

Ex-vivo Generierung von neutrophilen Zellen zur Prävention und Therapie der Sepsis

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

vorgelegt von

Ralf Friedrich Herbold

aus

Sinsheim (Elsenz)

Bonn (Januar) 2005

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

1. Referent: Prof. Dr. C. Wandrey

2. Referent: Prof. Dr. V. Herzog

Tag der Promotion: 23. Juni 2005

Kurzfassung - Abstract

Neutrophile Granulozyten stellen das zentrale Element der angeborenen Immunität gegen mikrobielle Infektionen des Körpers dar. Ein Versagen dieses Systems führt zu systemischen Infektionen, begleitet von der lebensbedrohlichen Sepsis-Symptomatik. Im Rahmen der Arbeit wurden Strategien und Systeme für Kultivierungsprozesse zur zelltherapeutischen Prävention und Therapie der Sepsis erarbeitet. Mit dem hier entwickelten Mini-Spinner-System ist es erstmals möglich, Zelllinien und primäre Zellen unter kontrollierten Bedingungen mehrfach parallel in Volumina von 20 bis 50 mL zu kultivieren. Damit konnte ein kliniktaugliches Verfahren entwickelt werden, um ausgehend von CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut neutrophil differenzierte Zellen ex-vivo zu generieren. Dabei wurden die Zusammensetzung des Mediums, der Wachstumsfaktoren sowie relevante Umgebungsbedingungen wie Temperatur, pH- und pO₂-Wert optimiert. Bereits nach 10 Tagen Kultivierung erreichten die neutrophilen Zellen einen Anteil von > 75% der Gesamtzellpopulation. An Tag 16 konnten auch Zellen mit der charakteristischen segmentkernigen Morphologie sowie Phagozytose- und Oxidative-Burst-Funktionalität reifer neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden. Mit einem in dieser Arbeit entwickelten scale-up-fähigen Verfahren zur Vermehrung und Ausreifung der Zelllinie HL-60 können ebenfalls Zellen mit granulozytärer Funktionalität in großen Mengen und damit zu vertretbaren Kosten hergestellt werden. Die generierten Zellen sind lagerfähig womit sich dieser Ansatz besonders für die Therapie der akuten Sepsis eignet. Im ersten Schritt wurden relevante Verfahrensparameter (Medium, Supplementierung, Umgebungsparameter, Fütterung) zur Generierung von HL-60-Biomasse optimiert. Die ATRA-induzierte Reifung von HL60 erfolgt in einem Intervall von 22,5 bis 48 h und ATRA-Konzentratione von 30 bis 50µM.

Beide Verfahren zur ex-vivo Generierung von neutrophilen Granulozyten erlauben die Herstellung von neutrophilen Zelltypen zur zellbasierten Prävention und Therapie der Sepsis und stellen Alternativen zur Verwendung von Granulozytenkonzentraten aus adulten Spendern.

Neutrophil granulocytes represent the key element of native immunity against microbial infection. Failure of this system leads to a whole body infection and as a consequence thereof to life-threatening symptoms of sepsis. In this work strategies and systems were developed for cell based prevention and therapy of sepsis. The developed Mini-Spinner system allows for the first time the multi-parallel cultivation of both cell lines and primary cells under fully controlled conditions in volumes of 20 to 50 mL. Using this system a clinically applicable cultivation process for the ex-vivo generation of neutrophil granulocytes starting from hematopoietic stem and progenitor cells was developed. Medium composition, growth factor combination as well as relevant ambient conditions like temperature, pH and pO₂ were optimized. The proportion of neutrophil cell types exceeded 75% of total cell count by day 10. At day 16 cells showed the typical banded and segmented morphology as well as phagocytosis and oxidative-burst activity which are typical for mature neutrophil granulocytes. In this thesis a scalable process for the production and maturation of HL-60 cells was developed allowing cost-effective production of cells with neutrophil functionality in large quantities. This might be useful for the therapy of acute septic events as the generated cells can be stored until needed. In a first step relevant process parameters (medium, supplements, ambient parameters, feeding) were optimized for the expansion of HL-60 biomass. Maturation of HL-60 is induced using ATRA at concentrations from 30 to 50 µM during a time-span of 22.5 to 48 h.

Both processes allow the ex-vivo generation of neutrophil granulocytes for cell-based prevention and therapy of sepsis and might be reasonable alternatives for the usage of donor-granulocytes.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung - Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Verzeichnis der Abkürzungen, Symbole und Warenzeichen	XI
1 Einleitung und theoretischer Hintergrund	15
1.1 Infektionsabwehr	15
1.2 Neutrophile Granulozyten: Zentrales Element des angeborenen Immunsystems.....	16
1.3 Systemische Infektionen und Sepsis	20
1.4 Kausale Ansätze zur Sepsis-Prävention und Therapie	23
1.5 Granulopoese	26
1.6 Aspekte der klinisch relevanten Zellkultivierung	34
2 Problemstellung	43
3 Zielsetzung	47
4 Material und Methoden	49
4.1 Medien und Zusätze	49
4.2 Zellen, Zellaufreinigung	51
4.3 Handhabung von Zellen	53
4.4 Verwendete Kultursysteme	54
4.5 Analytische Methoden.....	56
4.6 Verfahrenstechnische Charakterisierungen	66
5 Der miniaturisierte Spinner (Mini-Spinner)	69
5.1 Konstruktion des Kultivierungssystems.....	70
5.2 Verfahrenstechnische Charakterisierung	72
5.3 Etablierung des Kultivierungssystems	75
5.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels.....	83
6 Voruntersuchungen	87
6.1 Anpassung an kliniktaugliche Verfahren und Reagenzien	87
6.2 Etablierung der durchflußzytometrischen Analytik.....	90

6.3	Etablierung der Zellfunktionalitätstestungen	93
7	Generierung neutrophiler Zellen aus einer myeloiden Zelllinie	97
7.1	Generierung von HL-60 Zellbiomasse	97
7.2	Funktionale Ausreifung von HL-60.....	110
7.3	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels	116
8	Neutrophile Zellen aus primären Zellen.....	119
8.1	Kultivierungsmedien.....	119
8.2	Einsatz von Hämatoopoietinen	125
8.3	Supplementierung des Mediums.....	136
8.4	Temperatur	139
8.5	pH-Wert und Gelöstsauerstoffkonzentration	141
8.6	Verfahrensweise der Kultivierung	145
8.7	Vergleich klinikrelevanter Kultur-Systeme	159
8.8	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels	162
9	Charakterisierung der aus CB-CD34⁺ ex vivo generierten Zellen	165
9.1	Proliferationsfähigkeit.....	165
9.2	Phänotypisierung	167
9.3	Funktionale Charakterisierung	173
9.4	Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels	176
10	Schlußfolgerungen und Ausblick	179
10.1	Der Mini-Spinner	179
10.2	Biotechnologische Herstellung neutrophiler Zellen	180
11	Literaturverzeichnis	185
12	Anhang.....	191
12.1	Häufig verwendete Puffersysteme.....	191
12.2	Medienzusammensetzungen	193
12.3	Reagenzien für die Produkttiterbestimmung mit ELISA.....	194
12.4	Konstruktionszeichnungen des Mini-Spinner	195
12.5	Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	197
	Danksagungen.....	203
	Lebenslauf.....	204

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Morphologie des neutrophilen Granulozyten.....	17
Abbildung 1-2:	Schematischer Verlauf des Immunstatus bei Sepsis.....	22
Abbildung 1-3:	Abfall der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut nach HDCT....	24
Abbildung 1-4:	Funktionsprinzip der EISS-Sepsistherapie.....	26
Abbildung 1-5:	Aufbau des hämatopoetischen Systems.....	28
Abbildung 1-6:	Morphologische Veränderungen während der Granulopoese.....	30
Abbildung 1-7:	Neutrophile Granula und typische Inhalte.....	31
Abbildung 1-8:	Biologisch aktive Retinoide.....	33
Abbildung 2-1:	Möglichkeiten der biotechnologischen Herstellung von neutrophilen Zellen.....	45
Abbildung 3-1:	Konzept der vorliegenden Arbeit.....	48
Abbildung 5-1:	Der Mini-Spinner und seine Integration in das cellferm pro (DASGIP) Fermentationssystem.....	71
Abbildung 5-2:	Charakterisierung des Mini-Spinners: Mischzeit t_m	73
Abbildung 5-3:	Charakterisierung des Mini-Spinners: k_a -Charakteristik.....	74
Abbildung 5-4:	Verfahrenstechnischer Vergleich des Mini-Spinners mit etablierten, statischen und gerührten Kultivierungssystemen.....	76
Abbildung 5-5:	Vergleichende Kultivierungen: Hybridoma-Zellen.....	78
Abbildung 5-6:	Vergleichende Kultivierungen: CHO-Zellen.....	79
Abbildung 5-7:	Vergleichende Kultivierungen: Expansion primärer T-Lymphozyten.....	81
Abbildung 5-8:	Durchflußzytometrische Analyse von Markerantigenen auf primären T-Lymphozyten.....	82
Abbildung 5-9:	Verlauf von pH und Gelöstsauerstoff, Begasungsparameter während vergleichender Kultivierungen primärer T-Lymphozyten.....	83
Abbildung 6-1:	Vergleich von alternativen Kryokonservierungsmedien.....	90
Abbildung 6-2:	Expression neutrophiler Differenzierungsantigene über die Zeit.....	92
Abbildung 6-3:	Durchflußzytometrischer Vergleich von FITC-E.coli-Konjugaten im Phagozytose-Test.....	94
Abbildung 6-4:	Vergleich verschiedener Matrices für den CL-basierten oxidative-burst Test.....	96
Abbildung 7-1:	Wachstum und Vitalität von HL-60 in serumhaltigen Medien.....	99
Abbildung 7-2:	Wachstum und Vitalität von HL-60 in serumfreien Medien.....	101
Abbildung 7-3:	Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration auf das Wachstum von HL-60.....	102
Abbildung 7-4:	Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum von HL-60.....	104
Abbildung 7-5:	Einfluß von Laktat auf Wachstum und Vitalität von HL-60.....	106
Abbildung 7-6:	Konzentrationsprofil von Glukose und Laktat bei satzweiser Kultivierung von HL-60.....	107
Abbildung 7-7:	Aminosäure-Konzentrationen zu Beginn und nach 96 h der satzweisen Kultivierung von HL-60.....	107
Abbildung 7-8:	Kultivierung von HL-60 in unterschiedlich supplementierten Medien (AS: Aminosäuresupplement, Vit/Lip: Vitamin/Fettsäure-Supplement)....	109
Abbildung 7-9:	Zeitabhängige Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA: Wachstum und Vitalität.....	112
Abbildung 7-10:	Zeitabhängige Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA: Phagozytosekapazität der gereiften Zellen.....	113
Abbildung 7-11:	Zeitabhängige Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA: Oxiburst-Kapazität der gereiften Zellen.....	113

Abbildung 7-12:	Einfluß des Medien-pH-Wertes auf die ATRA-induzierte Reifung von HL-60	115
Abbildung 8-1:	Vergleich von Kultivierungsmedien für die ex vivo Expansion humaner neutrophiler Zellen aus CD34 ⁺ Zellen.....	122
Abbildung 8-2:	Vergleich von Kultivierungsmedien: Expansion von neutrophilen Progenitoren.....	123
Abbildung 8-3:	Vergleich von Kultivierungsmedien über einen Zeitraum von 14 Tagen	124
Abbildung 8-4:	Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen	128
Abbildung 8-5:	Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen: Expression von Differenzierungsmarkern	129
Abbildung 8-6:	Markerexpression bei Kultivierung mit rhG-CSF oder rhGM-CSF	131
Abbildung 8-7:	Optimierung der Konzentration einer S36G Zytokin-Mischung	133
Abbildung 8-8:	Gesamtzellexpansion bei Supplementierung von IL-1 β , IL-10, IL-12 und Flt3-L zu einer Mischung von SCF und IL-3 (S3) bzw. SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (S36G)	135
Abbildung 8-9:	Expression extrazellulärer Marker bei Supplementierung von IL-1 β , IL-10, IL-12 und Flt3-L zu einer Mischung von SCF und IL-3 (S3) bzw. SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (S36G)	135
Abbildung 8-10:	Einfluß von Seren auf das Expansionsergebnis der Gesamtzellzahl	138
Abbildung 8-11:	Einfluß von Serum auf die Expression von Differenzierungsmarkern ex vivo expandierter Zellen.....	138
Abbildung 8-12:	Einfluß der Temperatur auf das Wachstum von neutrophil differenzierenden Zellen.....	140
Abbildung 8-13:	Vergleich der Expression von Markerantigenen bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen.....	141
Abbildung 8-14:	Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Gesamtzellzahl und Vitalität bei der Generierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34 ⁺ Zellen.....	143
Abbildung 8-15:	Einfluß des Medium pH-Wertes auf Gesamtzellzahl und Vitalität bei der Generierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34 ⁺ Zellen.....	145
Abbildung 8-16:	Zytokin-Stabilitäten in Medium ohne zellulären Konsumenten.....	147
Abbildung 8-17:	Endpunktbestimmung der Zytokinkonzentrationen von SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF an Tag 5 und Tag 10 nach Kultivierung.....	149
Abbildung 8-18:	Verlauf von Gesamtzellzahl und Vitalität bei satzweiser Kultivierung	151
Abbildung 8-19:	Substratverbrauch bei satzweiser Kultivierung	152
Abbildung 8-20:	Anhäufung von Metaboliten im Kulturmedium bei satzweiser Kultivierung	153
Abbildung 8-21:	Resultierende Kulturvolumina im Vergleich unterschiedlicher, diskontinuierlicher Fütterungsstrategien	154
Abbildung 8-22:	Vergleich des Zelldichteverlaufs bei verschiedenen Fütterungsstrategien (repräsentative Kurvenverläufe eines Kulturansatzes)	155
Abbildung 8-23:	Vergleich von Fütterungsstrategien: Substratverbrauch und Bildung von Laktat.....	158
Abbildung 8-24:	Vergleich klinikrelevanter Kultursysteme	161
Abbildung 9-1:	Zelldichte- und Vitalitätsverlauf bei Langzeitkultivierung	166
Abbildung 9-2:	Expression neutrophiler und monozytärer Markerantigene über einen Kultivierungszeitraum von > 40 Tagen.....	169
Abbildung 9-3:	Separation nach CD15.....	172
Abbildung 9-4:	Zellen der CD15 ⁺ -Fraktion an Tag 16 der Kultivierung.....	172
Abbildung 9-5:	Immuncytometrischer Nachweis intrazellulärer Antigene.....	175
Abbildung 9-6:	Durchflußzytometrischer Nachweis der Phagozytose-Leistung.....	175
Abbildung 9-7:	Nachweis der Oxidative-Burst-Leistung durch Chemolumineszenz.....	176

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Literaturbeschriebene Eigenschaften von Zytokinen, die in dieser Arbeit verwendet wurden	40
Tabelle 1-2:	Ausschnitt aus den wichtigsten Regularien, die klinikrelevante Kultivierung von (Stamm-) Zellen betreffend	41
Tabelle 4-1:	Verwendete Zytokine	50
Tabelle 6-1:	Expressionsmuster von Oberflächenantigenen der granulozytären Differenzierungslinie.....	91
Tabelle 6-2:	Antigenexpression weiterer Marker während der neutrophilen Differenzierung.....	92
Tabelle 6-3:	Ansätze zur Konjugation von E.coli-Zellen mit FITC.....	93
Tabelle 7-1:	Kulturparameter zur Untersuchung des Wachstums von HL-60 in serumhaltigen Medien.....	98
Tabelle 7-2:	Kulturparameter zur Untersuchung des Wachstums von HL-60 in serumfreien Medien	100
Tabelle 7-3:	Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration auf das Wachstum von HL-60	102
Tabelle 7-4:	Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum von HL-60.....	103
Tabelle 7-5:	Einfluß des pH-Wertes auf den Medien-Glukose-/Laktatgehalt bei Kultivierung von HL-60 (Werte nach 96h Kultivierung)	104
Tabelle 7-6:	Kultivierungsparameter zur Untersuchung des Einflusses von Laktat	105
Tabelle 7-7:	Kultivierungsparameter zur Untersuchung von Wachstumssupplementen	108
Tabelle 7-8:	Kulturparameter zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA.....	111
Tabelle 7-9:	Kulturparameter zur Untersuchung des pH-Wertes auf die ATRA-induzierte Reifung von HL-60.....	114
Tabelle 8-1:	Kultivierungsparameter für den Vergleich von Kultivierungsmedien	121
Tabelle 8-2:	Literaturbekannte Zytokine und deren Einsatzmengen für die Generierung neutrophiler Zellen	126
Tabelle 8-3:	Kultivierungsparameter zum Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen	127
Tabelle 8-4:	Kultivierungsparameter zum Vergleich von G-CSF und GM-CSF in der Zytokinmischung.....	130
Tabelle 8-5:	Kultivierungsparameter zur optimalen Konzentration der S36G Zytokinmischung.....	132
Tabelle 8-6:	Kultivierungsparameter zum Vergleich zusätzlicher Zytokine	134
Tabelle 8-7:	Kultivierungsparameter zum Vergleich von Seren als Medien-Supplemente	137
Tabelle 8-8:	Kultivierungsparameter zur Untersuchung des Temperatureinflusses.....	139
Tabelle 8-9:	Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Proliferation und Differenzierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34 ⁺ Zellen	142
Tabelle 8-10:	Einfluß der Gelöstsauerstoff-Konzentration auf den Anteil neutrophiler Zellen an der Gesamtzellzahl.....	143
Tabelle 8-11:	Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf Proliferation und Differenzierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34 ⁺ Zellen	144

Tabelle 8-12:	Zerfallskonstante (k) und Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von Zytokinen in Medium ohne zellulären Konsumenten.....	147
Tabelle 8-13:	Mittlerer Zytokin-Verbrauch (10 Tage Kultivierung, ohne Zerfall).....	149
Tabelle 8-14:	Kulturparameter zur Untersuchung verschiedener Fütterungsstrategien .	153
Tabelle 8-15:	Vergleich von Fütterungsstrategien: Gesamtzell-Expansionen (16 Tage Kultivierung)	156
Tabelle 8-16:	Vergleich von Fütterungsstrategien: Endpunktbestimmung der Medienkonzentration von Substraten und Metaboliten	159
Tabelle 8-17:	Kulturparameter zum Vergleich klinikrelevanter Kultursysteme.....	160
Tabelle 9-1:	Kulturparameter für die Langzeitkultivierung.....	166
Tabelle 9-2:	Spezifische Wachstumsraten bei Langzeitkultivierung	167

Verzeichnis der Abkürzungen, Symbole und Warenzeichen

Abkürzungen

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung</i>
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
ATRA	all-trans Retinoic Acid
BFU-E	Burst-Forming-Unit-Erythroid
BFU-MK	BFU-Megakaryocyte
BGBI	Bundesgesetzblatt
BGesundhBl	Bundesgesundheitsblatt
BM	Bonemarrow
BSA	Bovine-Serum-Albumin
CB	Cord Blood
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony Forming Unit
CFU-G	CFU-Granulocyte
CFU-GEMM	CFU-Granulocyte, Erythroid, Megakaryocyte, Macrophage
CFU-GM	CFU-Granulocyte, Macrophage
CFU-M	CFU-Macrophage
CHO	Chinese Hamster Ovary
DE	Deutscher Gesetzgeber
DMSO	Dimethylsulfoxid
DO	Dissolved Oxygen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbend Assay
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluorescence-Activating-Cell-Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
FL	Fluorescence
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating-Factor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage CSF
GMP	Good Manufacturing Practise
GQ	Großquadrat
HA	Humanes Albumin
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IL-1	Interleukin-1

IL-3	Interleukin-3
IL-6	Interleukin-6
IL-12	Interleukin-12
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LF	Lactoferrin
LZ	Lysozym
MACS	Magnetic Cell Sorting
MNZ	Mononucleäre Zellen
MPO	Myeloperoxidase
MW	molecular weight
PB	peripheral blood
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PEI	Paul Ehrlich Institut
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetraflourethylen
RA	Retinoic Acid
RAR	Retinoic Acid Receptor
SCF	Stem Cell Factor
TPO	Thrombopoietin
UV	Ultraviolett

Symbole

<i>Symbol</i>		<i>Einheit</i>
μ	mikro	
a	volumenbezogene Oberfläche	$[\text{m}^2/\text{m}^3]$
c	Konzentration, cell	
d	day	
g	Gramm, Erdbeschleunigung	
h	Stunde	
kDa	Kilodalton	
k_i	flüssigkeitsseitiger Stoffübergangskoeffizient	$[\text{m}/\text{s}]$
L	Liter	
m	milli	
n	Anzahl der Replikate, nano	
T	Temperatur	$[\text{K}]$
t	Zeit	$[\text{s}]$
U	Unit	

Warenzeichen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Inhaber</i>
CASY	Schärfe System, Reutlingen
CellGro	CellGenix, Freiburg
Cy-Chrome	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Falcon	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
MACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Teflon	E.I. du Pont de Nemours, Wilmington, DE, USA
ViCell	Beckman, Krefeld

1 Einleitung und theoretischer Hintergrund

Die Zusammenhänge innerhalb des Immunsystems, seine Funktionsweise, seine Komponenten sowie seine Pathologien sind seit nunmehr über zwei Jahrhunderten Gegenstand intensivster Forschung. Das wohlorchestrierte Zusammenspiel der einzelnen Komponenten dieses hoch komplexen Netzwerkes wird erst dann offenbar, wenn Dysfunktionen die Lebensqualität empfindlich mindern oder sogar lebensbedrohlich werden – Allergien und AIDS seien als Beispiele genannt. Die Sepsis gehört wohl zu den bedrohlichsten Dysfunktionen des Immunsystems, deren Pathogenese ein ebenso komplexes wie noch nicht voll verstandenes Geschehen darstellt. Ansätze zur zellulären Prävention und/oder der Therapie der Sepsis können nur vor dem Hintergrund des immunologischen Netzwerkes verstanden werden. In diesem Kapitel sollen kurz die wichtigsten Grundlagen dargestellt werden, die zur Vorbereitung der Problemstellung dieser Arbeit notwendig sind.

1.1 Infektionsabwehr

Das Immunsystem kann als ein den gesamten Körper umfassendes „Organ“ aufgefasst werden, das die effektive und dauerhafte Abgrenzung der Individualstruktur von einer mikrobiell besiedelten Außenwelt ermöglicht. Bei den Wirbeltieren hat es sich zu einem vielschichtigen Gebilde entwickelt, dessen zelluläre Bestandteile, die Leukozyten (weiße Blutkörperchen) und löslichen (humoralen) Faktoren sich zwei Funktionskreisen zuordnen lassen:

- Das adaptive Immunsystem (bestehend aus T-, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen) richtet sich spezifisch gegen die als „fremd“ erkannten molekularen Strukturen des Pathogens. Durch ein gewaltiges Rezeptor-Repertoire, das durch genetische Rearrangements bei der somatischen Zelldifferenzierung entsteht, kann prinzipiell jede Fremdstruktur erkannt werden. Adaptive Immunantworten erfolgen zeitverzögert auf eine Infektion, führen aber in vielen Fällen zum lebenslangen Schutz vor Neuinfektion mit demselben Pathogen.
- Das native oder angeborene Immunsystem kann sofort nach der Infektion die Bekämpfung einer großen Bandbreite von Mikroorganismen aufnehmen, ohne daß ein vorheriger Kontakt mit dem Pathogen notwendig wäre. Ein Repertoire an keimbahnkodierten Rezeptoren ermöglicht den Zellen des angeborenen Immunsystems konservierte Pathogen-Strukturen zu erkennen (Mustererkennung).

Zunächst verhindern die natürlichen Barrieren des Körpers, wie die Haut und Schleimhäute, das Eindringen von Mikroorganismen in das Körpergewebe. Werden diese Strukturen jedoch überwunden, so tritt das angeborene Immunsystem als „erste Verteidigungslinie“ des Körpers der Infektion entgegen. Die angeborene Immunität wird hauptsächlich durch professionelle *Phagozyten* (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) vermittelt. Phagozyten sind weiße Blutzellen, die pathogene Mikroorganismen und deren Toxine erkennen (*afferente* Funktion) sowie aufnehmen (Phagozytose) und zerstören (*efferente* Funktionen). Darüber hinaus sind diese Zellen durch Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (Entzündungsvermittler wie z.B. Zytokine, Histamine, etc.) an der Errichtung eines entzündlichen Milieus beteiligt. Seit dem Altertum sind die von GALEN im 2. Jhd. v. Chr. erstmals beschriebenen, typischen Akutphase-Symptome einer Entzündung, Rötung („Rubor“), Schwellung („Tumor“), Erwärmung („Calor“), Schmerz („Dolor“) und der Funktionsverlust des Gewebes („*functio laesa*“), bekannt. Sie sind die Folge von Gewebsreaktionen, die eine erhöhte Durchblutung und Einfluß von Sekreten und Immunzellen in das Infektionsgebiet bewirken.

1.2 Neutrophile Granulozyten: Zentrales Element des angeborenen Immunsystems

Die neutrophilen Granulozyten gehören zu den Zellen der ersten Phase (Akutphase) der Immunantwort am Entzündungsort. In dieser Zeit machen sie etwa 70% der Zellen aus, die an den Infektionsort dringen. Ihre Aufgabe ist das Eindämmen und Entfernen der mikrobiellen Infektion um einen Heilungsprozeß im Gewebe zu ermöglichen. Als spezialisierte „Killerzellen“, ausgestattet mit einem breiten cytotoxischen Arsenal, erledigen sie vornehmlich das Aufspüren und Zerstören von Mikroorganismen. Der konstant hohe Anteil von 60 bis 70 % an der Gesamt-Leukozytenpopulation im peripheren Blut und der tägliche Turnover von ca. $1\text{-}2 \cdot 10^9$ Zellen/kg Körpergewicht unterstreicht die Bedeutung der Neutrophilen als wichtigste Effektorzelle des angeborenen Immunsystems [Maiani NA, 2004].

Neutrophile Granulozyten entwickeln sich im Knochenmark durch Teilung und Differenzierung aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen über verschiedene Progenitorstufen zur reifen, teilungsunfähigen Zelle (Granulopoese, sh. Kap. 1.5). Nach dem Verlassen des Knochenmarks zirkulieren die Zellen ca. 6-12 Stunden im Blutkreislauf. Von dort dringen sie ins Gewebe ein und verharren dort, sofern sie nicht durch eindringende Mikroorganismen aktiviert werden, etwa 2 Tage [Maiani et al. 2004]. Danach gehen sie durch programmierten Zelltod (apoptotisch) zugrunde und werden von gewebeansässigen Makrophagen oder semi-professionellen Phagozyten (z.B. Mesangial-Zellen) abgebaut [Savill J, 1997].

1.2.1 Morphologie des Neutrophilen

Obwohl bereits 1774 HUNTER Leukozyten in eitrigen Ausflüssen entdeckte, wurden phagozytierende Zellen erst durch den Immunologen METCHNIKOFF im Jahre 1882 nachgewiesen. Er fand in Invertebraten eine Population von „wandernden Zellen“, die in der Lage waren, Farbpartikel und Pilzsporen aufzunehmen. Seine zelluläre Theorie der Immunität sah dieses Prinzip beim Menschen durch die Mikrophagen (mobile, kleine Phagozyten des Blutes: neutrophile Granulozyten) und Makrophagen (sessile, große Phagozyten des Gewebes) verwirklicht [Silverstein AM, 1979].

Das Aufkommen synthetischer Farbstoffe und moderner Fixierungstechniken Ende des 19. Jhd. ermöglichten es Paul EHRlich zelluläre Substrukturen dieser Phagozyten des Blutes sichtbar zu machen [Ehrlich P, 1879]. Der charakteristisch gefaltete und segmentierte Nukleus sowie die Vielzahl intrazellulärer Vesikel (Granula) gaben den „polymorphnukleären Granulozyten“ den Namen (Abbildung 1-1). Aufgrund ihrer Anfärbbarkeit mit sauren und basischen Farbstoffen konnte EHRlich drei Typen von Granulozyten unterscheiden: Eosinophile, Basophile und Neutrophile.

Die Granula beherbergen das biozide Arsenal der neutrophilen Granulozyten. Sie unterscheiden sich sowohl in der Zusammensetzung ihrer Matrix als auch in der Rezeptorbestückung ihrer Membran. Bereits Paul EHRlich erkannte die verschieden starke Affinität der Granula zu dem Farbstoff Azur A und unterschied azurophile von nicht anfärbbaren, spezifischen Granula. Elektronenmikroskopische Techniken ermöglichten die Entdeckung eines dritten Typus von Granula, den tertiären Granula [Borregaard N & Cowland J, 1997].

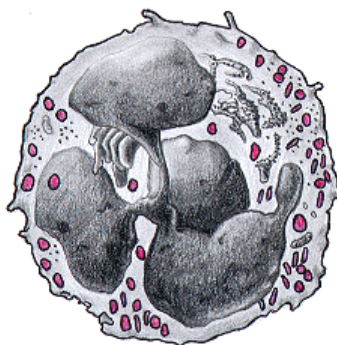


Abbildung 1-1: Morphologie des neutrophilen Granulozyten

[aus Tagliasacchi et al., 1997]

Charakteristische Merkmale der reifen Granulozyten sind der mehrfach eingefaltete Kern und die intrazellulären Vesikel (Granula)

1.2.2 Funktionalität der neutrophilen Granulozyten

Die Funktionsausstattung der Neutrophilen umfaßt *afferente* (aufspürende) und *efferente* (ausführende) Mechanismen. Um überhaupt in das Infektionsgeschehen eingreifen zu können, müssen die Neutrophilen den Infektionsort identifizieren und sich aktiv darauf zu bewegen können. Am Infektionsort angekommen, müssen sodann die Pathogene identifiziert und abgetötet werden.

1.2.2.1 Molekulare Erkennung durch Neutrophile

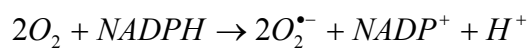
Die auskleidenden Zellen der Blutgefäße, die Gefäßendothelzellen, spielen bei der Identifikation des Entzündungsortes durch die Neutrophilen eine entscheidende Rolle. Neutrophile Zellen heften normalerweise lose am Gefäßendothel und werden durch den Blutstrom weiter getrieben, was als „rollen“ entlang des Gefäßendothels beobachtet werden kann. Eine Entzündungsreaktion stimuliert die Endothelzellen nahe des Entzündungsgebiets zur Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle und entsprechender Rezeptoren, die die rollenden Neutrophilen fest an die stimulierten Endothelzellen heften (Adhäsion). An einem benachbarten Zell-Zell-Kontakt (junction) treten die Neutrophilen durch das Endothel hindurch in die interzelluläre Matrix ein (Diapedese). Am Entzündungsort freigesetzte Mediatoren (Proteine der Chemokin-Familie, Zytokine) und mikrobielle Peptide (z.B. das bakterielle Flagellenpeptid fMLP) bilden Konzentrationsgradienten, die von Neutrophilen benutzt werden, um den interzellulären Raum gerichtet zu durchwandern (Chemotaxis).

Das immunologisch relevante Eliminieren von Pathogenen ohne Beschädigung des eigenen Körpers setzt voraus, daß die Neutrophilen diejenigen Struktureigenschaften, die den mikrobiellen Organismus von körpereigenem Gewebe unterscheiden, zu erkennen vermögen. Die Zellen der angeborenen Immunität nutzen dazu spezifische Pathogen-Muster. Bei Säugetieren werden pathogen-assoziierte Strukturmerkmale, wie z.B. Zellwandbestandteile (Peptidoglycane, Lipopolysaccharide), Flagellenproteine (fMLP) oder unmethylierte DNA durch einen Satz von sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkannt. Jeder dieser entwicklungsbiologisch konservierten Rezeptoren erkennt spezifisch ein pathogen-assoziiertes Strukturmerkmal. Die Mustererkennung über TLR erlaubt den Zellen des angeborenen Immunsystems ihre Effektorfunktionen eigenständig und ohne vorherigen Kontakt des Körpers mit dem Pathogen auszuführen. Insbesondere die neutrophilen Granulozyten entfalten ihre volle Funktionalität jedoch erst zusammen mit dem Komplementsystem und Komponenten des adaptiven Immunsystems. So exprimieren sie Komplement- und Fc-Rezeptoren, die mit Komplement und Antikörper belegte (opsonierte) Mikroorganismen erkennen und diese als Fremdstoffe markierten Partikel ihren Effektorfunktionen zuführen.

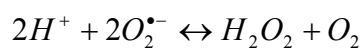
1.2.2.2 Efferente Mechanismen der Neutrophilen

Die efferenten Funktionen der Neutrophilen stellen das zentrale Abwehrarsenal des Immunsystems überhaupt dar. Das erkannte Pathogen wird von Ausstülpungen der Plasmamembran des Neutrophilen umschlungen und ähnlich der rezeptorvermittelten Endozytose, als membranumgrenztes Vesikel (*Phagosom*) in die Zelle aufgenommen. Dort verschmelzen die verschiedenen Granula mit dem Phagosom und setzen ihr biozides Arsenal in Gang. Dabei werden zwei Wege besprochen:

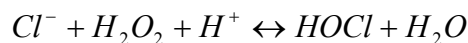
- Sauerstoffunabhängig agieren lytische Enzyme wie Lysozym, Gelatinase und verschiedene Proteinasen. Sie permeabilisieren die Zellwände von Bakterien und Pilzen und ermöglichen den Angriff von hochreaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die mikrobielle Ziele, darunter Lipide, Proteine, Nucleinsäuren, unspezifisch aber hoch potent angreifen.
- Die Serie der sauerstoffabhängigen Reaktionen wird von einer NADPH-Oxidase initiiert, die molekularen Sauerstoff zum Superoxid-Anion reduziert:



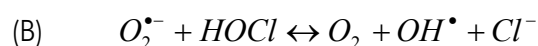
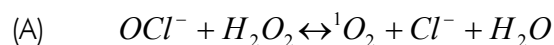
Das Superoxid-Anion ist selbst wenig reaktiv. Es dient vielmehr als Substrat für die Produktion von ROS. Dabei erzeugt eine Superoxid Dismutase Wasserstoffperoxid als Intermediat:



Myeloperoxidase, ein ausschließlich in den azurophilen Granula enthaltenes Enzym, erzeugt aus dem Wasserstoffperoxid reaktive Halogenverbindungen.



Die reaktiven Halogenverbindungen sind sowohl selbst potente Biozide als auch die Vorstufe zur Generierung weiterer ROS-Metabolite. Hypochlorid kann zu Singulett-Sauerstoff abreagieren, der besonders effektiv Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen angreift (A). Es bildet aber auch mit dem Superoxid-Anion das extrem reaktive Hydroxylradikal (B).



Die so angegriffenen Pathogene werden im Phagosom weitestgehend bis auf niedermolekulare Bausteine abgebaut. Zum Schutz des umgebenden Gewebes wird der Inhalt des Phagosoms jedoch nicht ausgeschieden. Der Neutrophile leitet die Apoptose ein, um kontrolliert zugrunde zu gehen [Maianski NA, 2004]. Monozyten und Makrophagen übernehmen dann die Entsorgung der Zellreste. Der Körper ist seinerseits jedoch nicht völlig abgeschottet gegen das biozide Arsenal der Neutrophilen, da sie auch in der Lage sind, auf bestimmte Stimuli hin, ROS und lytische Enzyme extrazellulär freizusetzen, was zu erheblichen Schäden am (teilweise auch gesundem Gewebe) führt. Trotzdem haben sich die Abwehrmechanismen der Neutrophilen als effektivste Waffe des Immunsystems gegen mikrobielle Infektionen evolutionär erhalten. Genetisch bedingte Funktionsstörungen oder chronischer Mangel an Neutrophilen ziehen schwerwiegende Immundefekte nach sich, die ein Überleben nur in keimfreien Räumen („life-islands“) ermöglichen.

1.3 Systemische Infektionen und Sepsis

1.3.1 Zahlen, Daten, Fakten

Die Sepsis stellt ungeachtet aller Fortschritte der modernen Intensivmedizin die häufigste Todesursache von intensivmedizinisch behandelten Patienten dar. Je nach Schwere der Erkrankung liegt die Sterblichkeit zwischen 20% und 80% [Brun-Buisson C, 2000].

Pro Jahr erkranken in den OECD-Staaten etwa 1,5 Millionen Einwohner an einer Sepsis. Von den 751.000 Patienten, die im Jahre 1995 in den USA an Sepsis erkrankten, verstarben etwa 215.000 [Angus DC, 2001]. Das entspricht auf die Gesamtbevölkerung umgerechnet einer Inzidenz von 300 Fällen pro 100.000 Einwohnern und ist damit um ein mehrfaches höher als die von Brustkrebs (110 pro 100.000) oder AIDS (17 pro 100.000) [Reinhard K, 2002]. Mit zunehmendem Lebensalter steigt die Inzidenz mehr als 100fach an (Kinder: 20 pro 100.000 versus 2620 pro 100.000 bei über 85-Jährigen). Anhand der Bevölkerungsstatistik läßt sich daraus für die USA ein Anstieg der Sepsiserkrankungen um 1,5% pro Jahr prognostizieren [Angus DC, 2001].

Die direkten Kosten der Sepsis-Behandlung werden für Deutschland mit € 23.297 ± 18.631 pro Patient angegeben, wobei ca. 80% der Kosten in etwa hälftig auf die medikamentöse Behandlung und den erhöhten Personalbedarf für die Betreuung entfallen [Moerer O, 2002]. Erhebt man zusätzlich noch indirekte Kosten wie die Behandlung von bleibenden Schäden, Nachsorgebehandlung, Arbeitsunfähigkeit und Frühverrentung so geht man von einer jährlichen

Belastung von etwa € 3-7 Milliarden, die alleine den deutschen Sozialsystemen durch die Sepsis entstehen.

Eine singuläre Kausalität ist für diese schwerwiegende Erkrankung nicht auszumachen. Vielmehr haben die Ursächlichkeiten, die ein Auftreten der Sepsis wahrscheinlicher machen, in den letzten Jahren zugenommen. So bemerken ANGUS et al. in ihrer Studie, daß die Sepsis eine Erkrankung der Alten ist [Angus DC, 2001]. Gerade alte Menschen leiden jedoch häufiger an gravierenden Vorerkrankungen, die ihre generelle körperliche Konstitution beeinträchtigen. In diesem Zusammenhang ist mit Besorgnis zu registrieren, daß einer schnell steigenden Anzahl von antibiotika-resistenten Keimen immer mehr Menschen mit eingeschränkter Immunfunktion gegenüberstehen. Die Immunabwehr kann akut, hervorgerufen durch Blutverlust nach Operation, Unfall oder akutes Leber-/Nierenversagen oder aber chronisch als Folge von Diabetes, Dialyse oder Immunsuppression nach Chemotherapie geschädigt sein.

1.3.2 Pathophysiologie

Die Mechanismen, die zum klinischen Bild der Sepsis führen, sind bis heute nur unzureichend verstanden. Aus diesem Grund soll hier auch nur ein grober Überblick über das Sepsisgeschehen gegeben werden, ohne ins Detail der Sepsis-Pathogenese vordringen zu wollen. Eine geläufige Vorstellung von der Sepsispathogenese geht von einem phasenhaften Verlauf aus [Weigand MA, 2003], der sich sehr gut mit überschwingenden Regelkreisläufen aus der Reaktionstechnik vergleichen läßt (Abbildung 1-2).

Breiten sich die Pathogene über den Infektionsherd hinaus in den Körper (systemische Infektion) aus, so setzen überschießend und systemisch freigesetzte proinflammatorische Faktoren (Zytokine, aktiviertes Komplement, etc.) die Regelmechanismen der angeborenen Immunität außer Kraft. Dieser Zustand der übermäßigen Aktivität des Immunsystems (Hyperinflammation) kann für den Patienten lebensbedrohlich werden, wenn durch die ebenfalls außer Kontrolle geratende Gerinnungskaskade die Organperfusion eingeschränkt wird. Hauptursache für die Letalität in diesem ersten Stadium der Sepsis ist der kardiozirkulatorische Kollaps, gefolgt von renalem und gastrointestinalem Versagen [Weigand MA, 2003].

Überleben Patienten die erste Phase der Sepsis aufgrund verbesserter intensivmedizinischer Behandlung, so kommt es durch Freisetzung von antiinflammatorischen Faktoren zu einer kompensatorischen Gegenreaktion, die die Aktivität des Immunsystems dämpft. Häufig schießt diese Gegenregulation ebenfalls über, das Immunsystem schaltet sich gewissermaßen selbst aus: es kommt zur Immunsuppression oder Anergie. In dieser Phase steht der Patient schutzlos

einer Sekundärinfektion gegenüber. Diese Abfolge von Hyper- und Hypoinflammation kann sich in einer Schleife mehrere Male während einer Sepsis wiederholen.

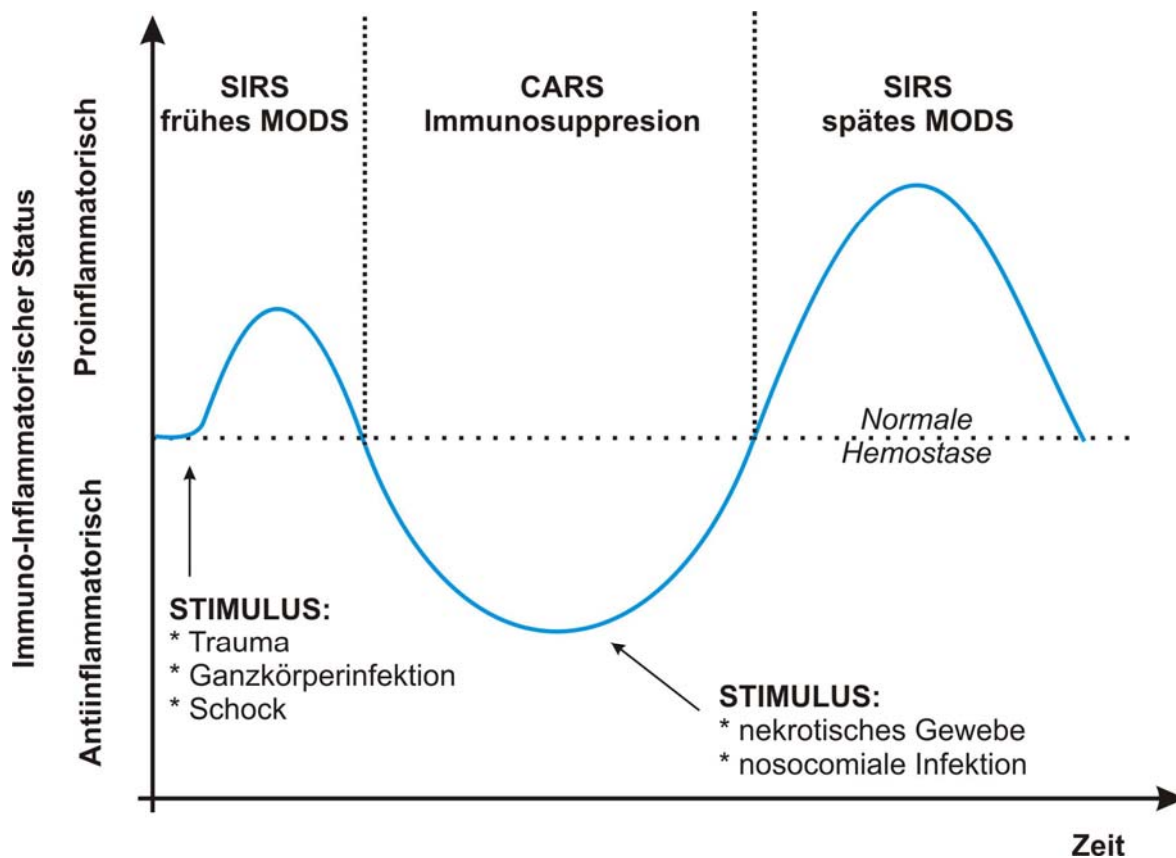


Abbildung 1-2: Schematischer Verlauf des Immunstatus bei Sepsis

SIRS: severe inflammatory response syndrome = Sepsis-Symptomatik
 MODS: multi organ dysfunction syndrome = Multiorganversagen in Sepsis
 CARS: compensatory anti-inflammatory response syndrome = Versagen zentraler Immunmechanismen (Deaktivierung von Immunzellen, reduzierte Antigenpräsentation)

1.3.3 Bisherige Therapieansätze

Viele der zur Zeit in klinischen Studien erprobten Behandlungsstrategien zielen auf einzelne Elemente der Mediatoren- und Gerinnungs-Kaskaden, um deren selbstverstärkende Effekte zu mildern oder zu unterbinden (z.B. Gerinnungsinhibitoren [Abraham E, 2003], Immunglobuline, Endotoxinbindende Proteine [Werdan K, 2001]. Dabei hat bisher jedoch nur aktiviertes Protein C in einer Phase-III-Studie die Lethalität von 30,8% auf 24,7% senken können [Bernard, 2001]. Durch Plasmaapherese bzw. Plasmaaustausch konnte ebenfalls eine Verbesserung der Überlebenschancen erzielt werden [Busund R, 2002].

