medium aufgefüllt. Während der Anhaftungsphase wurden die Roller-Bottles mit einer Drehzahl von 0,5 min⁻¹ in den ersten 24 h gedreht, anschließend wurde die Drehzahl auf 2 min⁻¹ erhöht. Da die Adaptionsphase der Zellen in den Roller-Bottles länger dauerte als in den T-Flaschen, wurden die Zellen 5–6 d kultiviert.

Es wurden zwei Kultivierungen im Bioreaktor mit unterschiedlichen Medien durchgeführt; die Kultivierungsparameter sind in Tabelle 7.3 zusammengefasst. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte durch Zugabe von jeweils 1 M Salzsäure und Natronlauge. Die pO₂-Elektrode wurde vor dem Animpfen 3 h im Medium polarisiert. Zum Animpfen wurden zunächst die Microcarrier (2 g·l⁻¹ Medium) in den Reaktor überführt und der Nullwert für den BioMass-Monitor eingestellt, anschließend wurden die Zellen zugegeben und mit temperiertem Medium (37 °C) auf 4,5 l aufgefüllt.

Medium	RPMI, 5 % NKS	DMEM, 10 % NKS
Microcarrier	Poly-L-Lysin beschichtete PMMA	
Rührergeschwindigkeit	75·min ⁻¹	
Temperatur	37 °C (±0,5 °C)	
pH-Wert	7,15 (±0,1)	

Tab. 7.3: Kultivierungsparameter der Microcarrier Kultivierungen im 5 l Bioreaktor.

Die Microcarrier wurden für 5 h mit einem Intervall von 3 min rühren und 45 min Pause gerührt. Anschließend wurde auf kontinuierliches Rühren umgestellt. Die Datenerfassung der Kultivierungsparameter erfolgte mithilfe der Software Bio-TEM. Proben zur Analyse von Glucose, Lactat, Aminosäuren und Zelldichte wurden alle 24 h genommen (siehe Abschnitt 7.1.1 auf Seite 75).

7.2 Ergebnisse

7.2.1 Adaption der Zellen und Versuche zum Intervallrühren

Adaption der NIH-3T3-Zelllinie

Die Umstellung von DMEM mit einer Serum-Konzentration von 10 % NKS auf RPMI 1640-Medium mit 5 % NKS hatte einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen. Diese Veränderung ist in Abbildung 7.2 gezeigt. Die Wachstumskurve bei Kultivie-

nung in RPMI 1640-Medium wurde drei Passagen nach Umstellung der Zellen auf das neue Medium aufgenommen.

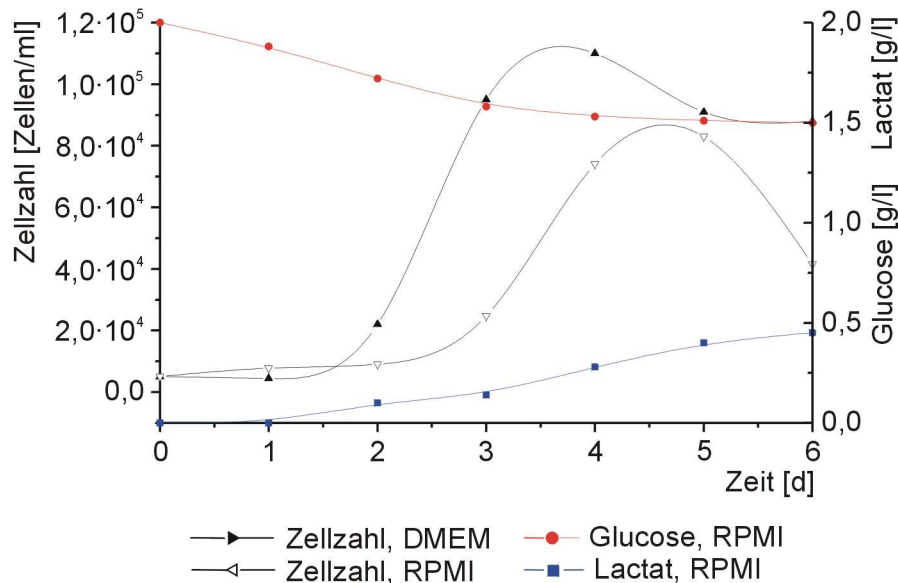


Abb. 7.2: Wachstumskurve der NIH-3T3-Zellen in DMEM vor und in RPMI 1640-Medium nach der Adaption. Konzentrationen für Glucose und Lactat sind für die RPMI 1640-Medium wiedergegeben.

Anhand der Wachstumskurve der NIH-3T3-Zellen mit RPMI 1640-Medium ließ sich eine längere Adaptionphase von 2 d erkennen. Die exponentielle Wachstumsphase ist hierbei zwischen dem 3. und 4. Tag nach Inokulation zu erkennen.

Vorversuche zum Intervallrühren

Der Zeitpunkt für die optimale Dauer des Intervallrührens wurde in Vorversuchen ermittelt. In Tabelle 7.4 sind die Plattierungseffizienzen der Vorversuche mit den Cytodex 1- und Plastic plus-Microcarriern zusammengefasst. Die Plattierungseffizienz ist jeweils auf die Animpfdichte von 10^4 Zellen·ml⁻¹ bezogen.

Dauer des Intervallrührens	Cytodex 1		Plastic plus	
3 h	$5,2 \cdot 10^3$ Zellen·ml ⁻¹	48 %	$8,5 \cdot 10^3$ Zellen·ml ⁻¹	15 %
4 h	$4,3 \cdot 10^3$ Zellen·ml ⁻¹	57 %	$7,2 \cdot 10^3$ Zellen·ml ⁻¹	28 %
5 h	$5,0 \cdot 10^2$ Zellen·ml ⁻¹	95 %	$3,0 \cdot 10^3$ Zellen·ml ⁻¹	70 %

Tab. 7.4: Zelldichte im Überstand und Plattierungseffizienz der Cytodex 1 und Plastic Plus Microcarrier 3–5 h nach Inokulation. Die Plattierungseffizienz ist bezogen auf die Animpfdichte von 10^4 Zellen·ml⁻¹.

Für beide Microcarrier war ein Anstieg der Plattierungseffizienz mit der Zeit zu beobachten. Nach einer Inkubationszeit von 5 h erreichte sie einen Maximalwert von 95 % für die Cyto-

dex 1- bzw. 70 % für die Plastic plus-Microcarrier. Eine längere Dauer des Intervallrührens führte bei den Plastic plus Microcarriern zu Verklumpungen der bewachsenen Microcarrier in Folge von Brückenbildung. Der Verzicht auf das Intervallrühren, wie in der Literatur angegeben, hat sich als nicht praktikabel erwiesen, da daraus eine sehr geringe Plattierungseffizienz resultierte [124]. Es wurde dementsprechend ein Zeitraum von 5 h für das Intervallrühren auf die folgenden Microcarrier-Kultivierungen übertragen.

7.2.2 Wachstumsverhalten der NIH-3T3-Zellen auf Microcarriern

Plattierungseffizienz

Die Wachstumskurven auf unterschiedlichen Microcarriern wurden bei gleicher Animpfdichte bestimmt. Dazu wurden die Zellen und Microcarrier entsprechend der Vorschrift aus Abschnitt 7.1.1 auf Seite 75 vorbehandelt und kultiviert. In Tabelle 7.5 sind die Plattierungseffizienzen der NIH-3T3-Zellen auf den einzelnen Microcarriern nach 5stündigem Intervallrühren wiedergegeben.

	Biosilon	Cytodex 1	Glas	Plastic plus	PMMA
Plattierungseffizienz	48 %	92 %	90 %	73 %	65 %

Tab. 7.5: Prozentuale Plattierungseffizienzen auf den Microcarriern nach 5stündigem Intervallrühren (3 min Rühren, 30 min Pause), bezogen auf die Zahl der anhaftenden Zellen.

Hier weisen die Cytodex 1- und Glas-Microcarrier eine hohe Plattierungseffizienz von 92 % bzw 90 % auf. Der niedrige Wert der Biosilon-Microcarrier von 48 % konnte durch eine verlängerte Dauer des Intervallrührens nicht erhöht werden. Bei den Cytodex 1- und Glas-Microcarriern wurde eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf die Partikel beobachtet, so dass bis zum Ende der Kultivierung Partikel ohne Zellen gefunden wurden. Eine statistische Verteilung der Zellen auf den Partikeln konnte bei den Biosilon- und Plastic plus-Microcarriern beobachtet werden.

Wachstumskurven

Die Zellzahl wurde durch Auszählen der Zellen nach Trypsinierung oder durch Herauslösen der Zellkerne und deren Zählung bestimmt. Die dabei ermittelte Zellzahl entsprach nicht der tatsächlich vorhandenen Zellzahl im Kulturmedium, da vor Behandlung der Microcarrier die Einzelzellen und die kleineren Zellaggregate durch zentrifugieren abgetrennt wurden, dementsprechend können die tatsächlichen Zellzahlen von den ausgezählten abweichen.

In Abbildung 7.3 und 7.4 sind die Wachstumskurven der NIH-3T3-Zellen auf den Microcarriern gegen die Zeit aufgetragen. Die Wachstumskurve auf den Glas-Microcarrier wurde gesondert dargestellt, da die Zellzahl um eine Größenordnung höher war.

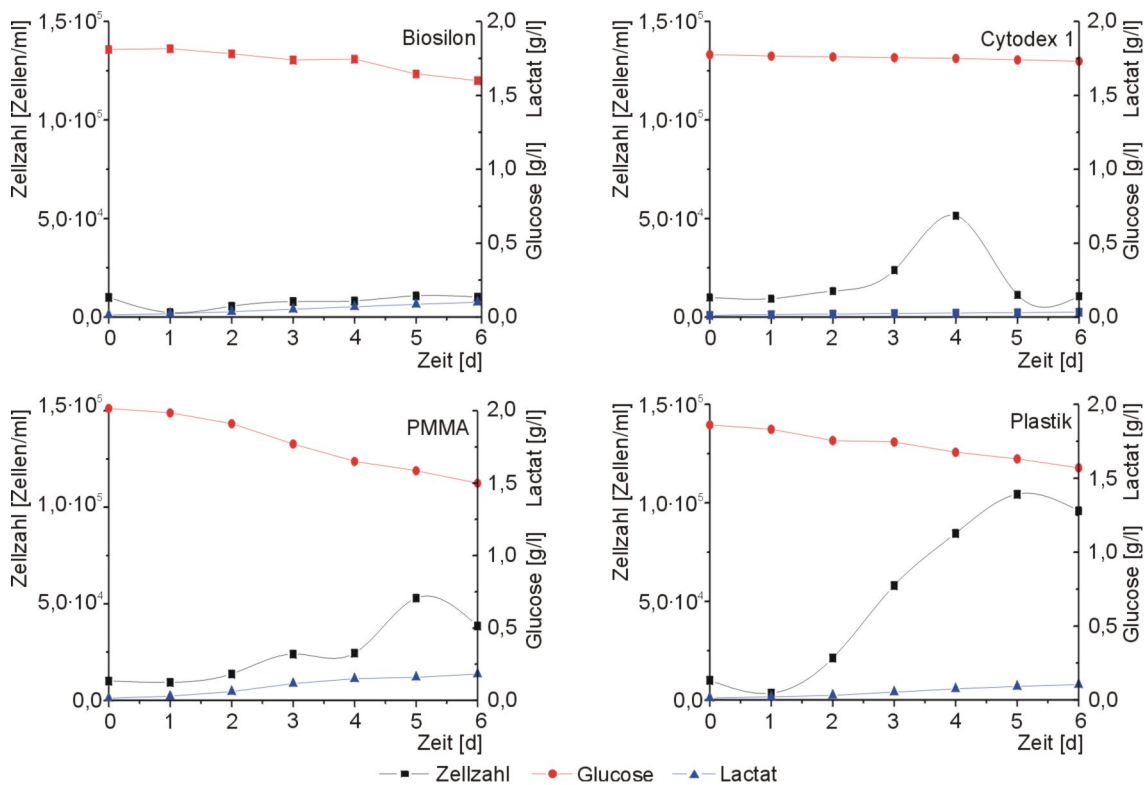


Abb. 7.3: Wachstumskurven der NIH-3T3-Zellen auf den Biosilon-, Cytodex 1-, PMMA- und Plastic plus-Microcarriern. Aufgetragen sind die Zellzahl sowie die Glucose- und Lactat-Konzentration des Mediums gegen die Kultivierungsdauer.

Die Kultivierung mit Biosilon-Microcarriern wies ein sehr kleines Wachstum über den betrachteten Zeitraum auf, am fünften Tag lag die Zellzahl bei $1,1 \cdot 10^4$ Zellen·ml⁻¹ und somit 10 % über der Inokulations-Zellzahl. Zu Beginn der Kultivierung konnte eine gute Anhaftung sowie eine statistische Verteilung der Zellen auf die Microcarrier beobachtet werden. Im Verlauf der Kultivierung lösten sich Zellen von den Partikeln ab und bildeten Aggregate im Medium. Der Glucose Verbrauch war dementsprechend gering, die Konzentration fiel von 1,8 auf $1,6 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ab.

Die Kultivierung mit Cytodex 1-Microcarriern wies eine Lag-Phase von zwei Tagen und ein Maximum mit $5,1 \cdot 10^4$ Zellen·ml⁻¹ am fünften Tag auf. Zu Beginn der Kultivierung konnte eine gute Anhaftung der Zellen beobachtet werden, jedoch war die Verteilung der Zellen auf die Partikel nicht gleichmäßig. Der Anteil von Zellen in Suspension war über den betrachteten Zeitraum sehr klein. Auffällig war die Empfindlichkeit der Microcarrier gegenüber Scherstress; der Anteil an beschädigten Microcarriern stieg während der Kultivierung an. Die Glucose- und Lactat-Konzentrationen blieben während der Kultivierung nahezu konstant bei 1,7 bzw. $0,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$.

Die Kultivierung mit PMMA-Microcarriern wies einen langsamen Anstieg der Zellzahl auf, mit einem Maximum von $5,3 \cdot 10^4$ Zellen·ml⁻¹ am fünften Tag. Es konnte keine statistische Ver-

teilung der Zellen auf die Microcarrier erreicht werden, was zu einer inhomogenen Bedeckung führte. Ab dem vierten Tag wurde die Bildung von Multilayern und das Ablösen von Zellen und Zellaggregaten beobachtet. Die Bildung von Microcarrier-Klumpen durch verbrückende Zellen war sehr ausgeprägt. Die Glucose-Konzentration fiel von 2,0 auf $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ während die Lactat-Konzentration von 0,0 auf $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ anstieg.

Die Kultivierung mit Plastic plus-Microcarriern wies eine Lag-Phase von einem Tag auf und erreichte die maximale Zellzahl am fünften Tag mit $1,0\cdot 10^5$ Zellen- ml^{-1} . Zu Beginn der Kultivierung konnte eine gute Anhaftung und eine gute Verteilung der Zellen auf die Microcarrier beobachtet werden. Ab dem dritten Tag trat vereinzelt Konfluenz auf. Die Glucose-Konzentration fiel von 1,9 auf $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ während die Lactat-Konzentration von 0,0 auf $0,1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ anstieg.