1.4 Kausale Ansätze zur Sepsis-Prävention und Therapie

Vereinfacht man die bisherigen Ausführungen auf eine Feststellung, so läßt sich sagen, daß die Fähigkeit des angeborenen Immunsystems, Infektionen effektiv einzudämmen von zwei Parametern abhängt: erstens der Anzahl und zweitens der Funktionalität der neutrophilen Granulozyten. Aus dem Verlauf des Sepsisgeschehens lassen sich daher zwei „Grenzfälle“ der Leistungsfähigkeit des angeborenen Immunsystems identifizieren (Abbildung 1-2): (1) Stehen bei Beginn eines Infektionsgeschehens nicht ausreichend Neutrophile zur lokalen Eindämmung der mikrobiellen Infiltration zur Verfügung, können sich die Keime ungehindert systemisch ausbreiten und ein Sepsisgeschehen einleiten. (2) Im bestehenden Sepsisgeschehen wird die Effektor-Funktionalität der Neutrophilen beeinträchtigt und kann ganz zum Erliegen kommen. Die Primär- aber auch eventuelle Sekundärinfektionen können sich ausbreiten und den Verlauf der Sepsis negativ beeinflussen. Die beiden Grenzfälle lassen die Betrachtung von zwei Szenarien des Einsatzes von neutrophilen Zellen als präventives bzw. therapeutisches Mittel sinnvoll erscheinen:

1.4.1 Prävention systemischer Infektionen in Neutropenie

Die Hochdosis-Chemotherapie (HDCT) in der Krebsbehandlung bewirkt die Zerstörung aller schnell proliferierenden Zellen des Körpers. Damit erhöhen sich die Chancen, alle Krebszellen abzutöten, jedoch wirkt der toxische Effekt auch auf die sich schnell teilenden, hämatopoetischen Zellen. Direkt nach der Chemotherapie werden dem Patienten daher hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen aus Knochenmark oder Nabelschnurblut transplantiert, die ein neues blutbildendes System aufbauen können. Zwischen der Transplantation und der Wiederherstellung der Hämatopoese durch das Transplantat (Anwachsen oder „engraftment“) vergeht eine mehrwöchige „lag“-Phase. In dieser Phase werden zugrundegehende Blutzellen noch nicht durch neue Zellen ersetzt, es kommt zu einem Blutzellmangel (Cytopenie). Die Neutropenie, also der Mangel an neutrophilen Granulozyten wirkt sich besonders drastisch aus. Die neutrophilen Granulozyten verfügen über die kürzeste Lebensdauer aller Blutzellen, stellen aber zahlenmäßig mit Abstand die größte Gruppe der Leukozyten dar. So sinkt nach Beginn eines Behandlungszyklus mit Chemotherapeutika die Anzahl der neutrophilen Granulozyten von 10.000 auf bis zu 100 Zellen pro μL Vollblut (Neutropene Phase). In der Regel dauert es etwa 10 Tage, bis sie wieder den Ausgangswert erreicht (Abbildung 1-3). Wird ein Schwellenwert von 1.000 Neutrophilen pro μL Vollblut unterschritten, so wächst die Gefahr von systemischen Infektionen und damit der Sepsis dramatisch an [Pschyrembel, 1990]. Die neutropene Phase ist bei Transplantationen mit Nabelschnurblut (cord blood) besonders ausgeprägt [Benito Al, 2004]. Dies ist neben der begrenzten Verfügbarkeit hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnurblut der gewichtigste Nachteil dieser Transplantationsvariante. Vereinfacht ausgedrückt fehlt während der Neutropenie der „Mittelbau“ des hämatopoetischen Systems, also

diejenigen Zellen die bereits auf die neutrophile Differenzierungslinie festgelegt sind und innerhalb kürzester Zeit die absterbenden Granulozyten im Blut und im Gewebe ersetzen können. Ex vivo generierte, neutrophil differenzierte Zellen könnten nach HDCT diese Funktion übernehmen, bis das Stammzelltransplantat seine lag-Phase überwunden hat.

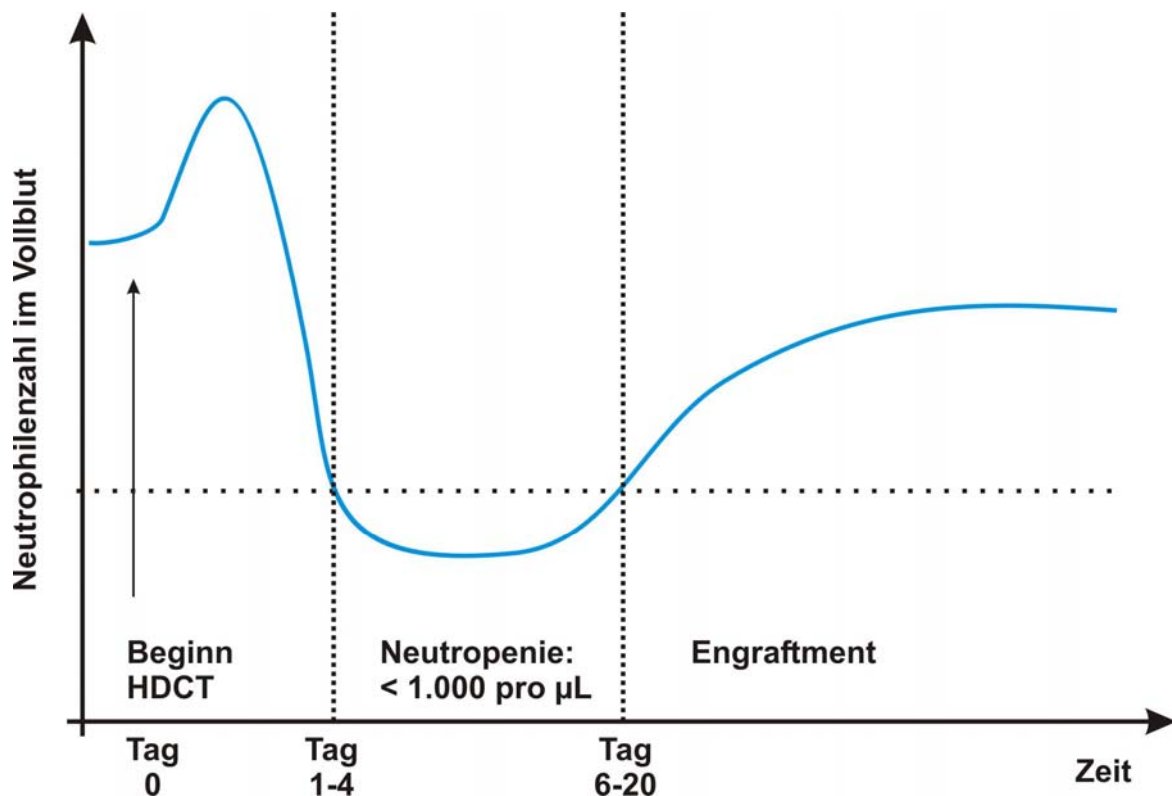


Abbildung 1-3: Abfall der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut nach HDCT

1.4.2 Sepsis-Therapie mit neutrophilen Zellen

Die Transfusion von Granulozyten als Therapieoption bei der Diagnose Sepsis ist untersucht worden, wobei die Ergebnisse groß angelegter klinischer Studien noch ausstehen [Hübel K, 2001]. Das Rationale dieser Anwendungen ist die Unterstützung des körpereigenen angeborenen Immunsystems durch die transfundierten Granulozyten [Yenghen T, 2001]. Die Nachteile der Granulozytenpräparate sind vor allem logistischer Natur: Granulozyten können nicht wie Erythrozyten langfristig gelagert werden. Zur Zeit kann man die Präparate nur 24 Stunden unter vollständigem Erhalt der zellulären Integrität und Funktionalität lagern. Zur Abtrennung der Granulozyten aus dem Spenderblut ist die Vorstimulation des Spenders mit einem Arzneimittel (dem Wachstumsfaktor G-CSF) erforderlich, was auch im Falle einer breiten Anwendung ethische Bedenken aufwerfen könnte. Nach der Entscheidung für eine Granulozytentransfusion kommt es dadurch zu einer zeitlichen Verzögerung von 36 - 48 h bis die Granulozyten für die

Therapie gewonnen werden können. Weitere Nachteile der Granulozytenpräparate sind die Spendervariabilität, die geringe Reinheit der Zellpopulation und insbesondere die Infektionsgefahr, da z.B. Ergebnisse der Steriltistung nicht abgewartet werden können. Daneben bestehen Bedenken bezüglich der unkontrollierten Neutrophilen-Aktivierung bei der Infusion von großen Granulozyten-Mengen in einen septisch vorerkrankten Menschen. Stellen sich nach erfolgter Transfusion der neutrophilen Zellen Nebenwirkungen ein, ist eine weitere Kontrolle der Zellen nur schwer und das Entfernen der transfundierten Zellen überhaupt nicht möglich.

Dem Teraklin EISS („Extracorporal Immune Support System“) System liegt die Überlegung zugrunde, daß die Anhäufung von Mikroorganismen, aber auch von (Zell-) Debris und Mediatoren der überschießenden Immunreaktion (z.B. Zytokine) im Blut des Patienten zur Funktionsbeeinträchtigung des angeborenen Immunsystems führen. Durch selektives Entfernen dieser Noxen aus dem Blut des Patienten könnte der Sepsisverlauf eingedämmt werden. Für das EISS-System wird ein extrakorporaler Blutkreislauf aufgebaut (Abbildung 1-4). Dieser Kreislauf ist jederzeit steuerbar und kann bei Komplikationen abgeschaltet werden. Das mit Noxen belastete Patientenblut wird über eine Mikrofiltrationseinheit (Plasmaseparator) geleitet. Die Porengröße des Filters ist so gewählt, daß zelluläre Bestandteile des Blutes zurückgehalten werden, Partikel von der Größe von Mikroorganismen und Zelldebris jedoch passieren können. Das belastete Plasma wird in ein Modul geleitet, in dem humane Granulozyten die Reinigung des Plasmas übernehmen. Sie phagozytieren die Mikroorganismen und Zelldebris und wirken durch Aufnahme und Abgabe von Zytokinen modulierend auf den Immunstatus. Das so gereinigte und aufbereitete Plasma wird über einen Sicherheitsfilter, der eventuell mitgeschleppte Granulozyten zurückhält, dem Patienten wieder zurückinfundiert. Erste klinische Behandlungen mit dem EISS-System und neutrophilen Spendergranulozyten verliefen sehr vielversprechend [Altrichter J, 2004].

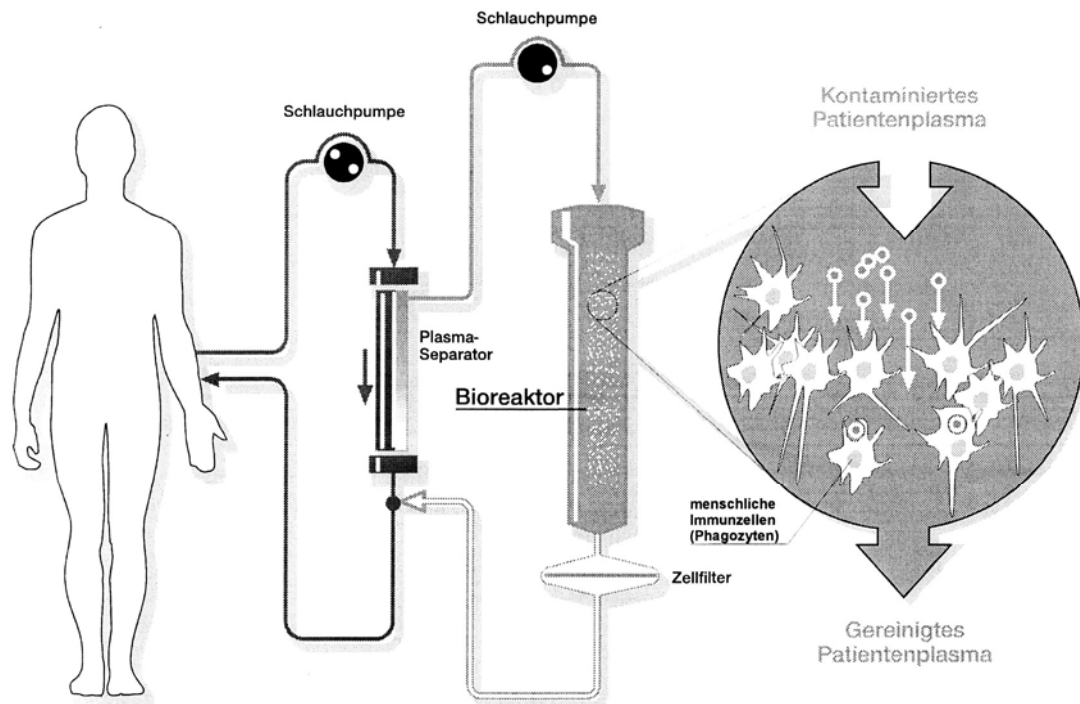


Abbildung 1-4: Funktionsprinzip der EISS-Sepsistherapie [TERAKLIN AG]

1.5 Granulopoese

1.5.1 Einordnung in das hämatopoetische System

1.5.1.1 Die hämatopoetische Stammzelle

Wie alle Zellen des Blutes haben Granulozyten eine beschränkte Lebensdauer und müssen fortwährend aus einer Quelle neu gebildet werden. Alexander MAXIMOW erkannte diese in einem Zelltypus den er „primitive Blutzelle“ nannte. Von diesem Zelltyp sollten sich alle reifen Blutzellen ableiten. Damit bestätigte er eine Hypothese, die bereits im Jahre 1890 von NEUMANN aufgestellt wurde [Samkiewitz C, 1998]. TILL und MCCULLOCH konnten an Mäusen, deren hämatopoetisches System durch Bestrahlung zerstört wurde, Hinweise auf die Natur der hämatopoetischen Stammzellen und der aus ihnen hervorgehenden Vorläufer gewinnen. Trotz vieler Bemühungen, die seither auf diesem Gebiet geleistet wurden, ist es bis heute nicht möglich die hämatopoetische Stammzelle als solche zu identifizieren und zu isolieren. Die pluripotente Stammzelle an der Spitze der hämatopoetischen Kaskade sollte daher eher von ihrer biologischen Funktionalität her definiert werden: Sie ist in der Lage, lebenslang den kontinuierlichen Nachschub an reifen Blutzellen zu leisten und kann dabei auf erhöhten Zellbedarf (etwa nach Blutverlust oder bei Infektionen) reagieren.

In regelmäßigen Abständen wird mit neuen Markern geworben, die angeblich die hämatopoetische Stammzelle auszeichnen. So war lange Zeit das Oberflächenantigen CD34 (Cluster of Differentiation), ein Adhäsionsmolekül, der allgemein akzeptierte Marker für hämatopoetische Stammzellen (CD34⁺ Zellen). Im Jahre 1996 zeigten jedoch OSAWA et al. im Mausmodell die dauerhafte Wiederherstellung eines Teils des hämatopoetischen Systems aus Zellen, die CD34 nicht oder nur wenig exprimierten (CD34^{-/lo} Zellen). CD34 kann also als Marker nur einen Teil der Stammzellpopulation eingrenzen. Auch weitere Marker, wie CD133, ein 7-Helix-Transmembranrezeptor und die Unterscheidung von Stammzellen von ausdifferenzierten Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33342 können die Population der Stammzellen nur weiter eingrenzen aber nicht eindeutig identifizieren. Ein Marker oder Markerpanel, das die Charakterisierung der echten hämatopoetischen Stammzelle ermöglicht, bleibt daher ein wünschenswertes Ziel. In der angewandten Hämatologie wird jedoch, bestätigt durch unzweifelhafte klinische Erfolge, die Transplantation von CD34⁺ Zellpopulationen weiter eingesetzt.

1.5.1.2 Aufbau des hämatopoetischen Systems

Durch Teilung und Differenzierung gehen aus der hämatopoetischen Stammzelle die sehr frühen Vorläuferzellen, Progenitorzellen, hervor. Dabei verlieren die Zellen ihre Pluripotenz und werden schrittweise auf eine Linie festgelegt. Bis zum Abschluß dieses Differenzierungsprozesses erhalten sich die Zellen die Fähigkeit zur Proliferation. Danach schließt sich der Prozeß der Reifung an, der den Zellen ihren endgültigen funktionalen Status verleiht.

Prinzipiell kann man zwei Äste der hämatopoetischen Zellentwicklung unterscheiden: die „myeloide“ (knochenmarkähnliche) und „lymphoide“ (lymphozytenähnliche) (Abbildung 1-5). Alle reifen myeloiden Zellen gehen aus einem gemeinsamen Vorläufer hervor, der CFU-GEMM (colony forming unit – granulocytes, erythrocytes, monocytes, megakaryocytes). Die Nachkommen dieses Progenitorzelltyps legen sich dann auf eine Linie fest (erythroid, megakaryoid, basophil, eosinophil), wohingegen die neutrophilen Granulozyten und Monozyten aus einem weiteren gemeinsamen Vorläufer, der CFU-GM hervorgehen und sich erst danach in die festgelegten („committed“) Progenitoren-Linien CFU-G (neutrophile Granulozyten) und CFU-M (Monozyten) aufteilen (Abbildung 1-5).

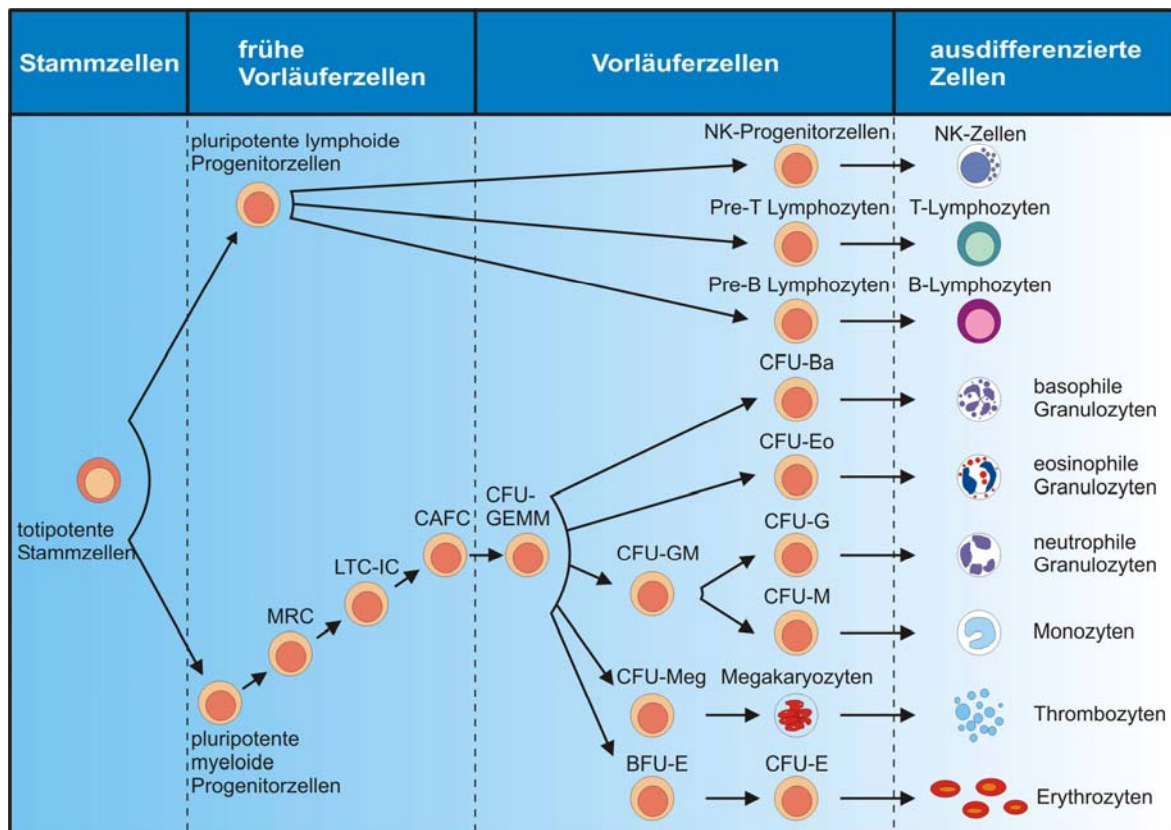


Abbildung 1-5: Aufbau des hämatopoetischen Systems
[aus Schmidt S, 2000]

1.5.1.3 Potential des hämatopoetischen Systems

Korreliert man die Lebensdauer der einzelnen Blutzellen mit ihrer Konzentration im Blut, so ergibt sich eine Größenordnung von ca. $3\text{-}4 \cdot 10^{11}$ reifen Blutzellen, die tagtäglich nachgebildet werden müssen, um eine annähernd konstante Zusammensetzung des Blutes zu gewährleisten. Berücksichtigt man, daß dem Gesamtvolumen an Blut ein Volumen von ca. 1-1,2 l Knochenmark mit einer Zelldichte von ca. $5 \cdot 10^8$ Blutzellen/mL gegenübersteht, so schätzt man eine mittlere Verdopplungszeit der Vorläuferzellen von etwa zwei Tagen. Damit gehören die Zellen des hämatopoetischen Systems zu den am schnellsten proliferierenden Zellen des Organismus [Koller MR, 1993]. Es verwundert daher nicht, daß cytotoxische Substanzen oder radioaktive Strahlung gerade im blutbildenden System verheerende Schäden anrichten können.

1.5.2 Das Knochenmark: Ort der Granulopoese

Das rote Knochenmark befindet sich beim Erwachsenen in den Wirbelkörpern, Rippen, Brustbein, Becken, Schulterblättern, Schädel und proximalen Anteilen der Oberarm- und Oberschenkelknochen. Als Makroorgan besitzt es ein Gewicht von 1-1,5 kg. Das Knochenmark ist im Inneren des Knochens in die sogenannte Spongiosa, ein schwammähnliches Netzwerk

feinster Knochenlamellen eingelagert. Durch die große Anzahl von Blutgefäßen, die das Knochenmark durchziehen, enthält es flüssige Anteile, die eine Knochenmarkspende durch Aspiration ermöglichen. Die Blutgefäße übernehmen nicht nur die nutritive Versorgung des Knochenmarks sondern lassen durch ihre weitmaschige Basallamina auch die Passage der ausgereiften Blutzellen in den Blutstrom zu.

Im blutbildenden Knochenmark sind alle Differenzierungs- und Reifungsstadien der Blutzellen, Fettzellen, Makrophagen und Plasmazellen morphologisch zu identifizieren, die zwischen den Blutgefäßen in ein weitmaschiges, bindegewebiges *Stroma* eingebettet sind. Das Stroma besteht hauptsächlich aus Retikulin- und Collagen-(III)-Fasern, sowie Fibronectin. Dieses Gerüst wird von Fibroblasten und fibroblastischen Retikulumzellen aufgebaut. Den Stromazellen kommt daher ein entscheidender Anteil an der Unterstützung und Regulation der Hämatopoese zu.

Man geht davon aus, daß die Prozesse des Stammzellerhalts einerseits und der Differenzierung und Reifung andererseits in unterschiedlichen Mikrokompartimenten dieser Struktur stattfinden [Schofield R, 1983]. Die Signal- und Regelmechanismen, die der Kommunikation zwischen hämatopoetischen und stromalen Zellen innerhalb des Knochenmarks zugrunde liegen und damit erst die Konstanz der Blutzellproduktion ermöglichen, sind Gegenstand intensiver Forschung [Moore KA, 2004; Nilsson SK, 2004]. So sind neben chemischen Botenstoffen (Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren), und Zell-Zell-Interaktionen über Oberflächenmoleküle auch die Bildung von gap junctions (Proteinkanäle zwischen benachbarten Zellen) und Interaktionen zwischen Zellen und der Extrazellulärmatix beschrieben worden [Krauss G, 1997].

1.5.3 Phänotypische Verfolgung der Granulopoese

Über weite Strecken kann der Weg von der Stammzelle bis zum reifen Granulozyten nur unzureichend analytisch direkt verfolgt werden. Die Aufklärung krankt, ebenso wie die Identifizierung der Stammzelle selbst, an dem Problem, eindeutige Marker für die jeweiligen Übergangsformen zu finden. Der Weg einer sich differenzierenden Tochterzelle einer hämatopoetischen Stammzelle muß als Kontinuum von zellulären Veränderungen verstanden werden. Ähnlich verhält es sich mit dem nicht faßbaren, aktivierten Übergangszustand eines Moleküls, bei dem bestehende Bindungen im Begriff sind, sich zu lösen und neue Bindungen gebildet werden. Darstellungen der Differenzierungslinien des hämatopoetischen Systems dürfen daher nicht als Kaskaden distinkter, analytisch zugänglicher Zwischenstufen aufgefaßt werden.

Über die Natur der Progenitorzellen innerhalb der Differenzierungslinien können nur biologische Assays Auskunft geben: Die zu untersuchende Zellpopulation wird in entsprechende in vivo oder in vitro Systeme inokuliert. Nach einer gewissen Zeitspanne werden die sich daraus entwickel-

den Zellen anhand „typischer“ Morphologien reifer Blutzellen oder bekannter Marker analysiert. Diese Information läßt im Nachhinein den Rückschluß auf den Differenzierungsgrad der ursprünglich eingesetzten Zellpopulation zu. Als Kriterium, anhand dessen eine Zellisolation stattfinden könnte, sind diese Assays jedoch ungeeignet. Erst wenn sich an den Zellen – zu einem relativ späten Zeitpunkt der Entwicklung – morphologisch eindeutige Veränderungen und linienspezifische Markerexpression einstellen, können die molekularen Prozesse direkt verfolgt werden, die zur reifen Zelle führen.

1.5.3.1 Morphologische Veränderungen

Die „unreifsten“ morphologisch identifizierbaren Zellen sind die Myeloblasten. Sie weisen einen Durchmesser von 10-20 μm auf und enthalten einen locker strukturierten Kern mit mehreren Nucleolen. Das relativ schmale Zytoplasma ist basophil und frei von Granula. Mit der zunehmenden Differenzierung setzt bei den Promyelozyten die Bildung der Granula ein. Die Neutrophilen bilden nur in den Myelozyten-Stadien des Differenzierungsprozesses sequentiell die verschiedenen Granula-Typen. Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten durchlaufen eine Reihe von weiteren mitotischen Teilungen. Dadurch nimmt der Gehalt an den zuerst gebildeten azurophilen Granula in den Myelozyten ab. Die weiteren Stadien der Metamyelozyten und Stabkernigen verlieren ihre Proliferationsfähigkeit und bilden auch keine weiteren Granula. Mit dem zunehmenden Grad der Differenzierung schreitet die Kondensation des Zellkerns voran. So ist bei den Myelozyten bereits eine relativ starke Chromatinkondensation festzustellen. Der segmentkernige Granulozyt stellt die letzte Entwicklungsstufe der Granulopoese des Neutrophilen dar und zeichnet sich durch die charakteristischen, tiefen, wespentailenartigen Einschnürungen seines Kerns aus (Abbildung 1-6).



Abbildung 1-6: Morphologische Veränderungen während der Granulopoese
Gezeigt sind die wichtigsten morphologisch identifizierbaren Zwischenstadien der Granulopoese: Myeloblast (A), unreifer Myelozyt (B), Metamyelozyt (C), segmentierter neutrophiler Granulozyt (D), [nach Frick P, 1995]

1.5.3.2 Proteinexpression in den Granula

Nach BORREGAARD et al. [Borregaard N, 1997] können die Granula in peroxidase-positive (primäre oder azurophile Granula) und peroxidase-negative Granula eingeteilt werden. Die Peroxidase-negativen Granula werden weiter in sekundäre (spezifische) und tertiäre Granula eingeteilt. Abbildung 1-7 zeigt die heterogene Verteilung der konstituierenden Proteine auf die drei Granulatypen. Hierin spiegelt sich ihre sequentielle Expression während der Zelldifferenzierung wieder. Die Granula, die zu einem gegebenen Zeitpunkt des Differenzierungs- und Reifungsprozesses gebildet werden, setzen sich aus den zu diesem Zeitpunkt synthetisierten Proteinen zusammen [Borregaard N, 1997]. Die Kontrolle der Granula-Proteinbiosynthese erfolgt dabei weitestgehend auf Transkriptionsebene [Hirata, RK 1993]. Durch die getrennte Lagerung der bioziden Proteine in unterschiedlichen Granula wird deren vorzeitige Aktivierung verhindert; ganz ähnlich wie Zwei-Komponenten-Klebstoffe getrennt aufbewahrt und erst bei Bedarf zum reaktiven Klebstoff gemischt werden (vgl. auch Kap. 1.2.2.2).

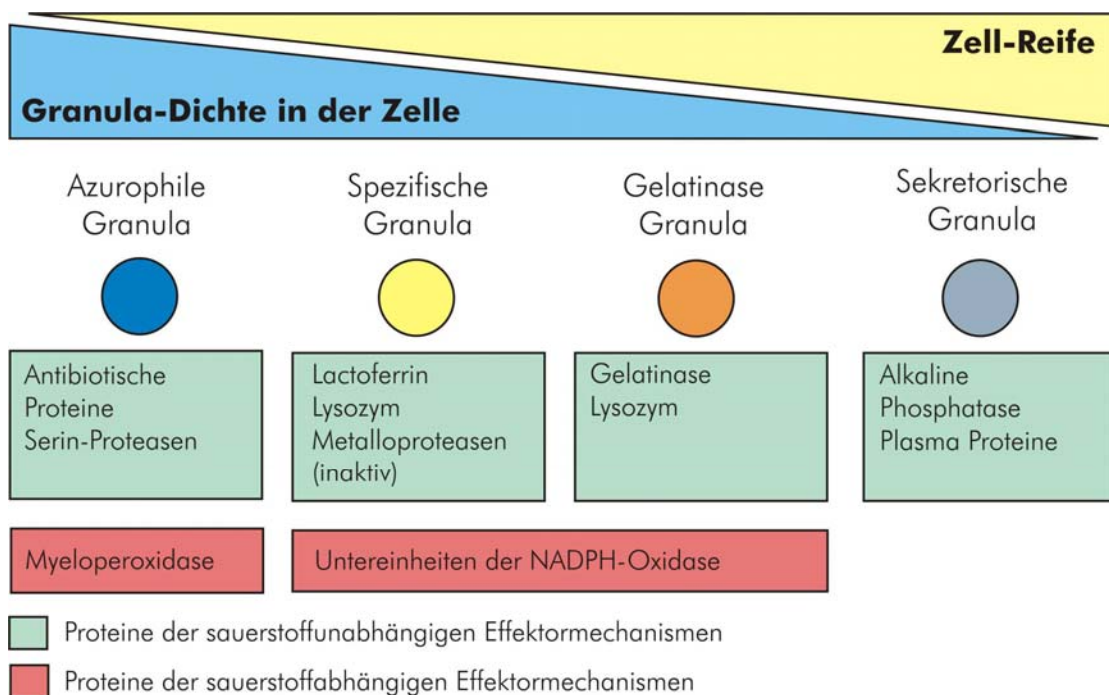


Abbildung 1-7: Neutrophile Granula und typische Inhalte

1.5.3.3 Oberflächenantigene

Differenzierungs- und Reifungsvorgänge während der Granulopoese werden von einer Reihe von Änderungen der Proteinexpression auf der Zelloberfläche begleitet. In vielen Fällen sind die

biologischen Aufgaben, die den Oberflächenantigenen während der Granulopoese zukommen noch nicht geklärt. TERSTAPPEN et al. konnten mit Hilfe durchflußzytometrischer Methoden den differenziellen Verlauf der Expression von Oberflächenantigenen mit morphologischen Entwicklungsstadien myeloider Zellen korrelieren [Terstappen L, 1992]. Dabei unterscheiden sich Granulozyten von anderen Blutzelltypen durch das zeitliche Profil des Auftretens bzw. Verschwindens von Marker-Antigenen von der Zelloberfläche während ihrer Entwicklung.

1.5.4 Regulation der granulozytären Differenzierung und Reifung

1.5.4.1 Regulation durch Zytokinsignale

Die Notwendigkeit von Wachstumsfaktoren im Mikromilieu der Zellen während der Hämatopoese wurde bereits erwähnt. Unter dem Begriff „Zytokine“ wird eine breite Palette von Proteinen zusammengefaßt, die in löslicher Form aber auch an die Plasmamembran oder die Extrazellulärmatrix gebunden, wie der Stem Cell Factor (SCF), vorkommen [Toksoz D, 1992]. Produziert werden sie von stromalen, akzessorischen und hämatopoetischen Zellen [Linenberger M, 1995]. Zytokine sind für den Erhalt von Vitalität und Proliferationsfähigkeit aller hämatopoetischer Progenitoren absolut notwendig [Cotter TG, 1994]. Im Hinblick auf die Regulation von Differenzierung und Reifung ist das Zytokinnetzwerk ein hochgradig redundantes und pleiotropes System.

Viele Zytokine wirken auf mehr als einen Zelltyp ein und können dabei mehr als einen Effekt hervorrufen, umgekehrt kann derselbe Effekt an einer Zelle durch mehrere Zytokine hervorgerufen werden [Ozaki K, 2002]. Die Granulopoese ist entscheidend mit dem Granulozyten Koloniestimulierenden Faktor (G-CSF) und Interleukin-6 (IL-6) verbunden. Knock-out-Mäuse, die G-CSF bzw. seinen Rezeptor nicht exprimieren, leiden an einem chronischen Neutrophilenmangel (Neutropenie) [Richards, MK 2003]. LIU et al. konnten ergänzend zeigen, daß Interleukin-6 (IL-6) an Regulation der Granulopoese unabhängig von G-CSF beteiligt ist [Liu, F 1997]. Die darüber hinausgehende relative Bedeutung weiterer Zytokine (GM-CSF, IL-3, SCF, etc.) für die Regulation der Granulopoese ist noch nicht vollständig verstanden.

Die Wirkung von Zytokinen wird durch spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche durch die Zellmembran ins Zytoplasma vermittelt. Die durch Zytokine vermittelten Signale bewirken hauptsächlich die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits die Expression von Genen des myeloiden Differenzierungs- und Reifungsweges steuern [Ward AC, 2000]. Lösliche Rezeptoren, z.B. für IL-6 und SCF sind zusätzliche Modulatoren der Zytokinwirkungen. Ihre Wirkung reicht von rein kompetitiver Hemmung, über die Zytokin-Stabilisierung bis zur Verstärkung des Ligandensignals am membranständigen Rezeptor [Jones, SA 2002].

1.5.4.2 Retinoide

Seit langem ist bekannt, daß die Gruppe der Retinoide eine wichtige Rolle bei der Differenzierung myeloider Vorläufer in Richtung der Neutrophilen darstellen. Zu diesen Verbindungen zählen das Vitamin A, das die biologisch aktiven Substanzen Retinal (Vitamin-A-Aldehyd), Retinol (Vitamin-A-Alkohol) und die all-trans-Retinolsäure (ATRA) umfasst. (Abbildung 1-8). Vitamin A Mangel ist unter anderem mit schweren Defekten in der Hämatopoese verbunden. COLLINS et al. et al. zeigten, daß promyelozytäre Leukämiezellen in Primärkultur durch ATRA zu terminal ausdifferenzierten, reifen Neutrophilen transformiert werden [Collins SJ, 1990]. Diesen Effekt macht man sich zunutze, um myelozytäre Leukämieformen zu heilen. Myeloide Zellen exprimieren im Zellkern retinoid-spezifische Rezeptoren (RAR - insbesondere RAR α), die nach Bindung von ATRA an der Induktion vieler Gene (Adhäsionsmoleküle, Zytokinrezeptoren etc.) beteiligt sind. Viele direkte Zielgene der RA-Rezeptorkomplexe sind selbst Transkriptionsfaktoren, die an der Induktion von weiteren Genen beteiligt sind [Gaines P, 2003]. Fehlt diese RA-Rezeptorklasse, so lassen sich z.B. RAR $^{-/-}$ -ES-Zellen in vitro nicht zu Granulozyten differenzieren [Labrecque J, 1998]. Die Tatsache, daß RAR α -defiziente knock-out-Mäuse normale Hämatopoese aufweisen, deutet auf alternative Wege der ATRA-Wirkung innerhalb des Netzwerks der Granulopoese hin [Kastner P, 2001].

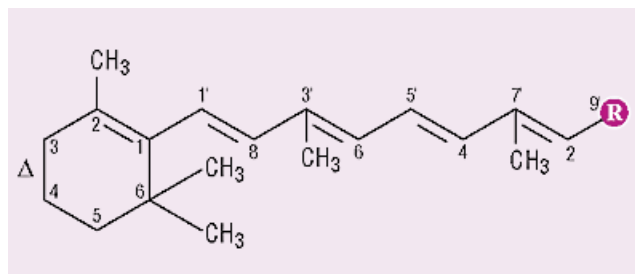


Abbildung 1-8: Biologisch aktive Retinoide

R= - CH₂OH: Retinol; - CHO: Retinal; -COOH: ATRA

1.5.4.3 Apoptose als Regulationsmechanismus

OSTBY et al. versuchen das quantitative Verhalten des granulopoetischen Systems mathematisch zu modellieren und vermuten eine wichtige Rolle des kontrollierten Zelltodes im Knochenmark zur Regulation der Granulopoese [Ostby I, 2003]. Bereits zuvor wurde mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Knochenmarkschnitten nachgewiesen, daß neutrophile Zelltypen

von Makrophagen aus dem Knochenmark entfernt werden [Dresch C, 1980]. Man nimmt an, daß eine große Menge von neutrophilen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Granulopoese apoptotisch zugrundegehen, ohne jemals das Knochenmark verlassen zu haben. Für den programmierten Zelltod als Regulationsfaktor für die Granulopoese spricht der Effekt, daß das Knochenmark in der Lage ist, innerhalb kürzester Zeit die neutrophile Zellproduktion um Faktor zwei bis fünf zu steigern. Auf welchem Weg das Apoptose-Signal zu den betroffenen granulopoetischen Vorläufern gelangt und welche molekularen Faktoren und zellulären Instanzen bei dessen Regulation eine Rolle spielen ist zur Zeit noch unklar.

1.6 Aspekte der klinisch relevanten Zellkultivierung

1.6.1 Ex vivo Kultur hämatopoetischer Zellen

Gerade auf dem Gebiet der hämatopoetischen Zellen ist eine Vielzahl von Arbeiten zur Kultivierung und Manipulation dieser Zellen außerhalb des Körpers (*ex-vivo*) durchgeführt worden. Sie gehören zu den am längsten bekannten und im klinischen Alltag routinemäßig gehandhabten Zellpopulationen überhaupt. Darüber hinaus sind sie aus vielen Quellen (Knochenmark, Nabelschnurblut, peripheres Blut) relativ einfach zugänglich. Die Motivation für klinische Zellkultivierung ergibt sich einerseits aus dem Wunsch, Zellpopulationen definiert zu manipulieren. Das Entfernen von Tumorzellen durch selektive Kultivierung von Zellen (Tumor-Purging) oder Gentherapieansätze sind hierunter zu zählen. Andererseits versucht man durch *ex-vivo* Expansionen bestehende Limitierungen in der Zahl von Zellen einer definierten Funktionalität zu überwinden. Entsprechend dem therapeutischen Zweck gehen diese Kultivierungen von verschiedenen Zelltypen aus:

1. *hämatopoetische Stammzellen*: Ein Beispiel ist die Expansion hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut. Man erhofft, durch Expansion der Zellen die Vorteile von Nabelschnurblutzellen bei der Transplantation auf Spender mit einem Körpergewicht von > 50kg zu übertragen.
2. *reife hämatopoetische Primärzellen*: Strategien der adoptiven Immuntherapie gehen von reifen Zellen des Blutes aus, um die körpereigene Abwehr des Patienten gegen einen Tumor oder lebensbedrohliche virale Infektionen effektiv zu unterstützen. Beispiele solcher Kultivierungen sind die Expansion von tumor- oder virusspezifischen T-Lymphozyten oder die Generierung von Dendriten mit einer definierten Reife. Für diese Strategie eignen sich natürlich nur diejenigen reifen Blutzellen, die auch Proliferationspotential ha-

ben (T-Lymphozyten) oder in großer Anzahl aus peripherem Blut gewonnen werden können (Monozyten).

3. *Zelllinien*: Hier wird die gewünschte Funktionalität nicht durch allogene oder autologe Primärzellen, sondern von einer permanent in Kultur wachsenden Zelle zur Verfügung gestellt. Ein Beispiel ist die Zelllinie NK-92, die gegenüber einer Reihe von primären Tumoren zytotoxische Fähigkeiten besitzt und in klinischen Studien zur Therapie von Lymphomen eingesetzt wird [Schmidt S, 2000]. Zelllinien gehen meist selbst aus der Kultivierung von Tumor-Proben hervor.

1.6.2 Kultivierungstechniken & Bioreaktorsysteme

Die technische Realisierung der verschiedenen Kultivierungen ist dem jeweils eingesetzten Zelltypus angepaßt. Des weiteren setzen auch die Berücksichtigung notwendiger Kultivierungsparameter, Materialien der Kultivierungssysteme und regulatorische Anforderungen (sh. Kap. 1.6.4) Rahmenbedingungen, die zu einer Vielzahl verschiedener Kultivierungsstrategien geführt haben.

Die ersten Arbeiten zur ex-vivo Expansion hämatopoetischer Zelltypen fanden in statischen, also ungerührten Kultivierungssystemen statt. Es zeigte sich jedoch, daß es mit diesen einfachen Systemen nicht gelang, optimale Bedingungen für die Zellvermehrung zu schaffen. Nachteilige Aspekte dieser Kultivierungsstrategien sind unter anderem fehlende Durchmischung begleitet von Gradientenbildung (Substrat-, Metabolit-, Gelöstsauerstoffkonzentration etc.), das Fehlen von Mess- und Regeleinrichtungen und mangelhaftes scale-up Potential. Bei Kultivierungen, die häufige Manipulationen (Fütterung, Supplementierung von Wachstumsfaktoren) erfordern, ist in den gängigen statischen Kultivierungssystemen ein Öffnen unumgänglich, was das Risiko der Kontamination erhöht. Durch den Einsatz von Bioreaktoren wird versucht die meisten dieser Nachteile auszuräumen. Diese Bioreaktoren stellen Adaptionen von Systemen dar, die bereits in der tierischen Zellkultur etabliert waren: Rührkessel und Spinner, Wirbelschicht-, Festbettreaktoren und Hohlfasermodule [Cabrita GJM, 2003]. So konnte in Arbeiten der Gruppe die Kultivierung von polyklonal stimulierten T-Lymphozyten bis in den 20-l Rührkessel-Maßstab erfolgreich vergrößert werden [Hilbert U, 2002]. Besonders geformte Suspensions-Kulturgefäße erlauben zudem die kontrollierte und geregelte Kultivierung in Volumina von ca. 40 mL bis 550 mL. Damit kann eine Kultur auch mit relativ geringen Mengen an primären T-Lymphozyten unter kontrollierten Bedingungen gestartet werden [Schmidt S, 2000].

1.6.3 Kulturparameter

Die Maximierung der Produktivität und der Produktqualität sind klassische Zielgrößen der Bioprozeßentwicklung von Produktionszellen. Entsprechend werden die Prozeßparameter auf diese Ziele hin optimiert. Bei der Kultivierung von hämatopoetischen Zellen, die selbst das Produkt für die Therapie darstellen, sind jedoch die Einflüsse der Prozeßparameter auf den Zelldifferenzierungsgrad, die Funktionalität und Reife sowie die Ansprüche der verschiedenen Reifungsstadien an ihre *in vitro* Umgebung zu berücksichtigen. Eine genaue Definition der Zielzellpopulation, die am Ende der Kultivierung erhalten werden soll, ist unerlässlich, um die für die Generierung dieser Zellen optimalen Bedingungen zu finden. Dazu gehören unter anderem die Untersuchung der wichtigsten physiko-chemischen und biologischen Kulturparameter im Hinblick auf hämatopoetische Zellen im Allgemeinen und neutrophile Zelltypen im Speziellen.

1.6.3.1 Temperatur

Die Standardmäßige Kultivierung von tierischen Zellen erfolgt bei 37°C, entsprechend der normalen Kerntemperatur in der Körpermitte. Die Erhöhung der Temperatur ist die natürliche Reaktion des Körpers auf Infektionen. Lokal, im Gebiet des Entzündungsherd, bewirkt die Temperaturerhöhung den Anstieg der Aktivität von Immunzellen und eine „hitze“-bedingte Hemmung von Mikroorganismen. Die systemische Temperaturerhöhung auf Temperaturen > 38,5°C (Fieber) steigert allgemein alle biochemischen Reaktionen des Körpers gemäß der RGT Regel und unterstützt die Ausbildung einer Immunantwort, z.B. durch die Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit von T-Lymphozyten. Neutrophile Zellen werden bei Fieber vermehrt im Knochenmark gebildet und freigesetzt [Pschyrembel, 1997].

1.6.3.2 Osmolalität

Die Osmolalität ist das Maß für die pro Masse Lösungsmittel gelösten Teilchen. Da eukaryontische Zellen keine stabile Zellwand besitzen, sind sie mit ihrer Plasmamembran in direktem Kontakt mit dem Lösungsmittel. Schwankungen des osmotischen Drucks führen zu Druckgradienten über die Membran. Ein- oder ausströmendes Wasser verändert die Homöostase innerhalb der Zelle, was im Extremfall zu irreversiblen cytotoxischen Schäden führt. Die optimale Osmolalität für die Kultivierung kann bei verschiedenen Zelltypen stark variieren [Burg, 1997]. McADAMS et al. und SCHMIDT konnten für die Kultivierung hämatopoetischer Progenitoren ein Optimum von ca. 310 mosmol/kg bestimmen [McAdams, 1997; Schmidt S, 2000]. Der physiologische Wert für Blut liegt bei 300 mosmol/kg.

1.6.3.3 pH-Wert

Seit langem ist bekannt und allgemein anerkannt, daß der pH-Wert des Kulturmediums einen direkten Einfluß auf das Wachstum und die Produktivität von Zellen hat [Miller WM, 2000]. Der optimale pH-Bereich zur Kultivierung von Zellen ist meist eng begrenzt. In Bezug auf die Differenzierung und Reifung von hämatopoetischen Zellen sind die Effekte dieses in der technischen Anwendung so wichtigen Parameters bisher nur ungenügend untersucht. Der physiologische pH-Wert des Blutes liegt bei pH 7,4. Man weiß jedoch, daß Knochenmark pH-Gradienten existieren, die von pH 7,4 (im Blutgefäß) bis pH 7,1 (in Knochenmarknischen mit einem Abstand von $>30\mu\text{m}$ vom Blutgefäß) reichen [Martin GR, 1994]. HEVEHAHN und PAPOUTSAKIS konnten mit Kultivierungen von CD34^+ Zellen in Medien mit verschiedenen Start-pH-Werten (Einstellung des pH-Wertes vor dem Inokulum durch 1N HCl, keine kontinuierliche pH-Kontrolle während des Versuchs) zeigen, daß der pH-Wert des Mediums neben der Zellproliferation auch die Zelldifferenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflusst [Hevehahn DL, 2000].

1.6.3.4 Sauerstoffsättigung des Mediums

Über die Effekte von gelöstem molekularem Sauerstoff auf Differenzierung und Reifung von hämatopoetischen Zellen ist liegen, ebenso wie für den pH-Wert des Mediums, kaum Daten aus kontrollierten Kultivierungen vor. Es ist mehrfach beschrieben worden, daß durch Kultivierung bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck in der Begasungsatmosphäre die Proliferation früher Vorläuferzellen unterstützt werden kann [Broxmeyer HE, 1990]. Dieser Effekt kann durch verminderten oxidativen Streß, hervorgerufen durch Sauerstoffmetabolite aus der Atmungskette, erklärt werden. Der Sauerstoffpartialdruck beeinflusst aber auch zusammen mit dem pH-Wert des Mediums die Expression von Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche [Hevehahn DL, 2000; Laluppa JA, 1998].

1.6.3.5 Kultivierungsmedium und Mediensupplemente

Für ein klinisch einsetzbares Kultivierungsverfahren werden ganz besondere Anforderungen das Kultivierungsmedium gestellt. Es soll

- frei von tierischen Bestandteilen sein,
- aus wohl definierten, kontrollierten Komponenten bestehen,
- gemäß den einschlägigen Qualitätsanforderungen (GMP) hergestellt werden,
- seine Unbedenklichkeit im Rahmen von klinischen Studien nachgewiesen haben.

Dies ist insbesondere bei der Produktion von Zellbiomasse für die therapeutische Anwendung von Wichtigkeit, da keine Aufreinigungsprozeduren der Fermentation nachgelagert sind. Aufarbeitsverfahren für Fermentationsbrühen (hauptsächlich chromatographische Methoden) sichern die Abreicherung von Substanzen, nicht oder nicht in signifikanten Mengen in das Endprodukt (Biopharmazeutikum) kommen sollen. Die Zellbiomasse hingegen läßt sich nur durch Waschen zu einem gewissen Grad oberflächlich von Medienbestandteilen und Debris befreien. Trotzdem bleiben signifikante Mengen der Medienbestandteile innerhalb der Zellen erhalten oder an der Zelloberfläche anhaften.

Klassischerweise werden bovine Seren, insbesondere fötales Kälberserum, als Medienkomponente eingesetzt, um die Kulturbedingungen der Situation *in vivo* anzunähern. Seren liefern eine Vielzahl an wachstumsfördernden Hormonen, Bindungs- und Transporterproteinen, anorganischen Salzen und Vitaminen [Lindl T, 2000]. Da Seren jedoch auch mit Toxinen (Umweltgiften, bakterielle Toxine) und vor allem xenogenen Pathogenen (Prionen, Viren, Bakterien) kontaminiert sein können, ist die Genehmigung eines Prozesses basierend auf tierserumhaltigen Medien zwar prinzipiell möglich, jedoch mit einem Restrisiko behaftet. Bei der Anwendung von Zellen, die in tierserumhaltigen Medien produziert werden, gelangen zwangsläufig auch tierische Antigene in nicht unerheblichen Mengen in den Körper, weshalb auch von Sensibilisierungen und allergischen Überreaktionen ausgegangen werden muß.

Als mögliche zusätzliche, nicht-tierische Mediensupplemente werden in der vorliegenden Arbeit folgende Blutprodukte humanen Ursprungs untersucht:

1. BISEKO ist ein als Arzneimittel zugelassenes Produkt, das aus gepoolten Plasmaspenden hergestellt wird. Durch die relativ große Poolgröße sind qualitative und quantitative Schwankungen der Inhaltsstoffe relativ gering. Der Herstellungsprozess enthält zusätzlich eine Stufe zur Virusabreicherung, was die Sicherheit dieses Produkts - verglichen mit Einzelspenden - erhöht.
2. allogenes Serum aus einer Vollblutspende von gesunden erwachsenen Spendern gewonnen. Obwohl allogene Blutspenden aufwendig auf mikrobielle Kontaminationen getestet werden, bleibt ein geringes Anwendungsrisiko.
3. autologes Serum entstammt der gleichen Nabelschnurblutprobe wie die jeweils inokulierten CD34⁺ Zellen. Gegen die Verwendung von autologem Serum sprechen keine Bedenken. Das gewinnbare Volumen hängt von der Größe der Nabelschnurblutprobe ab und ist begrenzt.

1.6.3.6 Hämatoipoetine

Als wohl wichtigster biologischer Parameter bei der ex-vivo Kultivierung sind die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (auch Zytokine oder Hämatoipoetine genannt) anzusehen. Ihre Bedeutung für die Regulation von Differenzierung und Reifung, die Stimulation von Proliferation und den Erhalt der Vitalität neutrophiler Zellen ist bereits im Kapitel 1.5.4.1 besprochen worden. Ihre Verfügbarkeit als rekombinante Proteine legt die Basis für ex-vivo Expansionen im isolierten Suspensionssystem. Entsprechend ihrer biologischen Aktivität, nachgewiesen in extrazellulären Assays bzw. durch Untersuchungen an knock-out Mäusen, werden die hämatopoetischen Zytokine in verschiedene Subgruppen eingeteilt:

1. Typ1-Hämatoipoetine sind Faktoren, die direkt in der Regulation der Hämatopoese eine Rolle spielen und deren Anwesenheit für einige Zelltypen absolut notwendig ist.
2. Typ2 - Hämatoipoetine entfalten zusammen mit Typ1 Hämatoipoetine synergistische Effekte besitzen selbst jedoch keine CSF-Aktivität
3. Typ3 - Hämatoipoetine wirken modulierend auf die Hämatopoese indem sie die Freisetzung von CSF aus ihren Zielzellen bewirken

Aufgrund der vielfältigen redundanten und synergistischen Wirkungen der Zytokine sind die Grenzen zwischen den Hämatoipoetin-Gruppen fließend. Die Eigenschaften der in dieser Arbeit angewendeten Zytokine werden in Tabelle 1-1 kurz vorgestellt.

1.6.4 Anforderungen an klinisch einsetzbare Prozesse & Bioreaktoren

Beim klinischen Einsatz von Zellkultivierungsprozessen sind neben der eigentlichen Anforderung, Zellen der gewünschten Reife und Funktionalität zu produzieren, weitere Aspekte zu berücksichtigen. Das Optimierungsziel der Prozeßentwicklung wird in der Klinik nicht nur durch die maximal mögliche Produktmenge (in diesem Fall Zellen) definiert. Vielmehr kommen Fragen der Produktsicherheit und der Bedienbarkeit des Kultivierungssystems als weitere Optimierungsgröße hinzu. Alle Parameter eines Zellkultivierungsprozesses, angefangen von den verwendeten Reagenzien für die Zellgewinnung und Zellkultivierung, den Materialien des Bioreaktors bis hin zum Kultivierungsprotokoll und dem ausführenden Personal selbst müssen auf die Erfüllung der Anforderungen, die sich aus den einschlägigen Regularien ergeben, überprüft werden. Die international einflußreichste Rechtsquelle für Richtlinien im Bezug auf Herstellung und Anwendung von Therapeutika ist die amerikanische Food and Drug Administration (FDA). In Deutschland unterliegt die Präparation von Blutzellen zur Anwendung am Patienten dem Arzneimittelgesetz und dem Transfusionsgesetz.

Tabelle 1-1: Literaturbeschriebene Eigenschaften von Zytokinen, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Zytokin	Hämatopoietin-Typ	MW [kDa]	Quelle	Biologische Aktivität
Interleukin 1 β	Typ2, Typ3	17	MNZ, Endothel, Stroma	Inflammations-Mediator
Interleukin 3	Typ1	15	MNZ, Endothel, Stroma	Multi-lineage CSF
Interleukin 6	Typ2	28	Fibroblasten, Endothelzellen	Differenzierung/Reifung hämatopoetischer Zellen
Interleukin 10	Typ3	36	T-, B-Zellen	Th1/Th2 Regulation Suppressiert Zytokinexpression
EPO	Typ1	21	Zellen der Niere, Hepatozyten	CSF für Erythrozyten
G-CSF	Typ1	19,6	MNZ, PMN, Endothel, Stroma	CSF für Granulozyten
GM-CSF	Typ1	22	MNZ, Endothel, Stroma	CSF für Monozyten & Granulozyten
SCF	Typ1	28	Stroma	Multi-lineage CSF
TPO	Typ1	35	Stroma	CSF für Thrombozyten
Flt3-L	Typ2		Stroma	Proliferation von Progenitorzellen

Darüber hinaus sind Richtlinien der Bundesärztekammer und des Paul-Ehrlich-Instituts maßgeblich, deren Inhalte sich stark an den FDA-Vorgaben orientieren. Tabelle 1-2 gibt einen Ausschnitt der wichtigsten nationalen und internationalen Normen wieder.

Für die konkrete Entwicklung einer Kultivierungsstrategie bedeutet dies, daß bereits im Entwicklungsstadium die wichtigsten regulatorischen Maßgaben bedacht sein sollten. Für einen Prozeß bedeutet dies

- die Durchführbarkeit der Kultivierung in klinisch einsetzbaren (qualifizierten) Kultivierungssystemen
- geschlossene Systeme von der Zellgewinnung bis zur Anwendung am Patienten
- einfache Bedienbarkeit und hohe Automatisierbarkeit
- Ausschließliche Verwendung von definierten Materialien und Reagenzien

Jede noch so hervorragende Kultivierungsstrategie bleibt chancenlos für eine klinische Anwendung, wenn diese Anforderungen nicht umgesetzt werden können.

Tabelle 1-2: Ausschnitt aus den wichtigsten Regularien, die klinikrelevante Kultivierung von (Stamm-) Zellen betreffend
[nach [Rowley SD, 2001], ergänzt]

Referenz	Rechtsquelle	Titel
21 CFR 211	FDA	Current Good Manufacturing Practices for Drugs
21 CFR 820	FDA	Current Good Manufacturing Practices for Devices
62 FR 52696	FDA	A Proposed Approach to the Regulation of Cellular- and Tissue-based Products
64 FR 52696	FDA	Suitability Determination for Donors of Human Cellular- and Tissue-based Products
66 FR 1508	FDA	Current Good Tissue Practices for Manufacturers of Human Cellular- and Tissue-based Products
66 FR 5447	FDA	Human Cells, Tissues and Cellular- and Tissue-Based Products; Establishment Registration and Listing
2004/23/EG	EU	Festlegung von Qualitäts- und Sicherheitsstandards für die Spende, Beschaffung, Testung, Verarbeitung, Konservierung, Lagerung und Verteilung von menschlichen Geweben und Zellen
BGBI	DE	Arzneimittelgesetz 12. Novelle
BGBI	DE	Gesetz zur Regelung des Transfusionswesens
BGesundhbl. 2001-44, 1240	PEI	Richtlinie zur Generierung von Blut- und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten

2 Problemstellung

Neutrophile Granulozyten stellen das zentrale Element der angeborenen Immunität dar und sind unverzichtbar für die Abwehr von Mikroorganismen, die, wenn sie sich über den Infektionsherd hinaus systemisch ausbreiten, ein Sepsisgeschehen einleiten. Mit neutrophilen Zellen können daher vielversprechende Ansätze zur Prävention und zur Therapie der Sepsis verfolgt werden. Die beiden denkbaren Indikationsgebiete für die Anwendung neutrophiler Zellen wären:

1. Milderung oder Verkürzung der neutropenen Phase nach HDCT (vgl. Kap. 1.4.1)
2. Unterstützung der angeborenen Immunität bei einer akuten Sepsis.

Die Transfusion von primären Spendergranulozyten wirft jedoch etliche logistische Probleme und medizinische Bedenken auf, die einer breiten Anwendung im klinischen Alltag im Wege stehen (Kap. 1.4.2). Daher stellt zur Zeit die Transfusion neutrophiler Zellen keine allgemein akzeptierte Option zur Prävention und/oder Therapie der Sepsis dar.

Die etablierten Techniken der *in vitro* Zellkultur bieten hingegen prinzipielle Vorteile, deren Anwendung auf die Generierung neutrophiler Zellen den klinischen Einsatz dieser Zellen eröffnen könnte:

- Die Zellspende zur Gewinnung von Ausgangsmaterial für das Inokulum der Kulturen und Kultivierung können entkoppelt werden. Spender müssen nicht „auf Abruf“ zur Verfügung stehen, im Fall von CB-Zellen muß auch keine G-CSF-Stimulierung des Spenders erfolgen
- Die Zellen sind termingerecht und auch auf Vorrat produzierbar
- Die Qualität und Reinheit der Zellen ist kontrollierbar

Die Anforderungen an das zu produzierende Zellmaterial definieren sich für die beiden oben genannten Indikationsgebiete unterschiedlich (Abbildung 2-1):

1. Präventionsansatz: Die neutropene Phase nach HDCT ergibt sich durch den therapeutieinduzierten „Produktionsausfall“ sich teilender neutrophiler Vorläuferzellen im Knochenmark. Bis das Stammzelltransplantat das Empfängerknochenmark besiedelt und genügende Zellmengen neutrophiler (Vorläufer-) Zellen generiert hat, vergeht eine „lag“-Phase mit einschneidender Neutropenie.

Benötigtes Zellmaterial: Die zu ersetzenden Zellen stellen den „Mittelbau“ des granulopoetischen Systems dar: Zellen, die in die neutrophile Richtung „an“ differenziert sind, aber noch nicht in den Reifungsprozess eingetreten sind. Diese Zellen müssen für einen kurzen Zeitraum in der Lage sein zu proliferieren und vitale, reife neutrophile Zellen zu produzieren.

2. Therapieansatz: Die Sepsis und ihre lebensbedrohliche Symptomatik tritt rasch und heftig auf. Zur effektiven Unterstützung des angeborenen Immunsystems des Patienten sind große Zellmengen nötig ($\sim 10^9$ bis 10^{10}). Je nach dem Erfolg der Behandlung sind eventuell mehrere Behandlungszyklen notwendig.

Benötigtes Zellmaterial: Die Zellen müssen vor allem funktionale Reife aufweisen. Zur effektiven Gestaltung der Therapie sollten die Zellen auch eine definierte, möglichst einheitliche Reife aufweisen. Die Zellen müssen kein Teilungspotential mehr aufweisen. Das Zellmaterial muß jedoch durch geeignete Verfahren konservierbar und für die Behandlung „bed-side“ zum Patienten verfügbar sein.

Die Generierung neutrophiler Zellen *in vitro* steht jedoch in Bezug auf das Ausgangsmaterial für die Kultivierung vor einem Problem: neutrophile Granulozyten sind terminal ausdifferenzierte Zellen, die keine Fähigkeit zur Proliferation mehr besitzen. Ex-vivo Expansionsansätze, wie sie für T-Lymphozyten bereits erfolgreich durchgeführt werden, können mit neutrophilen Zellen daher nicht realisiert werden. Es kann also prinzipiell nur von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen oder präexistierenden humanen myeloiden Zelllinien als Inokulums-Material ausgegangen werden.

Die Möglichkeit, ausgehend von $CD34^+$ hämatopoetischen Zellen (aus Knochenmark, G-CSF mobilisiert oder Nabelschnurblut) neutrophil differenzierte Zellen *in vitro* zu expandieren wurde bereits von einigen Autoren berichtet [Haylock DN, 1992; McNiece I, 2001; Scheduling S, 2000; Zimmermann TM, 1996]. Trotzdem ist über optimale Kultivierungsbedingungen dieser Zellen nur wenig bekannt. Das Wissen um den Einfluß von biologischen und physiko-chemischen Parametern auf Differenzierung, Reifung sowie Wachstumsverhalten und Vitalitätserhalt der Zellen in Kultur ist von zentraler Bedeutung um ein Kultivierungsprotokoll zu entwickeln, das in einen verfahrenstechnischen Zusammenhang gestellt werden kann. Nur so sind rationale Überlegungen zu einem kliniktauglichen scale-up möglich (Abbildung 2-1).

Die Expansion von myeloiden Zelllinien zur biotechnologischen Bereitstellung funktional ausgereifter Granulozyten ist bislang in der Literatur nicht verfolgt worden. Dabei spielen u.a. medizinische Bedenken gegen das Infundieren von Krebszellen in einen Patienten eine Rolle.

Durch die mit dem EISS System (sh. Kap. 1.4.2) realisierte Trennung des Patienten von den neutrophilen Zellen im Therapiesystem eröffnen sich jedoch neue Perspektiven für die Verwendung von Tumorzelllinien zu therapeutischen Zwecken. Myeloide Zelllinien, wie z.B. die promyelozytäre HL-60 waren bisher nur als zelluläres Modell für leukämische Erkrankungen bzw. als System zur Untersuchung myeloider Differenzierungs- und Reifungsvorgänge von grundlagenwissenschaftlichem Interesse. Folglich sind auch für diese seit Jahrzehnten bekannten Zellen viele verfahrenstechnisch relevante Parameter der Expansion und Funktionalisierung noch nicht im Hinblick auf einen scale-up fähigen, GMP-fähigen Prozeß untersucht worden (Abbildung 2-1).

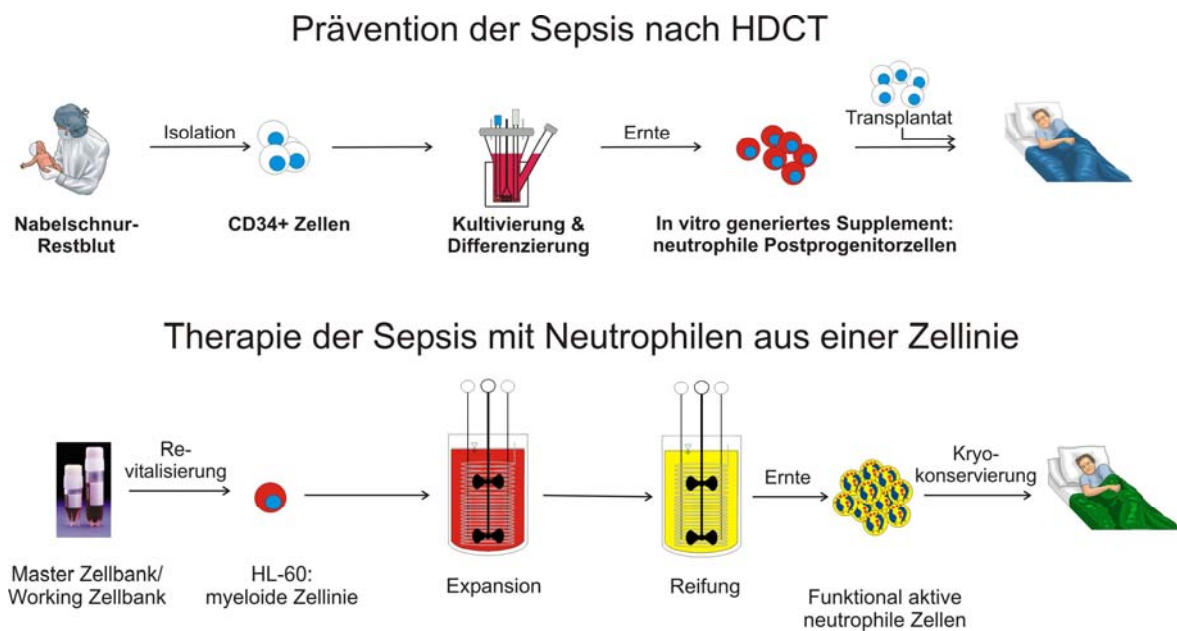


Abbildung 2-1: Möglichkeiten der biotechnologischen Herstellung von neutrophilen Zellen

Die pH und pO_2 -kontrollierte Kultivierung ist in der industriellen Praxis längst eine allgemein akzeptierte Voraussetzung, um scale-up relevante Fermentationsdaten zu generieren. Als Werkzeug für die Prozessentwicklung sind multi-parallele Fermentationssysteme auf dem Markt erhältlich, die vergleichende Untersuchungen unter kontrollierten Bedingungen ermöglichen. Die Mindestfüllvolumina der etablierten Kultivierungssysteme (Spinner, Rührkessel, etc.) führen jedoch im Fall von Primärzellkultivierungen zu Limitierungen. Einerseits sind die für die Forschung zur Verfügung stehenden Zellzahlen begrenzt und wachstumsfaktorhaltige Kultivierungsmedien stellen einen immensen Kostenfaktor dar, so daß vergleichende, mehrfachparallele Untersuchungen bislang nicht möglich waren. Hier fehlt es an einem kleinvolumigen (ca. 50 mL) Kultivierungssystem, das pH- und pO_2 - kontrollierte, mehrfachparallele Kultivierungen ermöglicht.

3 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit ist es, die ex-vivo Generierung von neutrophilen Granulozyten in einen biotechnologischen Zusammenhang zu stellen, um Kultivierungsstrategien zur kliniktauglichen Produktion dieser Zelltypen zu erarbeiten. Das Feld der klinikrelevanten in-vitro Generierung von neutrophilen Zellen aus Nabelschnurblut bzw. präexistierenden Zelllinien ist bisher noch nicht auf breiter Front erschlossen. Zur versuchsbegleitenden Charakterisierung der kultivierten Zellen werden phänotypische und morphologische Analysetechniken etabliert. Darüber hinaus werden die Immunophänotypisierung der Zellen mittels Durchflußzytometrie sowie die in vitro Testung der zellulären Effektorfunktionen untersucht.

Mit dieser Arbeit sollen verfahrenstechnisch relevante physiko-chemische und biologische Parameter identifiziert werden, die Wachstum, Differenzierbarkeit und Reifung von primären CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut zu neutrophilen Zellen beeinflussen können. Dazu werden im kleinen Maßstab Medienwahl, Mediensupplementierung, Wachstumsfaktorzusammensetzung, Zelldichte, Osmolalität, Temperatur und Zellfütterung untersucht. Anschließend soll die Eignung der Primärzellkultivierung für die präventive bzw. therapeutische Indikation sowie die Übertragbarkeit des optimierten Kultivierungsprotokolls auf klinikrelevante Kultivierungssysteme überprüft werden.

Für die Kultivierung und funktionale Ausreifung der kontinuierlich wachsenden myeloiden Zelllinie HL-60 werden grundlegende Parameter des Kultivierungs- und Ausreifungsprozesses wie Medienwahl, Medienbestandteile, limitierende Faktoren, sowie Dosis-Wirkungs-Relation des Reifungsinduktors unter kontrollierten Bedingungen untersucht. Diese Daten sollen als Basis für die Entwicklung eines Prozesses im Produktionsmaßstab dienen.

Inbesondere für vergleichende Kultivierungen unter pH- und pO₂-geregelten Bedingungen soll ein kleinvolumiges, parallelisierbares Kultivierungssystem entwickelt, charakterisiert und etabliert werden. Dieses System soll die Lücke zwischen statischen Kultivierungssystemen, die nur begrenzt scale-up fähig sind und gerührten Systemen mit großen Mindestfüllvolumina schließen. Erst damit sind verlässliche Aussagen über die Bedeutung dieser Parameter für die granulozytäre Differenzierung und Reifung möglich.

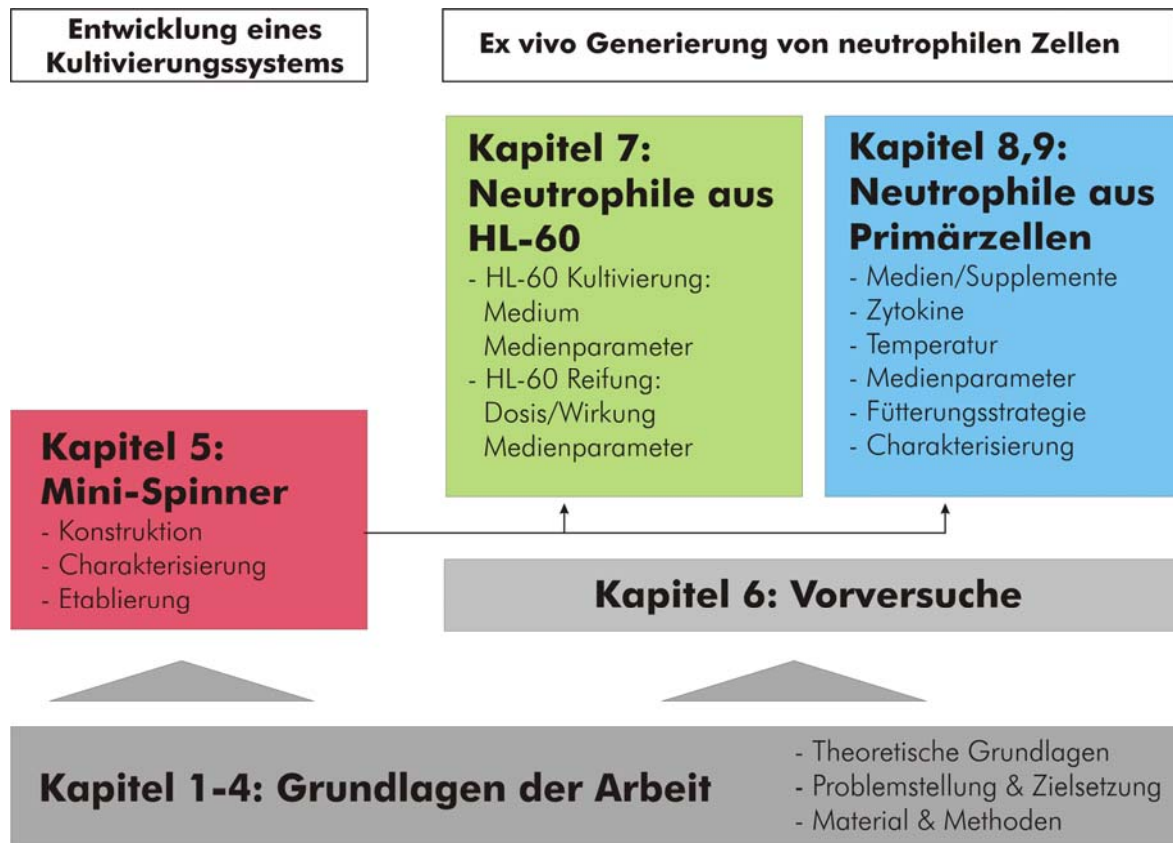


Abbildung 3-1: Konzept der vorliegenden Arbeit

4 Material und Methoden

4.1 Medien und Zusätze

4.1.1 Kulturmedien

Alle für die Kultivierungsversuche in dieser Arbeit eingesetzten Basal- und Komplexmedien wurden von kommerziellen Anbietern bezogen und entsprechend den Herstellerempfehlungen gelagert.

4.1.2 Plasmen, Seren und Serumkomponenten

Vollblut besteht zu 45% aus zellulären Bestandteilen und zu 55% aus einer Flüssigkeit, dem Blutplasma. Um Plasma gewinnen zu können, muß dem Vollblut bei der Blutspende ein Gerinnungshemmer zugesetzt werden. Durch Gerinnung des Vollblutes entsteht Serum, das von den zellulären Bestandteilen und Fibrin befreit ist. Vor- und Nachteile der Verwendung von Seren für die Zellkultivierung werden in Kap. 1.6.3.5 diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wurden Seren sowohl humanen als auch tierischen Ursprungs verwendet.

Plasmen und Seren humanen Ursprungs wurden aus Blutspenden gesunder, erwachsener Spender gewonnen. Die Blutabnahme erfolgte durch den medizinischen Dienst des Forschungszentrums in klinikübliche Blutabnahmeröhrchen. Für die Gewinnung von Plasma erfolgte die Blutabnahme in Heparin-Röhrchen. Die zellulären Bestandteile des Blutes wurden für 15 min bei 800 g sedimentiert. Serum wurde mit entsprechenden Serum-Röhrchen gewonnen. Die Serumröhrchen wurden 20 min bei RT inkubiert, bis die Gerinnung abgeschlossen war. Der entstehende Blutkuchen wurde für 15 min bei 800 g sedimentiert. Die jeweiligen Plasma- bzw. Serumüberstände wurden steril abgenommen und 15 min bei 15.000 g zentrifugiert. Es scheidet sich an der Oberfläche eine trübe, lipidhaltige Phase ab, die abgenommen und verworfen wurde. Die klare Flüssigkeit wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Autologes Nabelschnurblutplasma wurde durch Abnahme des Nabelschnurblutes in sterile 50 mL Röhrchen gewonnen. In den Röhrchen wurde 1 mL PBS mit 1000 U Heparin als Gerinnungshemmer vorgelegt.

Fötales Rinderserum (fetal bovine serum, FBS) wurde chargengetestet von der Firma Gibco bezogen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Vor der Verwendung erfolgte bei allen Plasmen und Seren, soweit nicht anders beschrieben, Hitzeinaktivierung durch Inkubation bei 56°C für 30min.

Als Ersatz für Plasmen und Seren von Einzelspendern kann das zugelassene Arzneimittel BISEKO verwendet werden. Diese standardisierte Serumkonserve deckt das natürliche Spektrum der Serumproteine weitestgehend ab und wird in der Klinik als Ersatz für Plasmaspenden verwendet. Aufgrund des Herstellungsverfahrens zeichnet sich die Serumkonserve durch eine höhere Virussicherheit und geringere Chargen-Variabilität als Produkte von Einzelspendern aus.

4.1.3 Zytokine

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zytokine wurden in rekombinanten Zelllinien bzw. Mikroorganismen hergestellt (Tabelle 4-1). Die Zytokine von R&D Systems wurden in lyophilisierter Form ohne stabilisierende Proteinzusätze geliefert. Zur Rekonstitution wurde das Lyophilisat in sterilem PBS + 0,5% humanem Serumalbumin aufgenommen. Diese Stammlösung wurde bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Die beiden Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF sind als Arzneimittel im klinischen Einsatz und wurden als verwendungsfertige Lösung (GM-CSF) bzw. als Lyophilisat (G-CSF) geliefert. Die Handhabung der beiden Arzneimittel erfolgte analog der oben beschriebenen Vorgehensweise.

Tabelle 4-1: Verwendete Zytokine

Zytokin	Aktivität gemäß Herstellerangaben [U / μ g]	Produktionsorganismus	Hersteller
IL-1 β	2,0·10 ⁵	E.coli	R&D Systems, Wiesbaden
IL-3	2,3·10 ¹	E.coli	R&D Systems, Wiesbaden
IL-6	1,1·10 ⁵	E.coli	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	2,9·10 ⁴	E.coli	R&D Systems, Wiesbaden
Flt3-L	3,1·10 ³	E.coli	R&D Systems, Wiesbaden
G-CSF (Granocyte)	1,2·10 ²	CHO	Chugai Pharma, Frankfurt
GM-CSF (Leucomax)	1,1·10 ⁴	E.coli	Novartis Pharma, Nuernberg
SCF	1,2·10 ³	E.coli	R&D Systems, Wiesbaden

4.2 Zellen, Zellaufreinigung

4.2.1 Zelllinien

4.2.1.1 Hybridoma (MAK 425)

Bei der verwendeten Zelllinie handelt es sich um eine Maus-Maus-Hybridomazelle. Die Zelle sekretiert einen IgG-Antikörper der Subklasse 2a. Der MAK425-Antikörper ist gegen den humanen EGF-Rezeptor gerichtet [Murthy, U 1990]. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von der Firma Merck KGaA, Darmstadt zur Verfügung gestellt.

4.2.1.2 CHO (MUC1-IgG2a)

Die verwendete CHO (Chinese Hamster Ovary) Zelllinie geht aus der CHO-K1-Linie hervor, die von der amerikanischen Zell- und Gewebekbank ATCC bezogen wurde. Die Zellen wurden aus konfluenter Kultur mit dem Plasmid MUC1-IgG2a-pcDNA3 durch Elektroporation transfiziert. Aus diesem Ansatz wurde mit Hilfe von G418-Sulphat eine rekombinante CHO-MUC1-IgG2a Zelllinie generiert, die die rekombinante cDNA genomisch integriert hat. Die Zellen sekretieren das Fusionsprotein MUC1-IgG2a, bestehend aus dem extrazellulären Teil eines humanen brustkrebsassoziierten Mucin-Glykoproteins (MUC1) und dem Fc-Teil eines murinen IgG-2a-Antikörpers. Die ursprünglich adhärent wachsende Zelllinie wurde für die Prozeßentwicklung in gerührten Kultivierungssystemen auf Wachstum in Suspension adaptiert [Link T, 2003].

4.2.1.3 HL-60

Die permanente humane Leukämiezelle HL-60 stammt aus einer Kultur von peripheren Leukozyten, die durch Apherese von einer Patientin mit akuter promyelozytärer Leukämie gewonnen wurden [Gallagher R, 1979]. Bei dieser in Suspension wachsenden Zelllinie handelt es sich morphologisch um Promyelozyten, die durch niedermolekulare Stimuli in granulozyten- bzw. monozyten-ähnliche Zellen terminal ausreifen können [Breitman TR, 1980; Collins SJ, 1990]. Die nicht stimulierten HL-60 Zellen zeigen keine Phagozytenaktivität und reagieren nicht auf chemotaktische Reize. Die Zellen wurden freundlicherweise von der Firma Teraklin AG, Rostock zur Verfügung gestellt.

4.2.2 Primäre Zellen

4.2.2.1 CD34⁺ Zellen

CD34⁺ Zellen wurden aus venösem Restblut von Nabelschnur und Plazenta gesunder Neugeborener nach Zustimmung der Eltern gewonnen. Die Blutabnahme führten die Geburtshelfer der beteiligten Krankenhäuser durch. Nach Durchtrennung der abgeklemmten Nabelschnur wird

das Nabelschnurrestblut durch Punktion der Nabelschnurvene in einen Blutabnahmebeutel (MacoPharma, Langen) mit vorgelegtem CPD-A-Puffer (Citrät-Phosphat-Dextrose-Adenosin) entnommen. Alternativ dazu erfolgt die Blutabnahme durch Öffnen der Klemme und Ausstreichen des Restblutes in ein steriles 50mL Röhrchen mit 1 mL vorgelegtem Heparin-Puffer (1000 U/mL Heparin in PBS).

Es wurden nur Blutproben, die nicht älter als 24 Stunden waren, aufgearbeitet. Im ersten Schritt wird die mononukleäre Zellfraktion (mono nuclear cells, MNC) durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu werden in Leucosep-Röhrchen (Größe: 50 mL; Greiner, Solingen) gemäß den Herstellerangaben 15 mL Biocoll Separationspuffer (Dichte: 1,077 g mL⁻¹; Biochrom, Berlin) vorgelegt. Nach Überschichtung des Separationspuffers mit Nabelschnur-Vollblut erfolgt eine Zentrifugation von 15 min bei 800 g. Die mononukleäre Zellfraktion erscheint als weiße Phase zwischen der darüberliegenden Serum- und der darunterliegenden Biocoll-Phase. Die mononukleären Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 400g sedimentiert.

CD34⁺ Zellen werden aus den mononukleären Zellen durch immunomagnetische Selektion (MACS-System; Miltenyi, Bergisch Gladbach) isoliert. Dazu wird die mononukleäre Zellfraktion in MACS-Puffer (sh. Kap. 12.1.2) aufgenommen und gemäß den Angaben des Herstellers mit „blocking reagent“ zur Absättigung von Fc-Rezeptoren und anschließend mit der gleichen Menge an CD34-Microbeads versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 7°C werden die Zellen zweimal in MACS-Puffer gewaschen und anschließend auf eine im Magnetfeld platzierte mit ferromagnetischen Kugeln befüllte Trennsäule geladen (Typ LS bzw. MS, entsprechend der Herstellerangabe je nach MNC-Zellzahl). Im Magnetfeld werden nicht markierte Zellen durch dreimaliges Waschen mit 1,5 mL (MS-Säule) oder 9 mL (LS-Säule) MACS-Puffer von der Säule gewaschen. Markierte CD34⁺ Zellen werden, nach Entnehmen der Säule aus dem Magnetfeld, mit 3 mL (MS-Säule) bzw. 5 mL (LS-Säule) von der Trennsäule eluiert. Durch Wiederholung der magnetischen Trennung mit einer MS-Säule wurde die Reinheit der CD34⁺ Zellen gesteigert.

4.2.2.2 T-Lymphozyten

Primäre T-Lymphozyten werden aus dem peripheren Vollblut von gesunden, erwachsenen Blutspendern gewonnen. Aus der Blutspende werden die mononukleären Zellen, wie im vorherigen Kap. 4.2.2.1 beschrieben, durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die Fraktion der mononukleären Zellen enthält neben den Lymphozyten auch Monozyten. Diese Zellen werden durch Plastikadhärenz abgetrennt. Dazu werden die mononukleären Zellen mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^7$ Z/mL in Medium aufgenommen und in Plastik-Gewebekulturflaschen für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die in Suspension befindlichen

Lymphozyten können mit dem Überstand von den am Flaschenboden adhärierenden Monozyten abgetrennt werden.

4.3 Handhabung von Zellen

Dieser Abschnitt beschreibt die allgemeine Verfahrensweise mit Zellen. Details zu den einzelnen Kultivierungen werden im direkten Zusammenhang mit den experimentellen Ergebnissen erläutert. Falls nicht anders angegeben werden die Zellen in einem Brutschrank bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO₂ kultiviert.

4.3.1 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Sowohl die primären CD34⁺ Zellen als auch die Zelllinien werden zur mutationsfreien Langzeit-Lagerung kryokonserviert. Voraussetzung ist, daß sich die Zellen in einem physiologisch stabilen Zustand befinden (keine Medienlimitierungen, Vitalität > 90%). Als Einfriermedium dient Serum oder BISEKO versetzt mit 10% DMSO. DMSO dringt als niedermolekulares Molekül leicht durch die Plasmamembran in die Zelle ein und verhindert dort als Frostschutzmittel die Bildung von Eiskristallen.

Die Zellen werden abzentrifugiert (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Primäre CD34⁺ Zellen werden je nach Bedarf auf Zelldichten zwischen 1·10⁵ mL⁻¹ und 1·10⁶ mL⁻¹ eingestellt. Zelllinien werden mit Zelldichten bis zu 5·10⁷ mL⁻¹ aufgenommen. Die Zellsuspensionen werden kalt in Kryoröhrchen aliquotiert und diese in eine auf 7°C vorgekühlte Isopropanol-Einfrierhilfe plaziert. Im -80°C temperierten Kühlschranks wird so eine kontinuierliche Abkühlung von 1°C/min erreicht. Nach mindestens 24h Lagerung bei -80°C werden die Kryoröhrchen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei -170°C bis -180°C gelagert. Die Zellen können so über Jahre in gleichbleibend guter Qualität gelagert werden.

Zur Revitalisierung müssen die Zellsuspensionen möglichst schnell aufgetaut werden. Dazu werden die Proben aus dem Stickstofftank entnommen und sofort im 37°C temperierten Wasserbad solange geschwenkt, bis ein erbsengroßer Eiskern übrig bleibt. Anschließend wird die aufgetaute Zellsuspension noch im Kryoröhrchen mit dem gleichen Volumen an kühl-schrankskaltem Auftaumedium (vgl. Kap. 12.2.5) versetzt. Die Zellsuspension wird dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt in dem etwa das zehnfache Volumen an kaltem Auftaumedium vorgelegt ist. Die Zellen werden einmal 5 min bei 200 g sedimentiert und dann in Kultur genommen.

4.3.2 Vorkultivierung und Stammhaltung von Zelllinien

Nach Revitalisierung erfolgt die Stammhaltung stets in Gewebekulturflaschen im Brutschrank. Bei ausreichender Vitalität ($> 85\%$) wird die Kultur in ein Spinnergefäß überführt. Die Rührgeschwindigkeit des Glasklöpfels überschreitet nicht 60 min^{-1} . Die Stammhaltung erfolgt in dem jeweiligen Kultivierungsmedium (sh. Kap. 12.2). Dabei wurden die Zelldichten aller Zelllinien durch entsprechende Verdünnungen mit Kultivierungsmedium zwischen $1 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ und $2 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ gehalten. Zur Stammhaltung der rekombinanten CHO-MUC1-IgG2a Zelllinie wurde das Kultivierungsmedium mit dem Antibiotikum Geneticin (G) 418 Sulphat versetzt. Dieser Selektionsmarker tötet selektiv diejenigen Zellen, die die rekombinante Geninformation und damit ihre Geneticinresistenz spontan verloren haben.

Die Stammhaltung von Zellen wird auf 2 Monate begrenzt. Bei längerer Kultivierung sind spontane Mutationen nicht auszuschließen, die die Reproduzierbarkeit von Kultivierungsergebnissen negativ beeinflussen können.

4.4 Verwendete Kultursysteme

4.4.1 Kultivierung in statischen Systemen

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebekulturflaschen und -platten sind kommerziell erhältliche, sterile Einmalartikel. Eine Oberflächenbehandlung der Kultivierungsgefäße wurde nicht vorgenommen. Die Zellkultivierung erfolgte in den verschiedenen Flaschen- und Plattengrößen jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Volumenbereich.

4.4.2 Kultivierung in gerührten Systemen

Zur Kultivierung von Zellen in gerührten Systemen kommen sowohl handelsübliche 1L-Glasspinner (Klöpfelspinner) als auch ein neues gerührtes Kultivierungssystem zur Kultivierung in kleinen Volumina (Mini-Spinner) zum Einsatz. Der Mini-Spinner und seine Etablierung sind Teil der Ergebnisse dieser Arbeit und werden im Ergebnisteil (Kap. 5) vorgestellt.

Beim Klöpfelspinner handelt es sich um eine Glasflasche in deren Mitte sich ein frei beweglicher Glasklöpfel befindet (im Folgenden nach dem Volumen der Spinnerflasche benannt, z.B. „1L-Spinner“). Der Glasklöpfel ist frei beweglich im Deckel (meist an einer Haken- oder Schlauchkonstruktion) aufgehängt. In dem Klöpfel befindet sich ein Magnetkern, der die Durchmischung der Kultur auf einer Magnetrührplatte ermöglicht. Zum Befüllen, Animpfen und zur Probenahme sind am Hals der Glasflasche zwei Öffnungen angeflanscht. In der Deckelkappe sind Öffnungen zur Begasung angebracht, die mit Sterilfiltern abgedeckt sind. Durch sie erfolgt diffusiver Gasaustausch mit der Umgebung. Der passive Gasaustausch begrenzt den

möglichen Sauerstoffeintrag in das Spinnergefäß. Um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten übersteigt das Kulturvolumen deshalb nicht die Marke von 40% des Gesamtvolumens der Spinnerflasche.

Die Vorbereitung aller Glaskultivierungsgefäße beinhaltet die Sterilisation durch Autoklavieren und einem anschließenden mindestens 24stündigen Sterilttest mit einem Basal- oder Kultivierungsmedium ohne Antibiotika. Nach dem Sterilttest wurde das Medium durch Kultivierungsmedium ersetzt und die Zellen in den Spinner angeimpft.

4.4.3 Cellferm pro® Anlage

Die cellferm-pro-Anlage ist ein modulares, PC-gestütztes Kultivierungssystem für die mehrfach-parallele Zellkultivierung unter kontrollierten Bedingungen. Ein Monitoring-Modul erlaubt die individuelle pH und pO_2 Messung in jedem Versuchsansatz. Durch das Begasungssystem ist die individuell zusammengesetzte Versorgung der einzelnen Kultivierungsgefäße mit vier Gasen (Luft, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlendioxid) möglich. Pro Ansatz können über ein Multipumpenmodul zwei verschiedene Flüssigkeiten zudosiert werden. Das erlaubt neben batch- auch fedbatch und kontinuierliche Verfahrensweisen. Die Massenflüsse von Gasen und Flüssigkeiten in die jeweiligen Spinner werden von der Prozessleitsoftware entsprechend den gewählten Einstellungen gesteuert. Daneben ermöglicht die Software auch die online-Berechnung des OUR (oxygen uptake rate) bzw. OTR (oxygen transfer rate). Alle Messdaten können während des Versuchs auf der Benutzeroberfläche der Software eingesehen werden.

Für die Kultivierung in der cellferm pro Anlage werden modifizierte Glasspinner der Firma DASGIP eingesetzt. Die Spinnergefäße haben zusätzliche Öffnungen zur Aufnahme von pH und pO_2 -Elektroden. Die Deckelkappe und Aufhängung des Glasklöpfels sind gegenüber herkömmlichen Spinners so modifiziert, daß neben den Anschlüssen für die aktive Begasung über Sterilfilter auch eine Zudosierungsleitung und eine Probenahmeleitung Platz finden. Über sterile Probenahmeventile ist es möglich, direkt am Inkubator mit Hilfe von sterilen Einmal-Injektionsspritzen Proben aus den Spinnergefäßen zu entnehmen.

Die Vorbereitung der Glasspinner für die Kultivierung mit der cellferm pro Anlage erfolgt prinzipiell wie in Kap. 4.4.2 beschrieben. Abweichungen ergeben sich durch die zusätzliche Ausrüstung der Spinner mit pH- und pO_2 -Sensoren: Die pH-Einstabmeßketten werden vor dem Sterilisieren mit der cellferm pro Anlage über zwei Meßpunkte kalibriert und in die Spinner eingesetzt. Die Sauerstoff-Elektroden werden einem Funktionstest unterzogen und ebenfalls in die Spinner eingesetzt. Nach dem Sterilisieren durch Autoklavieren werden die Sauerstoff-Elektroden über die cellferm pro Anlage über zwei Meßpunkte kalibriert.

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Zellzahl und Vitalität

Die Zelldichte von Proben aus Suspensionskulturen wird direkt nach der Probenahme manuell mit einem Hämatocytometer (Neubauer-Kammer) oder mit einem der automatischen Partikelzählgeräte CASY1 (Schärfe System, Reutlingen) oder VICELL (Beckman, Krefeld) bestimmt.

Zur Bestimmung der Zelldichte und Vitalität mit dem Hämatozytometer werden 20 μL der Zellsuspension mit 20 μL 0,2% (m/v) Trypanblaulösung gemischt und die Suspension in die vorbereitete Kammer eingefüllt. Trypanblau ist nicht membrangängig und wird nur von Zellen, deren Membranintegrität beeinträchtigt ist (hauptsächlich tote Zellen) aufgenommen.