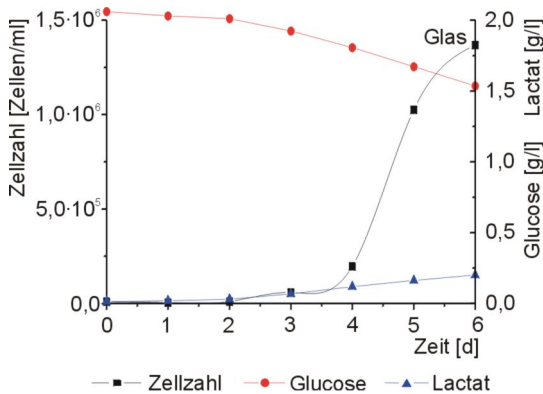


Abb. 7.4: Wachstumskurve der NIH-3T3-Zellen auf den Glas-Microcarriern. Aufgetragen sind die Zellzahl sowie die Glucose- und Lactat-Konzentration des Mediums gegen die Kultivierungsdauer.

Die Kultivierung mit Glas-Microcarriern wies eine Lag-Phase von drei Tagen auf und erreichte die maximale Zellzahl am sechsten Tag mit $1,4\cdot 10^6$ Zellen- ml^{-1} . Zu Beginn der Kultivierung konnte eine gute Anhaftung der Zellen beobachtet werden, jedoch war die Verteilung der Zellen auf die Partikel nicht gleichmäßig. Ab dem fünften Tag trat vereinzelt Konfluenz auf. Die Glucose-Konzentration fiel von 2,1 auf $1,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ während die Lactat-Konzentration von 0,0 auf $0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ anstieg.

Aminosäuren-Analytik

Die Konzentrationen der in dem Medium enthaltenen Aminosäuren wurden während der Kultivierungen in 24 h-Intervallen bestimmt. Die Ergebnisse sind im Anhang in Abbildung A.3 auf Seite 99 wiedergegeben. Zur besseren Übersicht wurden exemplarisch 4 der 18 gemessenen Aminosäuren dargestellt. Der Verlauf der Aminosäure-Konzentrationen korrelierte mit dem Verlauf der Glucose- und Lactat-Konzentration. Beim Vorliegen einer hohen Zellzahl kann von einem hohen Verbrauch von Aminosäuren ausgegangen werden. Dementsprechend ist der Verbrauch der Aminosäuren Glutamin, Arginin und Serin bei den Kultivierungen mit PMMA-

und Glas-Microcarriern am höchsten. Den geringsten Verbrauch wiesen die Kultivierungen mit Biosilon- und Cytodex 1-Microcarriern auf.

Alanin war in dem RPMI 1640-Medium nicht enthalten und wurde während der Kultivierung von den Zellen gebildet. Der Anstieg der Alanin-Konzentration sollte dementsprechend direkt mit der Lebend-Zellzahl korrelieren. Hier zeigte sich die höchste Produktionsrate bei der PMMA-Microcarrier-Kultivierung; die geringste Produktionsrate war bei den Cytodex 1-Microcarriern zu beobachten.

Ergebnisse der Impedanz-Spektroskopie

Die Kalibrationsergebnisse des BioMass-Monitors konnten aufgrund einer großen Schwankung während der Messung nicht verwendet werden. Die Standardabweichung belief sich zum Teil auf das Vierfache des gemittelten Messwertes. Aus diesem Grund wurde der BioMass-Monitor nur für die Bioreaktor-Kultivierung eingesetzt.

7.2.3 Auswertung der optischen Analysen

Phasenkontrast-Mikroskopie

Während der Microcarrier-Kultivierungen wurden täglich Phasenkontrast-Aufnahmen der Microcarrier gemacht, um die Zelldichte abschätzen zu können. Aufgrund der unterschiedlichen Materialien, aus denen die Microcarrier-Matrix aufgebaut waren, war zum Teil starke Lichtbrechung zu beobachten. In Abbildung 7.5 sind zum Vergleich die Aufnahmen von Cytodex 1- und Plastic plus-Microcarriern gezeigt. Durch die höhere optische Dichte des Polystyrols wurde das Licht im Zentrum des Microcarriers gebündelt, was die Aufnahme erschwerte.

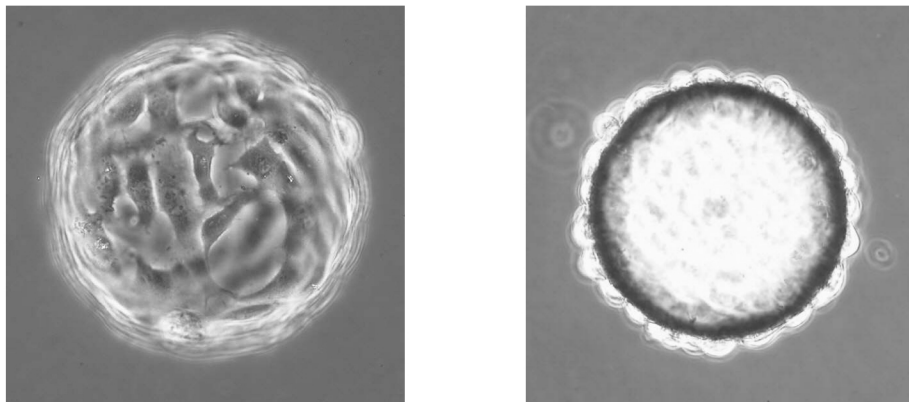


Abb. 7.5: Phasenkontrast-Aufnahmen von Cytodex 1- (links) und Plastic plus- (rechts) Microcarriern mit 200facher Vergrößerung. Beide Microcarrier sind konfluent mit NIH-3T3-Zellen bewachsen.

Die Abschätzung des Bedeckungsgrades der Microcarrier ist bei der optischen Analyse stets abhängig von dem subjektiven Eindruck des Beobachters und somit nicht repräsentativ und Labor-übergreifend zu bestimmen. Zur Entwicklung einer optischen Auswertungsmethode war

es notwendig, Parameter zu verwenden, die charakteristisch und repräsentativ für die Unterscheidung von unbewachsenen und bewachsenen Microcarriern sind. Charakteristisch für die optische Analyse von Microcarriern ist die Veränderung der Textur des Partikels. Diese Veränderung ließ sich durch die Analyse der Grauwerte verdeutlichen; in Abbildung 7.6 sind drei Microcarrier mit unterschiedlichem Bedeckungsgrad und den entsprechenden Grauwert-Histogrammen abgebildet. Die unbewachsenen Microcarrier zeigten ein hohes Anteil von hellen und dunklen Grauwerten. Mit steigendem Bedeckungsgrad war eine Zunahme der mittleren Grauwerte zu erkennen.

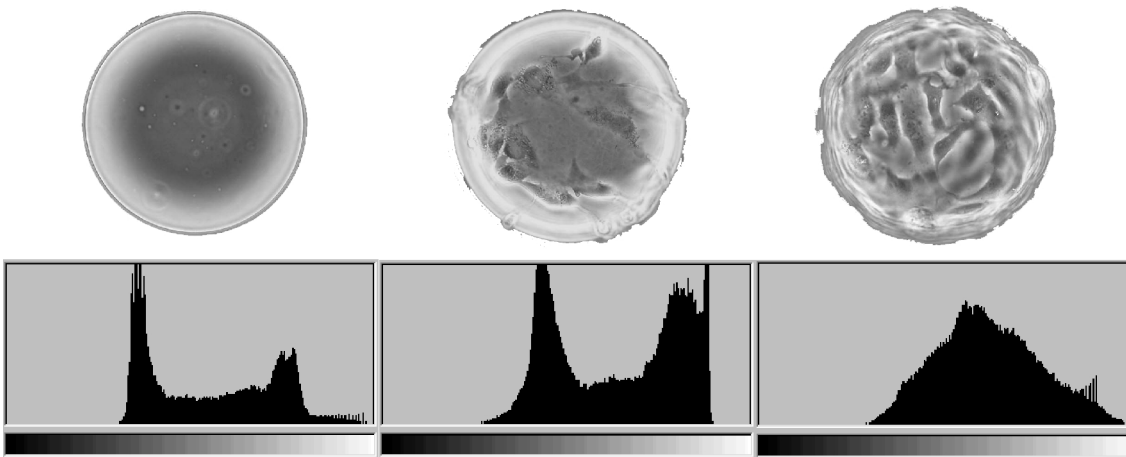


Abb. 7.6: Phasenkontrast-Aufnahmen von Cytodex 1-Microcarriern mit 200facher Vergrößerung. Abgebildet ist ein unbewachsener (links), ein halbkonfluent (mitte) und ein konfluent (rechts) Microcarrier. Darunter sind die entsprechenden Grauwert-Histogramme abgebildet mit den Graustufen (Abszisse) gegen die Anzahl (Ordinate).

In-situ-Mikroskopie

Die Offline-Aufnahmen der Microcarrier mittels In-situ-Mikroskop dienten der Vorauswahl. Hier zeigte sich, dass alle verwendeten Microcarrier, mit Ausnahme der Cytodex 1, einen starken Linseneffekt aufwiesen (siehe Abbildung 7.7).

Aufgrund der guten optischen Eigenschaften wurden die Cytodex 1-Microcarrier ausgewählt und ein Kultivierungsverlauf aufgenommen. Die Bilder wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren nachbearbeitet, um die Eignung der In-situ-Mikroskop-Bilder für eine Texturanalyse zu beurteilen. In Abbildung 7.8 sind drei Microcarrier mit unterschiedlichem Bedeckungsgrad und den entsprechenden Grauwert-Histogrammen abgebildet.

Anhand der Histogramme ist eine Verbreiterung der Grauwert-Verteilung mit zunehmendem Bedeckungsgrad zu erkennen. Die Software zur Auswertung der In-situ-Mikroskop-Bilder ist bereits in der Lage, Einzelzellen von Zell-Aggregaten und Störungen durch Luftblasen und Schwebstoffen zu isolieren. Eine Erweiterung dieser Software zur Textur-Analyse der Microcar-

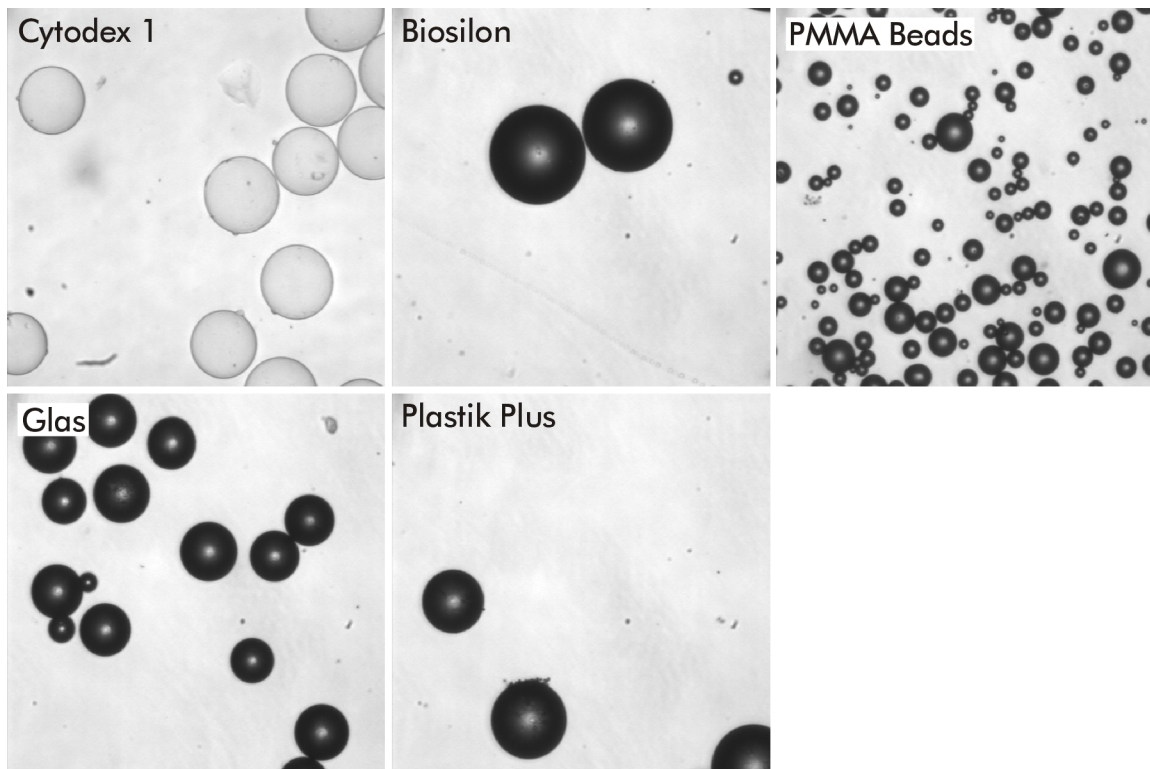


Abb. 7.7: Aufnahmen der verwendeten Microcarrier durch das In-situ-Mikroskop mit 80facher Vergrößerung.

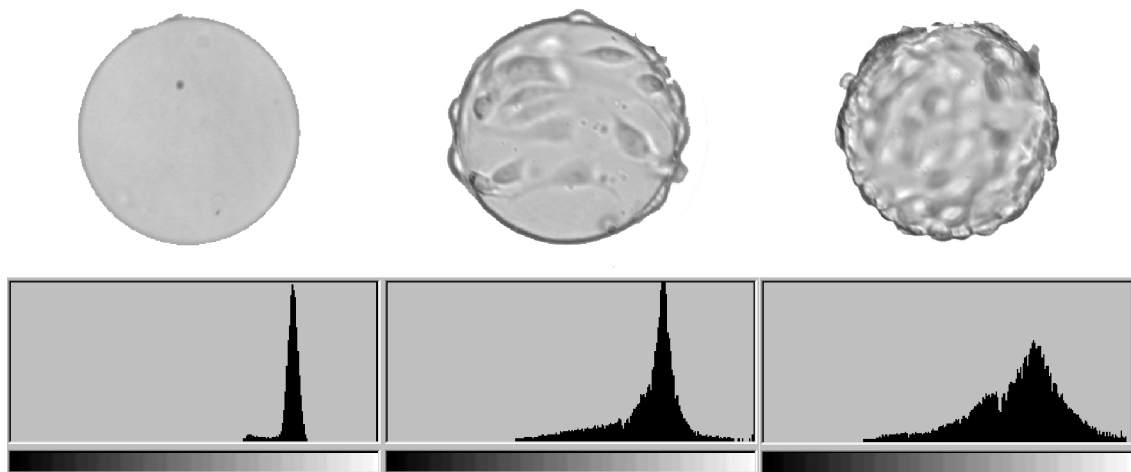


Abb. 7.8: In-situ-Mikroskop-Aufnahmen von Cytodex 1-Microcarriern mit 200facher Vergrößerung. Abgebildet ist ein unbewachsener (links), ein halbkonfluent (mitte) und ein konfluent (rechts) Microcarrier. Darunter sind die jeweiligen Grauwert-Histogramme abgebildet mit den Graustufen (Abszisse) gegen die Anzahl (Ordinate).

rier-Aufnahmen ist Gegenstand derzeitiger Arbeiten [mündliche Mitteilung von Dr. Frerichs, Firma Texsys Hannover].