Mit dem CASY-Partikelzählgerät sind indirekte Vitalitätsbestimmungen über die Größenverteilung der Probe möglich. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran ergeben ein dem realen Zelldurchmesser entsprechendes Signal. Tote Zellen ergeben ein wesentlich kleineres Signal, das im wesentlichen der Größe des Zellkerns entspricht. Die Proben wurden in CASYTON verdünnt und mit den entsprechenden Meßgrenzen analysiert.

Die Partikelzählung und Vitalitätsbestimmung mit dem automatischen Zählgerät VICELL basiert ebenfalls auf der Trypanblaumethode. Die Proben werden automatisch vorbereitet und mikroskopisch vermessen.

4.5.2 Methylzellulose-Assay

Mit dem Methylcellulose-Assay wird die Koloniebildungsfähigkeit einer Zellpopulation untersucht. Dem seimisoliden Medium sind Zytokine beigemischt, die die Proliferation und Ausdifferenzierung der inokulierten Zellen bewirken. Im Verlauf von 2 Wochen bildet sich aus einer Vorläuferzelle eine Kolonie von Tochterzellen, da die Migration der Zellen im hochviskosen Medium eingeschränkt ist. Anhand der Anzahl und des Phänotyps der Zellen lassen sich Kolonien der verschiedenen myeloiden Vorläuferzellen identifizieren.

Die inokulierte Zellmenge variiert mit der ex-vivo Kulturdauer, da der relative Anteil von koloniebildenden Zellen durch Differenzierung in Kultur abnimmt. Von Zellen des Inokulums werden 100 Zellen, bis Tag vier 250 Zellen und ab Tag fünf 500 Zellen in einem Volumen von 100 μL Kulturmedium mit 1 mL Methylcellulosemedium gemischt und in einer 35 mm Gewebekulturschale im Brutschrank für zwei Wochen inkubiert.

4.5.3 Morphologische Untersuchungen

Mit Hilfe von zytologischen Präparaten ist es möglich, den morphologischen Phänotyp intrazellulärer Strukturen der kultivierten Zellen zu charakterisieren. Dazu werden 100-200 μL einer Zellsuspension mit der Zelldichte von $1 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ mit Hilfe einer Zentrifugen-Kammer auf einem Glas-Objektträger (Poly-L-Lysin-beschichtet) für 5 min bei 200 g sedimentiert. Die überstehende Flüssigkeit wird abgesaugt und das Zellpräparat durch einminütige Zentrifugation bei 200 g vorgetrocknet. Die Fixierung erfolgt anschließend in 70% (v/v) Ethanol/Wasser.

Die Färbung des Präparates erfolgt nach der Pappenheim-Methode. Hierbei werden die Zellen mit Eosin-Methylenblau (May-Grünwald-Lösung) und Azur-Eosin-Methylenblau (Giemsa-Farbstoff) angefärbt. Je nach Zelltyp sind die Organellen bzw. das Zytoplasma charakteristisch gefärbt. Insbesondere die charakteristische Form des segmentierten Kerns völlig ausgereifter neutrophiler Granulozyten ist mit dieser Methode gut zu erkennen. Die zweifelsfreie Identifizierung aller Stadien der Granulopoese und deren Abgrenzung von Zellen anderer Differenzierungslinien allein aufgrund der verschiedenen Zellmorphologien erfordert ein großes Maß an Erfahrung in hämatologischen Techniken sowie „tägliche Übung“. In dieser Arbeit wurden morphologische Untersuchungen deshalb auf die Identifikation charakteristischer Kernmorphologien im Zusammenhang mit weiteren analytischen Methoden (z.B. FACS-Analyse) beschränkt.

Die Pappenheim-Färbung schließt sich direkt dem Ethanol-Fixierungsschritt an. Der Objektträger wird für 5 min in May-Grünwald-Arbeitslösung Lösung und danach für 1 min in ein 1:1 Gemisch aus Wasser und May-Grünwald-Arbeitslösung eingetaucht. Danach wird der Objektträger in eine Küvette mit destilliertem Wasser überführt. Destilliertes Wasser wird solange langsam überfließend in die Küvette eingefüllt, bis das überfließende Wasser farblos ist. Danach wird der Objektträger für 15 min in frisch angesetzte Giemsa-Arbeitslösung eingetaucht und der Waschschrift, wie oben beschrieben, wiederholt. Danach wird das Präparat an der Luft getrocknet und mikroskopisch untersucht.

4.5.4 Durchflusszytometrische Analysen

Durchflußzytometrie ist das Messen von Fluoreszenz- und Lichtbrechungseigenschaften einer Zellpopulation. Dabei erfolgt die Messung auf Einzelzellniveau, die Population stellt also die Menge aller Einzelmessergebnisse dar. Ursprünglich als Methode zur Beantwortung immunologischer Fragestellungen entwickelt, ist die Durchflusszytometrie heute eine Standardmethode zur Messung eines jeden zellulären Parameters geworden, der sich mit Hilfe einer fluoreszierenden Sonde in ein Fluoreszenzsignal übersetzen läßt. Klassische Beispiele dafür sind die Detektion von Oberflächenantigenen mit Hilfe von Antikörpern, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff

markiert sind und die Bestimmung der Zellzyklusverteilung in einer Zellpopulation durch Anfärben der DNA mit fluoreszierenden Farbstoffen.

Die entsprechend vorbereitete, suspendierte Zellprobe wird in ein Fluidsystem eingespeist, das die zu untersuchenden Partikel durch hydrodynamische Fokussierung einzeln am Meßpunkt vorbeiführt. Am Meßpunkt wird der Partikel mit dem kohärenten Licht eines Argon-Lasers ($\lambda = 488 \text{ nm}$) bestrahlt. Emittiertes Fluoreszenzlicht (FL) und seitwärts gestreutes Anregungslicht (SSC) wird im 90° Winkel zur anregenden Lichtquelle, vorwärts gestreutes Anregungslicht (FSC) wird in der Anregungsachse gemessen. Das Filter-Array des verwendeten Durchflußzytometers (FACSCalibur, Becton Dickinson) erlaubt das Wellenlängenspektrum des emittierten Fluoreszenzlichtes in 3 Kanäle (FL1 bis FL3) zu unterteilen. Jeder Kanal deckt einen gewissen Wellenlängenbereich im Spektrum von 500 bis 700 nm ab. Somit können bis zu drei unterschiedliche zelluläre Parameter (z.B. Oberflächenantigene) mit Hilfe von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen erfaßt werden. Dazu werden die Fluorophore so gewählt, daß die Emissionsmaxima innerhalb der jeweiligen Kanäle liegen und die Emissionsspektren möglichst wenig in benachbarte Kanäle überlappen.

Die von den Photodetektoren gemessenen Strahlungsintensitäten der Streulicht- bzw. Fluoreszenzsignale sind proportional zur Größe (FSC), intrazellulärer Granularität (SSC) und der Menge an gebundenen Fluorophor eines Partikels. Die einzelnen Meßwerte können auf einer linearen Skala von 0 (= keine Strahlungsintensität) bis 1024 (= höchste Strahlungsintensität) oder logarithmisch verstärkt über 4 Dekaden angegeben werden. Die Wahl der Darstellung hängt von der Verteilung der Signale ab. In den meisten biologischen Proben lassen sich die Größe (FSC) und Granularität (SSC) linear angeben, da sie nur geringen Schwankungen innerhalb einer Zellpopulation unterliegen. Die Fluoreszenzsignale von zellulären Antigenen sind jedoch meistens sehr viel breiter gestreut und müssen durch die logarithmische Darstellung „normiert“ werden. Durchflußzytometrisch aufgenommene Daten stellen Relativwerte dar. Aussagen über einen zellulären Parameter sind daher nur durch Vergleich mit einer entsprechenden Negativkontrolle möglich. Die quantitative Erfassung eines Parameters erfordert normierte Reagenzien und einen internen Zählstandard (z.B. Partikel definierter Größe und Fluoreszenzintensität).

Die angefertigten Proben wurden mit einem FACSCalibur -Durchflußzytometer und der MAC-basierten Software CellQuest 3.1 bzw. CellQuest 3.3 vermessen. Die offline-Analyse der Daten erfolgte mit der MAC-basierten Software CellQuest 3.3 bzw. der PC-basierten Software FCSExpress 2.0.

4.5.4.1 Oberflächenantigene

Zur Färbung von Oberflächenantigenen werden direkt fluorophorkonjugierte Antikörper verwendet. Die zu färbenden Zellen werden einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und mit PBS auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt. 100 μL dieser Zellsuspension werden bei 7°C für 15 min mit dem entsprechenden Antikörper im Dunkeln inkubiert. Als Negativkontrolle wird ein entsprechender Ansatz mit unspezifischen Isotyp-Antikörpern gefärbt. Die Zellen werden anschließend mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und in 0,5% (w/v) Paraformaldehyd-Puffer (sh. Kap. 12.1.3) fixiert.

4.5.4.2 Intrazelluläre Antigene

In der vorliegenden Arbeit wurde das intrazelluläre Vorliegen der Effektorproteine Myeloperoxidase (MPO; primäre Granula), Laktoferrin (LF; sekundäre Granula) und Lysozym (LZ; in beiden Granulatypen) immuncytometrisch bestimmt. Zur Färbung intrazellulärer Antigene müssen die Plasmamembran und Granulamembranen für die fluoreszenzgekoppelten Antikörper durchgängig gemacht werden. Der verwendete Permeabilisierungspuffer enthält das Detergenz Saponin, das während der Färbung und den Waschschritten die Durchlässigkeit der Membranen aufrechterhält.

$3 \cdot 10^5$ bis $5 \cdot 10^5$ Zellen werden in einem Probenröhrchen einmal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und in 100 μL Permeabilisierungspuffer aufgenommen. Die Zellsuspension wird mit einer den Herstellerangaben entsprechenden Menge an Antikörper versetzt (i.d.R. 20 μL) und mindestens 20 min bei 7°C im Dunkeln inkubiert. Als Negativkontrolle wird ein entsprechender Ansatz mit unspezifischen Isotyp-Antikörpern gefärbt. Die gesamten Proben werden mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und in Fixierungspuffer aufgenommen. Die Proben werden sofort nach der Fixierung vermessen.

Einige Färbungen in dieser Arbeit wurden mit dem kommerziell erhältlichen „Cytfix - Cytoperm“-Kit (Becton Dickinson, Heidelberg) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Vergleichende Studien ergaben keine signifikanten Unterschiede in den erhaltenen Analyse-Ergebnissen.

4.5.4.3 Apoptose-Bestimmung

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist verknüpft mit strukturellen Änderungen in der Plasmamembran der Zellen. Phosphatidylserin (PS) ist ein Membranbaustein, der sich in vitalen Zellen nur auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet. Während der Apoptose wird PS auf die Außenseite der Zelle transloziert. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkiertem Annexin V,

ein PS-bindendes Protein, können apoptotische Zellen durchflußzytometrisch nachgewiesen werden.

Bricht die Membranintegrität der Zellen in späten Apoptose-Stadien oder bei nekrotischem Zelltod zusammen, so wird auch Annexin auf der cytoplasmatischen Membranseite erkannt. Die Apoptosebestimmung ist daher mit einer DNA-Färbung kombiniert. Der DNA-Farbstoff dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran ein, so daß eine Differenzierung zwischen apoptotischen Zellen mit voller Membranintegrität und nekrotischen Zellen mit durchlässiger Membran möglich ist.

Für die Färbung wurden die Zellen einmal in Annexin-Bindepuffer (sh. Kap. 12.1.4) gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und in 100 μL Annexin-Bindepuffer mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ aufgenommen. Die Zellsuspension wird mit 5 μL Annexin V-FITC und 20 μL 7-AAD versetzt, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wird die Probe mit 400 μL Annexin-Bindepuffer aufgefüllt und sofort vermessen. Als Kontrollen dienten ungefärbte Zellen, sowie einfach gefärbte Zellen.

4.5.5 Zellfunktionalität

Die beiden wichtigsten efferenten Funktionen neutrophiler Zellen sind die Aufnahme von Pathogenen (Phagozytose) und deren anschließende Zerstörung durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Oxidative Burst) (sh. Kap. 1.2.2.2). Diese Funktionalitäten wurden in der vorliegenden Arbeit durch entsprechende in-vitro Testsysteme untersucht. Die Test-Verfahren beruhen auf literaturbekannten Protokollen, die für die Verwendung von ex-vivo expandierten Zellen aus Kultur modifiziert wurden.

4.5.5.1 Phagozytose-Assay

Der hier verwendete in-vitro Test auf Phagozytose-Aktivität weist die Aufnahme fluoreszenzmarkierter E.coli-Bakterien durch Phagozyten [Oda T, 1986] nach. Die fluoreszierenden Zellen können dann im Durchflußzytometer analysiert werden. Der Test zeigt sowohl die efferente Funktion der Zellen, als auch ihre Fähigkeit, das phagozytosepflichtige Material zu erkennen. Neutrophile Zellen können zwar selbständig Fremdpartikel (Mikroorganismen oder inerte Materialien) über entsprechende Rezeptoren erkennen und ihren Effektorfunktionen zuführen, diese Fähigkeit wird jedoch durch Markierung der Partikel mit Antikörper und Komplementfaktoren enorm gesteigert. Um mit dem in-vitro Test der physiologischen Situation näher zu kommen, wird humanes Serum eingesetzt, das nicht durch Hitzeinaktivierung dekomplementiert wurde (vgl. Kap. 4.1.2). Neben der Phagozytose-Probe werden bei jedem Test drei Negativproben mitgeführt: (1) Durch Inkubation bei 0°C wird der aktive Prozeß der Phagozytose unterbunden.

(2) Die Phagozytose wird auch in Gegenwart von EDTA gestört, da freie zweiwertige Ionen, insbesondere Ca^{2+} , die elektrostatische Abstoßung der beiden negativ geladenen Plasmamembranen von Phagozyt und Bakterie überbrücken und zur Bildung von Rezeptor-Ligand-Bindungen notwendig sind. (3) Eine mit PBS statt Bakteriensuspension versetzte Probe repräsentiert unmanipulierte Zellen.

Herstellung fluoreszenzmarkierter Bakterien

Lyophilisierte Bakterien (E.coli K12, Sigma, Deisenhofen) wurden in PBS aufgenommen und bei 70°C für 15 min pasteurisiert. Die Zellen werden sedimentiert (Zentrifugation: 4.500 g, 15 min), in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,0) einmal gewaschen (Zentrifugation: 4.500 g, 15 min) und in demselben Puffer aufgenommen. Diese Suspension wird durch Zugabe einer Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Stammlösung (2,5 mg·mL⁻¹ FITC in DMSO) auf eine Endkonzentration von 2,25 µg·mL⁻¹ FITC im Färbeansatz gebracht. Die Suspension wird eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die so gefärbten Bakterienzellen werden durch dreimaliges Waschen in 0,1 M Carbonatpuffer (pH 9,0) von anheftendem, ungebundenen FITC befreit und schließlich in PBS resuspendiert. Bakterienaggregate, die falsch-positive Signale liefern können, werden 15 min bei 200 g sedimentiert und verworfen. Der Überstand wird aliquotiert und bei -20°C gelagert. Unverbrauchte Mengen einer aufgetauten Bakterienprobe werden verworfen.

Durchführung des Assays

Die zu untersuchenden Zellen werden einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und mit humanem Serum oder Plasma (nicht dekomplementiert, sh. oben) auf eine Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ mL⁻¹ eingestellt. Jeweils 100 µL dieser Zellsuspension wird in ein Probenröhrchen (pro Test werden 4 Proben vermessen) überführt. Die Proben werden wie folgt behandelt:

1. *PBS-Kontrolle*: Zugabe von 50 µL PBS; Inkubation: 30 min bei 37°C
2. *0°C-Kontrolle*: Probe auf Eis auf 0°C vorkühlen, dann Zugabe von 50 µL eiskalter fluoreszenzmarkierter Bakteriensuspension; Inkubation: 30 min auf Eis
3. *EDTA-Kontrolle*: Zugabe von 15 µL EDTA-Lösung (4% (w/v) EDTA in PBS), mischen und anschließend mit 50 µL fluoreszenzmarkierter Bakteriensuspension versetzen; Inkubation: 30 min bei 37°C

4. *Phagozytose-Ansatz*: Zugabe von 50 μL fluoreszenzmarkierter Bakteriensuspension, mischen; Inkubation: 30 min bei 37°C

Nach der Inkubation werden alle Proben zweimal mit 3 mL eiskaltem 0,4% (w/v) EDTA-PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 10 min, 200 g), in 0,5% Paraformaldehyd-Puffer (sh. Kap. 12.1.3) aufgenommen und vermessen.

4.5.5.2 *Respiratory Burst-Assay*

Nach Kontakt mit löslichen Stimuli oder nach Aufnahme von Fremdmaterial können neutrophile Zellen einen „respiratory burst“ initiieren. Die Zellen setzen dabei Enzymkaskaden in Gang, die unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) mit hohem bioziden Potential bilden (sh. Kap. 1.2.2.2). Dieser Test verwendet die Chemilumineszenz-Reaktion von Luminol, um ROS aus dem H_2O_2 -Myeloperoxidase-Pathway nachzuweisen. Als extrazellulärer Stimulus dient Zymosan, ein Carbohydrat aus den Zellwänden von Hefen, das bereits seit langem als Entzündungsstimulus bekannt ist. Auch die Reaktionen des respiratory burst werden, wie die Phagozytose, durch Anwesenheit von Serumproteinen (Antikörper, Komplementfaktoren) begünstigt. Da sich jedoch die direkte Durchführung des Tests in Serum als ungünstig erwiesen hat (sh. Kap. 6.3.2), wird das Zymosan zuvor mit Antikörpern und Komplement-Proteinen belegt (*opsoniert*) und der Test in einem Puffersystem durchgeführt.

Opsonierung von Zymosan

Zymosan (Sigma, Deisenhofen) wird in 60°C heißem destilliertem Wasser mit einer Konzentration von 15 mg mL^{-1} aufgenommen und 20 min bei dieser Temperatur quellen gelassen. Das gequollene Zymosan wird sedimentiert (Zentrifugation: 15 min, 400 g) und in einem Pool aus mehreren humanem Seren oder Plasmen (nicht dekomplementiert) aufgenommen. Die Zymosankonzentration wird auf 15 mg/mL eingestellt. Die Opsonierung findet für 20 min bei 37°C statt. Das opsonierte Zymosan wird durch dreimalige Wäsche in PBS (Zentrifugation: 15 min, 400 g) von anheftenden Serum befreit und in PBS mit einer Konzentration von 5 mg mL^{-1} aufgenommen. Die Lagerung erfolgt portionsweise bei -20°C.

Durchführung des Tests

Pro Test werden $1,5 \cdot 10^6$ Zellen in Chemolumineszenzpuffer (sh. Kap. 12.1.5) einmal gewaschen und in 600 μL desselben Puffers aufgenommen. Je 100 μL dieser Zellsuspension werden in eine Vertiefung einer Mikrotiter-Chemolumineszenz-Platte (Greiner, Solingen) überführt. Alle sechs Vertiefungen werden mit 50 μL 1mM Luminol in PBS (Arbeitslösung aus: 100mM in DMSO) versetzt. Jeweils drei Vertiefungen werden mit 50 μL PBS bzw. mit 50 μL opsoniertem Zymosan vermischt. Die Chemolumineszenzplatte wird sofort nach der Zugabe des Zymosans

im Lumineszenz-Reader (Wallac Viktor², PerkinElmer Life Science, Bad Wildbad) bei 37°C (vorgewärmt) vermessen. Die Messung wird in Intervallen von 5 min wiederholt. Das Signal jeder Vertiefung wird über 1 s integriert.

4.5.6 Medienanalytik

Die Analyse der im Medium enthaltenen Substrat-, Metabolit-, Wachstumsfaktor- und Produktkonzentrationen erfolgt in zellfreien Flüssigkeiten. Dazu wurden die Zellen sedimentiert (Zentrifugation: 10 min, 200 g) und der Überstand abgenommen. Die Proben werden bei -20°C gelagert und vor der Analyse bei Raumtemperatur wieder aufgetaut und gut durchmischt.

4.5.6.1 Osmolalität

Die Medien-Osmolalität ist ein Maß für die Anzahl der gelösten Teilchen pro Masseinheit des Lösungsmittels. Dabei ist nur die Teilchenanzahl und nicht deren Art entscheidend. Die Messung der Osmolalität beruht auf dem Effekt der Gefrierpunkts-Erniedrigung. Eine Lösung mit der Salzkonzentration von 1 osmol/kg zeigt einen Gefrierpunkt von -1,858 °C, während entionisiertes Wasser bei 0°C gefriert.

Zur Messung werden 50 µL der zu untersuchenden Lösung in ein Gefrierpunktsmometer (Osmomat 030, Gonotec, Berlin) eingebracht und auf -7°C abgekühlt. Anschließend wird mit einem Impfkristall die Kristallisation eingeleitet. Die Temperatur der Probe steigt bis auf den Gefrierpunkt an. Die Temperaturdifferenz zwischen dem Gefrierpunkt des reinen Lösungsmittels und dem der Probe ist proportional zur Osmolalität der Probe.

4.5.6.2 Glukose

Die Glukose-Konzentration im Medium wird nach einem elektro-enzymatischen Prinzip bestimmt. Die Methode beruht auf der oxidativen Umsetzung von Glukose zu Glukonsäure an membrangebundenen Glukose-oxidasen. Das entstehende Wasserstoffperoxid wird an einer Platinelektrode zu Sauerstoff oxidiert. Der resultierende Strom ist proportional der Glukose-Konzentration in der Probe.

Die Messung erfolgt mit einem vollautomatischen Analysator (Ebio compact, Eppendorff, Hamburg). Die zu untersuchenden Proben werden in Analysator-Puffer (sh. Kap. 12.1.6) verdünnt und dem Gerät aufgegeben.

4.5.6.3 Laktat

Laktat wird ebenfalls nach einem elektro-enzymatischen Prinzip bestimmt. Hier wird mit einer Laktatoxidase Laktat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Letzteres wird wie oben beschrieben umgesetzt und bestimmt.

Für die Laktat-Analyse kommt ein YSI-Analysator (Yellow Springs, Ohio, USA) zum Einsatz. Das Gerät wird gemäß den Herstellerangaben mit Analysator-Puffer (sh. Kap. 12.1.6) befüllt. Pro Messzyklus wird eine Probe von 10 μ L Volumen aufgegeben.

4.5.6.4 Glutamin, Glutamat

Glutamin und Glutamat werden simultan in einem Analysator bestimmt. Die Messung entspricht dem für die Glukose beschriebenen Prinzip. Hier wird Glutamat an einer immobilisierten Glutamatoxidase zu α -Ketoglutarat, Ammoniak und Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das Glutamin muss mit einer Glutaminase zuvor zu Glutamat umgesetzt werden, bevor es ebenso vermessen werden kann.

Die Glutamin-, Glutamat-Analyse erfolgt mit einem YSI Analysator (Yellow Springs, Ohio, USA). Das Gerät wird gemäß den Herstellerangaben mit Analysator-Puffer (sh. Kap. 12.1.6) befüllt. Die Proben werden entsprechend den Herstellerangaben vorbereitet.

4.5.6.5 Aminosäuren

Um freie Aminosäuren einer Medienprobe zu analysieren, wurde eine Aminosäure-HPLC verwendet.

Die in einer Probe enthaltenen Proteine wurden durch Fällung mit Trichloressigsäure entfernt. Dazu werden die zellfreie Medienprobe mit 0,6M Trichloressigsäure-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min wird die Fällung sedimentiert und verworfen. Der Überstand wird durch Zugabe von 1M Natronlauge neutralisiert. Die Proben werden in einer Aminoquant HPLC (Hewlett Packard, Karlsruhe) automatisch mit einem o-Phthaldialdehyd-Reagenz zu fluoreszierenden Derivaten umgesetzt und mit einer RP-Chromatographiesäule aufgetrennt und in einem UV-Vis-Detektor bestimmt.

4.5.6.6 ELISA zur Bestimmung des Zytokingehalts

Der Gehalt an IL-3 und IL-6 im Medium wird mit kommerziell erhältlichen ELISA-Tests (OptEIA human ELISA Set, BD Pharmingen, Heidelberg) bestimmt.

Der Gehalt an G-CSF im Medium wird mit einer Kombination aus Beschichtungs- und Detektionsantikörper (DuoSet DY214, R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt.

Der Gehalt an SCF im Medium wird sowohl mit einem kommerziell erhältlichen ELISA-Test (humanSCF ELISA Set, PeproTech, Rocky Hill, USA) als auch mit einer Kombination aus Beschichtungs- und Detektionsantikörper (BAF255 und MAB655, R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt.

Die jeweiligen Tests werden gemäß den Herstellerangaben in Mikrotiterplatten (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) durchgeführt. Das Auslesen der Platten erfolgt auf einem ELISA-Reader (Wallac Viktor², PerkinElmer Life Science, Bad Wildbad) mit den vom jeweiligen Hersteller angegebenen Filtereinstellungen.

4.5.6.7 ELISA zur Bestimmung der Produktkonzentrationen

Zur quantitativen Erfassung der Konzentrationen an MAK425 (sh. Kap. 4.2.1.1) und MUC1-IgG2a (sh. Kap. 4.2.1.2) wurde jeweils ein ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Test verwendet. Beide Produkte enthalten den Fc-Teil eines Maus-IgG2a-Antikörpers, der spezifisch an den Beschichtungsantikörper (*goat-anti-mouse*, in Mikrotiterplatten immobilisiert) bindet. Das Produkt wird über einen Alkaline-Phosphatase-konjugierten Antikörper (*goat-anti-mouse-IgG-AP*) detektiert. Durch Zugabe einer Substratlösung (p-Nitrophenolphosphat) entsteht durch Abspaltung des Phosphatrestes gelb gefärbtes p-Nitrophenol, das photometrisch bestimmt wird. Die Intensität der Gelbfärbung ist proportional zur Konzentration des Konjugat-Antikörpers.

Die zur Durchführung des Versuches verwendeten Lösungen und Reagenzien sind im Anhang aufgeführt.

Vorbereitung der Mikrotiterplatten

Je 100 μ L Beschichtungsantikörper-Lösung werden in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Maxisorp, Nunc, Wiesbaden) gefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Verdunstung der Flüssigkeit zu verhindern, wird die Platte luftdicht abgedeckt. Die Platte wird nach dem Beschichtungsvorgang dreimal mit jeweils 200 μ L Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen und mit 200 μ L Blockierungspuffer pro Vertiefung befüllt. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgt für 2 Stunden bei 37 °C. Anschließend wird die Platte erneut dreimal gewaschen und durch Ausklopfen getrocknet. Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Hintergrundes werden die Extinktionswerte jeder Vertiefung bei 405 nm im ELISA-Reader ausgelesen.

Durchführung des Tests

Auf einer vorbeschichteten Mikrotiterplatte werden sowohl die Proben als auch der Standard in Schritten von 1:2 verdünnt. Dazu wird jeweils pro Probe (Einfachbestimmung), Standard (Zweifachbestimmung) oder Leerwert (Einfachbestimmung, Verdünnungspuffer) ein Volumen von 200 μL in eine Vertiefung der Kopfzeile (Zeile A) vorgelegt. In die übrigen Vertiefungen wird 100 μL Verdünnungspuffer vorgelegt. Spaltenweise wird, beginnend von der höchsten Konzentration im Spaltenkopf, eine Verdünnungsreihe mit einem Transfervolumen von 100 μL durchgeführt. Aus der letzten Vertiefung werden entsprechend 100 μL entnommen und verworfen. Die Platte wird abgedeckt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird die Platte gewaschen (ELISA-Washer) und durch ausklopfen getrocknet. Jede Vertiefung wird mit 100 μL Konjugatlösung befüllt und ebenfalls für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Ungebundenes Konjugat wird durch Waschen (ELISA-Washer) und anschließendes, einmaliges waschen mit bidest. Wasser entfernt. Die Platte wird durch ausklopfen getrocknet und in jede Vertiefung 100 μL frisch hergestellte Substratlösung pipettiert. Die Platte wird im ELISA-Reader bei 405 nm ausgelesen. Die Messung erfolgt in Intervallen von 15 min bis in der Standardspalte eine Extinktion von 0,7 bis 0,8 erreicht ist.

4.6 Verfahrenstechnische Charakterisierungen

4.6.1 Bestimmung der Mischzeit

Für die Bestimmung der Mischzeitcharakteristik wurde die Methode des Farbumschlags eines chemischen Indikators verwendet. Der verwendete Indikator Phenolrot ändert am Umschlagpunkt seine Farbe von rubinrot nach hellgelb. Dieser Farbumschlag wird mit einer digitalen Videokamera aufgezeichnet und die Daten durch Video-Bildanalyse ausgewertet. Da das Videobild den gesamten Rauminhalt des Kultivierungsgefäßes erfaßt, erlaubt diese Methode die eindeutigere Beurteilung der makroskopischen Vermischung als dies durch Auswertung des Signals einer ortsfesten Leitfähigkeitssonde oder pH-Elektrode möglich wäre.

Durchführung Mischzeitbestimmung

Das Kulturgefäß wird mit allen Einbauten ausgestattet, mit einem definierten Volumen an wäßriger Phenolrotlösung ($5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pH 7,0) befüllt und die gewünschte Rührerdrehzahl eingestellt. Der Bildausschnitt der Kamera umfaßt das gesamte Gefäß. Zum Zeitpunkt $t=0$ erfolgt die Zugabe eines Tropfens 1M Schwefelsäure. Die Videosequenz wird vor Zugabe der Schwefelsäure gestartet und bis zur vollständigen makroskopischen Durchmischung der Flüssigkeit aufgenommen. Die Sequenz wird als MPEG-Datei für die weitere Bildbearbeitung gespeichert. Vor jeder weiteren Messung wurde die Phenolrotlösung ausgetauscht.

Video-Bildanalyse

Die Aufzeichnung der Videosequenz erfolgte mit 3 Vollbildern pro Sekunde. Die aneinandergereihten Einzelbilder der Sequenz werden mit dem Programm AfterCam™ Version 2.24 (Vizway, Genf, Schweiz) aus dem Videostrom extrahiert und als Einzelbilder im TIF-Format abgespeichert. In diesem Farbbild-Format setzt sich jeder Farbpixel aus je einem Wert für die Grundfarbe Rot-(R)-, Grün-(G)- und Blau-(B) zusammen. Beim sichtbaren Farbumschlag des Indikators von rot nach gelb ändern sich die RGB-Signale aller Pixel, die die Flüssigkeit darstellen. Im zum Farbumschlag komplementären Farbraum „Grün“ findet die größte Signaländerung statt. Zur Auswertung wurden die extrahierten Einzelbilder mit dem Programm Scion Image™ 4.0.2 (Scion, Frederick, USA) auf ihren mittleren Grünanteil hin untersucht. Als Startbild wurde dasjenige Bild verwendet, bei dem der zugegebene Schwefelsäuretröpfchen gerade in die Phenolrotlösung eintaucht.

4.6.2 Bestimmung des Sauerstoffeintrags

Die Bestimmung des Sauerstoffeintrags erfolgte nach der instationären Methode mit einem standardisierten MA-Puffer (sh. Kap. 12.1.7). Der in der Flüssigkeit gelöste Sauerstoff wird mit Stickstoff entfernt und nach Begasung mit Sauerstoff wird die Kinetik der Sauerstoffaufsättigung in der Flüssigkeit untersucht.

Durchführung der Messung

Für die Messung wird das Fermentationssystem cellferm pro verwendet. Das Kulturgefäß wird mit allen Einbauten ausgestattet, einem definierten Volumen an MA-Puffer befüllt und die gewünschte Rührerdrehzahl eingestellt. Die Rührerdrehzahlen werden in einem für Fermentationen mit Zelllinien und Primärzellen typischen Bereich variiert. Alle weiteren Randparameter (Temperatur, Druck, etc.) entsprechen den Bedingungen in realen Kultivierungen. Nach Temperierung und Kalibrierung der Sauerstoffelektrode wird der gesamte Gelöstsauerstoff aus der Flüssigkeit durch Begasen mit Stickstoff entfernt. Zum Zeitpunkt $t=0$ erfolgt die Begasung mit Luft. Die Gelöstsauerstoffkonzentration steigt bis zur Sättigungskonzentration von ca. $8,2 \text{ mg L}^{-1}$ an. Die cellferm pro Software zeichnet relative Sauerstoffpartialdrücke über die Zeit auf.

Auswertung der Meßdaten

Die Anreicherung des Sauerstoffs im Medium folgt einer Kinetik 1. Ordnung und läßt sich durch folgende Formel darstellen:

$$\frac{dc_L}{dt} = k_L a \cdot (c_L^* - c_L)$$

mit	c_L	Gelöstsauerstoffkonzentration [mmol/L]
	c_L^*	Grenzlöslichkeit von Sauerstoff bei gegebener Temperatur/Druck [mmol/L]
	t	Zeit [h]
	$k_L a$	Sauerstoffübergangskoeffizient [h^{-1}]

durch Integration (in den Grenzen $t = 0$ bis t und $c = c_0$ bis c) erhält man:

$$\ln \frac{(c_L^* - c(t))}{(c_L^* - c_0)} = -k_L a \cdot t$$

Die halblogarithmische Auftragung von $\ln \frac{(c_L^* - c(t))}{(c_L^* - c_0)}$ über die Zeit ergibt eine Gerade, deren

Steigung dem Wert des Sauerstoffübergangskoeffizienten $k_L a$ entspricht. Die Regression der Meßwerte wurde in dem Programm Origin 7G (Originlab, Northhampton, USA) vorgenommen.

5 Der miniaturisierte Spinner (Mini-Spinner)

Vergleichende Untersuchungen in suspendierter Kultur können in einer Vielzahl von verschiedenen Systemen durchgeführt werden. Neben den statischen Kultursystemen, Gewebekulturflaschen, -beuteln und -platten, werden auch gerührte Systeme, sog. Spinnerflaschen erfolgreich eingesetzt. Dabei bieten die gerührten Systeme bezüglich der Skalierbarkeit in größere Bioreaktoren die relevanteren Umgebungsbedingungen. Einige wenige Spinnersysteme können mit Elektroden zur genauen Messung und Regelung von wichtigen Medienparametern (wie pH-Wert und Gelöstsauerstoffkonzentration) ausgerüstet werden. Das große biologische Wirkungsfeld dieser Parameter ist allgemein anerkannt. Abgesehen von den lange bekannten Wirkungen auf Wachstum, Vitalität und Produktivität der Zellen wirken pH und pO_2 -Gehalt des Mediums auch auf die Glykosylierungsmuster von Proteinen, synergistisch mit Wachstumsfaktoren auf hämatopoetische Zellen und beeinflussen die Effizienz von Transfektionsversuchen. Trotzdem werden viele vergleichende Kultivierungen und Optimierungsversuche (insbesondere von Primärzellen) in unregelmäßig, statischen Systemen durchgeführt. Häufig zwingen Limitierungen in den verfügbaren Zellzahlen (insbesondere bei Primärzellen), teure Medien oder Medienkomponenten (Wachstumsfaktoren oder markierte Substanzen) zur Verwendung unregelmäßiger, statischer Systeme. Diese können mit deutlich geringeren Mindest-Kulturvolumina verwendet werden als konventionelle mit Elektroden ausgestattete Spinner-Systeme.

Das hier entwickelte, kontrollierte (fakultativ) gerührte Kultivierungssystem (Mini-Spinner) soll geregelte Kultivierungen in Mindestvolumina von ca. 30 mL erlauben. Der Mini-Spinner kann eine Lücke zwischen den etablierten, gut skalierbaren, kontrollierten Bioreaktoren mit Mindestkulturvolumina von ca. 100 mL und statischen Systemen etwa T-Flaschen-Kultivierungen mit Arbeitsvolumina von 5 bis 50 mL schließen. Damit werden vergleichende Versuche auch unter kontrollierten Bedingungen durchführbar, die bisher wegen der signifikant niedrigeren Arbeitsvolumina nur in unregelmäßigen Systemen möglich waren.

Detaillierte Baupläne für den Mini-Spinner finden sich im Anhang.

5.1 Konstruktion des Kultivierungssystems

Abbildung 5-1 zeigt den Mini-Spinner und seine Integration in das cellferm pro Kultivierungssystem. Das Kultivierungsgefäß ist aus Borosilikatglas gefertigt. Zwei GL-25 Seitenarme nehmen die Elektroden für pH und Gelöstsauerstoffkonzentration auf und sind zusammen mit einem GL14-Stutzen, der für die Probenahme zur Verfügung steht, am Boden des Gefäßes angebracht. Ein gegenüber der Probenahme platzierter GL25 Stutzen ist volumensparend oberhalb des Flüssigkeitsspiegels angebracht und dient zum Inokulum des Spinners. Anschlüsse für Zu- und Abluft, eine Zudosierleitung sowie die Aufnahme für das Rührorgan finden sich in der Deckelplatte des Mini-Spinners, die aus rostfreiem Edelstahl gefertigt ist.

Das Rührorgan besteht aus einem PTFE-ummantelten Magnetührstab und einer ebenfalls aus PTFE hergestellten Rührwelle. Die Rührwelle dreht sich in einem in der Deckelplatte eingeschraubten PTFE-Lager. Lager und Welle befinden sich innerhalb des Kulturgefäßes also innerhalb des Sterilbereiches aber oberhalb des Flüssigkeitsspiegels. Die Rührwelle ist zusätzlich mit einer Kerbung versehen, in die bei Bedarf ein Rührblatt (PTFE) eingesetzt werden kann. Die so realisierte „über Kopf“ hängende Platzierung des Rührers vermeidet die mechanische Zerstörung von Zellen durch einen im Gefäß liegenden Rührfisch.

Das minimale Füllvolumen des Mini-Spinners ist durch die Mindesteintauchtiefe der pH-Elektroden und den Raum, den das Rührorgan einnimmt, begrenzt. Mit installiertem Rührorgan wird das Mindestvolumen für eine Kultivierung auf 30 mL bestimmt. Durch zusätzliche Installation des Rührblattes überstreicht die Rührung einen größeren Gesamtraum. Um trotzdem die Elektroden kollisionsfrei möglichst tief in dem Gefäß platzieren zu können, wurde das Rührblatt in Trapezform ausgeführt. Durch Verwendung dieses trapezförmigen Rührblattes steigt das minimale Arbeitsvolumen nur moderat auf 35 mL an. Sind die zu kultivierenden Zellen sehr scherempfindlich oder muß das minimale Kultivierungsvolumen weiter reduziert werden, so kann das System auch ohne Rührer auf einer Schüttelplatte platziert werden. Das minimale Arbeitsvolumen kann so auf 20 mL reduziert werden.

Der Mini-Spinner kann ohne technische Änderungen der cellferm pro Anlage größere Kultivierungssysteme wie 1L-Spinnerflaschen ersetzen. Das ermöglicht den parallelen Betrieb von größeren Bioreaktoren und Mini-Spinnern an einer cellferm pro Anlage.

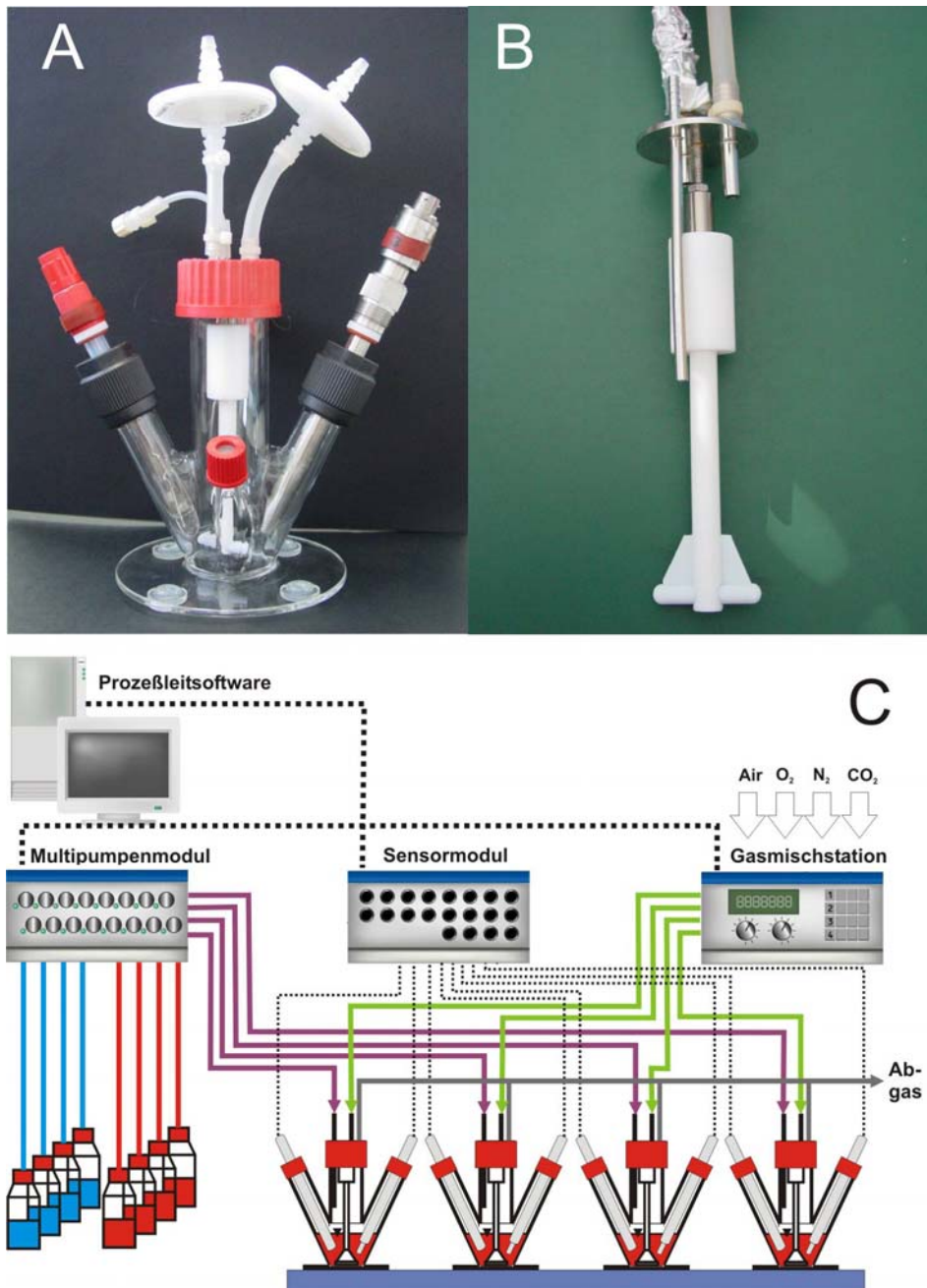


Abbildung 5-1: Der Mini-Spinner und seine Integration in das cellferm pro (DASGIP) Fermentationssystem. A: Mini-Spinner mit installierter Rührung; B: Deckeleinsatz mit Röhreinrichtung und Rührblatt; C: Schematische Darstellung der Integration des Mini-Spinners in die cellferm pro Anlage.

5.2 Verfahrenstechnische Charakterisierung

Mit der verfahrenstechnischen Charakterisierung sollen die wichtigen Parameter der Mischungscharakteristik und des Sauerstoff-Eintrags des Mini-Spinners beschrieben werden. Sie beeinflussen die Skalierbarkeit der im Mini-Spinner generierten Daten. Diese Untersuchungen dienen auch dazu, eine Basis für genauere Analysen und Bilanzierungen von Kultivierungen im Mini-Spinner zu ermöglichen.

5.2.1 Bestimmung des Mischzeitverhaltens

Der Einfluß der Rührergeschwindigkeit auf die Mischzeit wurde mit Hilfe einer modifizierten Indikator-Methode und optischer Analyse durchgeführt. Der Mini-Spinner war mit allen Sensoren und Bauteilen ausgestattet, wie diese auch bei entsprechenden Kultivierungsversuchen zum Einsatz kommen würden. Die Versuche wurden mit unterschiedlicher Rührerausstattung durchgeführt (mit/ohne Rührblatt). Die Drehzahl des Rührers wurde von 10 bis 90 min^{-1} variiert und der Farbumschlag wurde durch Videobildanalyse analysiert. Als Maß für die Durchmischung diente die Zeitspanne t_m (Mischzeit), die bis zum Erreichen eines Mischungsgrades von $\Theta = 0,95$ verstreicht. Die beiden Konfigurationen des Mini-Spinners, mit bzw. ohne Rührblatt wurden für Füllvolumina von 40 bis 50 mL (ohne Rührblatt) und 45 bis 55 mL (mit Rührblatt) durchgeführt. Diese Volumina decken einen sinnvollen Arbeitsbereich für die Kultivierungen oberhalb der minimalen Füllvolumina ab.

Die gemessenen Werte für die Mischzeit t_m reichen von 6 s bis 299 s ohne Rührblatt und von 2,6 s bis 148 s mit dem installierten Rührblatt. Für alle Rührerdrehzahlen oberhalb von 30 min^{-1} wird eine homogene Durchmischung des Kulturvolumens innerhalb von 30 s oder schneller erreicht. Durch Installation des Rührblattes wird die Mischzeit t_m generell um etwa einen Faktor zwei verringert (Abbildung 5-2). Eine qualitative Analyse der Strömungsverhältnisse ist durch die Videobildanalyse ebenfalls möglich. Aufgrund der kegelstumpffartigen Geometrie des Mini-Spinner Gefäßes wird ein Großteil des gesamten Füllvolumens in deutlich kürzeren Zeitspannen als der Mischzeit t_m durchmischt. Langsamere, aber trotzdem vollständige und ausreichende Durchmischung kann an den Schäften der Elektroden innerhalb der Seitenarme des Mini-Spinners beobachtet werden. Totzonen konnten nicht identifiziert werden.

Im Gegensatz zum gerührten System kann bei Betrieb des Mini-Spinners ohne Rührorgan auf einer Schüttelplatte durch Erhöhen der Schüttelfrequenz die Mischzeit nicht beliebig verkürzt werden. Wird bei einem Füllvolumen von 30 mL und einer Schüttelfrequenz von 30 min^{-1} die vollständige Durchmischung nach 40 s erreicht, so ist dies bei Erhöhung der Schüttelfrequenz auf 80 min^{-1} erst nach 90 s der Fall. Es scheint bei höheren Schüttelfrequenzen die gleichmäßi-

ge Durchströmung der Flüssigkeit nicht gewährleistet zu sein. Dies könnte auf die nicht-rotationssymmetrische Geometrie des Glaskörpers zurückzuführen sein.