Durchflusszytometrie

Das hier verwendete FACS eignete sich zur Detektion größerer Partikel bis zu einem Durchmesser von bis zu 200 μm . Für die durchflusszytometrische Bestimmung des Bedeckungsgrades der Microcarrier wurden die PMMA-Microcarrier verwendet, Vorversuche mit den Glas-Microcarriern führten zur Verstopfung der Probenleitung und des Düsenkopfes. Die Plastic plus-, Biosilon- und Cytodex 1-Microcarrier waren mit maximalen Durchmessern von mehr als 200 μm für eine durchflusszytometrische Analyse nicht geeignet.

Die durchflusszytometrische Analyse einer Microcarrier-Kultivierung wurde exemplarisch mit zwei PMMA-Microcarrier-Kultivierungen durchgeführt. Die Microcarrier wurden wie in Abschnitt 7.1.2 auf Seite 77 beschrieben vorbereitet und durchflusszytometrisch vermessen. Dabei wurde das Seitwärtsstreulicht (SSC) gegen die Fluoreszenzintensität (FL3) aufgetragen und vier quadratische Regionen ausgewählt (siehe Abbildung 7.1 auf Seite 79). Anhand der Verteilung der Ereignisse in den einzelnen Regionen konnte eine relative Bedeckung der Microcarrier abgeschätzt werden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen sind in Abbildung 7.9 wiedergegeben. Aus den Ergebnissen der beiden PMMA-Microcarrier-Kultivierungen wurden jeweils die Mittelwerte gebildet.

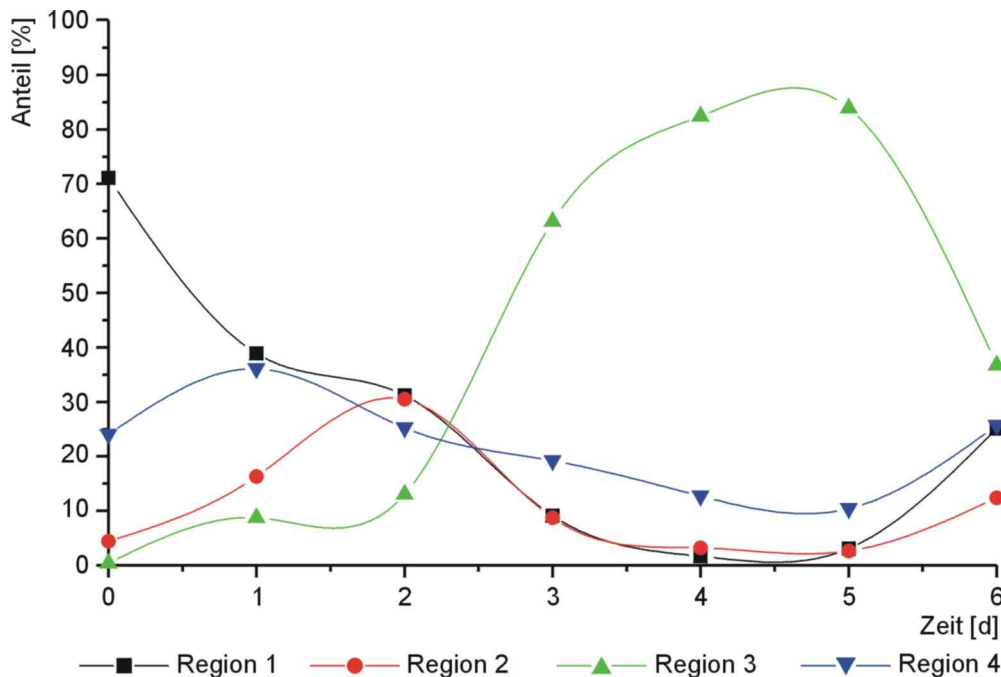


Abb. 7.9: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der PMMA-Kultivierungen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile von Ereignissen in Region 1 (unbewachsene Microcarrier) bis Region 3 (maximaler Bewuchs) und Region 4 (Einzelzellen/Zellaggregate) über die Kultivierungsdauer.

Mit steigender Kultivierungsdauer war eine Zunahme der bewachsenen Microcarrier zu beobachten. Dies zeigte sich durch die Zunahme der Ereignisse in den Regionen 2 und 3.

Dieser Anteil stieg bis zum 3. Tag an und nahm anschließend langsam ab. Ab dem 3. Tag war eine Zunahme des Anteils von Region 4 zu erkennen, was auf einen Anstieg von Einzelzellen und Zellclustern in der Suspension zurückzuführen war.

7.2.4 Bioreaktor-Microcarrier Kultivierung

Die Ergebnisse der Spinner-Flaschen-Kultivierung sollte durch Kultivierungen im Technikumsmaßstab auf die Möglichkeit zum Upscaling hin untersucht werden. Dazu wurden zwei Microcarrier-Kultivierungen in einem 5 l-Edelstahlbioreaktor im Batch-Betrieb durchgeführt. Dabei sollte überprüft werden, ob im Reaktor unter den gleichen Bedingungen kultiviert werden konnte, wie in den Spinner-Flaschen (Kultivierungsbedingungen siehe Tabelle 7.3 auf Seite 80).

Reaktorkultivierung in RPMI 1640-Medium

Es wurde eine Animpfdichte von $5,3 \cdot 10^4$ Zellen-ml⁻¹ und eine Plattierungseffizienz von 91 % gemessen. Im Folgenden wurden alle 24 h Proben nach Inokulation genommen, um die Viabilität zu bestimmen. Während der Kultivierung fiel die Viabilität bereits nach 24 h stark ab; nach 48 h konnten keine vitalen Zellen mehr nachgewiesen werden, so dass der Versuch abgebrochen wurde.

Reaktorkultivierung in DMEM

Es wurde eine Animpfdichte von $7,0 \cdot 10^4$ Zellen-ml⁻¹ und eine Plattierungseffizienz von 67 % gemessen. Während der Kultivierung konnten nach 24 h keine bewachsenen Microcarrier nachgewiesen werden; durch Besiedelung der Okulargläschen des In-situ-Mikroskops mit Zellen war eine direkte Beobachtung der Zellsuspension nicht mehr möglich. Mit steigender Kultivierungsdauer wurden zunehmend Zellcluster und Zelltrümmer in Suspension, sowie eine abnehmende Anzahl an suspendierten Microcarriern beobachtet. Die Kultivierung wurde am 6. Tag abgebrochen, dabei zeigte sich, dass die Metalloberflächen innerhalb des Reaktors mit Zellen bewachsen waren. Die Daten der Glucose- und Lactat-Analyse der beiden Reaktor-Kultivierungen sind in Abbildung 7.10 auf der folgenden Seite wiedergegeben.

7.3 Diskussion

7.3.1 Wachstumsverhalten der NIH-3T3-Zellen auf Microcarriern

Adaption der Zellen und Vorversuche zum Intervallrühren

Die Anwesenheit von bivalenten Kationen hat einen Einfluss auf die Anhaftung der Zellen. Durch die Adaption auf das RPMI 1640-Medium konnte die Verklumpung der Zellen während der Kultivierung in Spinnerflaschen reduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Die Vorversuche haben gezeigt, dass die Dauer des Intervallrührens einen entscheidenden Einfluss auf die Plattierungseffizienz hat. Für die untersuchten Microcarrier stieg die Plat-

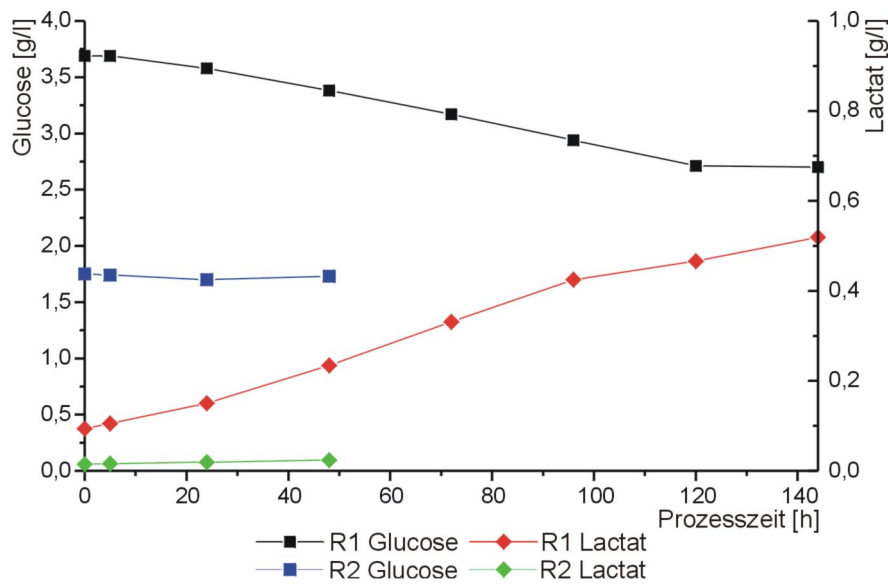


Abb. 7.10: Glucose- und Lactat-Konzentrationen der Microcarrier-Bioreaktor-Kultivierungen. Aufgetragen sind die Konzentrationen von Glucose und Lactat im Medium für die Kultivierung in RPMI 1640-Medium (R1) und in DMEM (R2).

tierungseffizienz mit der Zeit an. Für Cytodex 1 stieg die Plattierungseffizienz um 47 % und für Plastic plus um 55 % bei der Erhöhung der Dauer des Intervallrührens von 3 h auf 5 h an. Dies zeigt, dass die Zellen nur an die Microcarrier anhaften wenn die Suspension in Ruhe ist. Ein anheften von Zellen an Microcarrier während des kontinuierlichen Rührens ist zu vernachlässigen.

Wachstumsverhalten der NIH-3T3-Zellen auf Microcarriern

Die Glas- und Plastic plus-Microcarrier wiesen eine gute Plattierungseffizienz von 90 % bzw. 73 % und eine maximale Zellzahl von $1,4 \cdot 10^6$ bzw. $1,0 \cdot 10^5$ Zellen·ml⁻¹ auf. Die Cytodex 1-Microcarrier erreichten eine geringe maximale Zellzahl von $5,1 \cdot 10^4$ Zellen·ml⁻¹. Die hohen Plattierungseffizienzen der Cytodex 1- und Glas-Microcarrier führte zu einer ungleichmäßigen Beimpfung der Partikel, so dass bis zum Ende der Kultivierung Partikel ohne Zellen gefunden werden konnten. Diese Beobachtung zeigt, dass die Zellen bei kontinuierlichem Rühren nicht an den Microcarrier anhaften und somit während der ersten Stunden nach Inokulation ein Intervall-Rühren notwendig ist. Diese ungleichmäßige Verteilung von Zellen auf die Microcarrier dürfte ein Grund für die geringe maximale Zellzahl während der Kultivierung mit Cytodex 1-Microcarriern sein. Dieses Problem könnte mit einer höheren Animpfdichte vermieden werden.

Die Kultivierung mit PMMA-Microcarriern wies eine Plattierungseffizienz von 65 % auf und erreichten eine maximale Zellzahl von $5,3 \cdot 10^4$ Zellen·ml⁻¹. Mit längerer Kultivierungsdauer wurde eine massive Zunahme von Zellaggregaten beobachtet. Die Ausbildung von Multilayern auf den Microcarriern führte zu einer erhöhten Scherstress-Empfindlichkeit, so dass sich ganze

Zellverbände von den Microcarriern lösten. Die gemessene Zellzahl auf den Microcarriern gibt somit nicht die tatsächliche Zellzahl der Kultur wieder. Die hohen Verbrauchsdaten von Glucose und Aminosäuren ist somit auf das Vorliegen von Zellaggregaten zurückzuführen.

Die Biosilon-Microcarrier waren für eine Kultivierung mit NIH-3T3-Zellen ungeeignet. Die Zellzahl veränderte sich über den Kultivierungszeitraum nur minimal. Der Grund für dieses schlechte Wachstum könnte in der Oberfläche der Microcarrier zu finden sein. Die Matrix der Microcarrier besteht aus Polystyrol ohne Funktionalisierung oder Beschichtung; im Vergleich zu den Plastic plus-Microcarriern fehlt die kationische Ladung der Carrier-Oberfläche. Es kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass diese Funktionalisierung einen entscheidenden Einfluss auf die Kultivierung hat.

7.3.2 Optische Analysen

Phasenkontrast- und In-situ-Mikroskop Analyse

Durch die hohe optische Dichte und die sphärische Struktur der Polystyrol- und PMMA-Partikel trat beim Mikroskopieren ein Linseneffekt auf, der dazu führte, dass das Zentrum der Partikel sehr hell erschien und eine Beobachtung erschwerte. Dieser Effekt wurde besonders bei dem In-situ-Mikroskop beobachtet. Um dieses Problem zu vermeiden, könnten für eine mikroskopische Untersuchung die Microcarrier in einem Medium mit höherem Brechungsindex suspendiert werden, z. B. Immersionsöl.

Bei der Beobachtung der Kultivierung mit Cytodex 1-Microcarriern zeigte sich, dass diese Microcarrier für eine optische Analyse besonders gut geeignet sind. Aufgrund der geringen optischen Dichte der Polydextrin-Matrix war es möglich, jede Ebene der Microcarrier zu fokussieren. Dies zeigte sich besonders in den Aufnahmen des In-situ-Mikroskops von bewachsenen und unbewachsenen Cytodex 1-Microcarriern. Die In-situ-Mikroskop und Phasenkontrast-Aufnahmen der Cytodex 1-Microcarrier wurden für die Grauwert-Texturanalyse eingesetzt. Durch den starken Linseneffekt der übrigen Microcarrier war eine Texturanalyse nicht möglich.

Während der Cytodex 1-Microcarrier-Kultivierung zeigte sich mit zunehmendem Bewuchs eine breitere Verteilung in den mittleren Grauwerten. Der Anstieg der mittleren Grauwerte war auf die zunehmende Lichtstreuung an den Zellen, hier besonders an Einschlüssen/Organellen zu erklären. Durch die Automatisierung der Bildanalyse wäre man mithilfe des In-situ-Mikroskops in der Lage den Bedeckungsgrad von Microcarriern nicht-invasiv im laufenden Prozess zu bestimmen. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die eingeschränkte Übertragbarkeit der Ergebnisse. Die Ergebnisse der Grauwertanalyse müsste in einer Pilotkultivierung auf den Prozess durch manuelle Auszählung des Bedeckungsgrades kalibriert werden. In den vorliegenden Versuchen zeichnete sich das In-situ-Mikroskop durch die konstante Beleuchtungsstärke, die gute Durchleuchtung der Microcarrier und durch die gute Schärfe aus. Somit ist das In-situ-Mikroskop einer lichtmikroskopischen Analyse vorzuziehen.