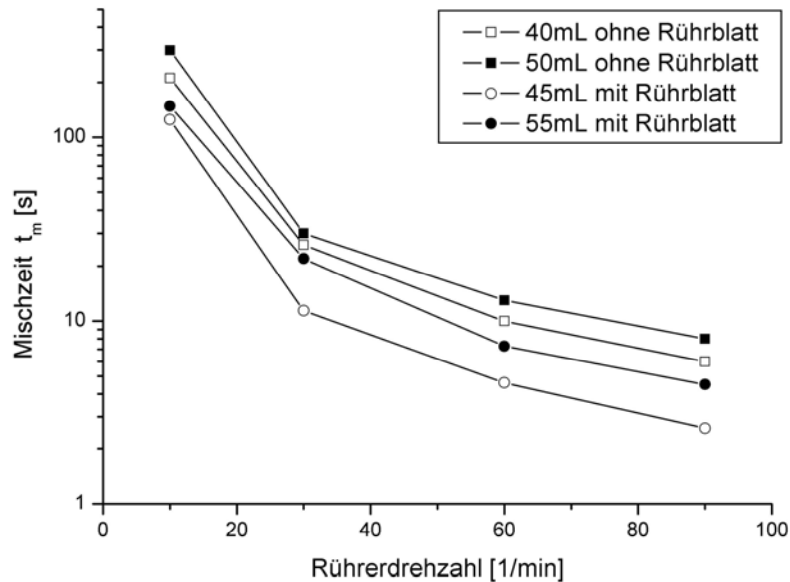


Abbildung 5-2: Charakterisierung des Mini-Spinners: Mischzeit t_m

5.2.2 Charakterisierung des Sauerstoff-Eintrags

Die Charakteristik des volumetrischen Sauerstofftransfers, gegeben durch den Koeffizienten k_1a , wurde unter Variation des Füllvolumens und der Rührergeschwindigkeit bestimmt. Während das Füllvolumen sowohl den k_1 als auch den a Wert beeinflusst, wird durch die Rührerdrehzahl nur k_1 beeinflusst. Da in keinem Fall eine Trombenbildung an der Flüssigkeitsoberfläche zu registrieren war, kann bei allen gewählten Rührerdrehzahlen von einem konstanten a ausgegangen werden. Die Darstellung der ermittelten k_1a -Kennlinienfelder für den Mini-Spinner ist in Abbildung 5-3 gegeben. Der Sauerstofftransfer ist relativ unabhängig davon, welche Rührerkonfiguration gewählt wird. Es werden je nach Konfiguration k_1a -Werte zwischen $0,5$ und $2,9 \text{ h}^{-1}$ erreicht. Die Verläufe der k_1a - Funktionen folgen keiner einheitlichen Korrelation, was wohl auf die uneinheitliche Geometrie des Mini-Spinners zurückzuführen ist. Auch bei Verwendung des Mini-Spinners als geschütteltes System ohne Rührorgan können die k_1a -Werte nicht mit einer einheitlichen Korrelation beschrieben werden. Die ermittelten Werte liegen zwischen $0,5$ und $3,1 \text{ h}^{-1}$. Der Mini-Spinner ist damit auch als geschütteltes System durchaus mit größeren Kultivierungssystemen vergleichbar.

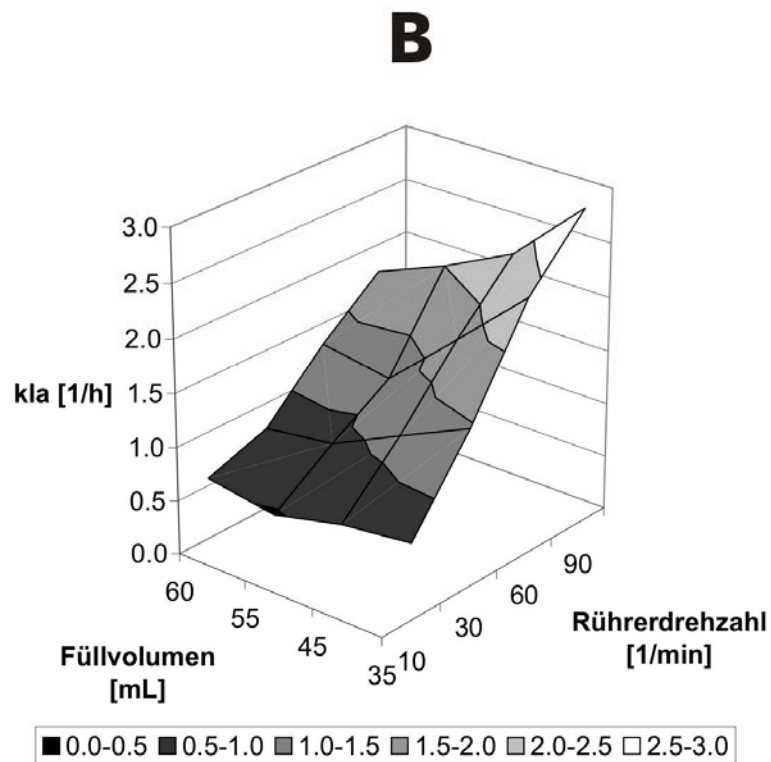
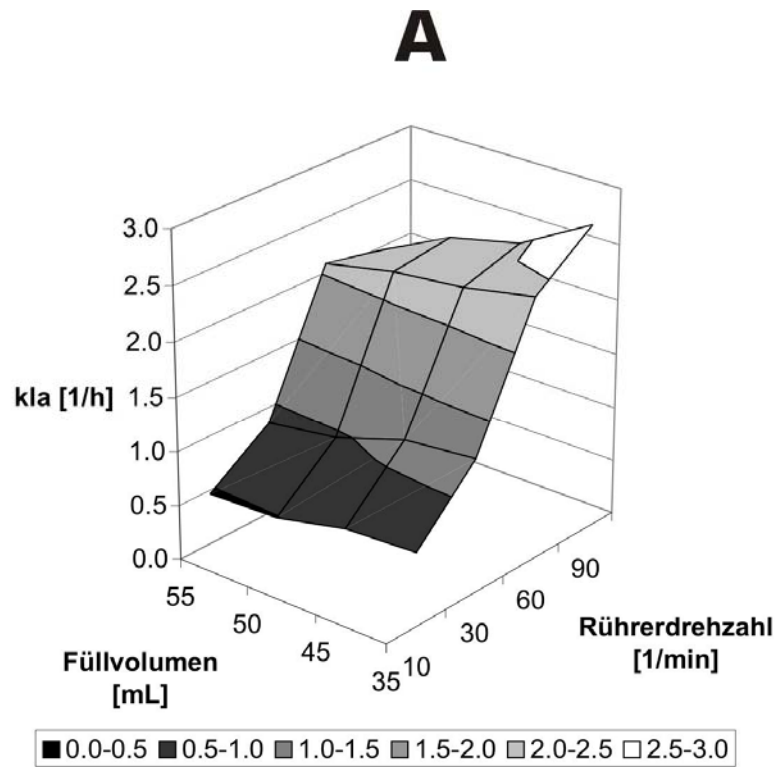


Abbildung 5-3: Charakterisierung des Mini-Spinners: k_a -Charakteristik
 A: mit installiertem Rührerblatt, B: ohne Rührerblatt

5.2.3 Vergleich mit etablierten Kultivierungssystemen

Der Mini-Spinner ist bewußt nicht als spezialisiertes System für eine einzelne wissenschaftliche Fragestellung entwickelt, sondern als allgemein einsetzbares Werkzeug zur Untersuchung von Zellen in suspendierter Kultur unter kontrollierten Umgebungsbedingungen. Damit besetzt der Mini-Spinner eine Lückenposition zwischen etablierten statischen und kontrollierten, gerührten Kultivierungssystemen. Hier soll aufgrund der oben ermittelten Kenndaten ein verfahrenstechnischer Vergleich mit diesen Systemen erfolgen.

Abbildung 5-4 zeigt den Vergleich des Mini-Spinners mit typischen Kultivierungssystemen für tierische Zellen in Bezug auf die möglichen Kulturvolumina und Sauerstoffeinträge. Der Sauerstoffeintrag der statischen Kultivierungssysteme wird einzig durch den Diffusionskoeffizienten des Sauerstoffs und das Füllvolumen bestimmt. Auf dieser Basis können die resultierenden k_a -Werte berechnet werden. Sie liegen zwischen 10^{-3} und 10^{-2} h^{-1} und damit zwei bis drei Größenordnungen unterhalb von gerührten Systemen. Aktiv begaste (blasenfrei) und gerührte Bioreaktoren zeigen k_a -Werte von 0,8 bis 3 h^{-1} ; einen ähnlichen Bereich deckt auch der Mini-Spinner mit wesentlich kleineren Arbeitsvolumina von 30 bis 50 mL ab. Das zeigt, daß der Mini-Spinner von seiner Charakteristik her durchaus mit größeren Kultivierungssystemen zu vergleichen ist.

5.3 Etablierung des Kultivierungssystems

Die allgemeine Handhabbarkeit des Mini-Spinners wurde zuerst mit Medium ohne Zellen und dann mit Hilfe von zwei Produktionszelllinien (Hybridoma, CHO) evaluiert. 1L-Klößelspinner dienten als Referenzsysteme und wurden direkt parallel zu den Mini-Spinnern betrieben.

5.3.1 Handhabung und Integrierbarkeit in das cellferm pro System

Das Inokulum der Mini-Spinner erfolgte unter Reinluft-Bedingungen in einer Sterilwerkbank. Nach dem Inokulum wurden alle weiteren Manipulationen an den Systemen im Inkubator vorgenommen. Um die Probenahme „in place“ am Inkubator durchzuführen, kann der Probenahmestutzen mit einem Septum abgeschlossen werden. Um die Arbeitssicherheit zu erhöhen, wurde jedoch eine nadelfreie Probenahme entwickelt. Durch einen Deckel, der in den Probenahmestutzen geschraubt wird, ist eine Kanüle geführt, die sterilseitig im Medium verweilt. Außenseitig ist ein Luer-Lock-Anschluß angebracht, der die Verbindung mit konventionellen Sterilkupplungen ermöglicht. Die Sterilität aller in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen konnte mit der nadelfreien Probenahme aufrecht erhalten werden.

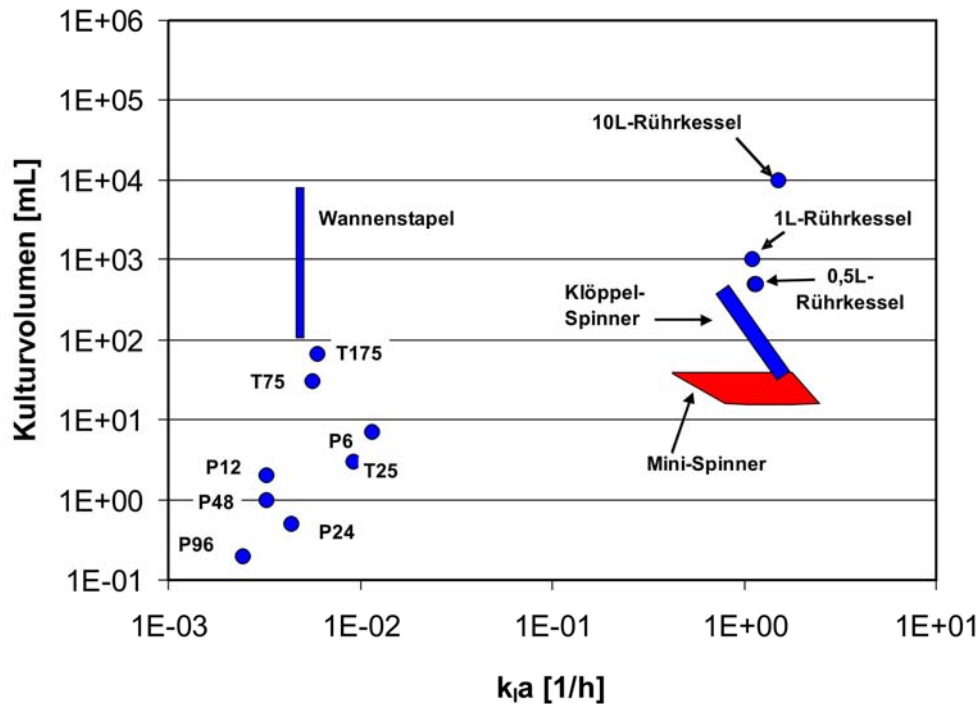


Abbildung 5-4: Verfahrenstechnischer Vergleich des Mini-Spinners mit etablierten, statischen und gerührten Kultivierungssystemen

P: Kulturplatte (folgende Zahl gibt die Anzahl der Vertiefungen an),
T: Gewebekulturflasche (folgende Zahl gibt die Kulturfläche an)

In den initialen Experimenten mit Zellen wurde der Mini-Spinner ohne Rührblatt ausgerüstet. Hybridomazellen, die als einzelne Zellen in Suspension wachsen, zeigten bei kleinen Rührerdrehzahlen ($< 40 \text{ min}^{-1}$) geringe zelluläre Ablagerungen unterhalb der Rührerwelle. Oberhalb von 40 min^{-1} konnten keine Ablagerungen von Zellen mehr identifiziert werden. CHO Zellen wachsen normalerweise als adhärenente Zellen, lassen sich jedoch auf Wachstum in Suspension adaptieren. Die Zellen neigen jedoch dazu, in Aggregaten aus mehreren Zellen zu wachsen. CHO Zellen bildeten auch Ablagerungen von Zellaggregaten unterhalb der Rührwelle. Darüber hinaus bilden sich jedoch auch Ablagerungen in den Seitenarmen unterhalb der Elektroden innerhalb von 48 bis 72 Stunden nach dem Inokulum. Diese Ablagerungen konnten durch Erhöhung der Rührerdrehzahl (bis 90 rpm) weder aufgelöst, noch verhindert werden. Erst unter Verwendung des Rührblattes konnten für Rührerdrehzahlen von $> 60 \text{ min}^{-1}$ auch mit den aggregatbildenden CHO-Zellen keine Ablagerungen festgestellt werden.

5.3.2 Vergleichende Kultivierungen von Zelllinien

Um zu überprüfen, inwieweit Ergebnisse, die im Mini-Spinner erzielt werden, auf größere Kultivierungssysteme übertragbar sind bzw. inwieweit der Mini-Spinner in der Prozeßentwicklung

größere Kultivierungssysteme ersetzen kann, wurden vergleichende Kultivierungen in satzweiser Verfahrensweise durchgeführt. In Abbildung 5-5 und Abbildung 5-6 ist die Wachstumscharakteristik von Hybridoma- und CHO Zellen gezeigt, die in Mini-Spinneren bzw. parallel dazu in 1L-Spinnern kultiviert wurden. Beide Kultursysteme wurden mit einer Startzelldichte von $2 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ inokuliert. Die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde auf 40%DO geregelt. Die Regelung des Medien pH-Wertes erfolgte über die CO_2 Konzentration des Zugases auf pH 7,0.

Alle verglichenen Kulturen von Hybridoma bzw. von CHO zeigten im Mini-Spinner gleiches Wachstum und Vitalitätsverhalten wie im 1L-Spinner. Die Hybridomazellen wachsen über 132 h bis zu einer maximalen Zelldichte von $1,54 \pm 0,6 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ in den Mini-Spinnern bzw. $1,49 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ in dem 1L-Spinner. In beiden Kultivierungssystemen sinkt nach 84 h Kulturdauer die Vitalität deutlich ab. Die im Mini-Spinner kultivierten Zellen erreichen eine maximale Wachstumsrate (μ_{max}) von $0,039 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ verglichen mit einem Wert von $0,042 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$ in den 1L-Spinnerkulturen. Auch die Produktivität der Zellen verhält sich im Mini-Spinner ähnlich wie im 1L-Spinner. Die produzierten Antikörper wurden mittels ELISA-Test im Medienüberstand quantifiziert. Innerhalb des Zeitraums vom Inokulum bis zu 84 Stunden der Kultivierung korrelieren die ermittelten Antikörpertiter von Mini-Spinner- und 1L-Spinner-Kultivierungen sehr gut. Mit zunehmendem Vitalitätsverlust, der in beiden Kultursystemen nach 84 Stunden einsetzt, wird in den Mini-Spinnern eine etwas höhere Produktkonzentration gemessen als in den 1L-Spinnern. Die bestimmte Raum-Zeit-Ausbeute der Hybridoma-Kultivierungen lag bei $5,42 \pm 1,01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in Mini-Spinnern und bei $5,02 \pm 0,17 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ in 1L-Spinnern.

CHO Zellen zeigen einheitliches Wachstum in beiden Kultivierungs-Systemen mit einer maximal erreichbaren Zelldichte $4,5 - 4,6 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$, die nach 143 h der Kultivierung erreicht wird. Dementsprechend zeigen sich auch kaum Abweichungen bei der maximalen Wachstumsrate (μ_{max}), die bei $0,041 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$ im Mini-Spinner und bei $0,039 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ in 1L-Spinner Kultivierungen liegen. Auch die ermittelte Produktivität der Zellen zeigte hervorragende Korrelation zwischen dem Mini-Spinner und dem größeren 1L-Spinner-System. Mit beginnendem Vitalitätsabfall ergeben sich bei gleichzeitiger guter Korrelation der ermittelten numerischen Mittelwerte größere Variabilitäten der einzelnen Kulturgefäße. Die sich ergebenden Raum-Zeit-Ausbeuten für Mini-Spinner Kulturen ergeben sich zu $7,92 \pm 1,42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ verglichen mit $7,49 \pm 0,75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ für 1L-Spinner Kulturen.

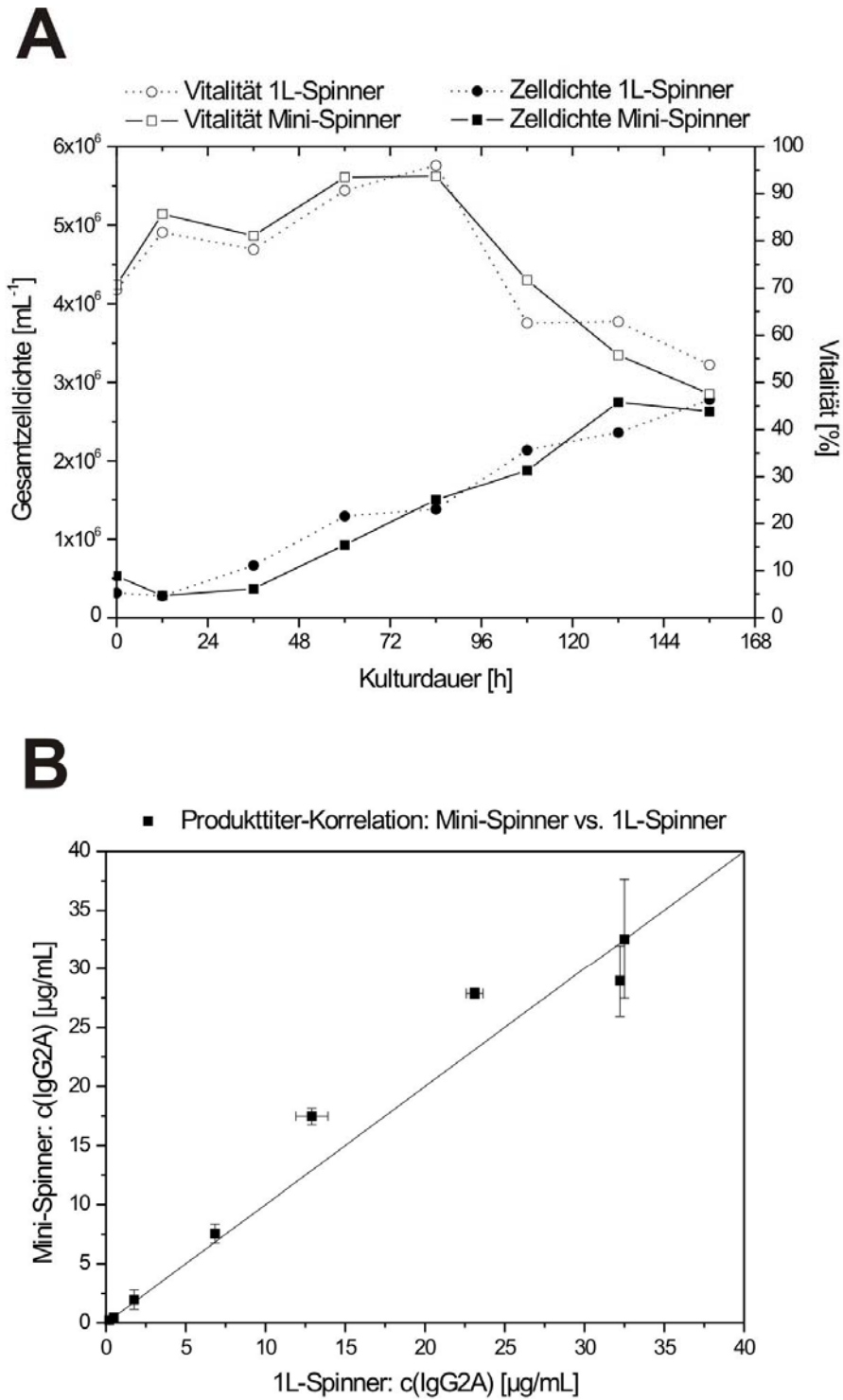


Abbildung 5-5: Vergleichende Kultivierungen: Hybridoma-Zellen
 A: Verlauf von Zelldichte und Vitalität, B: Produkttiterkorrelation

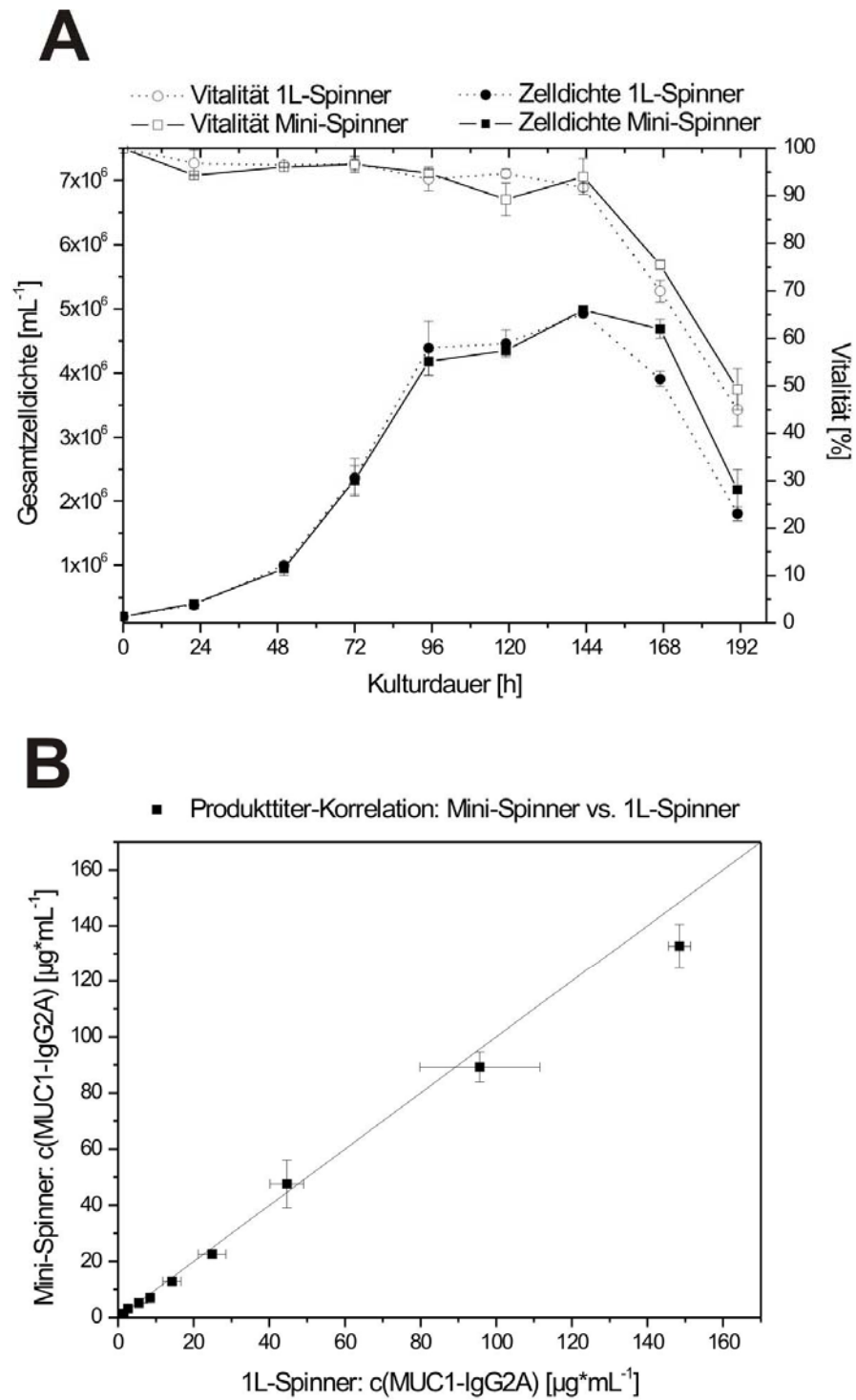


Abbildung 5-6: Vergleichende Kultivierungen: CHO-Zellen
 A: Verlauf von Zelldichte und Vitalität, B: Produkttiterkorrelation

5.3.3 Vergleichende Kultivierung von primären Zellen

Ein Einsatzgebiet des Mini-Spinners soll die Parameteroptimierung in der Bioprozeßentwicklung für klinisch relevante Kultivierungen sein. Die Skalierbarkeit der Kultivierungsergebnisse aus Mini-Spinner-Versuchen in größere Bioreaktoren wird im Folgenden anhand der ex vivo Expansion von humanen T-Lymphozyten gezeigt. Prinzipiell wurde die Skalierbarkeit von Prozessdaten, die in 1L-Klöpplspinnern gewonnen wurden, bis in einen Maßstab von 20L hinein gezeigt [Hilbert U, 2001]. Kann gezeigt werden, daß die Kultivierung von primären Zellen im Mini-Spinner vergleichbar mit der von 1L-Klöpplspinnern verläuft, ist eine direkte Übertragung von Kultivierungsprotokollen aus dem Prozeßentwicklungsmaßstab in klinisch relevante Maßstäbe möglich.

Isolierte PBMC von gesunden Spendern wurden in statischer Kultur mit α -CD3 mAb und α -CD28 mAb für fünf Tage stimuliert. Nach dieser Stimulationsphase müssen die Zellen noch für weitere 4 Tage in unregelmäßig, statischen Kultivierungssystemen kultiviert werden, um die notwendigen Zellzahlen für das Inokulum der 1L-Spinnergefäße zu erreichen. Während der vergleichenden Kultivierung in Mini-Spinnern und 1L-Spinnern wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium auf 50%DO eingestellt. Der pH-Wert des Mediums wurde einseitig über die CO₂-Konzentration der Zuluft auf pH 7,0 geregelt.

Abbildung 5-7 zeigt den Zelldichteverlauf für den gesamten Kultivierungsprozeß von der Stimulationsphase bis zu den vergleichenden Kultivierungen in den beiden Spinnersystemen. In der viertägigen Vor-Expansionsphase, die in unregelmäßiger Kultur durchgeführt wurde, zeigen die Zellen exponentielles Wachstum. In diesem Zeitraum erfolgt diskontinuierlich in Intervallen von 24 Stunden eine Verdopplung des Kulturvolumens durch Zufütterung von Frischmedium. Die Zelldichte bleibt über diesen Zeitraum daher annähernd konstant ($\mu_{\max} = 0,036 \text{ h}^{-1}$). Für die vergleichenden Satzkultivierungen wurden die Mini-Spinner mit 50 mL, die 1L-Spinner mit 300 mL Zellsuspension in Frischmedium inokuliert. Während der exponentiellen Wachstumsphase zeigen die erreichten Zelldichten und Vitalitäten der Kulturen in den beiden Spinnersystemen sehr gute Korrelation. Die maximale vitale Zelldichte wird in den Mini-Spinnern zu $3,9 \pm 0,9 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$, in den 1L-Spinnern zu $4,2 \pm 0,3 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ nach 96 Stunden Satzkultivierung (nach 312 h Gesamt-Kulturdauer) ermittelt. Mit abnehmender Vitalität der Kulturen wird auch, wie beiden Zelllinien, die Korrelation zwischen Mini-Spinner und 1L-Spinner schlechter.

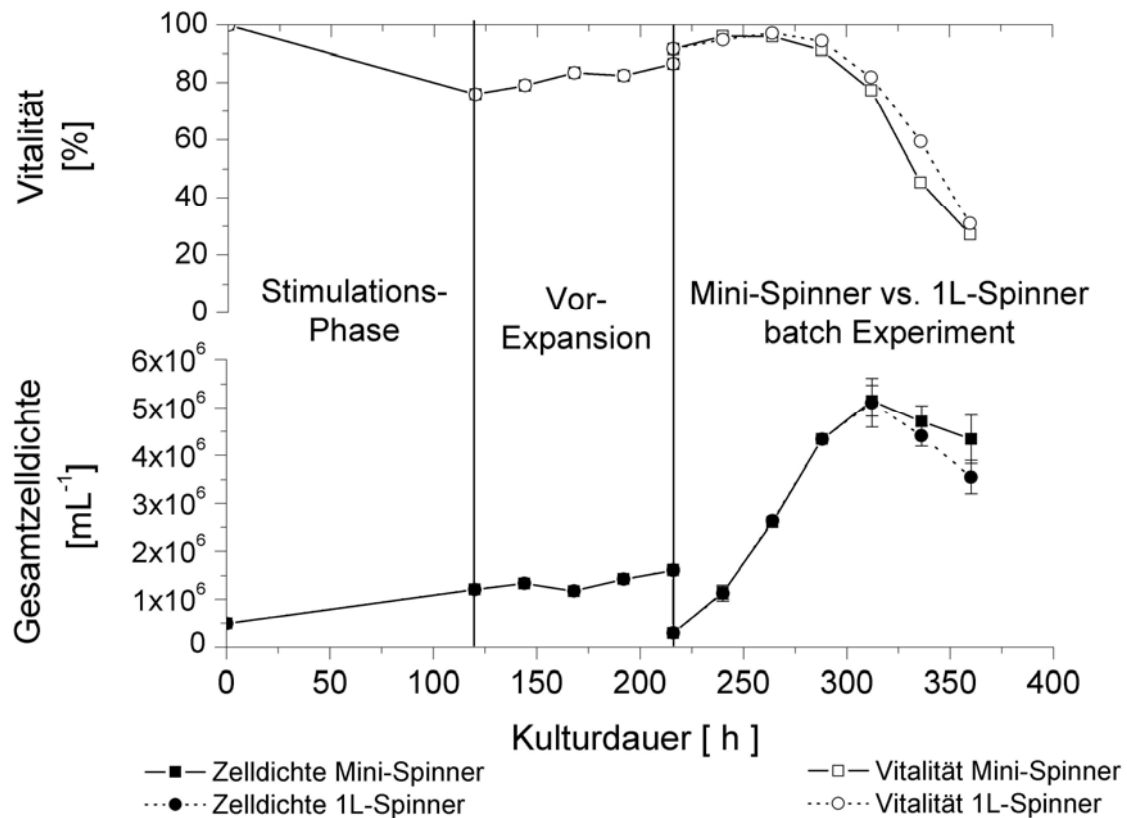


Abbildung 5-7: Vergleichende Kultivierungen: Expansion primärer T-Lymphozyten

Die Qualität der Kultivierung von Primärzellen drückt sich durch die Qualität der Zellen selbst (nicht wie bei Zelllinien durch die Qualität des sezernierten Proteinproduktes) aus. Die kultivierten Zellen wurden auf die Expression der T-Zellantigene CD3, CD4 und CD8 sowie die Aktivierungsmarker CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptor) und CD71 (Transferrin-Rezeptor) auf ihrer Zelloberfläche immuncytometrisch untersucht (Abbildung 5-8). Die Analyse erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten des Kultivierungsprozesses. Die an Tag 0 der Kultivierung inokulierten PBMC bestanden zu 57% aus T-Lymphozyten. Nach der Stimulationsphase an Tag 5 machen die T-Lymphozyten 99% der Gesamtzellpopulation aus. Zu diesem Zeitpunkt koexprimieren die CD3^+ T-Lymphozyten auch CD25 (93% der CD3^+ Zellen) und CD71 (96% der CD3^+ Zellen). Mit fortschreitender Expansion nimmt die Stimulation der Zellen ab. Der Anteil der Zellen, die CD25 und CD71 koexprimieren sinkt auf 9% (CD25) und 1,3% (CD71) in Mini-Spinner-Kultivierungen bzw. 12% (CD25) und 7% (CD71) in 1L-Kultivierungen (Werte: Tag 14). Das Verhältnis von der beiden Lymphozyten-Subpopulationen $\text{CD3}^+\text{CD4}^+$ zu $\text{CD3}^+\text{CD8}^+$ hat sich über den Kultivierungszeitraum nicht geändert und wurde auch durch die Wahl des Kultivierungssystems nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

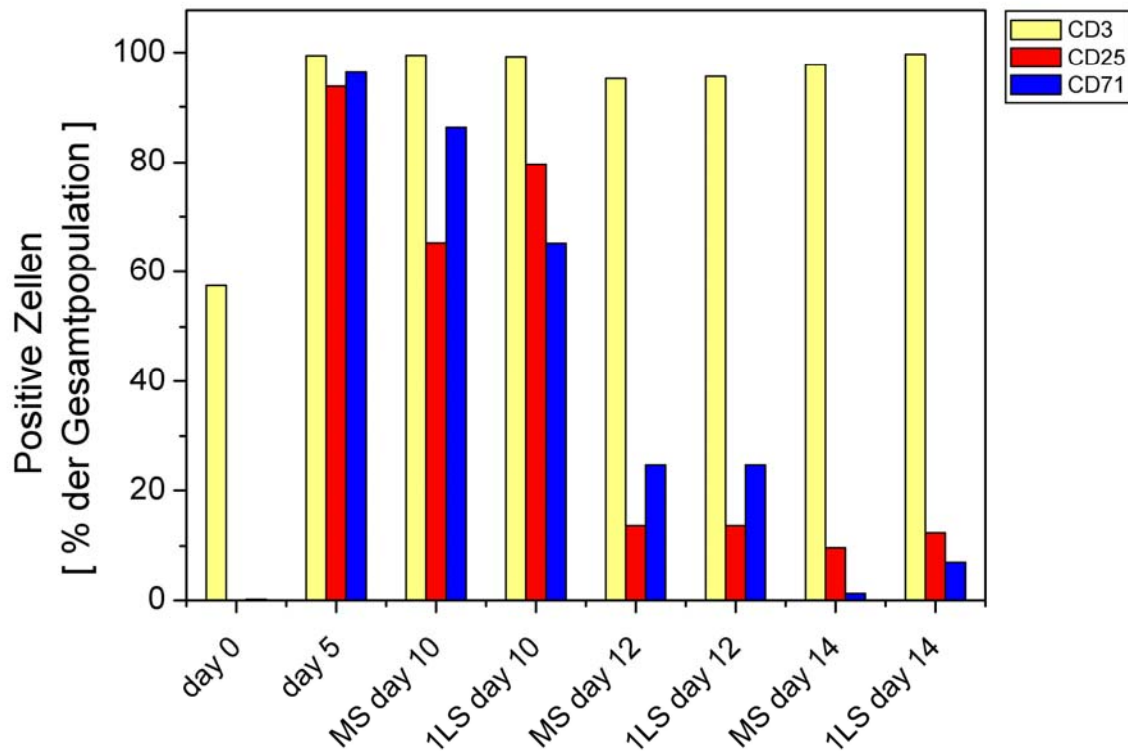


Abbildung 5-8: Durchflußzytometrische Analyse von Markerantigenen auf primären T-Lymphozyten

Den typischen Verlauf von pH und pO_2 im Medium während der Satzkultivierung im Mini-Spinner bzw. im 1L-Spinner ist in Abbildung 5-9 gezeigt. Während gesamten Kultivierung wurde in beiden Gefäßen die gewählte Gelöstsauerstoffkonzentration von 50%DO aufrecht erhalten. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde dazu in den Mini-Spinnern der Sauerstoffanteil in der Zuluft von 10,5 %(v/v) auf 17,5 %(v/v) erhöht (1L-Spinner: 10,5 %(v/v) auf 19,8%(v/v)). Die einseitig gewählte pH-Regelung über den CO_2 -Anteil in der Zuluft konnte in den beiden verglichenen Kultivierungssystemen den Medium-pH-Wert auf dem voreingestellten Soll-Wert von pH 7,0 halten. Durch Akkumulation von sauren Metaboliten (Laktat) im Medium mußte der CO_2 -Gehalt der Zuluft kontinuierlich gesenkt werden. Dieser Effekt setzt in den beiden verglichenen Spinner-Systemen übereinstimmend zum gleichen Zeitpunkt ein und führt ebenso ohne zeitliche Verschiebungen zu einer Depletion des CO_2 im Zugas nach 65 h. Danach fielen beide Spinner-Systeme von pH 7,0 auf pH 6,6 ab. Dieses Ergebnis zeigt deutlich die Wichtigkeit der Kontrolle und Korrektur des pH-Wertes während der Kultivierung primärer Zellen. Diese Option ist bereits bei der Konstruktion des Mini-Spinner berücksichtigt worden. Ein Zulauf-Anschluß im Deckel kann sowohl für eine Frischmedium-Zufütterung als auch für den Zulauf eines pH-Korrekturmittels verwendet werden.

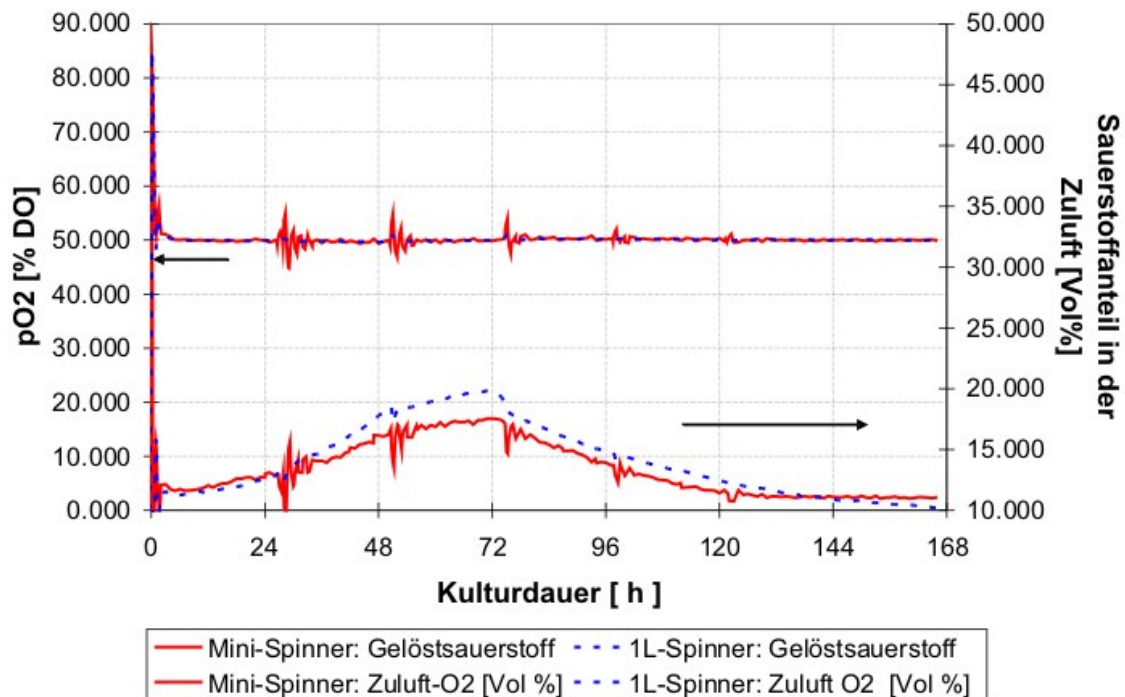


Abbildung 5-9: Verlauf von pH und Gelöstsauerstoff, Begasungsparameter während vergleichender Kultivierungen primärer T-Lymphozyten

5.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels

Mehrfach parallele Fermentationen unter vollständig kontrollierten Bedingungen sind ein geschätztes Werkzeug der Bioprozeßentwicklung für die Kultur tierischer Zellen geworden. Ziel der Entwicklung des Mini-Spinners ist es ein Kultivierungssystem zur Verfügung zu stellen, das unter kontrollierten Bedingungen in einem Arbeitsvolumenbereich von 20 bis 50 mL betrieben werden kann. Bisher stand ein solches System nicht zur Verfügung und vergleichende Kultivierungen, die auf kleine Kulturvolumina angewiesen sind, wurden daher in unregelmäßigen, statischen Systemen durchgeführt.

Der Mini-Spinner ist als gerührtes oder geschütteltes Kultursystem zu betreiben. Das Mini-Spinner-Gefäß kann mit konventionellen Elektroden zur pH und Gelöstsauerstoffmessung ausgestattet werden. Diese sind als Standardsysteme mit entsprechend normierter Messverstärker-Hardware in der Forschung und der Industrie weit verbreitet. Entsprechend kann das Mini-Spinnersystem größere Kultivierungssysteme in diesem Umfeld einfach ersetzen, ohne daß Investitionen in neue Sensorsysteme notwendig wären. Das minimale Arbeitsvolumen des

Systems wird durch die minimale Eintauchtiefe der Sensoren (bei pH-Elektroden ca. 15 mm) in großem Maße bestimmt. Mit Sensoren, die mit einem einzigen Oberflächenkontaktpunkt pH und/oder Gelöstsauerstoff bestimmen können (z.B. fiberoptische Sensoren) kann das minimale Arbeitsvolumen bedeutend gesenkt werden. Diese Systeme stehen jedoch noch nicht für den mehrfachparallelen Einsatz am vorhandenen Fermentationssystem cellferm pro zur Verfügung. Der Mini-Spinner erweist sich als ein mit größeren Kulturgefäßen vergleichbares Kultivierungssystem sowohl in Bezug auf die verfahrenstechnischen Charakteristika als auch in Bezug auf die erreichbaren Kultivierungsergebnisse. Die über Kopf angebrachte Rührung des Mini-Spinners ist in der Lage auch aggregatbildende Zellen in Suspension zu halten (Rührerdrehzahl $> 60 \text{ min}^{-1}$), ohne daß es zu Ablagerungen im Kulturgefäß oder zu scherstreßinduzierten Zellschäden kommt. Der im Mini-Spinner erreichbare Sauerstoffeintrag ist von der gleichen Größenordnung wie bei größeren Bioreaktoren, die standardmäßig in der Bioprozeßentwicklung eingesetzt werden. Mit dem im Mini-Spinner erreichbaren Sauerstoffeintrag ins Medium ($k_L a$ -Wert von $1,8 \text{ h}^{-1}$) können nach Berechnungen von DE LEON et al. mindestens $8 \cdot 10^6$ hämatopoetische Progenitorzellen pro mL ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden [De Leon, 1998]. Die mit dem Mini-Spinner erhaltenen Kultivierungsergebnisse zweier unterschiedlicher Zelllinien (CHO und Hybridoma) korrelieren hervorragend mit Ergebnissen, die in 1L-Spinnergefäßen mit 10fach größerem Arbeitsvolumen erzielt werden konnten. Sowohl biologische Parameter wie Wachstum, Vitalität und Produktivität der Zellen als auch technische Parameter wie die Regelcharakteristik der Mini-Spinner Kultivierungen zeigen gute Übereinstimmungen mit 1L-Spinnerkultivierungen. Die im Mini-Spinner erzielbaren Kultivierungsergebnisse können also auf größere Kultivierungsansätze skaliert werden.

Ein wichtiges Anwendungsfeld für den Mini-Spinner sollen Bioprozeßentwicklungen mit Primärzellen sein. In diesem Bereich ist die zugängliche Menge an Ausgangszellmaterial limitiert. Zusätzlich zwingen hohe Kosten für klinktaugliche Medien und Wachstumsfaktoren zu Prozeßentwicklungen in möglichst kleinem Maßstab, was bisher statische Systeme ohne jegliche Kontrollmöglichkeit bedeutete. Am Beispiel der Expansion von primären hämatopoetischen Zellen (T-Lymphozyten) wurde gezeigt, daß der Mini-Spinner auch für diesen Zelltypus gut skalierbare Ergebnisse liefert. Sowohl Wachstum als auch die Qualität der im Mini-Spinner expandierten Zellen entsprechen, wie durch FACS-Analyse gezeigt, den im 1L-System generierten Zellen. Sowohl die Mini-Spinner als auch die 1L-Spinner-Kultivierungen zeigten die Notwendigkeit einer Kontrolle der Medienparameter pH und Gelöstsauerstoff, um gleichbleibende Bedingungen im Medium aufrecht zu erhalten. Das Beispiel zeigt auch den Vorteil des Mini-Spinners gegenüber den bisher verwendeten großvolumigen Kultursystemen: Um genügend Zellen für das Inokulum von mehreren parallel betriebenen 1L-Spinnern überhaupt aufbringen

zu können, mußten die Zellen in unkontrollierten Kultivierungssystemen stimuliert und vorexpanziert werden. Dies kann unter der Verwendung der Mini-Spinner entfallen.