Durchflusszytometrie

Die Ermittlung des Bedeckungsgrades mittels Durchflusszytometrie hat sich als gute Alternative zur manuellen Zählung erwiesen. Damit konnte eine Wachstumskurve aufgenommen werden, die die Verhältnisse während der Kultivierung detaillierter und reproduzierbarer abbilden konnte. Die Unterteilung der Dotplots in isolierte Regionen macht eine differenzierte Analyse des Wachstumsverhaltens möglich; eine ungleichmäßige Beimpfung der Microcarrier ließe sich mithilfe der Durchflusszytometrie schnell und quantitativ bestimmen. Eine quantitative Bestimmung des Bedeckungsgrades ist mit der Durchflusszytometrie nicht möglich, da die angefärbten Zellen auf dem Microcarrier beim Durchtritt des Laser-Fokus nur von einer Seite bestrahlt werden und somit nicht von jeder Zelle die gleiche Fluoreszenzlichtstärke ausgeht.

Die Messung des Bedeckungsgrades mittels Durchflusszytometrie hat sich für eine Routine Untersuchung als zu störanfällig erwiesen. So kam es während der Messung sehr häufig zu Verstopfung der Probenzufuhr oder der Düse, so dass die Analyse verworfen werden musste. Hier könnte eine Vergrößerung des Schlauchs zur Probenzufuhr oder die Verwendung einer größeren Düse für Abhilfe schaffen; allerdings sind bisher nur Düsendurchmesser bis 400 μm von den FACS-Herstellern verfügbar. Eine Analyse von Microcarriern mittels Durchflusszytometrie würde somit von der Verfügbarkeit größerer Düsendurchmesser anhängen.

7.3.3 Bioreaktor-Microcarrier Kultivierung

Die Kultivierungen im Bioreaktor haben keine Ergebnisse über den Bedeckungsgrad der Microcarrier geliefert. Es hat sich gezeigt, dass das Medium einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Bioreaktor-Kultivierung hatte. Während der Kultivierung in RPMI 1640-Medium konnte kein Bewuchs der Microcarrier festgestellt werden. Dies ist zum Einen auf den geringen Anteil von bivalenten Kationen im Medium, zum Anderen auch auf das größere Volumen zurückzuführen. Microcarrier und Zellen benötigten während des Intervallrührens länger, um auf den Boden des Reaktors abzusinken.

Bei der zweiten Kultivierung wurde auf DMEM umgestellt. Der höhere Anteil an bivalenten Kationen bewirkte, dass die Zellen sich sehr schnell an Oberflächen angesiedelt haben. Der Reaktor war bei Abbruch des Versuchs vollständig mit Zellen bewachsen.

Um einen besseren Bewuchs der Microcarrier zu erreichen müsste für die folgenden Versuche ein anderes Medium verwendet werden (z. B. DMEM/RPMI 1640-Gemisch). Weiterhin könnte während des Intervallrührens ein geringeres Volumen eingesetzt werden, so dass die Zellen und Microcarrier schneller absinken und somit eine schnelle Anhaftung erreicht wird. Um ein Anhaften der Zellen an die Metallflächen des Reaktors zu verhindern müssten diese mit Silikon beschichtet werden.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die Durchflusszytometrie hat als Analysensystem in Medizin und Biotechnologie stark an Bedeutung gewonnen; dabei wird hauptsächlich auf routinemäßige Analysemethoden zurückgegriffen. In dieser Arbeit wurden neue Messmethoden etabliert und bestehende erweitert. Dabei wurden neue Messmethoden etabliert mit deren Hilfe die Ablagerung von Biomolekülen an anorganischen Stoffen und der Bedeckungsgrad von Microcarriern gemessen werden konnte. Messmethoden für Säuger- und Hefezellen wurden erweitert, so dass Veränderungen der Zellen zeitaufgelöst detektiert werden konnten. Die Verwendung des FACS wurde zur Anreicherung von Maus-Stammzellen verwendet. Die für nachfolgende Experimente notwendige Reinheit von über 90 % pluripotenter Stammzellen konnte somit erreicht werden. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Kapitel herausgestellt.

DNA-Bindungsstudien an Hydrotalcit

In der vorliegenden Arbeit wurde das Bindungsverhalten von DNA an Hydrotalcit untersucht. Beim Vergleich der statischen Kapazitätsmessungen mittels Photometrie mit den durchflusszytometrischen Messungen konnte gezeigt werden, dass die Durchflusszytometrie für die Adsorptionsmessung von fluoreszenzmarkierter DNA an Hydrotalcit geeignet war. Zur Erfassung der schnellen Bindungsvorgänge in einem Zeitfenster von 300 s wurde zunächst eine Messapparatur entwickelt, die es ermöglichte, in der laufenden Messung Analyten in die Hydrotalcitsuspension zu geben. Nach Bestimmung der relevanten Laufzeitparameter wurde durch Zugabe von fluoreszenzmarkierter DNA zu einer Hydrotalcit-Suspension sowohl die Bindungszeit als auch die relative gebundene Menge an DNA für zwei Hydrotalcite bestimmt. Es hatte sich gezeigt, dass sowohl die Vorbehandlung durch Calcination als auch das Alter des eingesetzten Materials einen starken Einfluss auf das Bindungsverhalten von DNA an Hydrotalcit hat. Somit war es möglich, Aussagen über das Bindungsverhalten von DNA an verschiedene Hydrotalcite zu machen.

Messung oszillierender Hefen

Synchrone *Saccharomyces cerevisiae*-Kulturen wurden über einen Zeitraum von mehreren aufeinanderfolgenden Oszillationen durchflusszytometrisch untersucht, um die biochemischen Veränderungen während der Oszillation zu bestimmen. Die Analyse der Zellzyklusphasen ergab eine gute Korrelation mit der CO₂-Abgas-Messung und zeigte für die erste Hefe-Kultivierung ein hohes Maß an Synchronität. Durch die Verwendung des Lipid-Fluoreszenzfarbstoffs BODIPY, der gegenüber anderen Lipidfarbstoffen, wie z.B. Nil Rot, eine höhere Sensitivität aufweist, war eine verbesserte Lipidanalyse möglich. Die Analyse des Gesamtproteingehalts ergab einen asynchronen Verlauf zwischen der BioView- und durchflusszytometrischen-Messung, was vermutlich auf die unterschiedlichen Messverfahren zurückzuführen war. Die Identifizierung von Einzelzellen mittels Durchflusszytometrie zeigte eine gute Korrelation mit den Ergebnissen

der in-situ-mikroskopischen Analyse. Durch die Kombination der durchflusszytometrischen Ergebnisse mit den Ergebnissen der Metabolitenanalyse (Glucose, CO₂-Gehalt des Abgas) war es möglich, ein mathematisches Modell zu entwickeln, mit dem das Oszillationsverhalten modelliert werden konnte.

Gewinnung von pluripotenten Stammzellen

Durch Transplantation von Stammzellen des Knochenmarks in einen durch Herzinfarkt abgestorbenen Herzmuskel kann die Regeneration induziert werden. Dazu wurde Maus-Knochenmark isoliert und durch FACS die pluripotenten Stammzellen angereichert. Hier hat sich gezeigt, dass die Wahl des Sortiermodus einen entscheidenden Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Eine verringerte Analysenfrequenz steigert zwar die Reinheit der sortierten Zellen, jedoch verringert die lange Sortierdauer die Viabilität der Zellen. Nach Transfektion der Zellen mit einem eGFP-Gen wurden sie erneut aufgereinigt. Hier zeigte sich, dass durch die Verringerung der Analysenfrequenz auf einen Anreicherungsschritt verzichtet werden konnte. Nach Transplantation der Zellen in Empfängermäuse konnten diese in dem nekrotischen Gewebe des Herzmuskels lokalisiert werden. Für weitere Informationen sei auf die laufende Dissertation von D. Kotlarz (MH-Hannover) verwiesen.

In-vitro-Testung neuartiger Wirkstoffe

Zunächst wurde ein etablierter In-vitro-Toxizitätstest erweitert, so dass es möglich war, die Reaktion der Zellen auf die Testsubstanzen in zeitlicher Abhängigkeit zu überwachen. Hierbei zeigte sich, dass bereits die Vorkultur der Zellen einen starken Einfluss auf das Messergebnis haben konnte; dementsprechend wurde auf den Einsatz von Antibiotika verzichtet. Mithilfe des Resazurin-Tests war es möglich, die Wirkung der eingesetzten Wirkstoffe detaillierter zu untersuchen. Die sonst übliche Anwendung des Resazurin-Tests trifft lediglich Aussagen über die Viabilität der Zellen. Durch die kinetische Messung konnte die Vitalität der Zellen untersucht werden. Eine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Zellkulturen ergab, dass Zellen gleicher Herkunft eine ungleiche Antwort auf die Testsubstanzen zeigten; eine Vorhersage der zu erwartenden Inhibierung bei gegebener Herkunft eines Tumors bzw. Zelllinie konnte nicht getroffen werden.

Weiteren Aufschluss über die Wirkungsweise der Testsubstanzen haben, nach Feststellung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung, durchflusszytometrische Messungen des Zellzyklus und des Apoptose/Nekrose-Verhältnis gegeben. Die Zellzyklus Messungen haben gezeigt, dass Ratjadon und Callystatin eine G₁-Phasen Arretierung auf die Zellen bewirken, wohingegen JJ34 die Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus arretiert. Dieses Phänomen ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Zellen bei vorliegender Schädigung den Zellzyklus an den Restriktionspunkten in der G₁- und G₂-Phase stoppen können. Es hat sich gezeigt, dass die Wirkstoffe mit der höchsten Wirksamkeit (Ratjadon, JJ34) ein Apoptose-auslösendes Poten-

tial aufweisen. Die Apoptose-Messungen zeigten in jeder Probe nur kleine Anteile an apoptotischen Zellen. Dies ist auf die geringe Sensitivität des Annexin V-Tests zurückzuführen. Um eine Quantifizierung vornehmen zu können, müssten mehrere Tests auf apoptotische Zellen in Abhängigkeit von der Zeit durchgeführt werden.

Entwicklung eines online Messsystems für Microcarrier-Kultivierungen

Die Untersuchung von großen Partikeln ist bereits gängige Praxis in der durchflusszytometrischen Analytik. Bisher beschränkte sich diese Methode jedoch auf die Messung von zellfreien Partikeln und pflanzlichen Protoplasten. Durch die Verwendung eines FACS mit einem Düsendurchmesser von 400 μm war es möglich, zellbewachsene Microcarrier durchflusszytometrisch zu untersuchen. Weitere Versuche zur Abschätzung des Bedeckungsgrades wurden mit dem In-situ-Mikroskop durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Microcarrier in Spinnerflaschen mit der Modellzelllinie NIH-3T3 besiedelt und deren Wachstumsverhalten über einen Zeitraum von 6 d beobachtet. Es hat sich gezeigt, dass unterschiedliche Faktoren für die erfolgreiche Kultivierung von Säugerzellen auf Microcarriern verantwortlich sind. Mit einer hohen Plattierungseffizienz und einer hohen Zelldichte am sechsten Tag der Kultivierung haben sich die Glas-Microcarrier als ideal für die Säugerzellkultivierung erwiesen. Für die folgenden Analysen waren diese Microcarrier jedoch nicht geeignet, da sie für das FACS einen zu großen maximalen Durchmesser aufwiesen und die mikroskopische Beurteilung des Bedeckungsgrades durch einen ausgeprägten Linseneffekt störten.

Durch die Wahl der PMMA-Microcarrier war es möglich, den Bedeckungsgrad der Microcarrier anhand des Streulicht/Fluoreszenzlicht-Verhältnis durchflusszytometrisch zu bestimmen. In dem resultierenden Dotplot konnten vier Populationen identifiziert werden, drei Populationen die eine ansteigende Fluoreszenzintensität zeigten, die mit der Zelldichte auf den Microcarriern korrelierte; die vierte Population umfasste die in Suspension befindlichen Einzelzellen und Zellcluster. Während der Kultivierung zeigte sich eine Zunahme des Anteils an maximal bewachsenen Microcarriern bis zum fünften Tag der Kultivierung. Ab dem fünften Tag nahm der Anteil an Einzelzellen bzw. Zellclustern zu. Dies war auf die verstärkte Ablösung der Zellen von den Microcarriern zurückzuführen, was durch die mikroskopischen Aufnahmen bestätigt wurde. Mithilfe dieser Methode konnte der Bedeckungsgrad schnell und reproduzierbar bestimmt werden. Eine quantitative Aussage über die Anzahl der Zellen pro Microcarrier konnte nicht gemacht werden, da bei Durchtritt des Microcarrier die darauf befindlichen Zellen nur von einer Seite vom Laser bestrahlt wurden und somit nicht von jeder Zelle die gleiche Fluoreszenzintensität ausging.

Die Analyse mittels In-situ-Mikroskop hatte gezeigt, dass die Cytodex 1-Microcarrier für eine mikroskopische Beobachtung besonders gut geeignet waren. Die Polydextrinmatrix weist durch ihre geringe optische Dichte ein hohes Maß an Transparenz auf, was die Fokussierung jeder Ebene ermöglichte. Durch die Grauwertanalyse von Phasenkontrast- und In-situ-Mikro-

skop-Aufnahmen der Kultivierung mit Cytodex 1-Microcarrier konnte eine Einschätzung des Bedeckungsgrades vorgenommen werden. Dazu wurden die Microcarrier in den Aufnahmen isoliert und einer Grauwertanalyse unterzogen. Hier zeigte sich eine Zunahme der mittleren Grauwerte mit zunehmendem Bewuchs, was auf die Lichtstreuung an den Zellen, besonders an den Organellen/Einschlüssen zurückzuführen war. Eine Quantifizierung dieser Ergebnisse, so dass direkt auf den Bedeckungsgrad zurückgeschlossen werden kann, steht noch aus.

Ausblick

Die Entwicklung der Durchflusszytometrie wird in Zukunft von der Verfügbarkeit neuer Geräte und Fluoreszenzfarbstoffe profitieren. Neue Geräte bieten die Möglichkeit, eine größere Anzahl an Farben und mehr Zellen in kürzerer Zeit zu messen. Die Anzahl an verfügbaren Fluoreszenzfarbstoffen wird sich erweitern, so dass neue zelluläre Parameter direkt detektiert werden können. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis über die Produktexpression und den Zellzustand. Dadurch können Kultivierungsabläufe besser durchgeführt werden, was zu weiteren Optimierungen von biotechnologischen Prozessen genutzt werden kann.