Das geringe Arbeitsvolumen des Mini-Spinner ermöglicht die Stimulation und Kultivierung im kontrollierten System vom Beginn der Kultivierung mit vergleichsweise geringen Ausgangszellzahlen an. Damit schließt das System die Lücke zwischen statischen, kleinvolumigen und unkontrollierten sowie gerührten und kontrollierten, aber großvolumigen Kultivierungssystemen. Zu den Vorteilen des Systems gehören die geringeren Kosten pro Versuch insbesondere wenn teure Substrate im Medium verwendet werden und die Verkürzung von Versuchszeiten, da weniger Zellbiomasse für das Inokulum benötigt wird. Dies ist insbesondere bei Stimulationsversuchen interessant, die von relativ hohen Inokulum-Zelldichten ausgehen oder aber bei Versuchen mit begrenztem Ausgangszellmaterial. Dadurch lassen sich auch Versuchszeiten verkürzen, da eine aufwendige Vorkultivierung entfallen kann. Diese Eigenschaften des Mini-Spinner haben eine Kommerzialisierung des Systems zusammen mit dem Partner DASGIP AG möglich gemacht. Zum Zeitpunkt der Drucklegung dieser Arbeit konnten bereits einige Systeme erfolgreich am Markt platziert werden.

6 Voruntersuchungen

In diesem Kapitel sind grundlegende Voruntersuchungen zusammengetragen, die sowohl die Gewinnung und Verwendung der CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut als auch die zu etablierende Analytik der Zellfunktionalitäten betreffen. Der Übersichtlichkeit halber erfolgt die Diskussion der Ergebnisse jeweils im Anschluß an das betreffende Unterkapitel.

6.1 Anpassung an kliniktaugliche Verfahren und Reagenzien

Die kontinuierliche Versorgung mit Stammzellmaterial aus der Nabelschnur wird sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Anwendung durch Kryokonservierung der Spenden sichergestellt. Während die klinische Anwendung auf die Bereithaltung der Spende für einen möglichen zukünftigen Patienten abgerichtet ist, steht in der Forschung die Möglichkeit zur unabhängigen Versuchsdurchführung, auch mit Zellen verschiedener Spender gleichzeitig, im Vordergrund.

In der Arbeitsgruppe Zellkulturtechnik des IBT wurde entsprechend eine Forschungs-Zellbank aus CD34⁺ Zellen aufgebaut [Jelinek N, 2000]. Die etablierten Protokolle wurden methodisch auf größtmögliche Reinheiten und Ausbeuten an CD34⁺ Zellen, sowie Senkung der Kontaminationsrate hin optimiert. Da eine, wie auch immer geartete klinische Verwertung der eingelagerten Zellen oder daraus expandierter Proben nicht in Frage kam, waren diese Fragestellungen bei der damaligen Methodenentwicklung und Zellprozessierung auch nicht relevant.

Zur Bearbeitung des vorliegenden Themas innerhalb des BMBF-Förderprogrammes „Tissue Engineering“ mit klinischen und industriellen Partnern, wurde eine Überarbeitung der Protokolle zur Zellgewinnung und -konservierung notwendig. Einerseits kann die Übertragung von Forschungsergebnissen auf tierexperimentelle und/oder klinische Studien-Protokolle umso schneller und reibungsloser erfolgen, je näher sich die Forschungsarbeiten bereits am klinischen Standard orientieren. Andererseits vereinfacht sich die Verwendung von Zellproben für die weitere klinische Forschung und Entwicklung wenn grundlegende Aspekte klinischer Zellprozessierung (z.B. Verzicht auf Reagenzien tierischen Ursprungs) bereits bei der Gewinnung und Einlagerung des Zellmaterials berücksichtigt werden. Darüber hinaus ergab sich aus dem technischen Fortschritt der letzten Jahre einiger Anpassungsbedarf.

6.1.1 Nabelschnurblutspende und Isolierung von CD34⁺ Zellen

Die Gewinnung des Nabelschnur-Restblutes erfolgte bisher durch einfaches Ausstreichen der durchtrennten Nabelschnur in ein steriles 50 mL Zentrifugenröhrchen. Als Antikoagulanzen diente eine Heparin-PBS-Lösung. Diese Entnahmetechnik wurde durch ein Beutelsystem zur Blutabnahme (Macopharma, Langen) ersetzt. Zur Blutentnahme wird hierbei die Nabelschnurvene punktiert und das Blut in einen Beutel mit vorgelegtem glukose-, phosphat- und adenosinhaltigen Citrat-Puffer (CPD-A) abgefüllt. Der Vorteil dieses Systems, das in allen öffentlichen und privaten Nabelschnurblutbanken zum Einsatz kommt, liegt darin, daß die gesamte Prozeßkette von der Spende bis zur Transplantation im geschlossenen System stattfinden kann. Offene Systeme finden nicht die Zulassung für die klinische Anwendung. Für die Forschungsanwendung versprechen sich darüber hinaus größere gewinnbare Blutvolumina.

Die Aufarbeitungsprozedur wurde ebenfalls angepaßt. Aus allen Proben wurden zunächst mittels Dichtezentrifugation MNC isoliert. Dazu kommen Leukasep-Röhrchen zum Einsatz, die durch eine eingebaute Fritte ein Rückvermischen der aufgetrennten Probe verhindern und so die Feinreinigung der gewonnenen Zellen durch ein BSA-Kissen überflüssig machen. Die anschließende Isolierung von CD34⁺ Zellen erfolgte durch magnetische Separation mit Hilfe der MACS-Technologie von Miltenyi, die auch im klinischen Maßstab eingesetzt wird. In dem bisherigen Aufreinigungsprotokoll wurde das CD34-Epitop indirekt magnetisch markiert (Bindung eines haptenkonjugierten Antikörpers an das CD34-Epitop gefolgt von der Bindung MACS-microbead-konjugierter Antikörper an das Hapten). Neue Reagenzien ermöglichen die direkte Bindung von MACS-microbeads an das CD34-Epitop und damit eine schnellere Verarbeitung der Probe. Aus Kostengründen wurde der maximale Einsatz an MACS-Microbeads auf 200 µL pro Nabelschnurblutprobe beschränkt.

In einem Zeitraum von 21 Monaten wurden 54 Nabelschnurblutproben mit Hilfe des Beutelsystems gesammelt und nach den modifizierten Protokollen CD34⁺ Zellen aufgereinigt. Es konnten durchschnittlich 49 mL Blut gewonnen werden (± 18 mL). Zwischen der Geburt und Beginn der Aufarbeitung lag eine Zeitspanne von $16,5 \pm 8,2$ Stunden. Pro mL Nabelschnurblut wurde eine Ausbeute von $8,63 \pm 0,18 \cdot 10^6$ MNC erreicht. Der Anteil der CD34⁺ Zellen in der MNC-Fraktion wurde nicht weiter bestimmt. Pro Nabelschnurblutprobe konnten mit dem überarbeiteten Aufreinigungsprotokoll durchschnittlich $1,59 \cdot 10^6$ CD34⁺ Zellen isoliert werden. Die CD34⁺ Zellen machten in der aufgereinigten Population einen Anteil von 95 ± 3 % aus.

Die erzielten Ergebnisse wurden mit historischen Daten der Nabelschnurblutsammlung und Aufarbeitung verglichen [Jelinek N, 2000]. Es zeigt sich, daß die gewinnbare Menge an Blut mit dem Beutelsystem im Mittel um ca. 19 mL höher liegt als bei der Abnahme in die Röhrchen (30

± 9 mL). Da die Logistik von der Abholung der Blutspende im Krankenhaus bis zur Prozessierung nicht verändert wurde, entspricht die durchschnittliche Zeitspanne bis zum Beginn der Aufarbeitung den historischen Werten (13 ± 11 Stunden). Mit den modifizierten Protokollen kann die gewinnbare Menge an MNCs pro mL Nabelschnurblut um ca. 20% gesteigert werden (historisch: $7,2 \cdot 10^6$ mL⁻¹). Die Reinheiten der gewonnenen CD34⁺ Zellpopulationen konnten ebenso gesteigert werden (historisch: 76 ± 19 %).

6.1.2 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung der aus Nabelschnur gewonnenen primären Zellen erfolgte bisher in fötalem Kälberserum (FBS). Um die Übertragung von xenogenen Erregern auf den Menschen auszuschließen, ist der Kontakt der Zellen mit Substanzen tierischen Ursprungs (wie z.B. Seren) zu vermeiden. Für ein klinisch einsetzbares Verfahren sind daher alternative Einfriermedien zu finden. Es wurden folgende alternative Kryokonservierungsmedien untersucht:

- Allogenes Serum eines erwachsenen Spenders
- Autologes Plasma
- Biseko[®]

Proben von frisch aufgereinigten CD34⁺ Zellen wurden mit den verschiedenen Kryokonservierungsmedien entsprechend des etablierten Einfrierprotokolls kryokonserviert. Die Lagerung der Proben erfolgte für mehrere Wochen über flüssigem Stickstoff bei -180°C . Das Auftauen der Zellen erfolgte gemäß dem etablierten Auftauprotokoll für CD34⁺ Zellen.

Es zeigt sich, daß alle Kryokonservierungsmedien sehr hohe Vitalitäten von $> 80\%$ nach dem Auftauen liefern. Abweichungen von diesem Wert halten sich in relativ engen Bereichen. Der Anteil der wiedergefundenen Zellen nach dem Auftauen liegt für FBS und autologem Plasma (AP) mit 83% bzw. 81% am höchsten. Etwas geringere Wiederfindungsraten von ca. 70% ergeben sich für Biseko bzw. allogenes Serum (AB-Serum: ABS). Die Wiederfindungsrate für mit Biseko eingefrorene Zellen ist mit einer etwas höheren Varianz behaftet als die im Referenzmedium FBS eingefrorenen Proben (Abbildung 6-1). Nach dem Auftauen treten bei den in autologem Plasma eingefrorenen Proben Ausfällungen auf, die eine Zählung der Zellen erschweren.

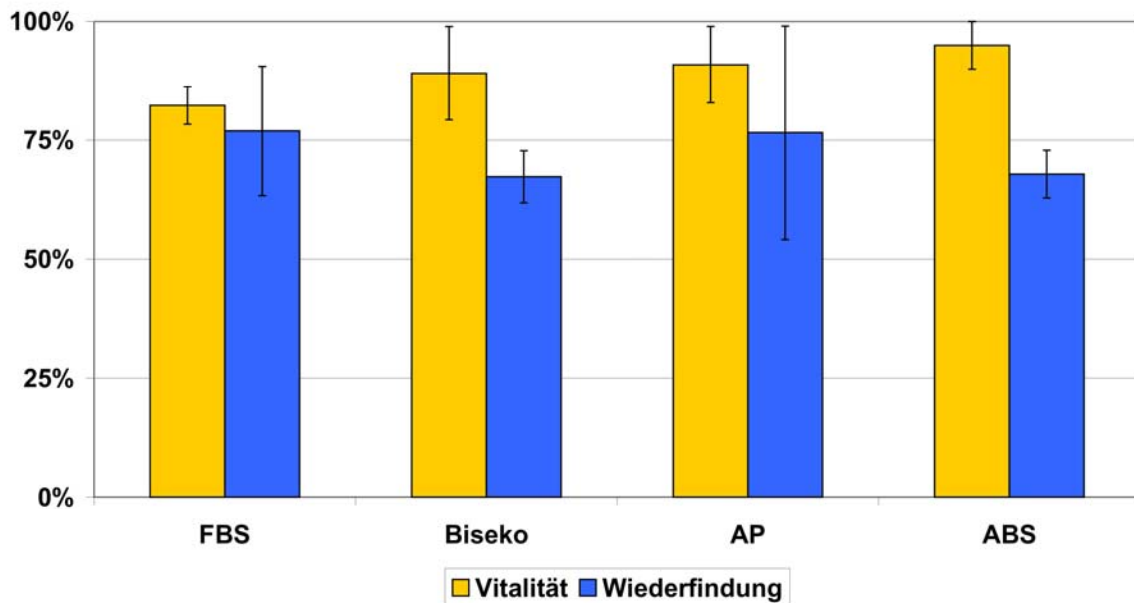


Abbildung 6-1: Vergleich von alternativen Kryokonservierungsmedien

Fötales Kälberserum als Kryokonservierungsmittel für CD34⁺ Zellen läßt sich durch humane Seren bzw. Serumpkomponenten ersetzen. Sowohl in Bezug auf die Wiederfindungsraten als auch in Bezug auf die Vitalitäten der eingefrorenen Zellen sind alle getesteten Seren verwendbar. Einzig das autologe Plasma zeigt beim Auftauen problematische Ausfällungen. Diese sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das Plasma ohne weitere Aufreinigung (Dekomplementierung, Abscheidung von Lipiden durch Ultrazentrifugation) eingesetzt wurde. Die Aufarbeitung des Plasmas würde jedoch den notwendigen Arbeitsaufwand erhöhen und den Aufarbeitungsprozeß verlängern. Da allogenes Serum bzw. die Serumkomponente BISEKO als ebenso gute Alternativen zur Verfügung stehen, kann davon abgesehen werden. Dem als Arzneimittel zugelassenen BISEKO wird der Vorrang für die Kryokonservierung der Zellen eingeräumt.

6.2 Etablierung der durchflußzytometrischen Analytik

Die Differenzierung und Reifung von CD34⁺ Zellen zu Granulozyten und deren Vorläuferzellen kann anhand des Expressionsmusters von Oberflächenmarkern verfolgt werden. Entsprechend der in der Literatur beschriebenen Oberflächenantigene CD15 (Lacto-N-Fucopentanose, Sialyl-Lewis-x-Antigen), CD11b (alphaM-beta2-Integrin) und CD16 (niedrig affiner Rezeptor für den Fc-Teil von Antikörpern) soll die granulozytäre Differenzierung verfolgt werden. Die Entsprechungen zwischen Immunophänotyp und morphologischem Phänotyp ist in Tabelle 6-1 gegeben.

Tabelle 6-1: Expressionsmuster von Oberflächenantigenen der granulozytären Differenzierungslinie

Immunophänotyp	Morphologischer Phänotyp
CD15 ⁺ / CD11b ⁻ / CD16 ⁻	Myeloblasten, Promyelocyten
CD11b ⁺ / CD16 ⁻	Myelocyten, Metamyelocyten
CD16 ⁺	Stab-/segmentkernige Granulozyten

CD34⁺ Zellen wurden unter Verwendung einer Zytokinmischung aus SCF, IL3, IL6 und G-CSF (je 50 ng/mL) in SCGM-Medium kultiviert. An Tag 0 sowie den Tagen 5, 9 und 12 der Kultivierung wurden Zellproben immunocytochemisch gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert (Abbildung 6-2). CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen exprimieren weder das Markerantigen CD15 noch CD11b. Während der Kultivierung werden die differenzierenden Zellen für den Marker CD15 positiv, ohne das CD11b Antigen auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Erst im weiteren Verlauf der Kultivierung exprimieren die neutrophil differenzierenden Zellen auch CD11b. Es ist festzustellen, daß die Expression der beiden Oberflächenmarker CD15 und CD11b ein breites Kontinuum von Intensitäten überdecken. Die Expression des Markers CD16 konnte weder durchflußzytometrisch noch immunhistochemisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Um ausgereifte Stab- und Segmentkernige Granulozyten dennoch nachweisen zu können, muß daher auf zytologische Präparate zurückgegriffen werden. Aufgrund der charakteristischen Kernfaltung können diese Zellen eindeutig morphologisch von den Blasten- bzw. Myelocytenstadien unterschieden werden.

Zur Abgrenzung der neutrophilen Differenzierung gegen den monozytären Differenzierungsweg kann ebenfalls die Durchflußzytometrische Analyse eingesetzt werden. Monozytäre Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den Marker CD11b zeitlich vor dem Marker CD15. Zellen mit dem Phänotyp CD15⁻CD11b⁺ sind daher der monozytären Differenzierungslinie zuzuordnen. Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse kann bei Bedarf auf weitere Markerantigene zurückgegriffen werden. Hierzu wurden die intrazellulären Antigene, die Teil des bioziden Arsenal der Neutrophilen sind, analysiert (Myeloperoxidase, Lysozym, Lactoferrin). Daneben werden auch die Oberflächenantigene HLA-DR, CD14, CD33 und CD38 analysiert. Die literaturbeschriebenen Expressionsmuster dieser Antigene sind in Tabelle 6-2 dargestellt.

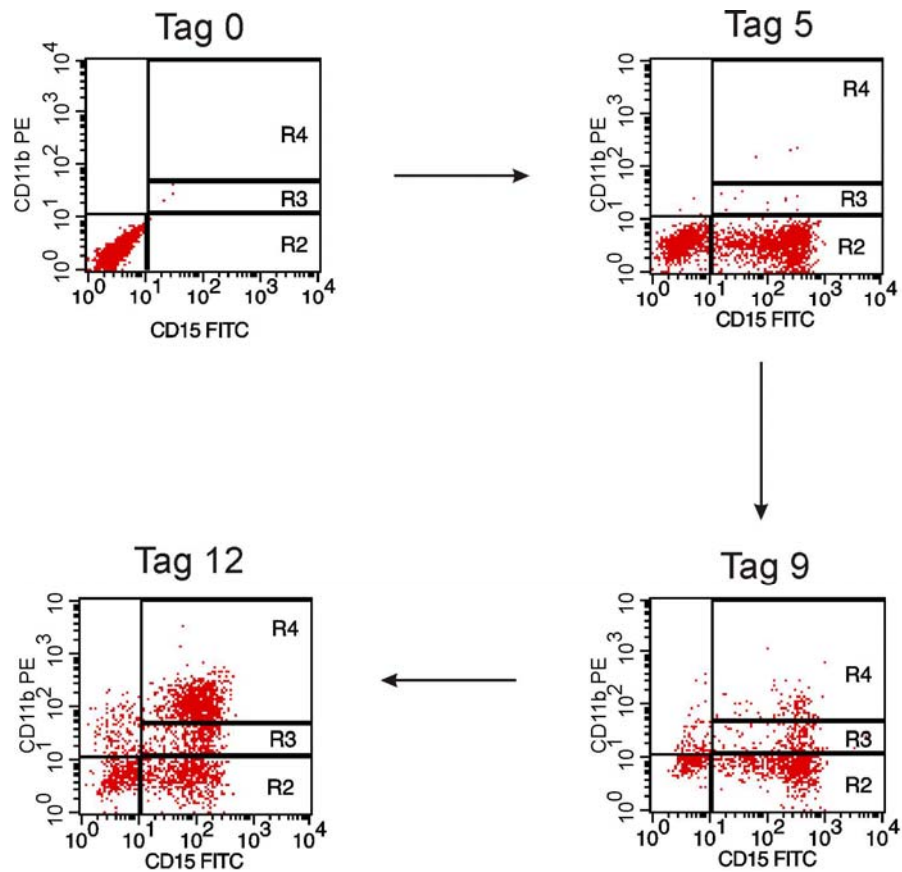


Abbildung 6-2: Expression neutrophiler Differenzierungsantigene über die Zeit
 R2: CD15+CD11b- : Myeloblasten, Promyelozyten
 R3: CD15+CD11blow: Myelozyten
 R4: CD15+CD11b+: Metamyelozyten, Stab-/Segmentkernige

Tabelle 6-2: Antigenexpression weiterer Marker während der neutrophilen Differenzierung

Antigen	Biol. Funktionalität	Expression
CD14	Lipopolysaccharid Receptor	Starke Expression auf Zellen der monozytären Linie Schwache Expression auf Zellen der granulozytären Linie
CD24	Heat stable Antigen	Myelozyten
CD66b	Adhäsions-Protein	Promyelozyten/Myelozyten
HLA-DR	Humaner MHCII-Komplex	Monozyten
Myeloperoxidase	Bildung aktiver O-Spezies	azurophile Granula von PMN
Lysozym	Muraminidase	sekundäre Granula von PMN
Lactoferrin	Eisenbindendes Protein	sekundäre Granula von PMN

6.3 Etablierung der Zellfunktionalitätstestungen

Neben der korrekten phänotypischen Differenzierung ist die biologische Aktivität der in vitro generierten Zellen von entscheidender Bedeutung. Zur Untersuchung der Funktionalität von neutrophilen Granulozyten werden die Reaktionen der Zellen auf ihre natürlichen mikrobiellen Ziele untersucht [van Eeden SF, 1999]. In der vorliegenden Arbeit werden die beiden zentralen Effektorfunktionen der neutrophilen Zellen zur Funktionstestung benutzt: Phagozytose, also die Aufnahme von Fremdpartikeln und die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, dem oxidativen Burst. Beide Tests untersuchen nicht nur das jeweilige Effektorsystem sondern implizieren auch, daß die molekularen Erkennungs- und Signaltransduktionsmechanismen der neutrophilen Zellen korrekt funktionieren.

6.3.1 Phagozytose

In der vorliegenden Arbeit wird die Phagozytose-Kapazität der neutrophilen Zellen mit Hilfe von E.coli-Bakterien bestimmt [Oda T, 1986]. Dazu werden die Zellen mit hitzeinaktivierten und fluoreszenzmarkierten E.coli-Partikeln in humanem Serum bei 37°C bzw. bei 0°C inkubiert. Die Menge an aufgenommenen Farbstoff bestimmt die Fluoreszenzaktivität der Zelle, die als Indikator für die phagozytische Aktivität dient. Unspezifische Bindung der fluoreszenzmarkierten Bakterienzellen an die Plasmamembran der neutrophilen Zellen wird durch die Kontrollprobe bei 0°C offensichtlich, da die Phagozytose ein aktiver Prozeß ist, der bei tiefen Temperaturen zum Erliegen kommt, während unspezifische Bindungen auch bei diesen Temperaturen zustande kommen können. Das von ODA et al. beschriebene Test-Protokoll verwendet ein Fluoreszenzspektrometer zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität der Gesamtzellpopulation. Hier soll die Fluoreszenzintensität jedoch mit Hilfe des Durchflußzytometers auf Einzelzellniveau bestimmt werden. Dafür muß die Färbung der E.coli-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff so angepaßt werden, daß in der durchflußzytometrischen Analyse eine gute Signaltrennung zwischen negativen und fluoreszierenden Zellpopulationen möglich ist. Hitzeinaktivierte E.coli-Zellen werden mit unterschiedlichen Mengen an FITC konjugiert und im Verhältnis von 10:1 unter sonst gleichen Testbedingungen mit humanen neutrophilen Zellen im Phagozytose-Testansatz eingesetzt. Das Ergebnis wurde durchflußzytometrisch dokumentiert (Tabelle 6-3).

Tabelle 6-3: Ansätze zur Konjugation von E.coli-Zellen mit FITC

Ansatz	FITC-Konzentration im Färbeansatz
A	0,75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
B	2,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
C	4,50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

Die fluoreszenzmarkierten E.coli-Zellen aller Kopplungsansätze sind in der Lage, eine ausreichende Signaltrennung zwischen den phagozytierenden und nicht phagozytierenden Zellen zu erreichen (Abbildung 6-3). In den Histogrammdarstellungen zeigt sich die Abhängigkeit der Signallage von der Färbeintensität der Zellen. Die relative Fluoreszenzintensität ist in der gewählten Histogrammdarstellung in Kanälen von 1 (geringste Fluoreszenzintensität) bis 10.000 (höchste Fluoreszenzintensität) über vier log-Stufen aufgetragen. Phagozytose-negative Signale liegen bei Kanal 4 ± 1 . Das geometrische Mittel des Signals der phagozytose-positiven Zellen (M1) reicht von Kanal 119 ± 3 (Färbeansatz A) bis zu 550 ± 41 (Färbeansatz C). Für die Charakterisierungen der generierten neutrophilen Zellen werden E.coli-Zellen der Färbeansätze A und B verwendet, da hier die Signale für phagozytose-positive und negative Zellen weiter voneinander getrennt sind.

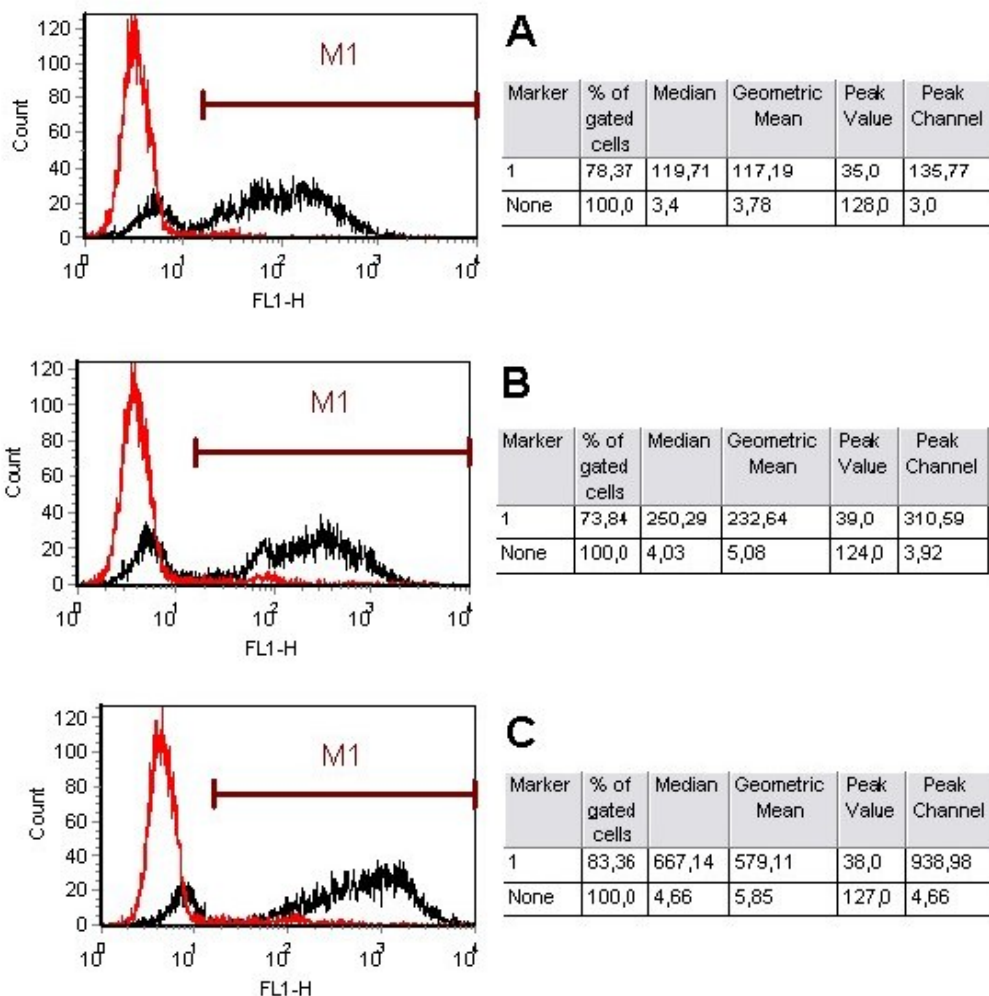


Abbildung 6-3: Durchflußzytometrischer Vergleich von FITC-E.coli-Konjugaten im Phagozytose-Test
(repräsentatives Ergebnis eines Ansatzes)

6.3.2 Oxidativer Burst

Kommen neutrophile Zellen in Kontakt mit gelösten oder suspendierten mikrobiellen Stimuli, initiieren sie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Umsetzung von molekularem Sauerstoff in einer Reaktionskaskade. Ein wichtiges Intermediat des sogenannten „respiratory bursts“ ist das Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Chemolumineszenz (CL) ist eine einfache Methode, um die Freisetzung von H_2O_2 und damit die biozide Funktionalität der neutrophilen Zellen zu untersuchen. Mit Hilfe der Luminol-Reaktion kann das freiwerdende H_2O_2 umgesetzt werden. Die dabei in stöchiometrischen Mengen freiwerdenden Lichtquanten dienen als Maß für die ROS-Bildung. Dieses Testprinzip ist einfach auf ein Mikrotiterplatten-Format anwendbar [Blair AL, 1988].

Hier sollte untersucht werden inwieweit die Matrix der Reaktion einen Einfluß auf das Testergebnis hat. Verglichen wurden 2 Puffersysteme (Hanks-Puffer sowie PBS supplementiert mit Ca^{2+} -, Mg^{2+} -Ionen und Glukose) mit humanem, allogenen Blutplasma. Die Zellen wurden in den unterschiedlichen Matrices aufgenommen und mit dem mikrobiellen Stimulus Zymosan (Zellwandbestandteile von Hefen) versetzt. Zymosan bewirkt spezifisch die extrazelluläre Freisetzung von ROS. Im Fall der beiden serumfreien Pufferlösungen wurde das Zymosan zuvor mit humanem Serum inkubiert. Durch dieses „Opsonieren“ werden Antikörper und Komplementfaktoren an Antigene des Zymosans gebunden und dieses als „Fremd“ markiert. Die Opsonierung ist auch in vivo eine Voraussetzung für die optimale Funktion der neutrophilen Zellen. Nach der Inkubation wird überschüssiges Serum vom Zymosan abgewaschen.

Abbildung 6-4 zeigt den Verlauf des vermessenen Chemolumineszenz-Signals in den unterschiedlichen Matrices. Die beiden Salzpuffer ergeben ein wesentlich höheres Signalmaximum als die in Serum durchgeführten Ansätze. Auch zeigt sich, daß die Lage der Signalmaxima in den beiden Salzpuffern deutlich früher, bei 18 min liegt, während in Serum das Signalmaximum bei ca. 30 min liegt. Im Serum enthaltene Enzyme und Proteine scheinen einen Teil des H_2O_2 abzubauen oder zu konsumieren, so daß dem CL-Substrat Luminol weniger H_2O_2 für die Umsetzung zur Verfügung steht. Aufgrund des besten Signal zu Rausch Verhältnisses werden die CL-basierten Untersuchungen in Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und glukose-supplementierten PBS durchgeführt.

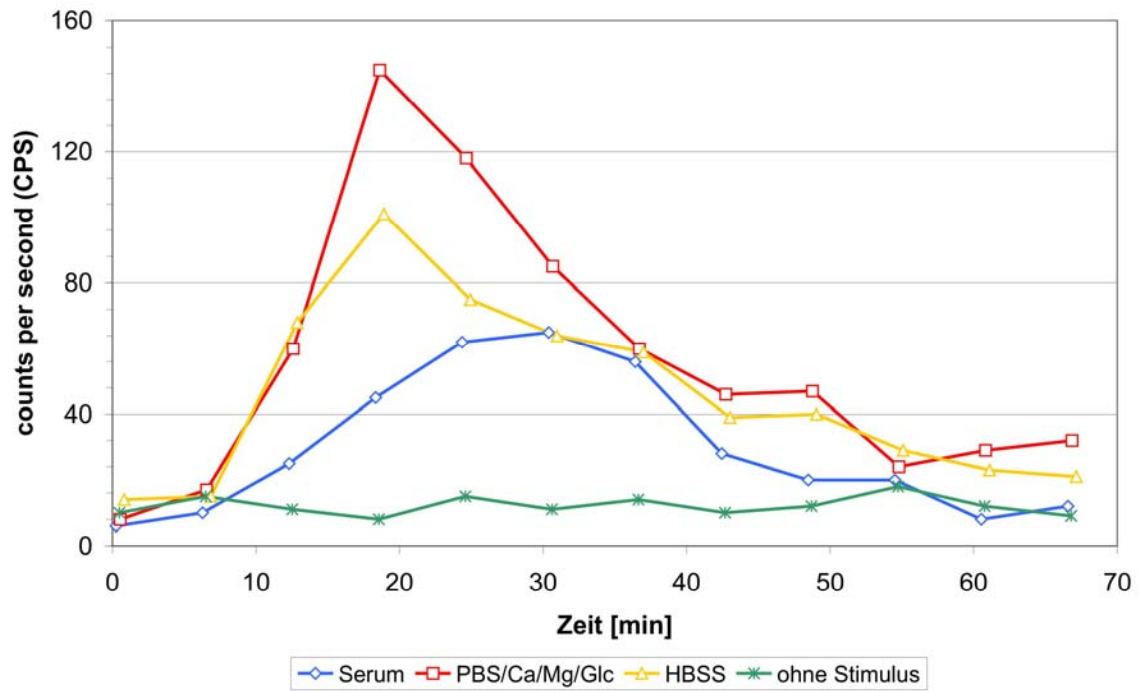


Abbildung 6-4: Vergleich verschiedener Matrices für den CL-basierten oxidative-burst Test

7 Generierung neutrophiler Zellen aus einer myeloiden Zelllinie

Die biotechnologische Bereitstellung von neutrophilen Zellen aus einer präexistierenden Zelllinie geht von folgenden zwingenden Voraussetzungen aus: Die Zelllinie wächst permanent, d.h. die Zelllinie kann über eine große Anzahl von Zellteilungen hinweg ohne Verlust zellulärer Vitalfunktionen und Proliferationsfähigkeit kultiviert werden. Die Zellen müssen sich möglichst einheitlich in einen funktionalen Status versetzen lassen. Auch diese Eigenschaft darf nicht mit zunehmender Anzahl der erfolgten Zellteilungen verloren gehen. Untersuchungen vom Projektpartner Teraklin AG zeigen, daß für die myeloide Zelllinie HL-60 diese Bedingungen erfüllt sind.

Zur Grundvoraussetzung für die klinische Anwendung der Zellen gehört die sichere und reproduzierbare Kultivierung und Funktionalisierung der Zellen. Der Gesamtprozeß unterteilt sich prinzipiell in zwei Teilschritte: Generierung von Zellbiomasse und anschließend deren Funktionalisierung. Hier sollen die Parameter der Kultivierung und Funktionalisierung von HL-60 untersucht werden. Für diese Zelllinie wurde von dem Projektpartner TERAKLIN AG bereits gezeigt, dass therapeutisch wirksame neutrophile Zelltypen generiert werden können. Da diese Zellen jedoch bisher nur zu Forschungszwecken und nicht in größeren Maßstäben kultiviert und funktionalisiert wurden, besteht noch weitgehende Unkenntnis über die erforderlichen Prozessparameter. Mit den gewonnenen Daten soll eine Aussage über die rationalste Ausgestaltung der Verfahrensweise des Gesamtprozesses und die Skalierung in größere Volumina einer Pilotanlage möglich sein.

7.1 Generierung von HL-60 Zellbiomasse

7.1.1 Medien und Supplementierung

Die Zelllinie HL-60 wurde ursprünglich in kälberserenhaltigen Kulturmedien isoliert und in diesem Medium bei der amerikanischen Zellbank ATCC hinterlegt. Die Zelllinie wächst ohne zusätzliche Supplementierung von rekombinanten Wachstumsfaktoren, jedoch ist bei der Verwendung von basalen Medienformulierungen die Supplementierung von Serum zwingend erforderlich.

In initialen satzweisen Kultivierungen wurde untersucht, inwieweit sich verschiedene Medien und Supplemente auf das Wachstumsverhalten von HL-60 auswirken. Untersucht wurden neben klassischen Basalmedien auch komplexe Medienformulierungen verschiedener Hersteller, die sich in dieser und weiteren Arbeiten der Zellkulturgruppe als vorteilhaft für die serumfreie

Kultivierung von Zellen – insbesondere auch von Primärzellen – erwiesen haben. Tabelle 7-1 und Tabelle 7-2 fassen die eingestellten Versuchsparameter zusammen.

Tabelle 7-1: Kulturparameter zur Untersuchung des Wachstums von HL-60 in serumhaltigen Medien

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin)
Ausgangszelldichte:	$1 \cdot 10^5$ Z/mL
Versuchsansätze:	Ansatz A: IMDM + 10% FCS Ansatz B: IMDM + 10% BISEKO Ansatz C: IMDM + 10% FCS + Supplement Ansatz D: BasalC + 10% BISEKO Ansatz E: IMDM + 10% BISEKO + Supplement
Supplement:	53 μ g/mL Liponsäure 21 μ g/mL Linolsäure 1,03 mg/mL Hypoxanthin 0,18 mg/mL Thymidin 10 mg/mL Insulin
Kultursystem:	75 cm ² Gewebekulturflaschen, statisch
Kulturvolumen:	40 mL / Ansatz

Verglichen mit der ursprünglich für HL-60 in der Literatur verwendeten Medienformulierung, bestehend aus einem Basalmedium (IMDM) und 10% FCS (Ansatz A), führt der einfache Austausch der bovinen Serumkomponente durch eine humane Serumkomponente (BISEKO, Ansatz B) zu einer drastischen Reduktion der im gleichen Basalmedium erreichbaren maximalen Zelldichte. Der mit FBS supplementierte Ansatz A erreicht eine maximale Zelldichte von $2,1 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹ gegenüber dem mit BISEKO supplementierten Ansatz B mit $9,2 \cdot 10^5$ Z·mL⁻¹. Durch Zugabe eines Supplement-Mix bestehend aus Fettsäuren, Nucleotidbasen und Insulin, wurde versucht die Proliferation der Zellen in dem IMDM Medium zu unterstützen. Während sich durch den Supplement-Mix in Gegenwart von FBS (Ansatz C) kein besseres Wachstum erzielen läßt (maximale vitale Zelldichte mit Supplement-Mix: $2,0 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹ vs. maximale Zelldichte ohne Supplement-Mix: $2,1 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹), kann mit dem Supplement das Wachstum der HL-60 in IMDM mit BISEKO deutlich gesteigert werden (Ansatz E). Die maximal erreichbare Zelldichte liegt bei diesem Ansatz bei $1,5 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹. Durch Adaption der Zellen mit Hilfe der von Teraklin entwickelten Medienformulierung „Basal C“ kann ebenfalls eine Umstellung auf die humane Serumkomponente BISEKO erfolgen. In dem entsprechenden Kultivierungsansatz (Ansatz D) lag die erreichbare maximale Zelldichte mit $1,3 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹ bereits deutlich höher

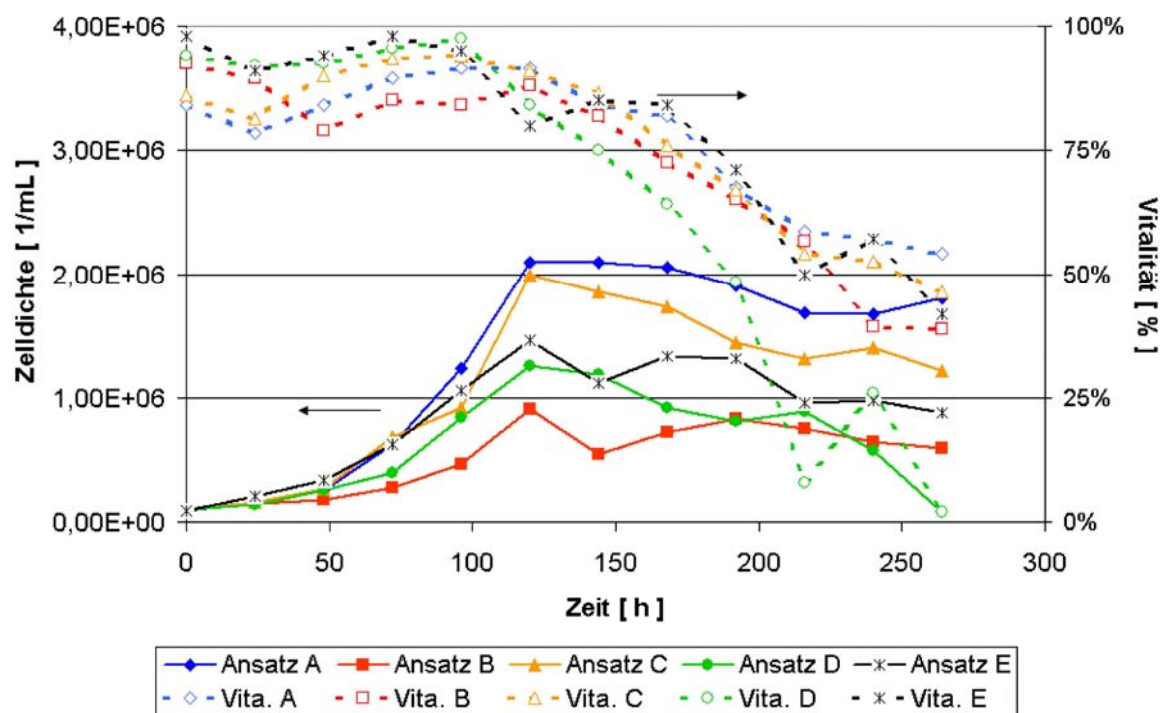


Abbildung 7-1: Wachstum und Vitalität von HL-60 in serumhaltigen Medien

als im Ansatz B, der in IMDM-Medium durchgeführt wurde. In Bezug auf die maximale Zelldichte unterscheiden sich die Medienformulierungen „Basal C“ mit BISEKO (Ansatz D) und das mit Supplementmix und BISEKO versetzte IMDM-Medium (Ansatz E) kaum. Der Erhalt der Vitalität während der Wachstumsphase ist bei allen untersuchten Medien bis zum Erreichen der maximalen Zelldichte gewährleistet. Es fällt auf, daß die Vitalität schnell nach Erreichen der maximalen Zelldichte in der Kultur massiv einbricht (Abbildung 7-1).

Generell ist der Ersatz von serumhaltigen Medienformulierungen durch definierte, serumfreie Formulierungen in der klinischen Anwendung immer wünschenswert. Wie bereits in Kapitel 1.6.3.5 ausführlich dargelegt, bergen Serumbestandteile gleich welcher Herkunft immer das Risiko der Kontamination mit Krankheitserregern und stellen im Fall von Seren tierischen Ursprungs ein nicht zu unterschätzendes Sensibilisierungspotential dar. Aus diesem Grund wurde das Wachstum von HL-60 in serumfreien Medien untersucht. Zum Einsatz kam einerseits SCGM-Medium (Cellgenix, Freiburg), das sich auch als vorteilhaft zur Expansion neutrophiler Zellen aus $CD34^+$ Zellen erweist (siehe auch Kapitel 8.1). Mit dem Medium X-Vivo 10 (Cambrex, Taufkirchen) liegen bereits breite Erfahrungen in der klinisch relevanten Expansion hämatopoetischer Stammzellen und der Tumor-Zelllinie NK-92 vor. Dem gegenüber wurde die

ProCHO4-CDM Medienformulierung ursprünglich für die Produktion rekombinanter Proteine aus CHO Zellen entwickelt.

Tabelle 7-2: Kulturparameter zur Untersuchung des Wachstums von HL-60 in serumfreien Medien

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin)
Ausgangszelldichte:	$1 \cdot 10^5$ Z/mL
Versuchsansätze:	Ansatz A: X-Vivo 10 Ansatz B: SCGM-Medium Ansatz C: ProCHO4-CDM
Kultursystem:	75 cm ² Gewebekulturflaschen, statisch
Kulturvolumen:	40 mL / Ansatz

Mit den speziell für die serumfreie Kultivierung von Zelllinien ausgelegten Medien lassen sich auch HL-60 Zellen gut kultivieren. Am besten schneidet das Medium SCGM mit einer maximal erreichbaren Zelldichte von $2,8 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹ ab. Das ebenfalls für die Kultivierung von Blutzelltypen entwickelte Medium X-Vivo 10 erreicht dagegen nur eine ca. 18% geringere maximale Zelldichte von $2,3 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹. Das für die Kultivierung von CHO Zellen optimierte Medium ProCHO4 unterstützt auch das Wachstum der HL-60 Zellen. Die erreichbaren Zelldichten liegen über weite Zeitspannen der Kultivierung unterhalb der für die beiden Medien SCGM und X-Vivo 10. Im Gegensatz zu den Kulturen in den beiden letztgenannten Medien ist bei der Kultivierung in ProCHO4 keine Absterbephase der Zellen zu beobachten. Vielmehr nimmt die Zelldichte auch zu späteren Phasen der Kultivierung, wenn auch verhalten, zu. Demgegenüber sinkt die Vitalität der in ProCHO4 kultivierten Zellen, wie auch bei den beiden anderen untersuchten Medien, nach 96 h der satzweisen Kultivierung (Abbildung 7-2).

Wie sich im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, enthält das Medium ProCHO4 unter anderen Ersatzstoffen für Serum auch ein Proteinhydrolysat pflanzlichen Ursprungs. Hiergegen bestanden von klinischer Seite erhebliche Bedenken, da von diesem Proteinhydrolysat ein großes Sensibilisierungspotential ausgehen könnte. Zudem sind allergische Reaktionen bereits in Folge der Erstbehandlung mit in ProCHO4 kultivierten Zellen bei entsprechend vorbelasteten Patienten nicht auszuschließen. Dieses Medium schied daher aus den weiteren Untersuchungen aus. Der Projektpartner Teraklin hat sich aus zulassungsrechtlichen Gründen für die Verwendung von „Basal C“ als Medium und BISEKO als Serumkomponente zur klinikauglichen Zellkultivierung entschieden. Aus diesem Grund werden die folgenden Versuche mit dieser proprietären Medienformulierung durchgeführt.

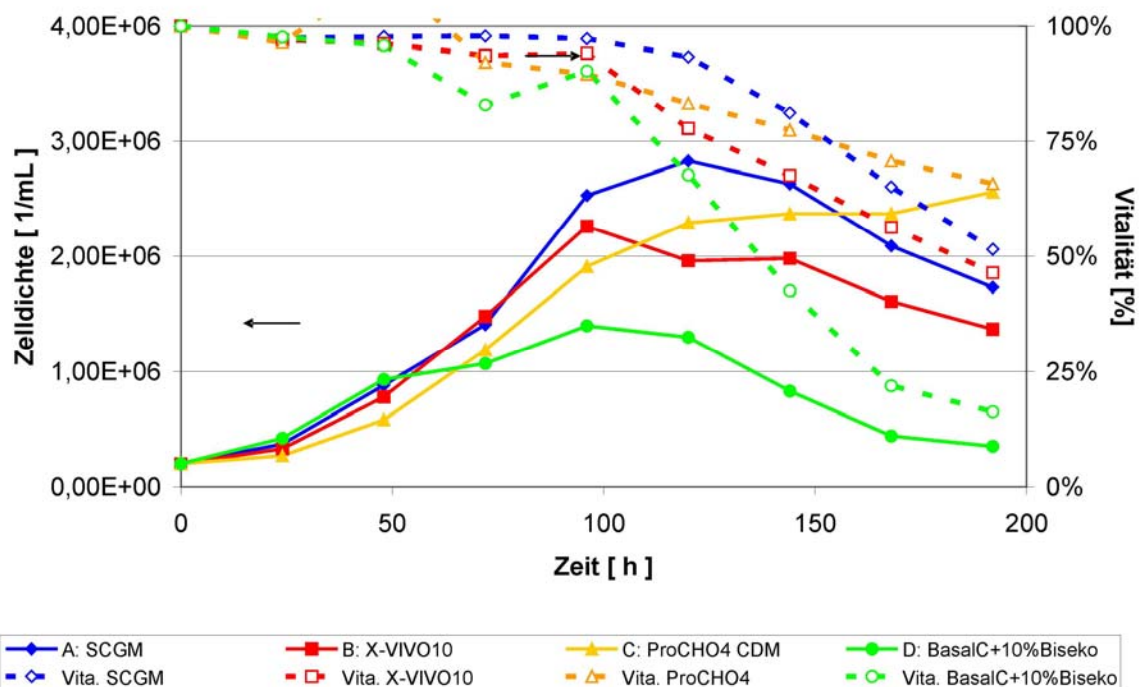


Abbildung 7-2: Wachstum und Vitalität von HL-60 in serumfreien Medien

7.1.2 Gelöstsauerstoffkonzentration

Ein Überblick über die Bedeutung der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Wachstum, Metabolismus, Differenzierung, Produktivität etc. auf Zellen, insbesondere im Hinblick auf neutrophil differenzierende Zellen wurde bereits in Kapitel 1.6.3.4 gegeben.