A Anhang

A.1 Abbildungen

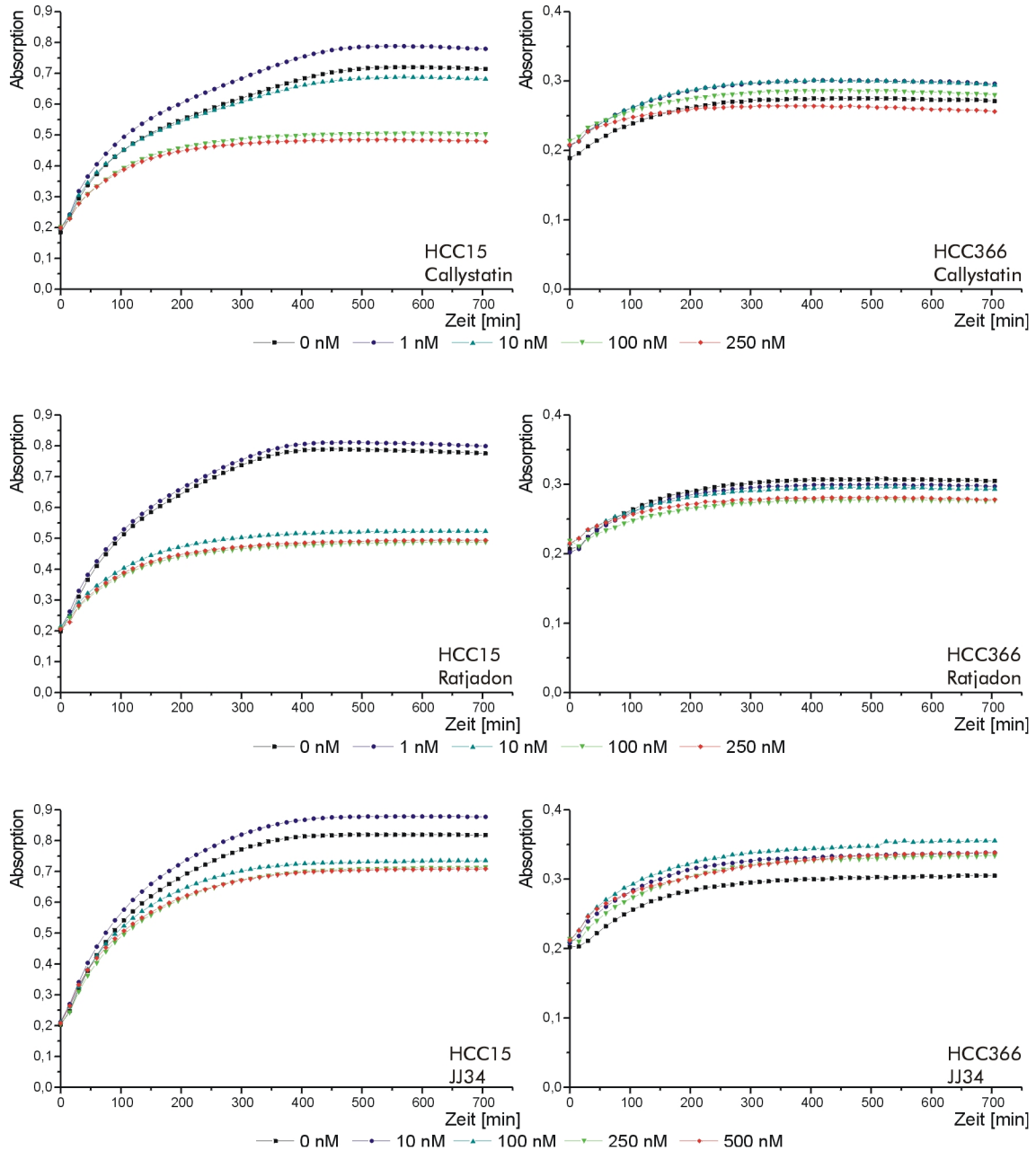


Abb. A.1: Absorptionswerte der In-vitro-Messungen der HCC15- und HCC366-Zelllinie für die drei Wirkstoffe Callystatin, Ratjadon und JJ34 bei den angegebenen Konzentrationen. Aufgetragen sind die absoluten Absorptionswerte gegen die Zeit.

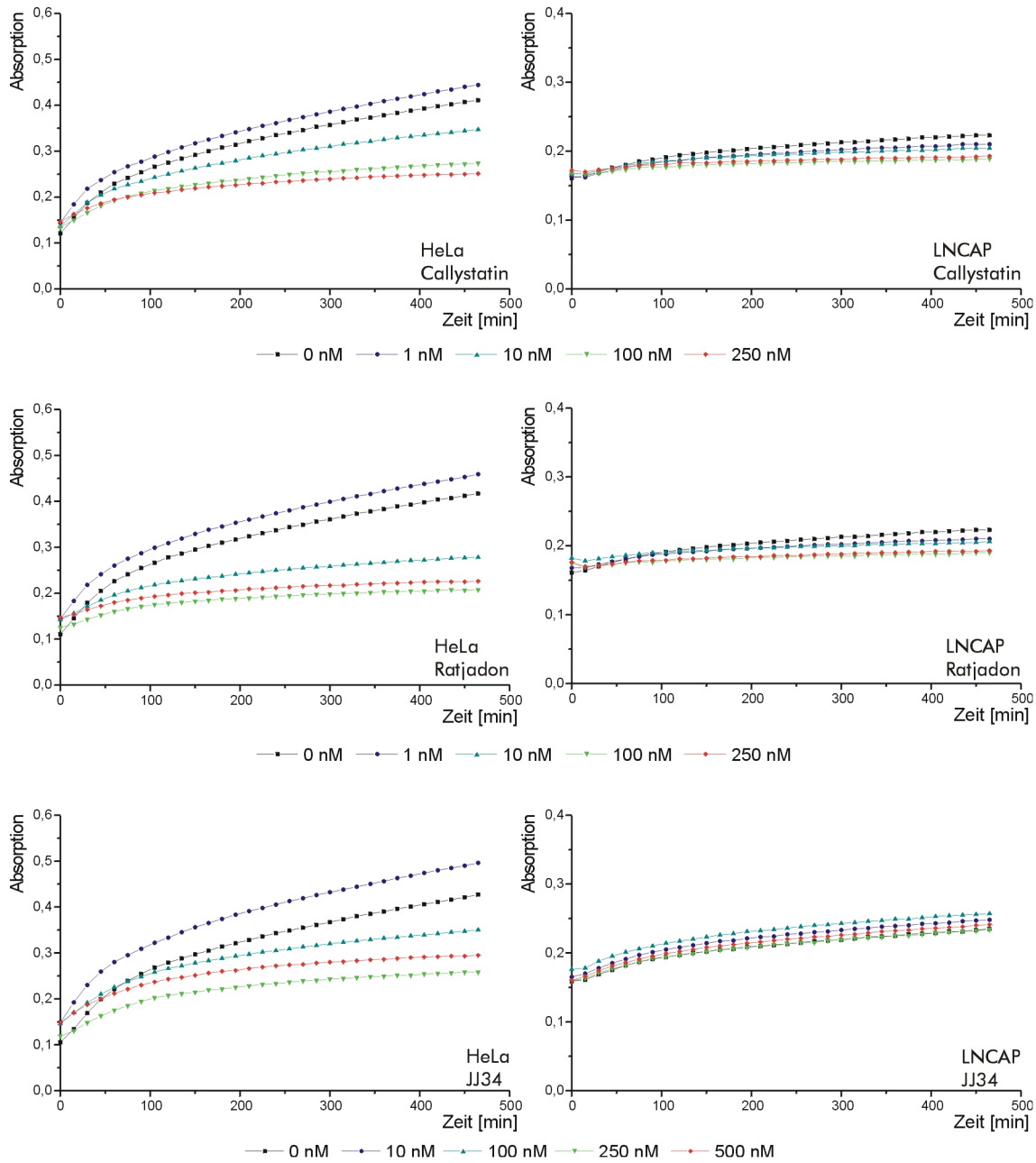


Abb. A.2: Absorptionswerte der In-vitro-Messungen der HeLa- und LNCAP-Zelllinie für die drei Wirkstoffe Callystatin, Ratjadon und JJ34 bei den angegebenen Konzentrationen. Aufgetragen sind die absoluten Absorptionswerte gegen die Zeit.

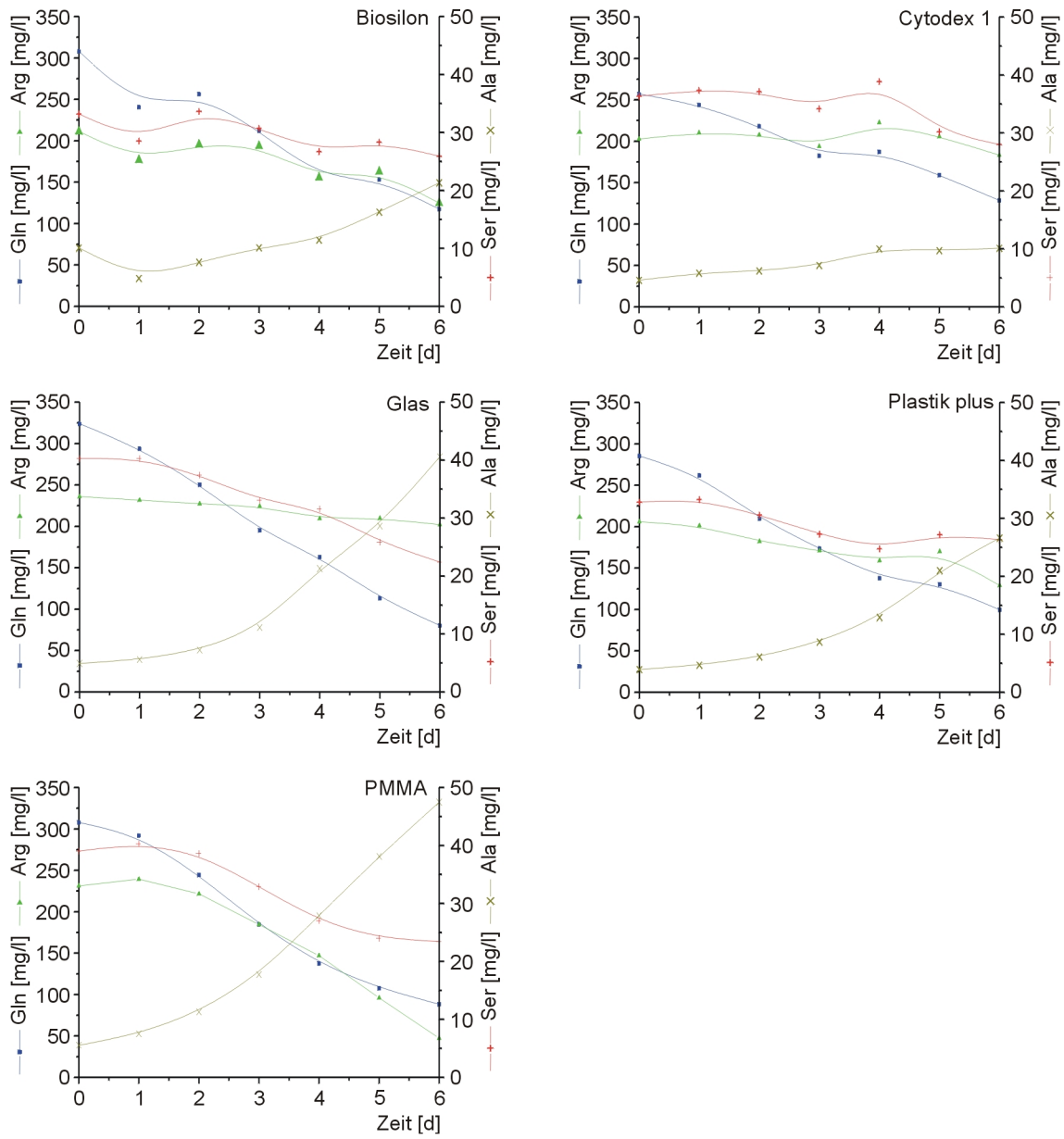


Abb. A.3: Konzentrationen der Aminosäuren Glutamin (Gln), Agrinin (Arg), Serin (Ser) und Alanin (Ala) im Medium der Microcarrier-Kultivierungen.

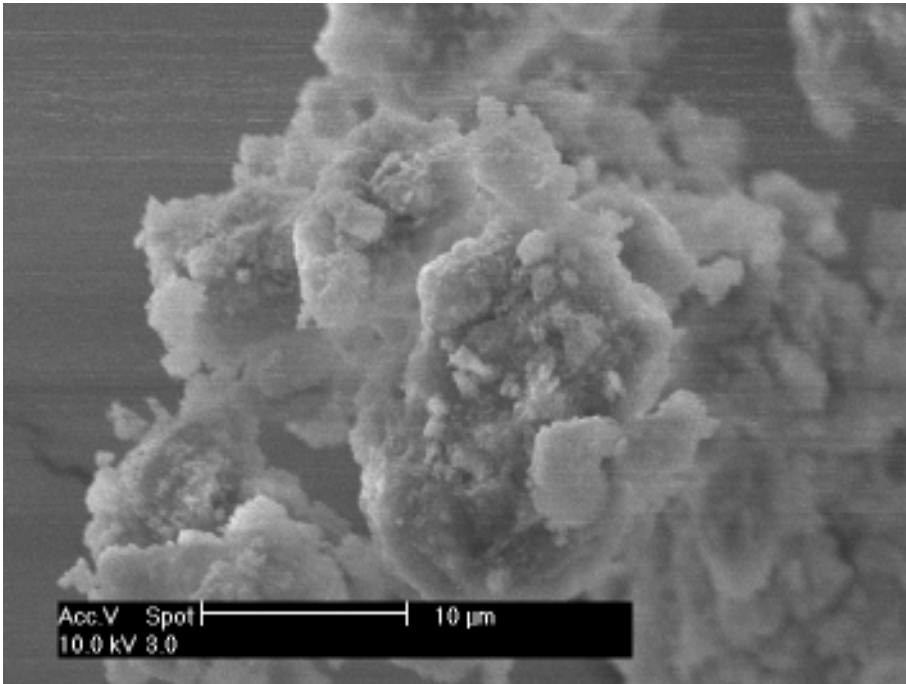


Abb. A.4: REM-Aufnahmen von normalem Sorbacid 701

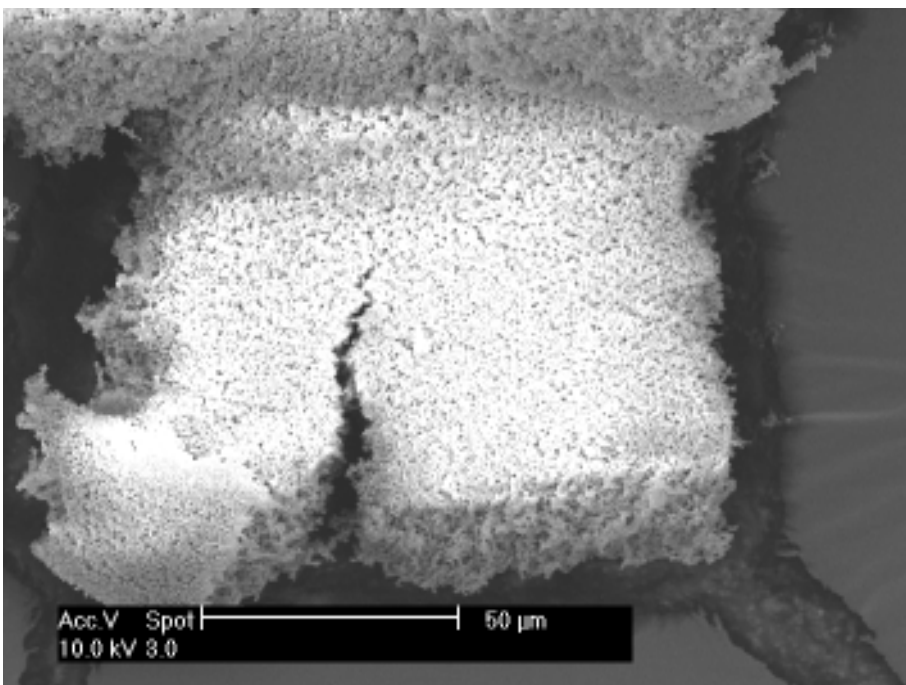


Abb. A.5: REM-Aufnahmen von normalem HT-Granulat

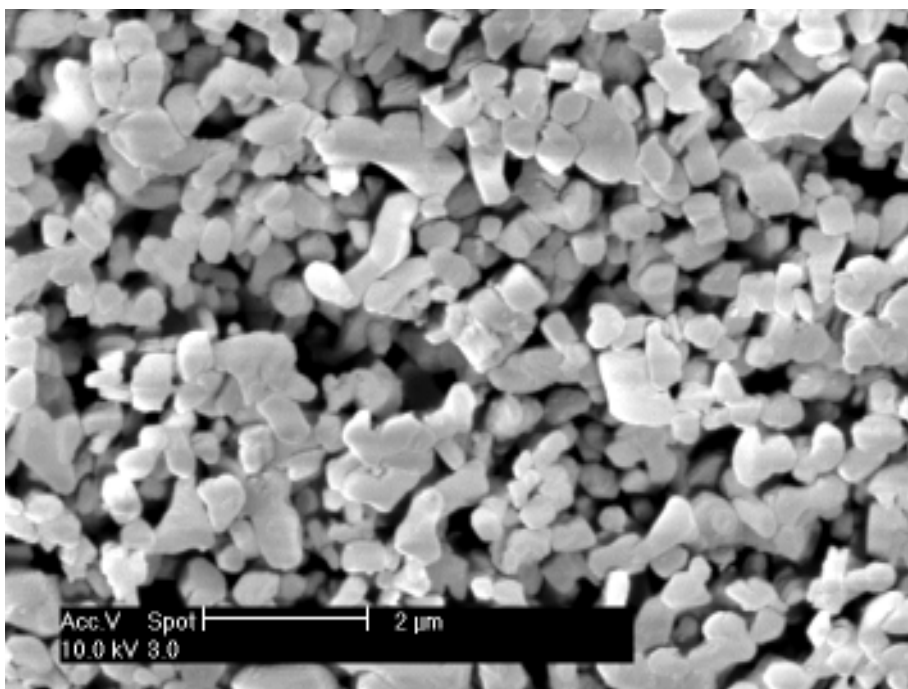


Abb. A.6: REM-Aufnahmen von normalem HT-Granulat

A.2 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika/Antibiotikum
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AM	Acetoxymethylester
Bp	Basenpaare
BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und-6)-carboxyfluorescein-acetoxymethylester
BODIPY	4,4-difluoro-1,3,5,7,8-pentamethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
CFDA	Carboxyfluoresceindiacetat
CFDA-AM	Carboxyfluoresceindiacetat-acetoxymethylester
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol, Dihydrochlorid
DiOC ₆ (3)	3,3'-dihexyloxacarbocyanin-iodid
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz aktivierender Zellsortierer (fluorescence activated cell sorter)
FDA	Fluorescein-diacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLX	Fluoreszenzkanal X (im Durchflusszytometer)
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scattering)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfon Säure]
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration
l	Liter
M	molar
MACS	Magnetisch aktivierter Zellsortierer (magnetic activated cell sorter)
MCE	Mercaptoethanol
MeOH	Methanol
mRNA	messenger RNA
N. A.	nicht angegeben
n. n.	nicht nachweisbar
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid

NaOH	Natronlauge/Natriumhydroxid
NKS	Serum neugeborener Kälber
OPA	Ortho-Phthaldialdehyd
PBS	wässriger Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PI	Propidiumiodid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PS	Polystyrol
QY	Quantenausbeute (für Fluoreszenzfarbstoffe) (quantum yield)
REM	Raster-Elektronenmikroskop
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Säugerzell-Medium)
RT	Raumtemperatur
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scattering)
TAMRA,SE	Carboxytetramethylrhodamin,Succinimidyl-Ester
min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
ün	über Nacht
X·g	Xfache Erdbeschleunigung

Für Längen-, Massen-, Stoffmengen- und Zeitangaben werden SI-Einheiten verwendet sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

A.3 Geräte

Gerät	Hersteller	Ort
6-Loch-Platten	TPP	Schweiz
96-Loch-Platten Nunclon	Nunc	Dänemark
Analysenwaage Analytic AC 210 S	Sartorius	Göttingen
autoMACS	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach
Bildbearbeitungssoftware Photopaint v8.369	Corel	Unterschleißheim
Cryoröhrchen (1,5 ml)	Nalgene	USA
Deckgläser (20·20 mm)	Menzel-Gläser	Braunschweig
Handi-Freeze	Taylor Wharton	USA
Microplate Reader Benchmark	Bio-Rad	München
Mikroskop BX-41	Olympus	Hamburg
Mikroskop IX-50	Olympus	Hamburg
Mikroskop-Digitalkamera C-4040	Olympus	Hamburg
Mikroskopsoftware DP-Soft v3.2 (Build 809)	Olympus	Hamburg
Nylonsieb Nitex 03-80/29	Sefar	Schweiz
Objektträger SuperFrost (76·26 mm)	Menzel-Gläser	Braunschweig
pH-Meter 605	Metrohm	Schweiz
Roller Bottles 800 cm ²	In Vitro	USA
Sterilfilter Bottle Top Filter	Nalgene	USA
Vortex Mixer VM300	Gemmy Industrial	Taiwan
Zellkulturflaschen	Corning Inc.	USA
Zentrifuge 5415C	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3S	Heraeus	
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	TPP	Schweiz
Zytometerröhrchen (5 ml)	Falcon	USA
Kultivierung oszillierende Hefe		
Abgasanalytik EGAS 2	Hartmann & Braun	Frankfurt
BioView	Delta Light and Optics	Dänemark
Edelstahlreaktor (2 l)	Eigenbau IFTC	Hannover
In situ Mikroskop III-P	Texys	Hannover
pH-Elektrode FemProbe T635	Broadley & James	USA
Sauerstoffelektrode Inpro 6000	Mettler-Toledo	USA
Steuereinheit Biostat B	B. Braun Biotech	Melsungen
Thermoelement Pt-100	B. Braun Biotech	Melsungen
Kultivierung Microcarrier		

Bio-TEM v8.22	Thomas Müller-Wirts	Hannover
BioMass Monitor	Aber Instruments	England
Edelstahlreaktor (5 l)	Eigenbau IFTC	Hannover
In situ Mikroskop III-T	Texys	Hannover
pH-Elektrode Polyclave 225	Hamilton	Schweiz
Sauerstoffelektrode 341003046	Mettler-Toledo	USA
Steuereinheit Biostat B	B. Braun Biotech	Melsungen
Thermoelement Pt-100	B. Braun Biotech	Melsungen

Aminosäuren-HPLC

Pumpe LCP4100	Techlab	
Fluoreszenzdetektor RF-10AxL	Shimadzu	
Autosampler	Triathlon von Spark	
3-Kanal Degasser	Sykam	
Säulenofen T-1	Techlab	
Datensystem Andromedar	DataApex Ltd.	
Säule	Waters Resolve C18, 5 µm, 3,9·150 mm	

Laufbedingungen

Flussrate	1 ml·min ⁻¹
Temperatur	30 °C
Detektion	Ex: 330 nm, Em: 420 nm

Gradient

0 min	100 % Eluent-A
50 min	100 % Eluent-B
55 min	100 % Eluent-B
60 min	100 % Eluent-A
67 min	100 % Eluent-A

Zytometer		Hersteller	Ort
Epics-XL MCL		Beckmann-Coulter	Krefeld
Software System-II		Beckmann-Coulter	Krefeld
<i>LASER</i>	<i>Wellenlänge [nm]</i>	<i>max. Leistung</i>	<i>Hersteller</i>
Argon	488	15 mW	Coherent, USA
<i>Filter</i>			
FL1	550DL <550 nm		
	525BP 505–545 nm		
FL2	600DL 555–600 nm		

575BP 560–590 nm
 FL3 620BP 605–635 nm
 DL: dichroitischer Teilerspiegel, BP: Bandpass-Filter

FACS

FACS VantageSE

Software Cell Quest Pro v3.5

Hersteller

BD Biosciences

BD Biosciences

Ort

Heidelberg

Heidelberg

*LASER**Wellenlängen [nm]**max. Leistung**Hersteller*

Enterprise II, Argon 351–364 (MLUV), 488

MLUV: 60 mW

Coherent, USA

Filter

FL1

560DL

530BP 515–545 nm

FL2

585BP 564–606 nm

FL3

610DL

695BP 675–715 nm

FL4

Split Mirror

424BP 402–446 nm

DL: dichroitischer Teilerspiegel, BP: Bandpass-Filter

A.4 Reagenzien

Material	Hersteller	Ort
Align Flow, Partikel für UV Anregung	MoBiTec	Göttingen
Amphotericin B	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Apoptose Detektions Kip	Roche Diagnostics	Mannheim
Biosilon	Nunc	Dänemark
BODIPY 493/503	MoBiTec	Göttingen
Cali-Brite Beads	BD Biosciences	Heidelberg
Crimp-Septen	Chromacol	USA
Cytodex 1	Amersham-Biosciences	Freiburg
DAPI	MoBiTec	Göttingen
DMEM Medium Pulver	Gibco	Österreich
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
FITC	Fluka	Deisenhofen
Glas Microcarrier	Cellon S.A.	Luxemburg
Hoechst 33342	MoBiTec	Göttingen
Immersionsöl	Olympus	Hamburg
Plastic plus Microcarrier	Cellon S.A.	Luxemburg
PMMA-Microspheres	Bangs Laboratories, Inc.	USA
Poly-L-Lysin ($\geq 70\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Fluka	Schweiz
Polybead Polystyrene-microspheres	Polyscience	USA
Polystyrol Partikel	Polyscience	Eppelheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Proteinase K	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
RPMI-1640 Medium Pulver, ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Resazurin, Natriumsalz	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Serum neugeborener Kälber	PAA	Österreich
Sytox Grün	MoBiTec	Göttingen
Triton X	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Trypsin, 10fach Lösung mit EDTA	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Antikörper		
Lineage cell depletion kit	Miltenyi Biotech	Bergisch Gladbach
FITC-konjugierter CD117 (c-kit) Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg
PE-konjugierter Ly-6A/E (sca-1) Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg

A.4.1 Medien und Puffer

Einfriermedium

Zum einfrieren der Zellen im flüssigen Stickstoff wurde jeweils das Kulturmedium mit 10 % DMSO versetzt.

PBS (154mM, pH 7,2-7,3)

7,9 g NaCl

0,4 g EDTA

0,4 g KCl

0,2 g KH_2PO_4

1,9 g Na_2HPO_4

in 1000 ml bidest. H_2O

DMEM, $4,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose (pH $\geq 7,2$)

13,53 g DME-Pulver

3,70 g Na_2CO_3

in 1000 ml bidest. H_2O

1N HCl und 1N NaOH zur pH-Wert Einstellung

RPMI-1640, $2,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ Glucose (pH $\geq 7,2$)

2,0 g Na_2CO_3

in 1000 ml bidest. H_2O

1N HCl und 1N NaOH zur pH-Wert Einstellung

TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris-HCl

1 mM Na_4 -EDTA

TAE-Puffer (50fach)

242,0 g Tris

57,1 ml konz. Essigsäure (99 %)

100,0 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

in 1000 ml bidest. H_2O

OPA-Reagenz

270,0 mg Ortho-Phthaldialdehyd (OPA)

200,0 μl Mercaptoethanol (MCE)

mit 0,4 M Boratpuffer (pH 9,5) auf 50 ml auffüllen

Eluent-A

13,6 g Natriumacetat-Trihydrat

12,0 g Natriumdihydrogenphosphat (wasserfrei)

in ca. 2 l H₂O lösen, 5 ml 10 M NaOH zugeben und mit der NaOH auf pH 7 einstellen,
auf 2 l auffüllen

42,0 ml THF

42,0 ml MeOH

Eluent-B

920 ml H₂O

1080 ml MeOH

Literaturverzeichnis

- [1] AARONSON, S. A. ; TODARO, G. J.: Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40. In: *Journal of Cellular Physiology* 72 (1968), Nr. 2, S. 141–148. – 3T3 Referenz
- [2] Kap. 17. Der Zellteilungszyklus, In: ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J. D.: *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage. VCH, 1995, S. 1018–1076
- [3] Kap. 4. Methoden der Zellforschung, In: ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J. D.: *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage. VCH, 1995, S. 161–222
- [4] Kap. 18. Die Mechanik der Zellteilung, In: ALBERTS, B. ; BRAY, D. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K. ; WATSON, J. D.: *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage. VCH, 1995, S. 1077–1118
- [5] ANDERSON, K. ; R., Wilkinson ; H., Grant M.: Assessment of liver function in primary cultures of hepatocytes using diethoxy(5,6)chloromethylfluorescein and confocal laser scanning microscopy. In: *The International Journal of Artificial Organs* 21 (1998), Nr. 6, S. 360–364
- [6] ARNDT-JOVIN, D. J. ; JOVIN, T. M.: Analysis and sorting of living cells according to desoxyribonucleic acid content. In: *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 25 (1977), Nr. 7, S. 585–589. – Hoechst 33342 Referenz
- [7] BARTOWIAK, D. ; HÖGNER, S. ; BAUST, H. ; NOTHDURFT, W. ; RÖTTINGER, E. M.: Comparative analysis of apoptosis in HL60 detected by annexin-V and fluorescein-diacetate. In: *Cytometry* 37 (1999), S. 191–196
- [8] BELTRAMI, A. P. ; URBANEK, K. ; KAJSTURA, J. ; YAN, S. M. ; FINATO, N. ; BUSSANI, B. ; SILVESTRI, F. ; LERI, A. ; BELTRAMI, C. A. ; ANVERSA, P.: Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. In: *New England Journal of Medicine* 344 (2001), S. 1750–1757
- [9] BHATT, U. ; CHRISTMANN, M. ; QUITSCHALLE, M. ; KALESSE, M.: The first total synthesis of (+)-Ratjadone. In: *Journal of Organic Chemistry* 66 (2001), Nr. 5, S. 1885–1893
- [10] BISSWANGER, H.: *Enzymkinetik*. 3. Auflage. Wiley-VCH, 2000