Mit Hilfe der cellferm pro Fermentationsanlage wurde in einem vierfach parallelen Ansatz der Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf das Wachstum von HL-60 untersucht. Unter sonst gleichen Kultivierungsbedingungen wurden unterschiedliche Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Medium eingestellt. Die Versuche wurden unter aktiver Begasung im gerührten Kultursystemen durchgeführt. Tabelle 7-3 faßt die Kultivierungsparameter zusammen. Alle untersuchten Ansätze zeigen sich in Bezug auf den Verlauf von Zelldichte und Vitalität sehr ähnlich. Insgesamt werden im gerührten und aktiv begasteten Spinner-System höhere Zelldichten als in statischer Kultur in T-Flaschen erreicht. Die eingestellten Gelöstsauerstoffkonzentrationen werden über den gesamten Kultivierungszeitraum mit nur geringen Schwankungen ($\pm 10\%$) um den Sollwert geregelt. Die maximale Zelldichte von $3,1 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ wird bei der geringsten Gelöstsauerstoffkonzentration von 5%DO erreicht. Dem gegenüber ergibt die höchste gewählte Gelöstsauerstoffkonzentration von 95%DO eine deutlich geringere zelluläre Expansion von $2,5 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die beiden mittleren Konzentrationen von 40%DO und 60%DO liegen zwischen diesen Werten und unterscheiden sich in ihrem Verlauf nicht deutlich.

Tabelle 7-3: Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration auf das Wachstum von HL-60

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin AG)
Ausgangszellichte:	$2 \cdot 10^5$ Z/mL
Versuchsansätze:	Eingestellte Sauerstoff-Sättigungen im Medium: Ansatz A: 5%DO Ansatz B: 20%DO Ansatz C: 60%DO Ansatz D: 95%DO (Anm.: Die Gelöstsauerstoff-Konzentration luftgesättigten Mediums (8,2 mg/L bei 37°C, 1013mbar) wird 100%DO gesetzt)
Kultursystem:	1L-Spinner, DASGIP, 60 min ⁻¹
Kulturvolumen:	300 mL
Gasfluß:	2,5 sL/h
Medien-pH:	pH 7,0

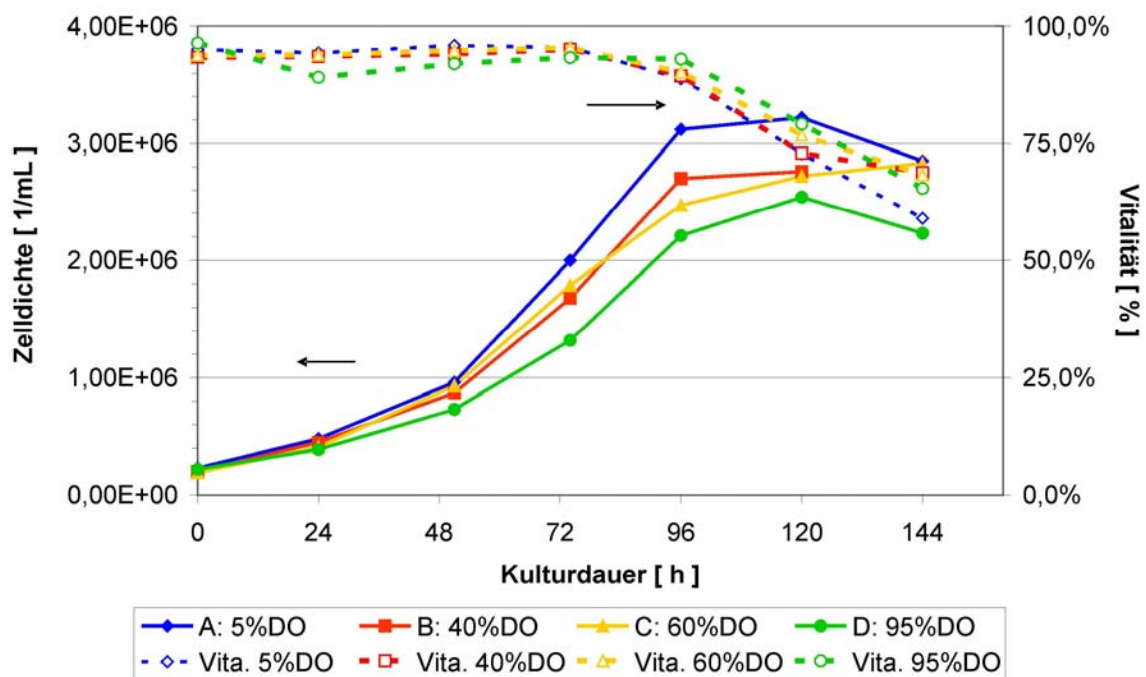


Abbildung 7-3: Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration auf das Wachstum von HL-60

7.1.3 pH-Wert

Ebenso wie die Gelöstsauerstoffkonzentration wurde auch der Einfluß den Medien pH-Wertes in vergleichenden kontrollierten, gerührten Satzkulturen untersucht. Die automatische Regelung des pH-Wertes erfolgte zweiseitig durch Variation des CO₂-Gehalts in der Zuluft und durch Titration mit 0,3M Natronlauge. Die wichtigsten Kulturparameter sind in Tabelle 7-4 zusammengefaßt.

Tabelle 7-4: Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum von HL-60

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin AG)
Ausgangszell-dichte:	2·10 ⁵ Z/mL
Versuchsansätze:	Eingestellte pH-Werte im Medium: Ansatz A: pH 6,7 Ansatz B: pH 7,0 Ansatz C: pH 7,3 Ansatz D: pH 7,5
Kultursystem:	1L-Spinner, DASGIP, 60 min ⁻¹
Kulturvolumen:	300 mL
Gasfluß:	2,5 sL/h
Gelöstsauerstoffkonzentration:	40%DO

Im Gegensatz zur Gelöstsauerstoffkonzentration zeigen die untersuchten Ansätze verschiedener pH-Werte untereinander ein deutlich abweichendes Verhalten in Bezug auf die Proliferation und der Vitalität. In Abbildung 7-4 ist der Zelldichte- und der Vitalitätsverlauf der Ansätze gezeigt. Der auf pH 7,3 geregelte Ansatz zeigt die höchste durchschnittliche Wachstumsrate ($\mu = 0,035 \text{ h}^{-1}$) und erreicht nach 72 h Kulturdauer die im Vergleich höchste Endzell-dichte von $2,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die beiden Ansätze mit pH 7,0 und pH 7,5 zeigen ähnliches Wachstum und erreichen ebenfalls nach 72 h eine maximale Zelldichte von $1,6 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die beiden Ansätze C (pH 7,3) und D (pH 7,5) müssen durch Zugabe von Lauge nach 60 h (Ansatz D) und 64 h (Ansatz C) auf dem voreingestellten pH-Wert gehalten werden. Interessanterweise zeigt der auf pH 6,7 geregelte Ansatz A zwar das langsamste Wachstum über die Kulturdauer ($\mu = 0,027 \text{ h}^{-1}$), jedoch erreicht dieser Ansatz bei einer Vitalität von >80% eine annähernd so große maximale Zelldichte, wie der Ansatz C (pH 7,3). Die Vitalität der Zellen nimmt in dem auf pH 7,5 geregelten Ansatz bereits nach 48 h der Kultivierung deutlich ab. Die Vitalitäten in den beiden Ansätzen B und C nehmen direkt nach dem Erreichen der maximalen Zelldichte ab.

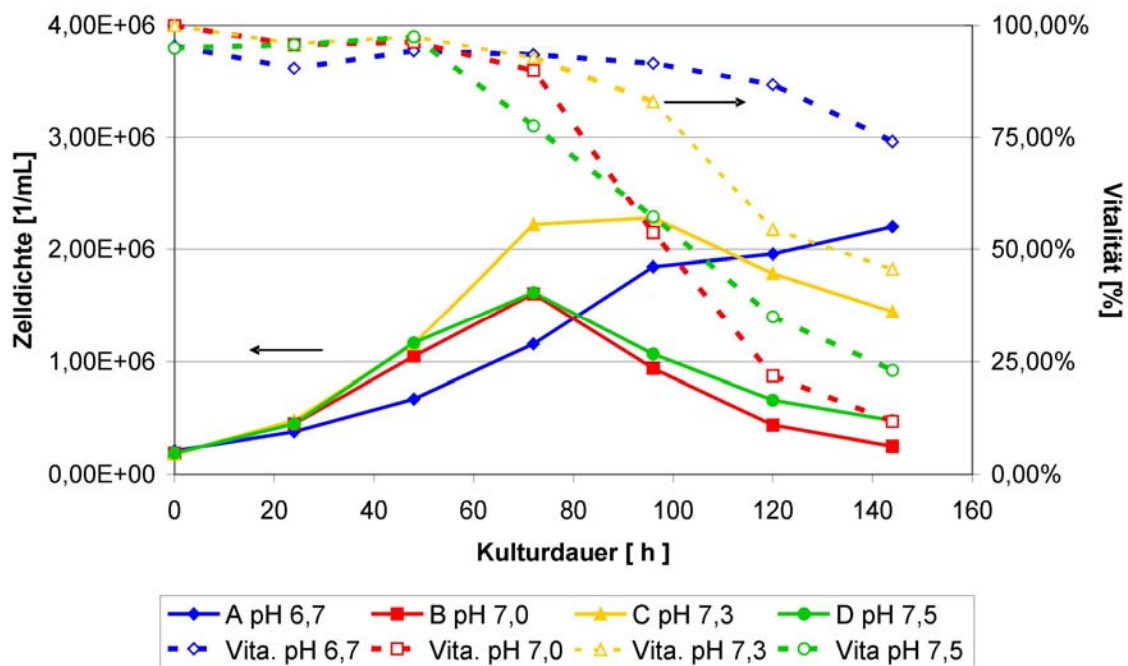


Abbildung 7-4: Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf das Wachstum von HL-60

Nur der langsam wachsende Ansatz A (pH 6,7) kann über einen Zeitraum von 120 h die Vitalität > 80% erhalten. Danach erfolgt ein vergleichsweise moderater Abfall der Vitalität.

Um den Einfluß des pH-Wertes des Mediums auf den zellulären Stoffwechsel näher zu untersuchen, wurden Medienproben der Kultivierungen auf ihren Gehalt an Wachstumssubstraten und Metaboliten untersucht. Tabelle 7-5 zeigt die Ergebnisse für die Quantifizierung von Glukose und Laktat nach 96h der Kultivierung. Es fällt auf, daß in dem langsam wachsenden Ansatz A (pH 6,7) deutlich weniger Glukose verbraucht wird als in den restlichen Ansätzen. Entsprechend wird in diesem Ansatz auch weniger Laktat akkumuliert.

Tabelle 7-5: Einfluß des pH-Wertes auf den Medien-Glukose-/Laktatgehalt bei Kultivierung von HL-60 (Werte nach 96h Kultivierung)

	Ansatz A pH 6,7	Ansatz B pH 7,0	Ansatz C pH 7,3	Ansatz D pH 7,5
c(Glukose) [mM]	15,2	6,6	0,8	0,9
c(Laktat) [mM]	15,9	35,4	45,7	47,7

7.1.4 Einfluß von akkumulierendem Laktat

Im obigen Versuch zum Einfluß des pH-Wertes auf das Wachstum von HL-60 zeigte sich, daß in dem Ansatz, der weniger Laktat über die Zeit akkumuliert, das Wachstum und die Vitalität der Zellen über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden kann. Daher sollte ein weiterführender Versuch zeigen, inwieweit sich im Medium akkumulierendes Laktat hemmend auf das Zellwachstum auswirkt. Dazu wurden Ansätze mit verschiedenen initialen Laktat-Konzentrationen von 0 bis 15 mM vergleichend kultiviert. Der Metabolit wurde in Form seines Natriumsalzes dem ansonsten unveränderten Kultivierungsmedium zugefügt. Der Ausgleich der Osmolalität erfolgte in allen Ansätzen durch Natriumchlorid. Die weiteren Parameter der Kultivierung sind in Tabelle 7-6 zusammengefaßt.

Tabelle 7-6: Kultivierungsparameter zur Untersuchung des Einflusses von Laktat

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin AG)
Ausgangszelldichte:	$2 \cdot 10^5$ Z/mL
Versuchsansätze:	Eingestellte Laktat-Konzentrationen im Medium: Ansatz A: 0 mM Ansatz B: 5 mM Ansatz C: 10 mM Ansatz D: 15 mM
Kultursystem:	75 cm ² Gewebekulturflaschen, statisch
Kulturvolumen:	40 mL

Die maximal erreichbare Zelldichte liegt für alle untersuchten Replikate bei $1,4 \cdot 10^6$ Z·mL⁻¹. Unterschiede ergeben sich nur beim Zeitpunkt des Erreichens der maximalen Zelldichte. So wird die maximale Zelldichte bei einer initialen Laktatkonzentration von 0 und 5 mM Laktat nach 96h der Kultivierung erreicht. Die beiden Ansätze mit höherer initialer Laktatkonzentration erreichen diesen Wert bereits nach 72h der Kultivierung. Bis zu diesem Zeitpunkt sind auch in allen Ansätzen die Vitalitäten auf einem Niveau von > 90%. Danach fallen die Vitalitäten ab und zwar umso rapider, je höher die eingestellte initiale Laktatkonzentration ist. Alle untersuchten Ansätze akkumulieren zusätzlich zu dem initial vorhandenen Laktat weiteres Laktat. Die Endkonzentrationen an Laktat reichen von 40 mM (Ansatz A: 0mM initial) bis 52 mM Laktat (Ansatz D: 15 mM initial).

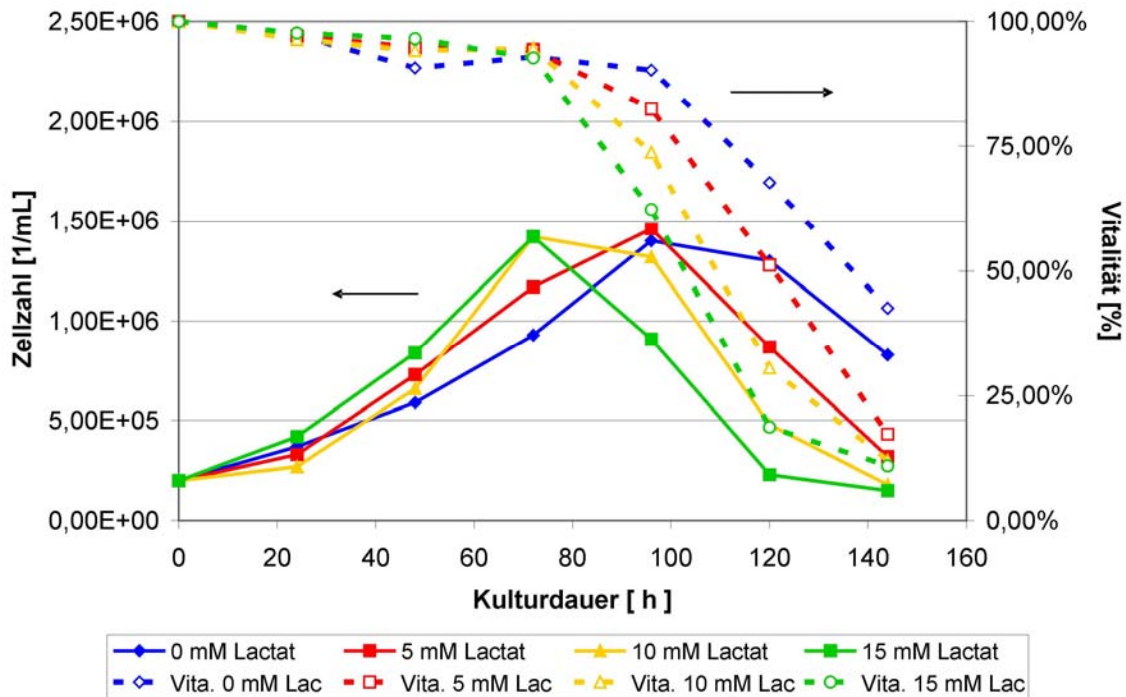


Abbildung 7-5: Einfluß von Laktat auf Wachstum und Vitalität von HL-60

7.1.5 Substratverbrauch und -limitierungen bei Kultivierung von HL-60

Aus den vorangegangenen Versuchen haben sich Hinweise ergeben, daß Lactat im Medium die Wachstumscharakteristik der HL-60 Zellen beeinflussen kann. Insbesondere wenn es sich in hohen Konzentrationen im Medium akkumuliert, kann auch ein hemmender Effekt nicht ausgeschlossen werden. Es konnte unter keinen Umständen eine Verstoffwechslung von Laktat festgestellt werden. Der schnelle Proliferationsstopp und der ebenso rasche Abfall der Vitalität nach Erreichen der maximalen Zelldichte in der Kultur läßt jedoch zusätzlich auf medienseitige Limitierungen an Wachstumssubstraten schließen. Aus Satzkultivierungen von HL-60 unter kontrollierten Bedingungen (Kapitel 7.1.2 und 7.1.3) wurden Medienproben auf die Konzentration der wichtigsten Wachstumssubstrate Glukose und die freien Aminosäuren hin untersucht. Abbildung 7-6 zeigt den Verlauf von Glukose und Laktat in Korrelation zu Zelldichte, Abbildung 7-7 zeigt die Restkonzentrationen an Aminosäuren im Medium nach Erreichen der maximalen vitalen Zelldichte (96h).

Beim Erreichen der maximalen Zelldichte und dem damit einsetzenden Proliferationsstopp ist das Wachstumssubstrat Glukose noch in ausreichender Menge vorhanden (> 5 mM). Der Metabolit Laktat ist zu diesem Zeitpunkt zwar bereits zu Konzentrationen von > 25 mM akkumuliert, jedoch ist diese Konzentration, wie die obigen Versuche zeigten, noch nicht stark limitierend. Auch die Untersuchung der Aminosäure-Konzentrationen im Medium ergibt keine

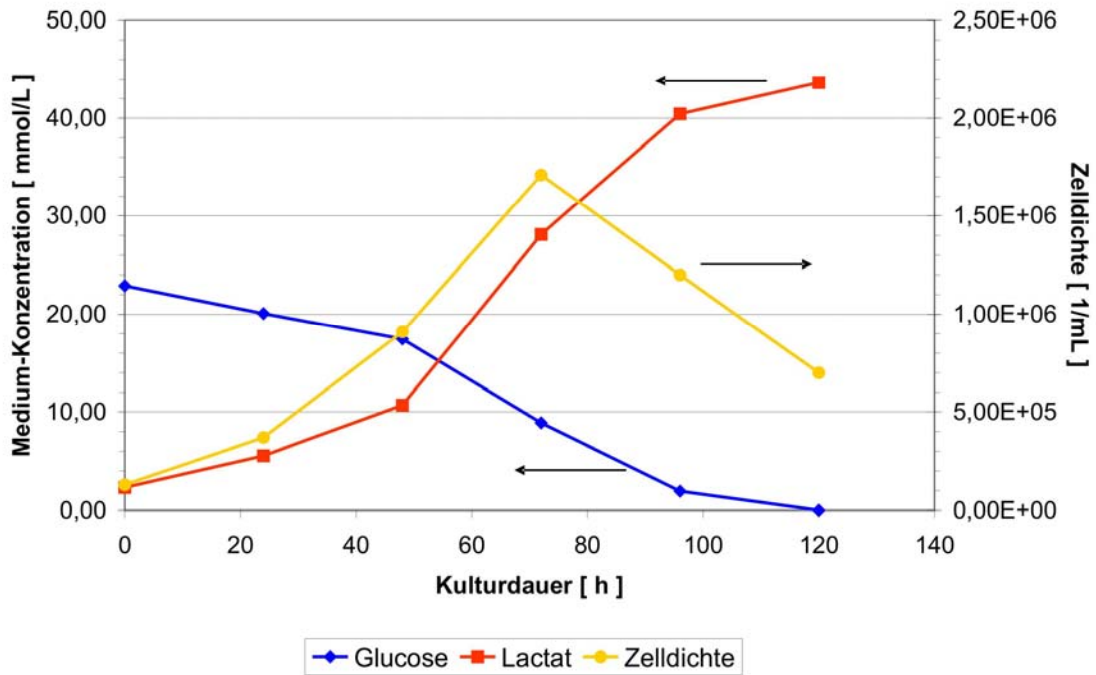


Abbildung 7-6: Konzentrationsprofil von Glukose und Laktat bei satzweiser Kultivierung von HL-60

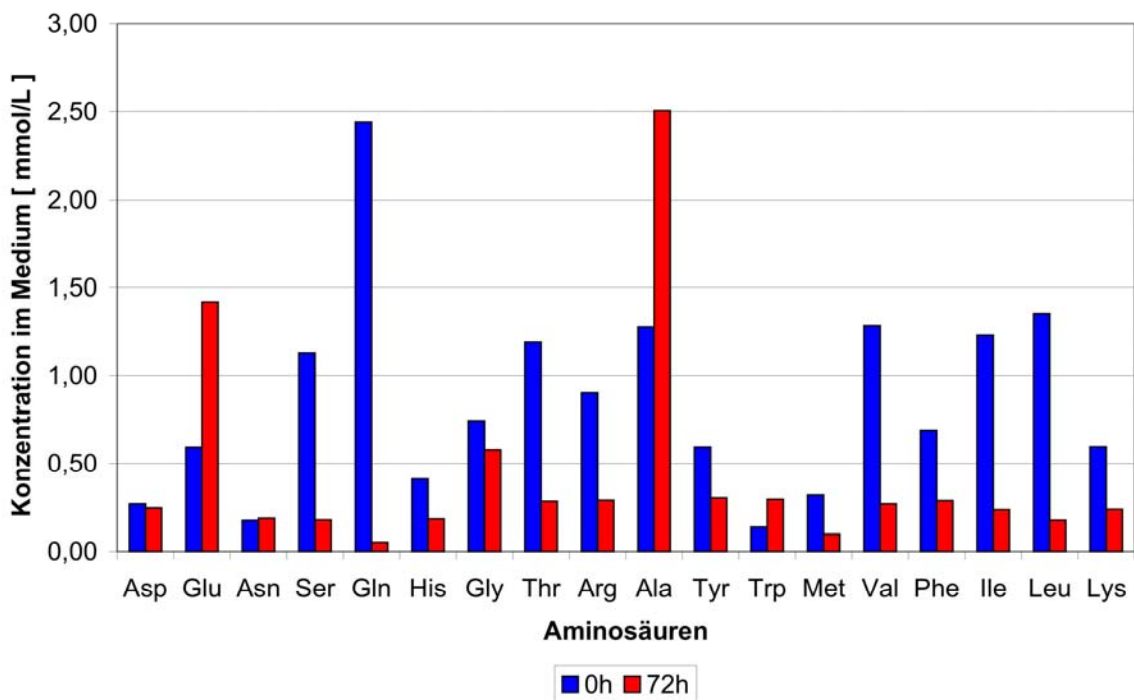


Abbildung 7-7: Aminosäure-Konzentrationen zu Beginn und nach 96 h der satzweisen Kultivierung von HL-60

Depletion einer essentiellen Aminosäure. Trotzdem werden einige Aminosäuren deutlich ausgezehrt. Dazu gehören neben dem Glutamin auch die Aminosäuren Serin, Histidin, Methionin, Threonin und Leucin.

Im Folgenden soll nun geklärt werden, ob die Wachstumslimitierung durch die geringen Aminosäurekonzentrationen hervorgerufen wird. Darüber hinaus ist jedoch auch denkbar, daß die Wachstumslimitierung durch Auszehrung weiterer, niedrigkonzentrierter Medienfaktoren und/oder Faktoren der Serumkomponente (Vitamine, Lipide, Hormone, Transport-, Bindungsproteine) hervorgerufen wird. Diese Stoffe sind einer routinemäßigen Analyse nicht zugänglich. Es werden daher in verschiedenen Ansätzen zu dem Medium Aminosäuren, Vitamine und Lipide sowie BISEKO zusätzlich supplementiert.

Tabelle 7-7 Kultivierungsparameter zur Untersuchung von Wachstumssupplementen

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin AG)
Ausgangszell-dichte:	$2 \cdot 10^5$ Z/mL
Versuchsansätze:	Zusätzliche Supplementierungen: Ansatz A: keine Ansatz B: + AS Ansatz C: + AS + Vitamine/Lipide Ansatz D: + AS + Vitamine/Lipide + BISEKO Im Versuchsansatz werden durch die Supplementierung die Medien-Konzentrationen der jeweiligen Stoffe verdoppelt.
angesetzte Supplement-Mischungen:	AS: Gln, Met, Ser, His, Trp, Leu, Lys Vitamine/Lipide: D-Pantothenat, Cholinchlorid Niacinamid, Inositol Pyridoxin, Thiamin Hypoxanthin, Folsäure Thymidin, Riboflavin, B12 Linolsäure, Liponsäure
Kultursystem:	1L-Spinner, DASGIP, 60 min^{-1}
Kulturvolumen:	300 mL
Gasfluß:	2,5 sL/h
Medienparameter:	pH = 7,2, 40%DO

Abbildung 7-8 zeigt das Ergebnis des Versuchs. Die zusätzliche Supplementierung von Aminosäuren (Ansatz B, $c_{v, \max} = 1,7 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$) bringt keine zusätzlichen Gewinn an Zellbiomasse verglichen mit einem unsupplementierten Ansatz (Ansatz A, $c_{v, \max} = 1,8 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$). Es kann also ausgeschlossen werden, daß die Wachstumslimitierung der HL-60 Zellen ihre Ursache in

Substratlimitierungen wie Glukose und Aminosäuren hat. Die mögliche Ausbeute an Zellbiomasse läßt sich jedoch deutlich steigern, wenn das Kulturmedium mit Aminosäuren sowie Vitaminen und Fettsäuren supplementiert wird. In diesem Ansatz (Ansatz C) kann die maximal erreichbare vitale Zelldichte auf $2,7 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ gesteigert werden. Eine Erhöhung der Konzentration der Serumkomponente bringt darüber hinaus jedoch nur einen geringen Zugewinn an Zellbiomasse (Ansatz D, $c_{v, \text{max}} = 3,1 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$). Wie bereits in den Kultivierungen zuvor tritt nach Erreichen der maximalen Zelldichte die Absterbephase der Kultur ohne eine ausgeprägte Plateauphase ein. In den Ansätzen C und D trat nach 96h der Kultivierung Glukosedepletion auf. In keinem der untersuchten Ansätze konnte eine Verstoffwechelung des im Medium in hohen Konzentrationen ($> 45 \text{ mM}$) akkumulierten Laktats beobachtet werden.

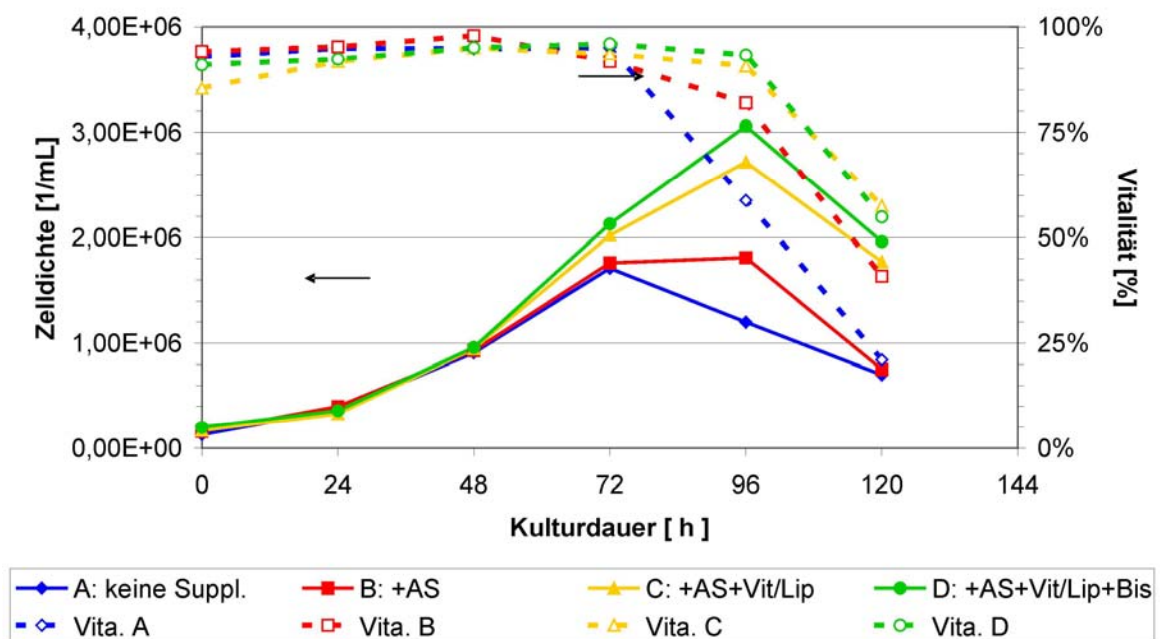


Abbildung 7-8: Kultivierung von HL-60 in unterschiedlich supplementierten Medien (AS: Aminosäuresupplement, Vit/Lip: Vitamin/Fettsäure-Supplement)

7.2 Funktionale Ausreifung von HL-60

HL-60 Zellen sind Promyelozyten, die keine funktionale Reife, d.h. die Fähigkeit zur Aufnahme und Abtötung von Mikroorganismen haben. Ein geringer Anteil der Zellen reift spontan zu funktionalen Zellen aus. Durch einige niedermolekulare organische Verbindungen kann die Differenzierung der HL-60 Zellen eingeleitet werden. Zu diesen Reifungsinduktoren gehören das Dimethylsulfoxid (DMSO) und die Vitamin-A-Säure (ATRA). Die so ausgereiften Zellen teilen mit primären Granulozyten viele funktionale Charakteristika wie z.B. Phagozytose sowie Freisetzung lysosomaler Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies nach Kontakt mit Pathogenen. Aus diesem Grund ist den HL-60 Zellen eine große Bedeutung als Modellzelle für granulozytäre Differenzierungs- und Reifungsprozesse zugekommen.

Für die biotechnologische Bereitstellung funktionaler neutrophiler Zellen aus HL-60 muß dem Prozeß der Biomassegenerierung eine Reifungsstufe folgen, die die Zellen zu ihrer funktionalen Reife bringt. Hier sollen die Verfahrensparameter, die bei der Funktionalisierung der Zellen eine Rolle spielen, untersucht werden. Dazu gehören neben dem Reifungsinduktor ATRA auch die Medienparameter pH und Gelöstsauerstoff für die ein Einfluß auf die Granulopoese vermutet wird. Der Mini-Spinner erweist sich für die Untersuchungen zur Funktionalisierung der Zellen unter geregelten Kulturbedingungen als wertvolles Hilfsmittel. Die Funktionalisierung geht von wesentlich höheren Zelldichten aus als die Expansion der Zellen. In entsprechenden Versuchen zum Inokulum bei der Funktionalisierung ergab sich eine optimale Zelldichte von $1 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Die funktionale Reife der Zellen wurde über die Phagozytose und Oxidative-Burst-Leistung der Zellen charakterisiert.

7.2.1 Dosis-Wirkungs-Relation des Reifungsinduktors ATRA

Durch die Reifungsinduktion mit ATRA sollen möglichst alle Zellen der zuvor expandierten Population zu einem einheitlichen, therapeutisch wirksamen Reifungsgrad gebracht werden. Durch die Anwendung von ATRA wird auch ein Proliferationsstopp der HL-60 erreicht. Dieser soll einen möglichst großen Anteil der Zellpopulation erfassen, um die Einheitlichkeit der funktionalisierten Zellpopulation zu erhalten. Im Folgenden stellt sich die Frage nach der optimalen ATRA Dosis und der notwendigen Einwirkdauer des Induktors auf die Zellen. Die Zellen wurden jeweils in frisches Kultivierungsmedium inokuliert und dann mit ATRA versetzt. Tabelle 7-8 faßt die Versuchsparameter zusammen.

Tabelle 7-8: Kulturparameter zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin AG)
Ausgangszell-dichte:	$1 \cdot 10^6$ Z/mL
Versuchsansätze:	Eingestellte ATRA-Konzentrationen im Medium: Ansatz A: $10 \mu\text{M}$ Ansatz B: $30 \mu\text{M}$ Ansatz C: $50 \mu\text{M}$ Ansatz D: $75 \mu\text{M}$
ATRA-Stammlösung	gesättigte ethanolische Lösung (8,3mM)
Kultursystem:	Mini-Spinner
Kulturvolumen:	40 mL
	satzweise Kultivierung
Gasfluß:	1 sL/h
Medienparameter:	pH = 7,2 Gelöstsauerstoff: 40%DO

In Abbildung 7-9 ist der Verlauf der Zelldichte und der Vitalität von HL-60 Zellen unter Einwirkung von ATRA gezeigt. Deutlich zeichnen sich die Unterschiede der untersuchten ATRA-Konzentrationen in Bezug auf den Erhalt der Vitalität und des Proliferationsstopps ab. Während die niedrigste ATRA-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ keinen signifikanten Proliferationsstopp hervorruft, ist bereits mit der Konzentration von $30 \mu\text{M}$ nach 48 h Inkubation keine Proliferation feststellbar. Durch Erhöhung der ATRA-Konzentration auf $50 \mu\text{M}$ kann das Zeitintervall bis zum Proliferationsstopp auf eine Inkubationszeit von 24 h reduziert werden. Allerdings überlagert sich bei längerer Inkubation auch das unvermeidliche Absterben der Zellen, was in einem deutlichen Einbruch in der Vitalität nach 48 h zu erkennen ist. Die weitere Erhöhung der ATRA-Konzentration ist von Nachteil, hier kommen cytotoxische Effekte des Reifungsinduktors zum Tragen, was sich in einem Proliferationsstopp der Zellen und rapiden Abfall der Vitalität ausdrückt. In einem parallel durchgeführten Experiment konnte gezeigt werden, daß der durch die ethanolische ATRA Lösung eingebrachte Alkohol (entsprechend einer Ethanolkonzentration von 0,12 %(v/v) bis 0,9 %(v/v)) sich nicht negativ auf Wachstum oder Vitalität der Zellen auswirkt (Daten nicht gezeigt).

Um die Effektivität der ATRA-induzierten Ausreifung der Zellen zu überprüfen wurden Funktionsassays durchgeführt. Abbildung 7-10 zeigt repräsentativ den Verlauf der Phagozytosekapazität einer vierfachparallel durchgeführten Untersuchung. Die Entwicklung der Phagozytosekapazität der Zellen hängt neben der ATRA-Konzentration auch von der Inkubationsdauer des Reifungsinduktors ab. So kann bei den ATRA-Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$

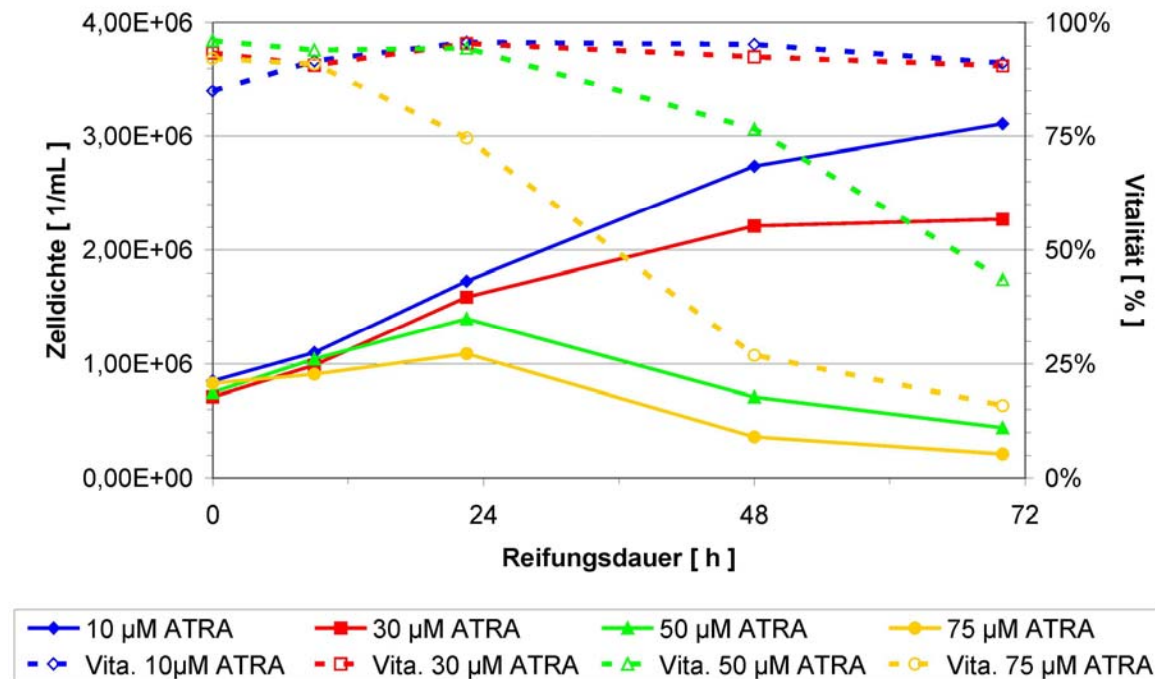


Abbildung 7-9: Zeitabhängige Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA: Wachstum und Vitalität

bzw. 30 μM der Anteil phagozytierender Zellen erst nach 70 h ATRA-Inkubation einen Wert von $> 60\%$ der Gesamtzellpopulation erreichen. Dagegen werden bei einer ATRA-Konzentration von 50 μM nach 22,5h und nach 48h der Inkubation die höchsten Phagozytose-Leistungen aller untersuchten Ansätze gemessen. Der cytotoxische Effekt der höchsten ATRA-Konzentration von 75 μM wird auch im Phagozytose-Assay sichtbar, da hier keinerlei Funktionalitätsgewinn der Zellen festzustellen ist. Die Fähigkeit der Zellen, reaktive Sauerstoff-Spezies auf einen extrazellulären mikrobiellen Stimulus hin freizusetzen (Oxidative Burst) entwickelt sich für die ATRA-Konzentrationen von 10 bis 50 μM annähernd ähnlich. Die beiden Ansätze mit 10 und 30 μM erreichen nach 70 Stunden Reifungsdauer die höchste Oxiburst-Kapazität (proportional zu den Chemolumineszenz-Signalen). Der mit 50 μM ATRA versetzte Ansatz erreicht nach 48 h der Reifung seine maximale Oxidative-burst-Kapazität. Entsprechend der abnehmenden vitalen Zellzahl ist das erreichte CL-Signal auch deutlich geringer als bei dem mit 30 μM supplementierten Ansatz und nimmt für noch längere Reifungsdauern weiter ab. Einzig der mit einer Dosis von 75 μM ATRA versetzte Ansatz zeigt auch hier über die gesamte Reifungsdauer keine signifikante Funktionalität.

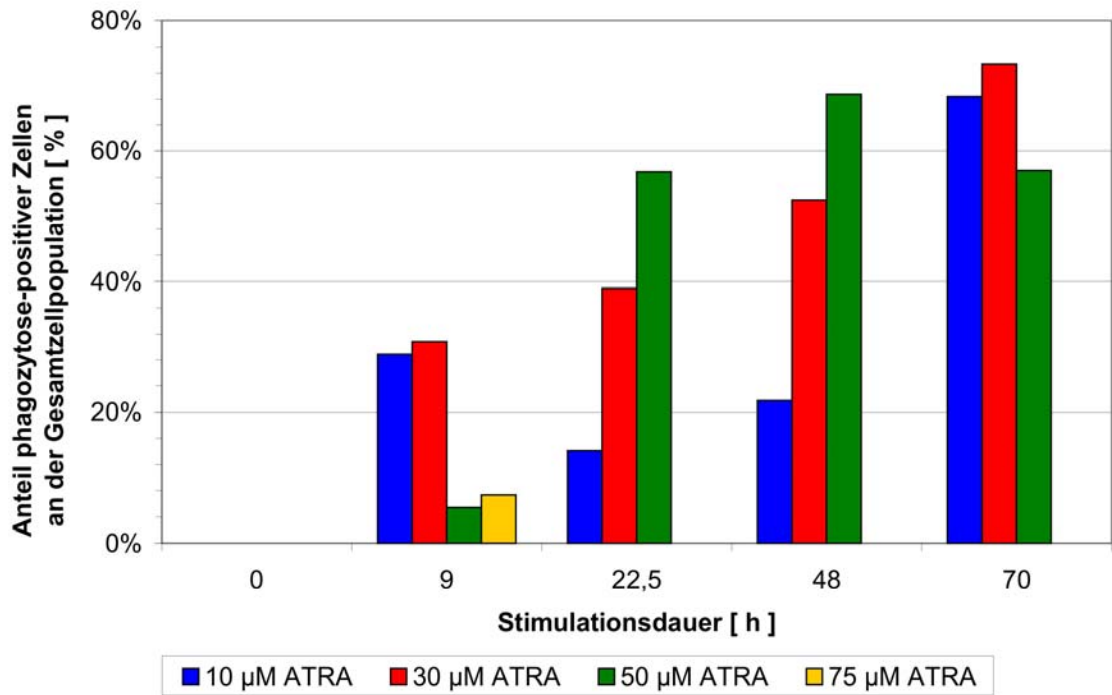


Abbildung 7-10: Zeitabhängige Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA: Phagozytosekapazität der gereiften Zellen

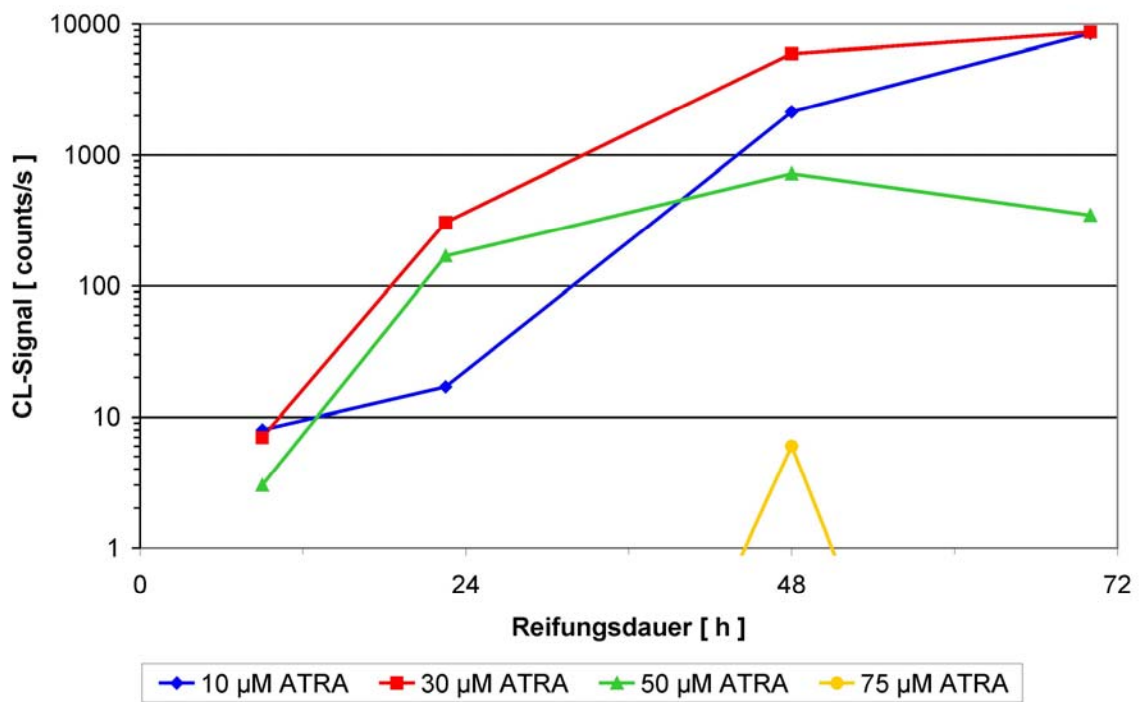


Abbildung 7-11: Zeitabhängige Dosis-Wirkungs-Relation von ATRA: Oxiburst-Kapazität der gereiften Zellen

7.2.2 Medienparameter der Reifung von HL-60

Die Ausreifung der neutrophilen Zellen läuft in vivo im Knochenmark unter hochgradig kontrollierten und regulierten Bedingungen ab. Für die beiden physiko-chemischen Parameter pH-Wert und Gelöstsauerstoff-Konzentration sind Effekte auf die Granulopoese primärer Zellen beschrieben. Es ist daher zu erwarten, daß diese Parameter auch auf die Ausreifung der Promyelozytenzelllinie HL-60 zu funktionalen Zellen einen Einfluß ausüben könnten. Denkbar ist z.B. die Beeinflussung der Reifungskinetik und des Vitalitätserhalts der gereiften Zellen. In technischer Hinsicht gilt es sicherzustellen, daß ein optimaler Sauerstoffgehalt und pH-Wert während der gesamten Reifungsdauer aufrecht erhalten werden kann. Die Ausreifung der HL-60 unter Variation der pH- und Gelöstsauerstoffwerte erfolgte ebenfalls vierfach parallel in Mini-Spinner-Ansätzen mit dem Fermentationssystem cellferm pro. Tabelle 7-9 faßt die Parameter der Reifung zusammen.