- [11] BITTNER, C. ; WEHNERT, G. ; SCHEPER, T.: In situ microscopy for on-line determination of biomass. In: *Biotechnology and Bioengineering* 60 (1998), Nr. 1, S. 24–35
- [12] BORTNER, C. D. ; CIDLOWSKI, J. A.: Flow cytometric analysis of cell shrinkage and monovalent ions during apoptosis. In: SCHWARTZ, L. M. (Hrsg.) ; ASHWELL, J. D. (Hrsg.): *Methods in Cell Biology - Apoptosis* Bd. 66. Academic Press, 2001, Kapitel 3, S. 49–67
- [13] BORYSENKO, J. Z. ; WOODS, W.: Density, distribution and mobility of surface anions on a normal/transformed cell pair. In: *Experimental Cell Research* 118 (1979), Nr. 2, S. 215–227
- [14] BURCHIEL, S. W. ; EDWARDS, B. S. ; KUCKUCK, F. W. ; LAUER, F. T. ; PROSSNITZ, E. R. ; RANSOM, J. T. ; SKLAR, L. A.: Analysis of free intracellular calcium by flow cytometry: Multiparameter and pharmacologic applications. In: *Methods* 21 (2000), S. 221–230
- [15] BURZLAFF, A. ; KALESSE, M. ; KASPER, C. ; SCHEPER, T.: Multi parameter in vitro testing of Ratjadone using flow cytometry. In: *Journal of applied Microbiology and Biotechnology* 62 (2003), S. 174–179
- [16] BURZLAFF, A. ; KASPER, C. ; SCHEPER, T. ; KALESSE, M. ; BHATT, U. ; KHANDAVALLI, C. ; ECKHARD, K. ; CHRISTMANN, M. ; QUITSCHALLE, M. ; BEIL, W. *Ratjadon-Derivate zum Hemmen des Zellwachstums*. Europäisches Patent EP0200817. 05.11.03
- [17] BURZLAFF, A. ; KASPER, C. ; SCHEPER, T. ; KALESSE, M. ; BHATT, U. ; KHANDAVALLI, C. ; ECKHARD, K. ; CHRISTMANN, M. ; QUITSCHALLE, M. ; BEIL, W. *Ratjadon-Derivate zum Hemmen des Zellwachstums*. Deutsches Patent DE10106647A. 22.08.02
- [18] CAVANI, F. ; TRIFIRÓ, F. ; VACCARI, A.: Hydrotalcite-type anionic clays: Preparation, properties and applications. In: *Catalysis Today* 11 (1991), S. 172
- [19] CIOSSEK, T. ; FETZER, J.: MTS-Anlage zur Identifizierung cytotoxischer Wirkstoffkandidaten. In: *Biospektrum* 2 (2004), S. 207–209
- [20] DANIEL, D. ; SUSAL, C. ; KOPP, B. ; OPELZ, G. ; TERNESS, P.: Apoptosis-mediated selective killing of malignant cells by cardiac steroids: Maintenance of cytotoxicity and loss of cardiac activity of chemically modified derivatives. In: *International Immunopharmacology* 3 (2003), Nr. 13-14, S. 1791–1801
- [21] DARZYNKIEWICZ, Z. ; JUAN, G. ; LI, X. ; GORCZYCA, W. ; MURAKAMI, T. ; TRAGANOS, F.: Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). In: *Cytometry* 27 (1997), S. 1–20

- [22] DEL BINO, G. ; DARZYNKIEWICZ, Z. ; DEGRAEF, C. ; MOSSELMANS, R. ; FOKAN, D. ; GALAND, P.: Comparison of methods based on annexin-V binding, DNA content or TUNEL for evaluation cell death in HL-60 and adherent MCF-7 cells. In: *Cell Proliferation* 32 (1999), S. 25–37
- [23] DUCOMMUN, P. ; KADOURI, A. ; VON STOCKAR, U. ; MARISON, I. W.: On-line determination of animal cell concentration in two industrial high-density culture processes by dielectric spectroscopy. In: *Biotechnology and Bioengineering* 77 (2002), Nr. 3, S. 316–323
- [24] ELLIOTT, S. G. ; MCCLAUGHLIN, C. S.: The yeast cell cycle: Coordination of growth and division rates. In: *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 28 (1983), S. 143–176
- [25] FASMAN, G. D.: *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. 3. Auflage. CRC Press, 1976
- [26] FRERICHS, J.-G.: *Entwicklung eines In-situ Mikroskops zur bildgestützten Online-Überwachung von Bioprozessen*, Universität Hannover - Technische Chemie, Diss., 2000
- [27] FREY, T.: Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. In: *Cytometry* 28 (1997), S. 253–263
- [28] GERTH, K. ; SCHUMMER, D. ; HÖFLE, G. ; IRSCHIK, H. ; REICHENBACH, H.: Ratjadon: A new antifungal compound from *sorangium cellulorum* (Myxobacteria) production, physico-chemical and biological properties. In: *The Journal of Antibiotics* 48 (1995), Nr. 9, S. 973–976
- [29] GIBAS, Z. ; BECHER, R. ; KAWINSKI, E. ; HOROSZEWICZ, J.: A high-resolution study of chromosome changes in a human prostatic carcinoma cell line (LNCaP). In: *Cancer Genetics and Cytogenetics* 11 (1984), S. 399–404
- [30] GIRARD, L. ; ZÖCHBAUER-MÜLLER, S. ; VIRMANI, A. K. ; GAZDAR, A. F. ; MINNA, J. D.: Genome-wide allelotyping of lung cancer identifies new regions of allelic loss differences between small cell lung cancer and non-small cell lung cancer, and loci clustering. In: *Cancer Research* 60 (2000), S. 4894–4906. – HCC 15, HCC 366 Referenz
- [31] GOCZE, P. M. ; FREEMAN, D. A.: Factors underlying the variability of lipid droplet fluorescence in MA-10 leydig tumor cells. In: *Cytometry* 17 (1994), S. 151–158. – BODIPY Referenz

- [32] GOFFEAU, A. ; BARRELL, B. G. ; BUSSEY, H. ; DAVIS, R. W. ; DUJON, B. ; FELDMANN, H. ; GALIBERT, F. ; HOHEISEL, J. D. ; JACQ, C. ; JOHNSTON, M. ; LOUIS, E. J. ; MEWES, H. W. ; MURAKAMI, Y. ; PHILIPPSEN, P. ; TETTELIN, H. ; OLIVER, S. G.: Life with 6000 genes. In: *Science* 274 (1997), Nr. 5303, S. 1051–1052
- [33] GREEN, D. R. ; REED, J. C.: Mitochondria and apoptosis. In: *Science* 281 (1998), S. 1309–1312
- [34] GREENSPAN, P. ; FOWLER, S. D.: Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red. In: *Journal of Lipid Research* 26 (1985), S. 781–789. – Nil Rot Referenz
- [35] GRINNELL, F.: Cellular adhesiveness and extracellular substrata. In: *International Review of Cytology* 53 (1978), S. 65–144
- [36] GRUNDLER, W. ; DIRSCHERL, P. ; BEISKER, W. ; MARX, K. ; STAMPFL, A. ; MAIER, K. ; ZIMMERMANN, I. ; NÜSSE, M.: Early functional apoptotic responses of thymocytes induced by tri-n-butyltin. In: *Cytometry* 44 (2001), S. 45–56
- [37] GÖTTLINGER, C. ; MECHTHOLD, B. ; RADBRUCH, A.: Operation of a flow cytometer. In: RADBRUCH, A. (Hrsg.): *Flow Cytometry and Cell Sorting*, Springer, 2000, S. 3–25
- [38] GUIBAULT, G. G.: *Practical Fluorescence: Theory, Methods, and Techniques*. Dekker, 1973
- [39] HABERS, E.: *Nucleinsäuren: Biochemie und Funktionen*. 2. Auflage. Thieme, 1975
- [40] HANTELMANN, K.: *laufende Dissertation*, Universität Hannover, Diss., 2004
- [41] HAUGLAND, R. P.: Detecting enzymatic activity in cells using fluorogenic substrates. In: *Biotechnic and Histochemistry* 70 (1995), Nr. 5, S. 243–251
- [42] HEYNDRIKX, G. R. ; BAIG, H. ; NELLENS, P. ; LEUSEN, I. ; FISHBEIN, M. C. ; VATNER, S. F.: Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. In: *The American journal of physiology* 234 (1978), S. 653–659
- [43] HIRTENSTEIN, H. ; CLARK, J. ; LINDGREN, G. ; VRETBLAD, P.: Microcarriers for animal cell culture: A brief review of theory and practice. In: KARGER, S. (Hrsg.): *3rd General Meeting of ESACT* Bd. 46, 1979, S. 109–116
- [44] HO, A. *Faszinierende Multitalente-„Rohstoff“ Stammzellen?*
http://www.uni-heidelberg.de/presse/ruca/ruca3_2001/multitalente.html. März 2001
- [45] HO, K. K. ; ANDERSON, K. M. ; KANNEL, W. B. ; GROSSMAN, W. ; LEVY, D.: Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham heart study subjects. In: *Circulation* 88 (1993), S. 107–115

- [46] HOLLEMAN, A. F. ; WIBERG, E.: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 91.-100. Auflage. de Gruyter, 1985
- [47] ISHAQUE, A. ; AL-RUBEAI, M.: Use of intracellular pH and annexin-V flow cytometric assays to monitor apoptosis and its suppression by bcl-2 over-expression in hybridoma cell culture. In: *Journal of Immunological Methods* 221 (1998), S. 43–57
- [48] JACOBSON, B. S. ; BRANTON, D.: Plasma membrane: Rapid isolation and exposure of the cytoplasmic surface by use of positively charged beads. In: *Science* 195 (1977), S. 302–304
- [49] JIANMIN, Z. ; HONGFANG, W. ; MEIFU, F.: Resistance of multicellular aggregates to pharmorubicin observed in human hepatocarcinoma cells. In: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35 (2002), S. 255–260
- [50] JOERIS, K. ; FRERICHS, J.-G. ; KONSTANTINOV, K. ; SCHEPER, T.: In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell culture. In: *Cytotechnology* 38 (2002), S. 129–134
- [51] KACHEL, V. ; FELLNER-FELDEGG, H. ; MENKE, E.: Hydrodynamic properties of flow cytometry instruments. In: MELAMED, M. R. (Hrsg.) ; LINDMO, T. (Hrsg.) ; MENDELSON, M. L. (Hrsg.): *Flow cytometry and sorting*, John Wiley and Sons, 1990, S. 27–44
- [52] KALESSE, M. ; CHARY, K. P. ; QUITSCHALLE, M. ; BURZLAFF, A. ; KASPER, C. ; SCHEPER, T.: The total synthesis of (-)-Callystatin A. In: *Chemistry* 9 (2003), Nr. 5, S. 1129–1136
- [53] KALESSE, M. ; CHRISTMANN, M. ; BHATT, U. ; QUITSCHALLE, M. ; CLAUS, E. ; SAEED, A. ; BURZLAFF, A. ; KASPER, C. ; HAUSTEDT, L. O. ; HOFER, E. ; SCHEPER, T. ; BEIL, W.: The chemistry and biology of ratjadone. In: *Chembiochem* 9 (2001), S. 709–714
- [54] KALESSE, M. ; QUITSCHALLE, M. ; KHANDAVALLI, C. P. ; SAEED, A.: Total synthesis of (-)-Callystatin A. In: *Organic letters* 3 (2001), Nr. 20, S. 3107–3109
- [55] KASPER, C. ; SCHEPER, T. ; BURZLAFF, A. ; BRETHAUER, S. ; JACKISCH, B.-O. *Verwendung von Schichtdoppelhydroxiden zur An- bzw. Abreicherung von Biomolekülen aus flüssigen oder fluiden Medien*. Deutsches Patent DE10237518.6. 16.08.02
- [56] KASPER, C. ; SCHEPER, T. ; BURZLAFF, A. ; BRETHAUER, S. ; JACKISCH, B.-O. *Verwendung von Schichtdoppelhydroxiden zur An- bzw. Abreicherung von Biomolekülen aus flüssigen oder fluiden Medien*. Deutsches Patent DE10237517.8. 16.08.02

- [57] KATAKURA, Y. ; ALAM, S. ; SHIRAHATA, S.: Immortalization by gene transfection. In: MATHER, J. P. (Hrsg.) ; BARNES, D. (Hrsg.): *Methods in Cell Biology* Bd. 57. Animal cell culture Methods, 1998, S. 69–91
- [58] KAUFMANN, S. H. ; MESNER JR., P. W. ; SAMEJIMA, K. ; TONÉ, S. ; EARNSHAW, W. C.: Detection of DNA cleavage in apoptotic cells. In: REED, J. C. (Hrsg.): *Methods in Enzymology* Bd. 322. Apoptosis, Academic Press, 2000
- [59] KEHAT, I. ; KENYAGIN-KARSENTI, D. ; SNIR, M. ; SEGEV, H. ; AMIT, M. ; GEPSTEIN, A. ; LIVNE, E. ; BINAH, O. ; ITSKOVITZ-ELDOR, J. ; GEPSTEIN, L.: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. In: *The Journal of clinical investigation* 108 (2001), S. 407–414
- [60] KING, M. A. ; RADICCHI-MASTROIANNI, M. A. ; WELLS, J. V.: There is substantial nuclear and cellular disintegration before detectable phosphatidylserine exposure during the camptothecin-induced apoptosis of HL-60 cells. In: *Cytometry* 40 (2000), S. 10–18
- [61] KLUG, M. G. ; SOONPAA, M. H. ; KOH, G. Y. ; FIELD, L. J.: Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells from stable intercardiac grafts. In: *The Journal of clinical investigation* 98 (1996), S. 216–224
- [62] KOBAYASHI, M. ; HIGUCHI, K. ; MURAKAMI, N. ; TAJIMA, H. ; AOKI, S.: Callystatin A, a potent cytotoxic polyketide from the marine sponge, *Callyspongia truncata*. In: *Tetrahedron Letters* 38 (1997), S. 2859–2862
- [63] KOLBER, M. A. ; QUINONES, R. R. ; GRESS, R. E. ; HENKART, P. A.: Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF). In: *Journal of Immunological Methods* 108 (1988), S. 255–264
- [64] KOLENKO, V. M. ; UZZO, R. G. ; DULIN, N. ; HAUZMAN, E. ; BUKOWSKI, R. ; FINKE, J. H.: Mechanism of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes. In: *Apoptosis* 6 (2001), S. 419–429
- [65] KOTLARZ, D.: *Entwicklung innovativer Strategien einer nicht-invasiven Gen- und Stammzelltherapie nach akutem Myokardinfarkt*, Medizinische Hochschule Hannover, Diss., in Vorbereitung
- [66] KRETZMER, G.: Industrial processes with animal cells. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (2002), S. 135–142

- [67] KUDO, N. ; MATSUMORI, N. ; TAOKA, H. ; FUJIWARA, D. ; SCHREINER, E. P. ; WOLFF, B. ; YOSHIDA, M. ; HORINOUCI, S.: Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), S. 9112–9117
- [68] KULOZIK, A. E. ; HENTZE, M. W. ; HAGEMEIERS, C. ; R., Bartram C.: *Molekulare Medizin*. 1. Auflage. Walter de Gruyter, 2000
- [69] LANGSRUD, S. ; SUNDHEIM, G.: Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. In: *Journal of Applied Bacteriology* 81 (1996), S. 411–418. – Sytox-Grün Referenz
- [70] LINDBERG, W. ; RUZICKA, J. ; CHRISTIAN, G. D.: Flow injection cytometry: A new approach for sample and solution handling in flow cytometry. In: *Cytometry* 14 (1993), S. 230–236
- [71] LINDBERG, W. ; SCAMPAVIA, L. D. ; RUZICKA, J. ; CHRISTIAN, G. D.: Fast kinetic measurements and on-line dilution by flow injection cytometry. In: *Cytometry* 16 (1994), S. 324–330
- [72] LINDMO, T. ; PETERS, D. C. ; SWEET, R. G.: Flow sorters for biological cells. In: MELAMED, M. R. (Hrsg.) ; LINDMO, T. (Hrsg.) ; MENDELSON, M. L. (Hrsg.): *Flow cytometry and sorting*, Wiley-Liss, 1990, S. 145–169
- [73] LIU, Y. ; PETERSON, D. A. ; KIMURA, H. ; SCHUBERT, D.: Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. In: *Journal of Neurochemistry* 69 (1997), Nr. 2, S. 581–593
- [74] LOPEZ-LAZZERO, M. ; PALMA DE LA PENA, N. ; MARTIN-CORDERO, C. ; NAVARRO, E. ; CORTES, F. ; AYUSO, M. J. ; TORO, M. V.: Anti-tumor activity of *Digitalis purpurea* L. subsp. *heywoodii*. In: *Planta Medica* 69 (2003), Nr. 8, S. 701–704
- [75] MACIOROWSKI, Z. ; VEILLEUX, C. ; GIBAUD, A. ; BOURGEOIS, C. A. ; KLIJANIENKO, J. ; BOENDERS, J. ; VIELH, P.: Comparison of fixation procedures for fluorescent quantification of DNA content using image cytometry. In: *Cytometry* 28 (1997), S. 123–129
- [76] MARCHEVSKY, A. ; TOLMACHOFF, T. ; LEE, S.: Quality assurance issues in DNA image cytometry. In: *Cytometry* 26 (1996), S. 101–107
- [77] MAROSE, S.: *Bioprozessanalytik mit zweidimensionaler Fluoreszenzspektroskopie*, Universität Hannover - Technische Chemie, Diss., 1999

- [78] MARTEGANI, E. ; PORRO, D. ; RANZI, B. M. ; ALBERGHINA, L.: Involvement of cell size control mechanism in the induction and maintenance of oscillations in continuous cultures of budding yeast. In: *Biotechnology and Bioengineering* 36 (1990), S. 453–459
- [79] MCCONKEY, D. J. ; NUTT, L. K.: Calcium flux measurements in apoptosis. In: SCHWARTZ, L. M. (Hrsg.) ; ASHWELL, J. D. (Hrsg.): *Methods in Cell Biology - Apoptosis* Bd. 66. Academic Press, 2001, Kapitel 10, S. 229–246
- [80] MENASCHE, P. ; HAGEGE, A. A. ; SCORSIN, M. ; POUZET, B. ; DESNOS, M. ; DUBOC, D. ; SCHWARTZ, K. ; VILUQIN, J. T. ; MAROLLEAU, J. P.: Myoblast transplantation for heart failure. In: *Lancet* 357 (2001), S. 279–280
- [81] Kap. 11. Nucleinsäurestoffwechsel, Proteinsynthese und Zellcyclus in Eukaryonten In: MICHAL, G. (Hrsg.): *Biochemical Pathways*. Spektrum Akademischer Verlag, 1999, S. 137–157
- [82] MÜNCH, T. ; SONNLEITNER, B. ; FIECHTER, A.: The decisive role of the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle behaviour for dynamic growth characterization. In: *Journal of Biotechnology* 22 (1992), S. 329–352
- [83] MÜNCH, T. ; SONNLEITNER, B. ; FIECHTER, A.: New insights into the synchronization mechanism with forced synchronous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of Biotechnology* 24 (1992), S. 299–314
- [84] MOSMANN, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. In: *Journal of Immunological Methods* 65 (1983), S. 55–63. – MTT Referenz
- [85] MURAKAMI, N. ; SUGIMOTO, M. ; KOBAYASHI, M.: Participation of the β -Hydroxyketone part for potent cytotoxicity of Calystatin A, a spongean polyketide. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 9 (2001), S. 57–67
- [86] MURAKAMI, N. ; SUGIMOTO, M. ; NAKAJIMA, T. ; KAWANISHI, M. ; TSUTSUI, Y. ; KOBAYASHI, M.: Participation of the conjugated diene part for potent cytotoxicity of calystatin A, a spongean polyketide. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 8 (2000), S. 2651–2661
- [87] O'BRIEN, J. ; WILSON, I. ; ORTON, T. ; POGNAN, F.: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. In: *European Journal of Biochemistry* 267 (2000), S. 5421–5426
- [88] OECD: OECD guideline for testing of chemicals: in vitro syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. 1994. – Forschungsbericht

- [89] OMANN, G. M. ; COPPERSMITH, W. ; FINNEY, D. A. ; SKLAR, L.: A convenient on-line device for reagent addition, sample mixing and temperature control of cell suspension in flow cytometry. In: *Cytometry* 6 (1985), S. 69–73
- [90] OMIECINSKI, C. J. ; REMMEL, R. P. ; HOSAGRAHARA, V. P.: Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. In: *Toxicological Sciences* 48 (1999), S. 151–156
- [91] ORLIC, D. ; KAJSTURA, J. ; CHIMENTI, S. ; JAKONIUK, S. M. ; LI, B. ; PICKEL, J. ; MCKAY, R. ; NADAL-GINARD, B. ; BODINE, D. M. ; LERI, A. ; ANVERSA, P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. In: *Nature* 410 (2001), S. 701–705
- [92] PFEFFER, M. A. ; BRAUNWALD, E.: Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. In: *Circulation* 46 (1995), S. 455–466
- [93] REINECKE, H. ; ZHANG, M. ; BARTOSEK, T. ; MURRY, C. E.: Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts: A study in normal and injured rat hearts. In: *Circulation* 100 (1999), S. 193–202
- [94] RENDIC, S. ; DI CARLO, F. J.: Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. In: *Drug Metabolism Reviews* 29 (1997), Nr. 1+2, S. 413–580
- [95] RINK, T. J. ; TSIEN, R. Y. ; POZZAN, T.: Cytoplasmic pH and free Mg²⁺ in lymphocytes. In: *Journal of Cell Biology* 95 (1982), Nr. 1, S. 189–196. – BCECF Referenz
- [96] ROSS, D. D. ; JONECKIS, C. C. ; ORDÓÑEZ, J. V. ; SISK, A. M. ; WU, R. K. ; HAMBURGER, R. E.: Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. In: *Cancer Research* 49 (1989), S. 3776–3782
- [97] SANFORD, K. K. ; EARLE, W. R. ; EVANS, V. J. ; WALTZ, K. ; SHANNON, J. E.: The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. In: *Journal of the national Cancer Institute* 11 (1951), S. 773–795
- [98] SCHERER, W. F. ; SYVERTON, J. T. ; GEY, G. O.: Studies on the propagation in vitro of polomyelitis viruses. In: *Journal of Experimental Medicine* 97 (1953), Nr. 5, S. 695–710. – HeLa Referenz
- [99] SCHIEDLMEIER, B. ; KLUMP, H. ; WILL, E. ; ARMAN-KALCEK, Z. ; WANG, Z. ; RIMEK, A. ; FRIEL, J. ; BAUM, C. ; OSTERTAG, W.: High-level ectopic HOXB4 expression confers a profound in vivo competitive growth advantage on human cord blood CD34+ cells, but impairs lymphomyeloid differentiation. In: *Blood* 101 (2003), S. 1759–1768

- [100] SCHMIDER, J. ; MOLTKE, L. L. ; SHADER, R. J. ; HARMATZ, J. S. ; GREENBLATT, D. J.: Extrapolating in vitro data on drug metabolism to in vivo pharmacokinetics: evaluation of the pharmacokinetic interaction between amitriptyline and fluoxetine. In: *Drug Metabolism Reviews* 31 (1999), Nr. 2, S. 545–560
- [101] SCHNEIDER, U. ; SCHWENK, H.-U. ; BORNKAMM, G.: Characterization of EBV-genome negative 'null' and 'T' cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-hodgkin lymphoma. In: *International Journal of Cancer* 19 (1977), S. 621–626. – Jurkat Referenz
- [102] SCHUMMER, D. ; GERTH, K. ; REICHENBACH, H. ; HÖFLE, G.: Ratjadone: A new antifungal metabolite from *sorangium cellulosum*. In: *Liebigs Annalen* (1995), S. 685–688
- [103] SELLERS, J. R. ; COOK, S. ; GOLDMACHER, V. S.: A cytotoxicity assay utilizing a fluorescent dye that determines accurate surviving fractions of cells. In: *Journal of Immunological Methods* 172 (1994), S. 255–264
- [104] SHAPIRO, H. M.: Flow cytometry of DNA content and other indicators for proliferation activity. In: *Archives of pathology and laboratory medicine* 113 (1989), S. 591–597
- [105] SHAPIRO, H. M.: *Practical Flow Cytometry*. 3. Auflage. Wiley-Liss, 1995
- [106] SMITH, A. B. ; BRANDT, B. M.: Total synthesis of (-)-Callystatin A. In: *Organic Letters* 3 (2001), Nr. 11, S. 1685–1688
- [107] SPAN, L. F. R. ; PENNINGS, A. H. M. ; VIERWINDEN, G. ; BOEZMAN, J. B. M. ; RAYMAKERS, R. A. P. ; WITTE, T. de: The dynamic process of apoptosis analyzed by flow cytometry using annexin V/propidium iodide and a modified in situ end labeling technique. In: *Cytometry* 47 (2002), S. 24–31
- [108] SPIELMANN, H.: In-vitro Methoden. In: MARQUARDT, H. (Hrsg.) ; SCHÄFER, S. G. (Hrsg.): *Lehrbuch der Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag, 1997, S. 814–820
- [109] STEEN, H. B.: A sample injection device for flow cytometers. In: *Cytometry* 49 (2002), S. 70–72
- [110] STROTMANN, U. J. ; BUTZ, B. ; BIAS, W.-R.: The dehydrogenase assay with resazurin: Practical performance as a monitoring system and pH-dependend toxicity of phenolic compounds. In: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25 (1993), S. 79–89
- [111] SUHR, H. ; WEHNERT, G. ; SCHNEIDER, K. ; BITTNER, C. ; SCHOLZ, T. ; GEISSLER, P. ; JÄHNE, B. ; SCHEPER, T.: In situ microscopy for on-line characterization of cell-populations in bioreactors, including cell-concentration measurements by depth from focus. In: *Biotechnology and Bioengineering* 47 (1995), S. 106–116

- [112] TAYLOR, D. A. ; ATKINS, B. Z. ; HUNGSPREUGS, P. ; JONES, T. R. ; REEDY, M. C. ; HUTCHESON, K. A. ; GLOWER, D. D. ; KRAUS, W. E.: Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. In: *Nature - Medicine* 4 (1998), S. 929–933
- [113] U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES: Guidance for Industry, Drug metabolism drug interaction studies in the drug development. 1997. – Forschungsbericht. Food and Drug Administration
- [114] U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES: Guidance for Industry, S7A Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. 2001. – Forschungsbericht. Food and Drug Administration
- [115] VALAVANIS, C. ; HU, Y. ; YANG, Y. ; OSBORNE, B. A. ; CHOUAIB, S. ; GREENE, L. ; ASHWELL, J. D. ; SCHWARTZ, L. M.: Model cell lines for the study of apoptosis in vitro. In: SCHWARTZ, L. M. (Hrsg.) ; ASHWELL, J. D. (Hrsg.): *Methods in Cell Biology - Apoptosis* Bd. 66. Academic Press, 2001, Kapitel 18, S. 417–436
- [116] VAN HEMERT, P. ; KILBURN, D. ; VAN WEZEL, A. L.: Homogenous cultivation of animal cells for the production of virus and virus products. In: *Biotechnology and Bioengineering* 11 (1969), S. 875–885
- [117] VAN WEZEL, A. L.: Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogenous culture. In: *Nature* 216 (1967), Nr. 110, S. 64–65
- [118] VAN WEZEL, A. L.: The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture. Improvement of microcarrier. In: KARGER, S. (Hrsg.): *Symposium of the standardization of cell substrates of cell substrates for the production of virus vaccines* Bd. 37, 1977, S. 143–147
- [119] VAN WEZEL, A. L. ; VANDER VELDEN-DE GROOT, C. A. M.: Large scale animal cell cultivation for production of cellular biologicals. In: *Developments in Biological Standardization* 60 (1985), S. 229–236
- [120] VERMES, I. ; HAANEN, C. ; STEFFENS-NAKKEN, H. ; REUTELINGSPERGER, C.: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. In: *Journal of Immunological Methods* 184 (1995), S. 39–51. – Annexin V Referenz
- [121] VILLA, M. V. ; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J. ; SÁNCHEZ-CAMAZANO, M.: Hydrotalcites and organo-hydrotalcites as sorbents for removing pesticides from water. In: *Journal of environmental science and health* 34 (1999), Nr. 3, S. 509–525

- [122] WARBURG, O. ; CHRISTIAN, W.: Isolation and crystallisation of enolase. In: *Biochemische Zeitschrift* 310 (1941), S. 384
- [123] WARING, M. J.: Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. In: *Journal of Molecular Biology* 13 (1965), Nr. 1, S. 269–282. – PI Referenz
- [124] WERNER, A. ; DUVAR, S. ; MÜTHING, J. ; BÜNTEMEYER, H. ; LÜNSDORF, H. ; STRAUSS, M. ; LEHMANN, J.: Cultivation of immortalized human hepatocytes HepZ an macroporous Cultispher G microcarriers. In: *Biotechnology and Bioengineering* 68 (2000), Nr. 1, S. 59–70
- [125] WESTON, S. A. ; PARISH, C. R.: New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. In: *Journal of Immunological Methods* 133 (1990), S. 87–97
- [126] WILLIAMSON, P. ; EIJNDE, S. van d. ; SCHLEGEL, R. A.: Phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic cells. In: SCHWARTZ, L. M. (Hrsg.) ; ASHWELL, J. D. (Hrsg.): *Methods in Cell Biology - Apoptosis* Bd. 66. Academic Press, 2001, Kapitel 15, S. 339–364
- [127] WOLFBEIS, O. S. ; SCHULMAN, S. G. (Hrsg.): *Fluorescence of organic natural products, in: Molecular luminescence spectroscopy methods and applications - Part 1*. Bd. 77. John Wiley and Sons, 1985
- [128] ZHAO, R. ; NATARAJAN, F.: A flow injection flow cytometry system for on-line monitoring of bioreactors. In: *Biotechnology and Bioengineering* 62 (1999), Nr. 5, S. 609–617

Lebenslauf

Persönliche Daten		Peter Arne Burzlaff geboren am 23. Januar 1973 in Lehrte
Schulbildung	1979–1983	Grundschule Lehrte
	1983–1985	Orientierungsstufe Lehrte
	1985–1993	Gymnasium Lehrte
Schulabschluss	17.05.93	Abitur (Note 2,4)
Zivildienst	1993	KiTa Roderbruch, Hannover
Studium	10/94–11/00	Studium Chemie, Universität Hannover
Studienabschluss	27.11.00	Diplom Chemiker, Titel der Arbeit: Studien zur Wirkungsweise von Ratjadon auf humane Zellen
	ab 03/01	Doktorand im Fachbereich Technische Chemie, Universität Hannover
Auslandsaufenthalt	10/98–03/99	Department of Chemistry, Cambridge University, UK Titel der Arbeit: Exploration of the conformational space of the cinchona alkaloids - A computational study