Tabelle 7-9: Kulturparameter zur Untersuchung des pH-Wertes auf die ATRA-induzierte Reifung von HL-60

Zellen:	HL-60, WZB (Teraklin AG)
Ausgangszellichte:	$1 \cdot 10^6$ Z/mL
Versuchsansätze:	Eingestellte pH-Werte im Medium: Ansatz A: pH 6,7 Ansatz B: pH 7,0 Ansatz C: pH 7,3 Ansatz D: pH 7,5
ATRA-Reifung:	50 μ M ATRA im Endansatz Stammlösung: gesättigte ethanolische Lösung (8,3mM)
Kultursystem:	Mini-Spinner
Kulturvolumen:	40 mL
	satzweise Kultivierung
Gasfluß:	1 sL/h
Medienparameter:	Gelöstsauerstoff: 40%DO

Der pH-Wert des Mediums wirkt sich stark auf das Ausmaß der ATRA-Reifung aus. So kann bei einem Medien-pH von 6,7 keine signifikante Funktionalität der Zellen aufgebaut werden. Oberhalb von pH 7,0 ergeben sich dagegen nur geringe Unterschiede in der Ausprägung der Phagozytose-Kapazität und der Reifungskinetik der HL-60 Zellen. Unter den gegebenen Kulturbedingungen erreichen in allen Ansätzen (pH 7,0; pH 7,3; pH 7,5) mehr als 75% der Zellen ihre Phagozytosekapazität nach 24 Stunden Reifung. In der Staffelung der Medien-pH-Werte von pH 6,7 bis pH 7,5 wächst die mit der Reifung verbundene Oxiburst-Kapazität

deutlich an. So kann mit den bei pH 7,5 gereiften Zellen im Oxiburst-Assay ein mehr als fünffach höheres CL-Signal als mit bei pH 7,0 gereiften Zellen erreicht werden. Das CL-Signal ist proportional zur freigesetzten Menge an ROS (3310 cps (pH 7,5-Zellen) vs. 576 cps (pH 7,0-Zellen)). Die bei pH 7,5 ausgereiften Zellen sind daher in der Lage deutlich mehr biozider ROS zu produzieren.

Interessanterweise wirkt sich der Medien-pH-Wert auch auf die Ausprägung des durch ATRA induzierbaren Proliferationsstopps aus. Abbildung 7-12 zeigt den Verlauf von Zelldichte und Vitalität der HL-60 Zellen unter Einwirkung von ATRA bei verschiedenen pH-Werten. Während bei einem pH-Wert von 6,7 das Wachstum sofort eingestellt wird, wachsen die Zellzahlen der bei pH 7,0 und pH 7,3 gereiften Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Reifungsinduktion noch etwa um einen Faktor 2 an. Bei einem Medien pH-Wert von 7,5 tritt unter ATRA-Einwirkung der Proliferationsstopp erst nach 36h ein. Einzig die Medien pH-Werte von pH 7,3 und pH 7,5 erhalten die Vitalität der ATRA-gereiften Zellen auch über einen längeren Inkubationszeitraum aufrecht.

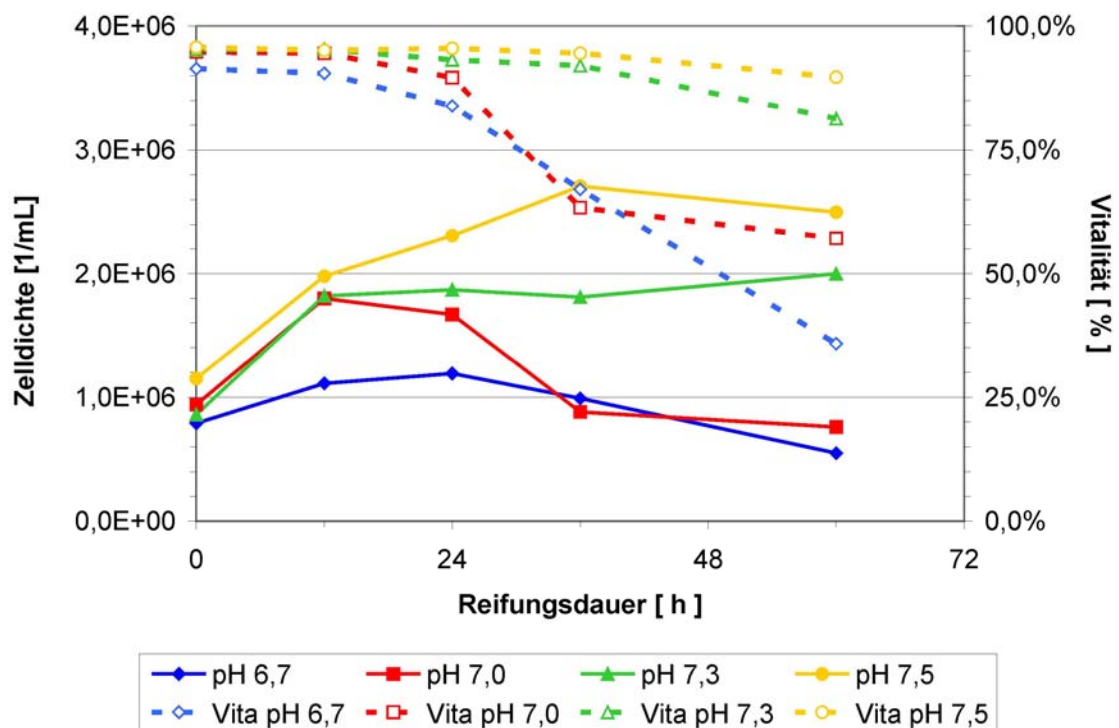


Abbildung 7-12: Einfluß des Medien-pH-Wertes auf die ATRA-induzierte Reifung von HL-60

In einem anschließenden Versuch wurden die Gelöstsauerstoff-Konzentrationen im Medium bei sonst gleichen Randbedingungen der Kultivierung variiert. Die eingestellten Gelöstsauerstoffkonzentrationen reichten von 5%DO bis 95%DO. In den Versuchen konnte festgestellt werden, daß der Einfluß der Gelöstsauerstoff-Konzentration auf die Wirkung des ATRAs weniger profund ist als der Medien pH-Wert. Die Zellen aller untersuchten Ansätze erlangten funktionale Reife. Die gemessenen Werte für Phagozytoseleistung (Anteil der phagozytierenden Zellen an der Gesamtpopulation) und Oxidative-burst-Kapazität liegen im gleichen Größenordnungsbereich, so daß hier keine eindeutige Aussage über eine zu bevorzugende Gelöstsauerstoffkonzentration gemacht werden kann.

7.3 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels

Eine grundlegende Entscheidung der Bioprozeßentwicklung ist die Wahl des Kultivierungsmediums. Es ist in der Arbeit gelungen, die Kultivierbarkeit von HL-60 ohne FBS als Mediensupplement zu zeigen. Die verwendeten Medien sind chemisch vollständig definiert. Als Serumkomponente fungiert ein Plasmaprodukt humanen Ursprungs, das die Zulassung als Arzneimittel besitzt. In den vorgestellten Versuchen konnte ebenfalls eine erfolgreiche Adaption der Zellen auf serumfreie Medien (SCGM, X-Vivo) gezeigt werden. Diese Medien werden bereits zur Herstellung von Zellen zur Therapie im Rahmen verschiedener klinischer Studien eingesetzt.

Die Versuche zur Optimierung der Medienparameter pH und Gelöstsauerstoff wurden unter kontrollierten Bedingungen in gerührten und aktiv begasten Kultivierungssystemen durchgeführt. Insgesamt zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen deutlich größere Zellmengen produziert werden konnten als bei statischer Kultivierung in der T-Flasche (unter sonst gleichen Randbedingungen der Kultivierung). In der bekannten Literatur gibt es bisher keine Beispiele für kontrollierte Kultivierungen von HL-60. Vergleiche können daher nur mit anderen Zelltypen getroffen werden, für die entsprechende Untersuchungen vorliegen.

Die Staffelung der gefundenen Werte für Wachstum und Vitalität der HL-60 unter verschiedenen Gelöstsauerstoffkonzentrationen zeigt eine gewisse Sensitivität der HL-60 Zellen gegenüber Sauerstoff. So wird bei einer niedrigen Gelöstsauerstoffkonzentration von 5%DO die beste Zellexpansion erzielt. Die gefundenen Ergebnisse legen nahe, die Gelöstsauerstoffkonzentration auf möglichst niedrigem Niveau zu regeln. In den verwendeten Kultursystemen ist ebenso wie in größeren Bioreaktoren eine gute und gleichmäßige Durchmischung der Zellsuspension gewährleistet. Trotzdem muß bei einem scale-up beachtet werden, daß es in strömungsarmen Regio-

nen im Bioreaktor bei hohen Zelldichten durchaus zu lokalen Sauerstofflimitierungen kommen kann. Zudem muß ein gewisses Schwankungsband des Gelöstsauerstoff-Ist-Wertes um seinen Soll-Wert einkalkuliert werden. Es läßt sich zusammenfassend festhalten, daß eine Gelöstsauerstoffkonzentration von $40\%DO \pm 20\%DO$ ein optimales Zellwachstum bei genügendem zum Schutz vor Sauerstoff-Limitierungen bietet. Damit unterscheiden sich HL-60 Zellen von anderen Zelltypen (z.B. Hybridoma, CHO). Diese Zelllinien zeigen optimales Wachstum bei mittleren Gelöstsauerstoff-Konzentrationen. Extrem hohe und extrem niedrige Gelöstsauerstoff-Konzentrationen inhibieren bei diesen Zellen das Wachstum [Ozturk SS, 1990, Link T, 2004]. Anders als die Gelöstsauerstoffkonzentration übt der pH-Wert des Mediums einen profunderen Einfluß auf das Wachstumsverhalten und den zellulären Stoffwechsel von HL-60 aus. Die höchste Endzelldichte und Wachstumsrate wird zwar bei einem Medien-pH von 7,3 erreicht, bei pH 6,7 kann jedoch ebenfalls ein zwar langsames aber stetiges Wachstum der Zellen und ein lang andauernder Erhalt der zellulären Vitalität gefunden werden. Für Hybridoma-Zellen fanden MILLER et al. in kontinuierlicher Kultur einen massiven Abfall der Zellzahlen und der Vitalität der Zellen [Miller WM, 1987] bei niedrigen pH-Werten. In Satzkultivierungen von Hybridoma-Zelllinien konnten MÜTHING et al. bei einem pH-Wert von 6,9 zwar ebenfalls moderates Wachstum der Zellen feststellen, das aber auch von einem Abfall der Vitalität begleitet war.

Es konnte gezeigt werden, daß HL-60 Zellen, wie andere Zelllinien auch, über den Verlauf der Kultivierung hinweg in großem Maße Laktat akkumulieren. Dennoch konnte festgestellt werden, daß über weite Strecken der Kultivierung die Laktatkonzentration keine tiefgreifende Inhibierung des Zellwachstums darstellt. Medienseitig konnten zum Endpunkt der exponentiellen Wachstumsphase auch keine Limitierungen in wichtigen Wachstumssubstraten (Glukose, Aminosäuren) festgestellt werden. Erst die Supplementierung des Kultivierungs-Mediums mit Vitaminen, Lipiden und Nucleosidbasen konnte die Produktion an Zellbiomasse soweit erhöhen, bis tatsächlich Substratlimitierung auftrat. HL-60 verstoffwechseln weder bei Glukose-Überschuß noch bei Glukose-Limitierung im Medium das vorhandene (akkumulierte) Laktat.

Die funktionale Ausreifung der HL-60 Zellen zu neutrophilen Zellen gelingt mit dem Reifungsinduktor Vitamin-A-Säure (ATRA). Das ATRA übt einen Reifungs-Reiz auf die Zellen aus, wirkt jedoch auch als Zellgift, was sich schon nach kurzer Zeit bei hohen ($75\mu\text{M}$) oder langer Inkubationsdauer mit mäßig hohen ($50\mu\text{M}$) ATRA-Konzentrationen zeigt. Da bei der Funktionalisierung der Zellen ein Proliferationsstopp eintreten soll und die funktional reifen Granulozyten nur eine relativ kurze Lebensspanne haben, wird der Reifungsprozeß, je länger er dauert, von Vitalitätsverlusten der Zellpopulation überlagert. Daher ist es das Ziel die Zellen möglichst schnell zur funktionalen Reife zu bringen. Die Untersuchungen zeigen, daß eine optimale Reifung der Zellen mit $50\mu\text{M}$ ATRA im Medium in 24- bis 30-stündiger Inkubation erreicht

werden kann. Auch bei der Ausreifung der Zellen spielen die gewählten Medienparameter, hauptsächlich der pH-Wert, eine entscheidende Rolle. Bei niedrigen pH-Werten verstärkt sich der cytotoxische Effekt des ATRA. Bei hohen pH-Werten hingegen ist der Proliferationsstopp in der Zellpopulation weniger stark ausgeprägt. Als optimaler pH-Wert für eine gute Funktionalisierung mit sicherem Proliferationsstopp wurde ein pH-Wert von pH 7,3 festgestellt.

Der sich ergebende Gesamtprozeß bestehend aus einem Schritt der Biomasse-Generierung und deren anschließender Funktionalisierung ist eine Reihung zweier satzweiser Kultivierungen. Im ersten Schritt werden HL-60 bis zu einer Zelldichte von maximal $2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ kultiviert. Dabei wird nicht das Maximalvolumen des Bioreaktors ausgenutzt, denn im zweiten Schritt wird nach einem Medienwechsel eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ eingestellt und der Reifungsinduktor ATRA hinzugefügt. Bis zum endgültigen Erreichen des Proliferationsstopps nach 24h bis 30h vergrößert sich die Zelldichte nochmals um etwa einen Faktor 2. Damit ist gewährleistet, daß es zu keinen Substratlimitierungen im Medium kommt. Die Teraklin AG hat ein Protokoll zur Ernte und Kryokonservierung der funktional ausgereiften Zellen entwickelt, das eine Revitalisierung der Zellen bei guten Vitalitäten, Wiederfindungen und Erhalt der Funktionalität ermöglicht. Bei dem Projektpartner wurden bereits einige erfolgreiche Fermentationen in einer 40l Pilotanlage unter GMP-Bedingungen durchgeführt.

8 Neutrophile Zellen aus primären Zellen

- Entwicklung eines Kultivierungsprotokolls -

Obwohl sich bereits einige Arbeitsgruppen mit der Generierung neutrophiler Zellen aus CD34⁺ Zellen beschäftigt haben, gehen diese Arbeiten über ein reines „proof of concept“ kaum hinaus. So wurde die Frage nach der ex-vivo Expansion von neutrophil differenzierten Zellen aus hämatopoetischen Zellen des Nabelschnurbluts bisher nur in einer einzigen Arbeit behandelt [DeBruyn, 2003]. Dies ist umso überraschender, als gerade bei Transplantationen von Nabelschnurblutzellen die Neutropenie ein ernstzunehmendes Problem darstellt. Zudem sind CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut sehr leicht zu gewinnen und ihre Anwendung verspricht überdies gegenüber Zellen von adulten Spendern therapeutische Vorteile. In diesem Kapitel sollen daher biologisch (Medien, Zytokine, Supplemente) und verfahrenstechnisch relevante Parameter (Zelldichte, Temperatur, Osmolalität, Sauerstoffpartialdruck, pH-Wert, Zellfütterung, Kultivierungssysteme) untersucht werden um für die ex vivo Expansion von neutrophilen Zellen optimale Bedingungen zu erreichen. Durch die Identifizierung optimaler Kulturbedingungen muß einerseits die Proliferation der Zellen stimuliert werden, um ausreichende Zellmengen generieren zu können. Andererseits müssen jedoch die Kultivierungsbedingungen auch die Differenzierung und Reifung der CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut zu neutrophilen Zellen ermöglichen. Am Beispiel der Phagozytose und des oxidativen Burst wird die Funktionalität der ex vivo expandierten Zellen überprüft. Anschließend soll untersucht werden, in welchen kliniktauglichen Kultivierungssystemen ein scale-up des Kultivierungsprotokolls sinnvoll durchführbar wäre.

8.1 Kultivierungsmedien

Für ein klinisch einsetzbares Kultivierungsverfahren werden ganz besondere Anforderungen das Kultivierungsmedium gestellt (sh. Kap. 1.6.3.5). Sie sollen frei von tierischen Bestandteilen sein, aus wohl definierten, kontrollierten Komponenten bestehen, gemäß den einschlägigen Qualitätsanforderungen (GMP) hergestellt sein und ihre Unbedenklichkeit im Rahmen von klinischen Studien nachgewiesen haben. Entsprechend diesen Kriterien wurden 13 verschiedene Medien, die nach Aussage der Hersteller gemäß cGMP (current good manufacturing practice) in entsprechend qualifizierten Anlagen hergestellt werden, ausgesucht. Die Auswahl läßt sich in drei Klassen unterteilen:

1. Komplexmedien zur Kultivierung von primären hämatopoetischen Stammzellen. Diese Medien sind speziell auf den Zweck der Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen hin optimiert. Die genaue Formulierung dieser Medien unterliegt der Geheimhaltung der jeweiligen Hersteller. Generell läßt sich jedoch festhalten, daß neben den chemisch definierten Bestandteilen auch Proteinkomponenten humanen Ursprungs (Human-Albumin) oder humanes Serum enthalten sein können. Entammt das humane Material aus qualifizierten Quellen und ist entsprechend getestet, so bestehen geringe regulatorische Hürden für die klinische Umsetzung eines Kultivierungsprotokolls mit entsprechenden Medien.
2. In der Literatur sind bereits einige Medien zur Kultivierung von primären Leukozyten aus peripherem Blut beschrieben. Diese Medienformulierungen würden bei entsprechender Eignung die klinikrelevante Übertragung des Kultivierungsprotokolls ermöglichen, da bereits entsprechende klinische Studien vorliegen.
3. Als weitere Gruppe wurden Medien bzw. Medienformulierungen, die zur Kultivierung von Zelllinien dienen, untersucht. In diese Gruppe wurden exemplarisch das in der tierischen Zellkultur bereits mit gutem Erfolg eingesetzte Medium ProCHO4CDM (Kultivierung von CHO-Zellen) und die Medienformulierung BASAL B vom Projektpartner Te-raklin (Kultivierung von HL-60) eingestellt.

Die Medienproben wurden auf ihre Tauglichkeit für die Expansion von CD34⁺ bzw. neutrophilen Vorläufern in Suspensionskultur hin getestet. CD34⁺ Zellen wurden in zwei Testgruppen in den verschiedenen Medien unter sonst gleichen Randbedingungen (Tabelle 8-1) kultiviert. Die erste Testgruppe (w/o G-CSF) wurde nach dem bereits etablierten Suspensions-Kultivierungsprotokoll für die Expansion von CD34⁺ Zellen mit einer Wachstumsfaktormischung bestehend aus SCF, IL-3, Flt3-L, TPO kultiviert. Durch Zugabe von G-CSF zu den Ansätzen der zweiten Testgruppe (w G-CSF) sollte die neutrophile Differenzierung der CD34⁺ Zellen zusätzlich spezifisch stimuliert werden. Untersucht wurde die Expansion der Zellen nach einem Kultivierungsintervall von 8 Tagen. Als interne Referenz wurde bei allen Testungen das in der Arbeitsgruppe bereits bekannte Medium X-Vivo 10 verwendet. Dieses Medium ist bereits häufig zur standardmäßigen Kultivierung von hämatopoetischen Zellen zum Einsatz gekommen. Die Zellexpansionen aller anderen Medienproben wurden auf diese interne Referenz bezogen.

Tabelle 8-1: Kultivierungsparameter für den Vergleich von Kultivierungsmedien

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	Referenzmedium: X-Vivo 10, 12 Medien im Vergleich dazu
Wachstumsfaktoren	Mischung A (ohne G-CSF): SCF, IL-3, TPO, Flt3-L Mischung B (mit G-CSF): G-CSF, SCF, IL-3, TPO, Flt3-L
Kultursystem	Gewebekulturplatte
Zelldichte	1-2·10 ⁴ Z·mL ⁻¹
Anzahl Replikate	n = 3
Kulturdauer	8, 14 Tage
Fütterung	Verdünnen der Zellsuspension an Tag 8 mit Frischmedium (Endzelldichte: 1-3·10 ⁵ Z·mL ⁻¹)

Es zeigt sich, daß nur die Komplexmedien der X-Vivo-Produktlinie (Cambrex) bzw. die speziell für die Kultivierung von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen optimierten Medien (SCGM, StemPro34, StemLine, StemSpan) eine deutliche Expansion der Zellen ermöglichen (Abbildung 8-1). Sowohl die Medien zur Kultivierung von primären Zellen des peripheren Blutes (AIM-V, HL-1, TB-1, MakrophageMedium) als auch die Medien für Zelllinien (ProCHO und BasalB) eignen sich indes nicht für die Expansion von Zellbiomasse aus CD34⁺ Zellen. Diese getesteten Medienansätze schneiden in der zellulären Expansion deutlich schlechter ab als das Referenzmedium X-Vivo 10 (Abbildung 8-1). Innerhalb der Gruppe der Komplexmedien sind jedoch auch erhebliche Unterschiede in der Unterstützung der zellulären Expansion festzustellen. So sind unter Verwendung der G-CSF-haltigen Wachstumsfaktormischung die Zellmengen in dem Medium SCGM im Mittel um 70% über den im Referenz-Medium X-Vivo 10 erzielbaren Mengen. Interessanterweise ergeben sich zwischen den Komplexmedien auch Unterschiede in der erreichbaren zellulären Expansion bei Verwendung unterschiedlicher Wachstumsfaktorkombinationen (mit/ohne G-CSF): Im Vergleich mit dem Referenzmedium X-Vivo 10 liefern die Medien X-Vivo 20, StemPro34, StemLine und StemSpan in den Ansätzen ohne G-CSF (w/o G-CSF) höhere Expansionsfaktoren als in den G-CSF enthaltenden Ansätzen (w G-CSF). Das SCGM-Medium hingegen erlaubt unter G-CSF-Supplementierung die Produktion von größeren Zellzahlen als in vergleichbaren Ansätzen ohne G-CSF.

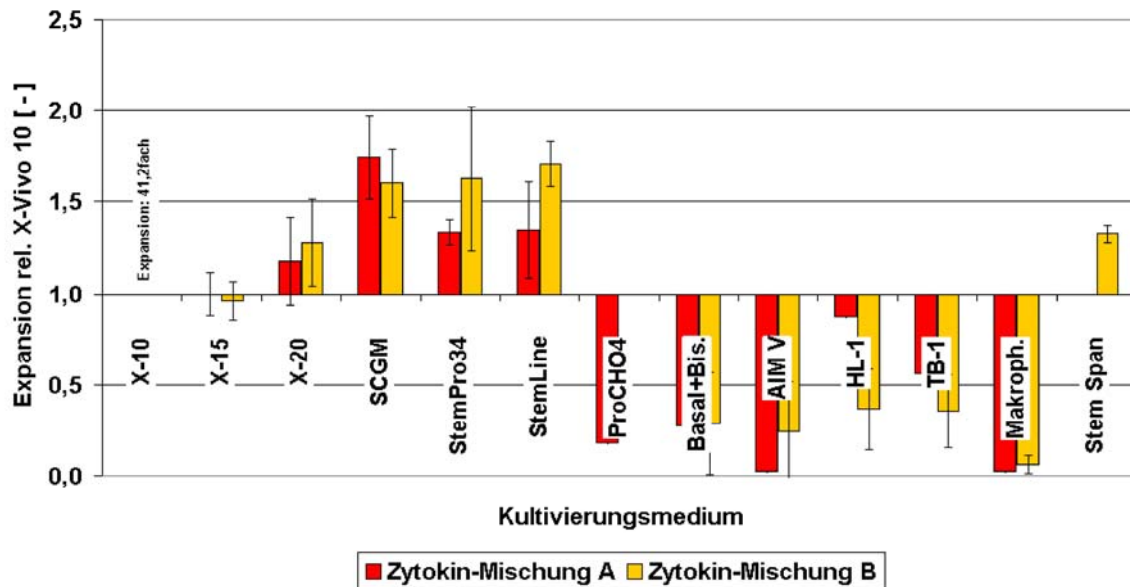


Abbildung 8-1: Vergleich von Kultivierungsmedien für die ex vivo Expansion humaner neutrophiler Zellen aus CD34⁺ Zellen
 Zytokinmischung A: SCF, IL-3, TPO, Flt3-L, Zytokinmischung B: G-CSF, SCF, IL-3, TPO, Flt3-L

Für die verschiedenen Komplexmedien wurde neben der Expansion der Gesamtzellzahl auch die Expansion der koloniebildenden Vorläuferzellen (CFU) untersucht. Je mehr CFU der granulozytären Reihe aus den inokulierten CD34⁺ Zellen hervorgehen, desto mehr ausdifferenzierte neutrophile Zellen können gewonnen werden. Nach der 8tägigen Kultivierung der Zellen in den unterschiedlichen Komplexmedien (unter Supplementierung der G-CSF-haltigen Wachstumsfaktormischung) wurden Methylzellulose-Assays angelegt und nach weiteren 14 Tagen Inkubation die Häufigkeit von Kolonien bestimmt, die granulozytäre Zellen enthielten. Dazu wurden die Kolonieformen CFU-G, CFU-GM und CFU-GEMM summarisch behandelt. Es zeigt sich, daß durch Kultivierung in den Medien X-Vivo 20, SCGM, StemPro34 und StemLine im Mittel mehr granulozytäre Vorläufer expandiert werden können als im Referenzmedium X-Vivo 10. Die sich ergebenden großen Variabilitäten der Ergebnisse lassen jedoch einzig für das Medium SCGM den Schluß zu, deutlich größere Mengen an granulozytären Vorläuferzellen zu erzielen als in den anderen Medien der untersuchten Gruppe.

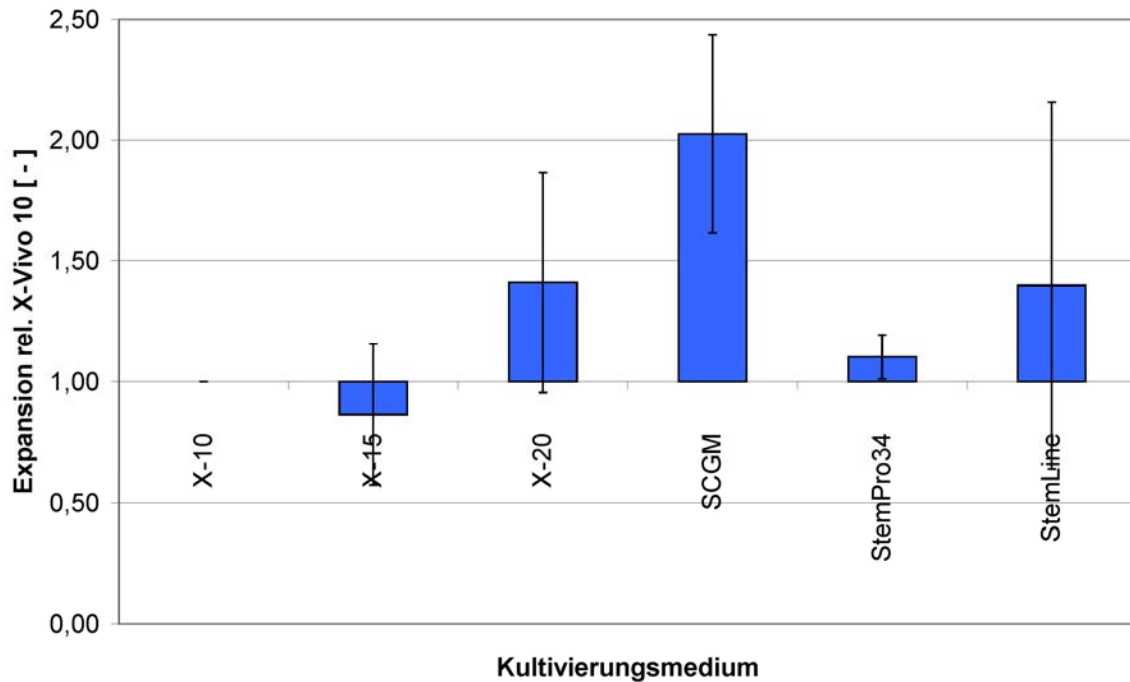


Abbildung 8-2: Vergleich von Kultivierungsmedien: Expansion von neutrophilen Progenitoren

Die Unterschiede in den Gesamtzellexpansionen zwischen den einzelnen Komplexmedien können sich durch unterschiedliche Eignung der jeweiligen Medien für bestimmte Vorläuferzelltypen erklären. Es ist denkbar, daß die für die Stammzellkultivierung optimierten Medien zwar die Proliferation von Stamm- und frühen Vorläuferzellen besonders fördern, jedoch die sich im weiteren Verlauf der Kultivierung bildenden, differenzierten Zelltypen nichtmehr optimal unterstützen. Die Anforderungen der differenzierteren Zellen an die Wachstumsumgebung müssen nicht notwendigerweise mit denen der frühen Zelltypen identisch sein. In einem anschließenden Versuch wurde daher die Kultivierungsdauer auf 14 Tage erhöht, um zu überprüfen, ob sich die Unterschiede zwischen den Komplexmedien bei länger dauernder Kultivierung ausnivellieren. Die CD34⁺ Zellen wurden dafür unter sonst gleichen Randbedingungen für 7 Tage in den verschiedenen Medien kultiviert. An Tag 7 wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine Zelldichte von $2 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$ eingestellt und weitere 7 Tage kultiviert. Die ermittelten Expansionswerte sind wiederum auf das Referenzmedium X-Vivo 10 bezogen.

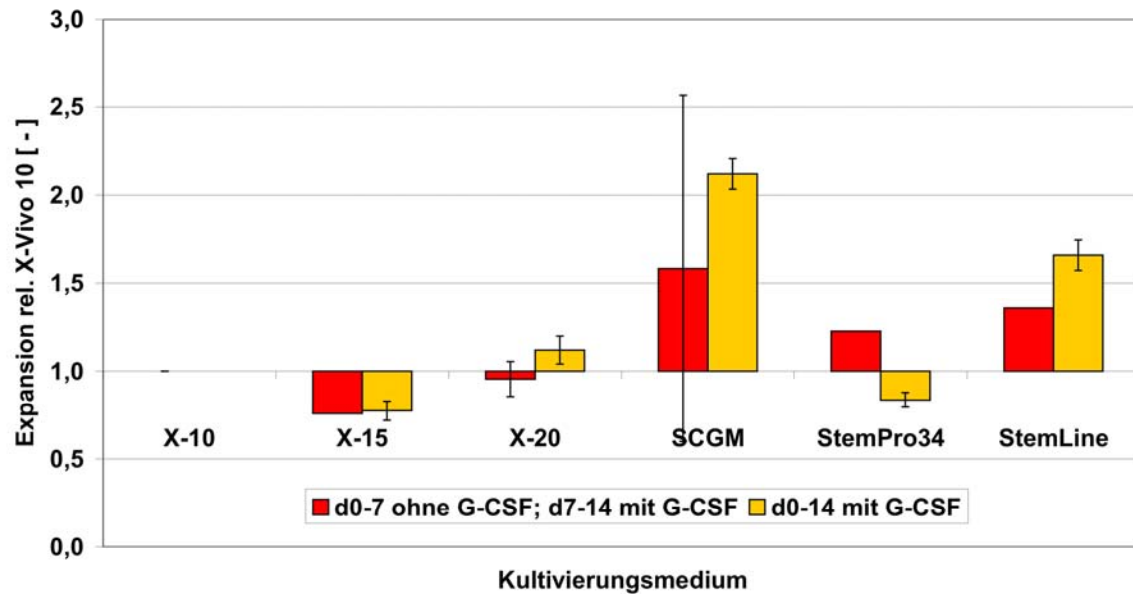


Abbildung 8-3: Vergleich von Kultivierungsmedien über einen Zeitraum von 14 Tagen

Zwischen den einzelnen Komplexmedien gleichen sich die Unterschiede in den erreichbaren Expansionen durch länger dauernde Kultur nur bedingt aus. So kann innerhalb der X-Vivo Produktreihe und für das StemPro34 Medium eine Annäherung der Expansionswerte an die Ergebnisse des Referenzmediums X-Vivo 10 festgestellt werden. Die Medien SCGM und StemLine liefern hingegen auch bei 14tägiger Kultivierung im Mittel eine deutlich größere zelluläre Expansion (Abbildung 8-3).

Die Wahl des Mediums für weitere Untersuchungen fällt auf das Medium SCGM (Cellgenix, Freiburg). Mit diesem Medium konnten durchweg höhere Expansionswerte erreicht werden als bei der entsprechenden X-Vivo 10 Kontrolle. Die großen absoluten Variabilitäten der mittleren Expansionswerte aus unabhängigen Replikaten ergeben sich aus nicht zu vermeidenden Spendervariabilitäten. Die getroffenen Aussagen werden auch durch die relativen Ergebnisse der Medien innerhalb eines unabhängigen Versuches bestätigt. So liefert SCGM unabhängig von der maximal erzielten absoluten Zellzahl in allen Ansätzen mit Abstand mehr Zellen als die X-Vivo 10 Referenz und liegt gleichauf oder über den Werten für konkurrierende Produkte. Neben der Eignung des Mediums für die Generierung der vergleichsweise besten numerischen Expansion ist auch die klinische Anwendbarkeit des Mediums von großer Wichtigkeit. Der Hersteller Cellgenix sichert die entsprechende Eignung des Mediums für den klinischen Einsatz zu und steht auch dessen Anwendung zur Produktion von Zellen für in vivo Testungen nicht ablehnend gegenüber.

8.2 Einsatz von Hämatopoietinen

Primäre hämatopoetische Zellen sind im Gegensatz zu permanent wachsenden Zelllinien nicht in der Lage aus sich selbst heraus ihre Proliferation zu stimulieren und zu unterstützen. In isolierter Kultur sind sie obligat wachstumsfaktorabhängig. Obwohl Seren vielfältige Qualitäten von Wachstumsfaktoren enthalten, kann eine effektive Kultivierung hämatopoetischer Zellen nur mit rekombinanten hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gelingen. Das Ziel aus CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen ex vivo neutrophile Zelltypen zu generieren verlangt dem Kultivierungsprozeß ab, die biologischen Randbedingungen der Granulopoese in vitro abzubilden. In Bezug auf die Hämatopoietine bedeutet dies, daß sowohl Zytokine, die die Proliferation der inokulierten CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen stimulieren, als auch linienspezifische Zytokine der neutrophilen Differenzierungsreihe im Kultivierungsmedium enthalten sein müssen. Das technologische Ziel der Versuche ist es, die Qualitäten und Quantitäten der benötigten Zytokine soweit einzuschränken, daß bei einem möglichst wirtschaftlichen Einsatz der Wachstumsfaktoren (Preise reichen von € 1.000 bis € 10.000 pro mg) ausreichende Zellzahlen an neutrophilen Zellen produziert werden können.

8.2.1 Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen

In der Literatur sind einige Zytokinmischungen zur Unterstützung der Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen neutrophiler Granulozyten aus peripherem Blut oder Knochenmark beschrieben (Tabelle 8-2). Die Arbeiten haben eine große Vielfalt sowohl in Bezug auf die Qualität als auch die Quantität der eingesetzten Zytokine hervorgebracht. Darüber hinaus variieren entscheidende Kultivierungsparameter (Medien, Supplementierung von Serum, Kultivierungsdauer etc.) zwischen den verschiedenen Arbeiten. Auf Grundlage der Literaturdaten kann daher keine eindeutige Aussage zum optimalen Einsatz der Wachstumsfaktoren getroffen werden. In den hier beschriebenen Versuchsansätzen sollen die in Tabelle 8-2 vorgestellten Zytokinmischungen untereinander in einem normierten Kultivierungsprotokoll verglichen werden. Damit soll eine konsistente Datenbasis geschaffen werden, die eine Aussage über Art und Menge der zu verwendenden Zytokine ermöglicht.

Insgesamt werden in der relevanten Literatur 9 verschiedene Zytokine in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 125 ng·mL⁻¹ im Kulturmedium angewendet. Bei näherer Betrachtung der verwendeten Mischungen fällt auf, daß einige wenige Zytokine in fast allen Mischungen enthalten sind. Hierzu zählen Interleukin-3, SCF und das linienspezifische Zytokin G-CSF. Interleukin-6 wird ebenfalls von vielen Autoren verwendet. Einige Autoren (#4, #6, #10) verwenden auch weitere Zytokine, die bevorzugt auf Vorläuferzellen anderer myeloider Linien wirken: TPO und EPO. Das Zytokin Flt3-L, das in #6 zusätzlich enthalten ist, findet bei der

Expansion CD34⁺ Stammzellen in Suspensionskultur Anwendung. Der ebenfalls linienspezifische Wachstumsfaktor GM-CSF wirkt sowohl auf Zellen der granulozytären auch auf Zellen der monozytären Linie [Ozaki K, 2002]. Um spezifisch neutrophile Zellen zu expandieren, herrscht in der keine Konsistenz darüber, ob die Verwendung von GM-CSF von Vorteil ist oder nicht (vergleiche auch Anmerkungen von SCHEDING et al. [Scheding S, 2000]).

Tabelle 8-2: Literaturbekannte Zytokine und deren Einsatzmengen für die Generierung neutrophiler Zellen

#	Autor	Jahr	Journal	Zytokine	Zytokinmenge [pro mL]
1	Lill et al.	1994	Stem Cells 12:626-637	G-CSF IL-3 IL-6 SCF	50 ng 50 ng 50 ng 50 ng
2	Unverzagt et al.	1997	J Leuk Biol. 62: 480-484	G-CSF GM-CSF IL-3 SCF	2,5 ng 25 ng 125 ng 10 ng
3	Laluppa et al.	1997	Stem Cells 15: 198-206	G-CSF GM-CSF IL-3 IL-6 SCF TPO	1,5 ng 4 ng 1,5 ng 10 ng 50 ng 25 ng
4	Martinson et al.	1998	J Hematother. 7:463-471	G-SCF IL-3 IL-6 SCF	100 ng 100 ng 100 ng 100 ng
5	Scheding et al. (variiert)	2000	Exp. Hematol. 28, 460-470	EPO Flt3-L G-CSF GM-CSF IL-1 β IL-3 IL-6 SCF	1 U 100 ng 100 ng 100 ng 3 ng 100 ng 100 ng 10 ng
6	Hino et al.	2000	Brit. J. Hem. 109: 314-321	G-CSF GM-CSF IL-3 SCF	10 ng 5 ng 5 ng 5 ng
7	Hevehahn et al.	2000	Exp. Hematol. 28, 267-275	G-CSF IL-3 IL-6 SCF	10 ng 10 ng 10 ng 50 ng
8	McNiece et al. (Variante ohne MGDF)	2000	Exp. Hematol. 28, 1181-1186	G-CSF SCF	100 ng 100 ng
9	Laluppa et al.	1998	Exp. Hematol. 26, 835-843	IL-3 SCF EPO G-SCF TPO	1,5 ng 50 ng 3 U 1,5 ng 25 ng

Tabelle 8-3 gibt die Randbedingungen der Kultivierungen wieder.

Tabelle 8-3: Kultivierungsparameter zum Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Zelldichte	1·10 ⁴ Z·mL ⁻¹
Medium	SCGM
Wachstumsfaktoren	sh. Tabelle 8-2
Kultursystem	Gewebekulturplatte
Anzahl Replikate	n = 2
Kulturdauer	10 Tage

Das Ergebnis zeigt deutlich, daß sowohl die Wahl der jeweiligen Zytokine als auch deren eingesetzte Menge einen Einfluß auf das Expansionsergebnis haben. Die verschiedenen Zytokinmischungen (#1 bis #9) liefern in der standardisierten 8tägigen Kultivierung eine weite Spannbreite von Gesamtzell-Expansionen, die von einem Faktor 100 der Zellexpansion (#9: 107 ± 15) bis zu einem Faktor 15 (#8: 15 ± 8) hinabreicht (Abbildung 8-4). Dabei zeigen alle Ansätze, bis auf Mischung #9, gute Vitalitäten im Bereich von ca. 90%. In anderen Versuchsreihen konnten mit dem verwendeten SCGM-Medium deutlich höhere Zelldichten erreicht werden, so daß hier eine medienseitige Substratlimitierung ausgeschlossen werden kann. Die Vitalität der Zellen kann also von der verwendeten Zytokinmischung nicht auf hohem Niveau aufrecht erhalten werden. Durch Verwendung einer breiten Palette von Zytokinen (z.B. #5) kann die Gesamtzell-Expansion im Mittel deutlich gesteigert werden (84 ± 8 fache Expansion). Bei diesem Ansatz wird jedoch auch mit >500 ng/mL die größte Gesamtmasse an Zytokinen zur Kultivierung eingesetzt.

Bei einem genaueren Vergleich der Ansätze #1, #2, #4, #6 und #7 läßt sich ebenfalls die Abhängigkeit der maximalen Zellexpansion von der eingesetzten Gesamtmasse an Zytokin erkennen (Tabelle 8-2). Alle Ansätze enthalten die Zytokine G-CSF, IL-3 und SCF. Unterschiede zwischen den Ansätzen ergeben sich nur durch die zusätzliche Verwendung von IL-6 (in #1, #4, #7) anstelle von GM-CSF (in #6, #2). Der Vergleich dieser Ansätze zeigt daß, die Menge an gewinnbaren Zellen mit der Gesamtmasse an eingesetztem Zytokin ansteigt. Bei Einsatz einer Gesamtmasse von 25 ng/mL Zytokin ist eine deutlich geringere Gesamtzell-Expansion zu erreichen (#6; 17 ± 10 fache Expansion) als bei Einsatz von insgesamt 400 ng/mL Zytokin (#4; 51 ± 11 fache Expansion).

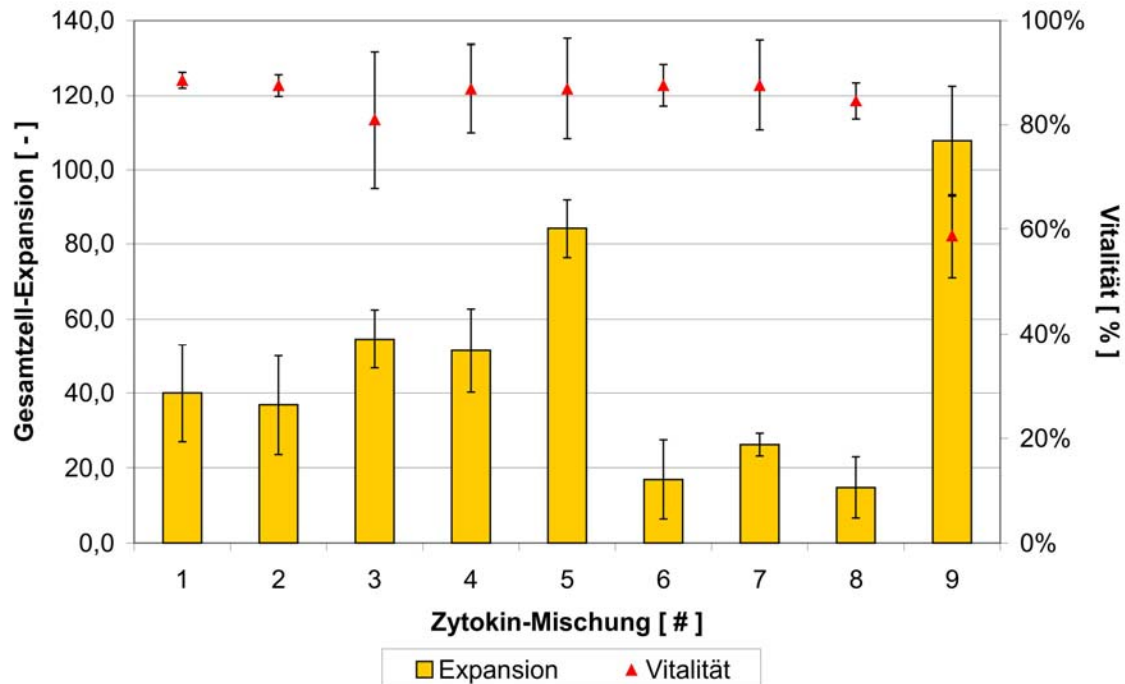


Abbildung 8-4: Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen

Neben der Gesamtzellexpansion ist auch die Differenzierung der Zellen in die neutrophile Linie von der eingesetzten Zytokinmischung abhängig. Die durchflußzytometrische Analyse der erhaltenen Zellpopulationen macht Unterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen deutlich. Für die Anwendung ist ein möglichst hoher Anteil an proliferierenden neutrophilen Zelltypen erwünscht. Zu diesen Zelltypen gehören Myeloblasten und Promyelozyten ($CD15^+CD11b^-$) sowie Myelozyten und Metamyelozyten ($CD15^+CD11b^+$). Der Anteil der neutrophil differenzierten Zellen an der Gesamtpopulation reicht in den untersuchten Ansätzen von 78% (#1) bis 9% (#9) (Abbildung 8-4). Die Wichtigkeit des linienspezifischen Wachstumsfaktors G-CSF zeigt sich bei dem nur mit G-CSF und SCF supplementierten Ansatz (#8). Trotz der schlechten Gesamtzell-Expansion (15 ± 8 fach) ist der Anteil von neutrophil differenzierten Zellen an der Zellpopulation mit $> 60\%$ bereits vergleichsweise hoch. Die durch den Einsatz vieler Zytokine höhere Gesamtzell-Expansion von Ansatz #5 ist nur zu einem Teil auf die vermehrte Produktion neutrophil differenzierter Zellen zurückzuführen. Ihr Anteil an der Gesamtzellpopulation liegt bei $< 60\%$. Die höhere Produktion an zellulärer Biomasse ist also mit einer geringeren Spezifität bezogen auf die Expansion neutrophiler Zellen verknüpft. Der gleiche Effekt zeigt sich auch bei Ansatz #3 und am deutlichsten bei Ansatz #9. Zum Erreichen eines möglichst hohen Anteils an neutrophil differenzierten Zellen scheint eine Kombination von 4 Zytokinen ausreichend zu sein (#1, #2).

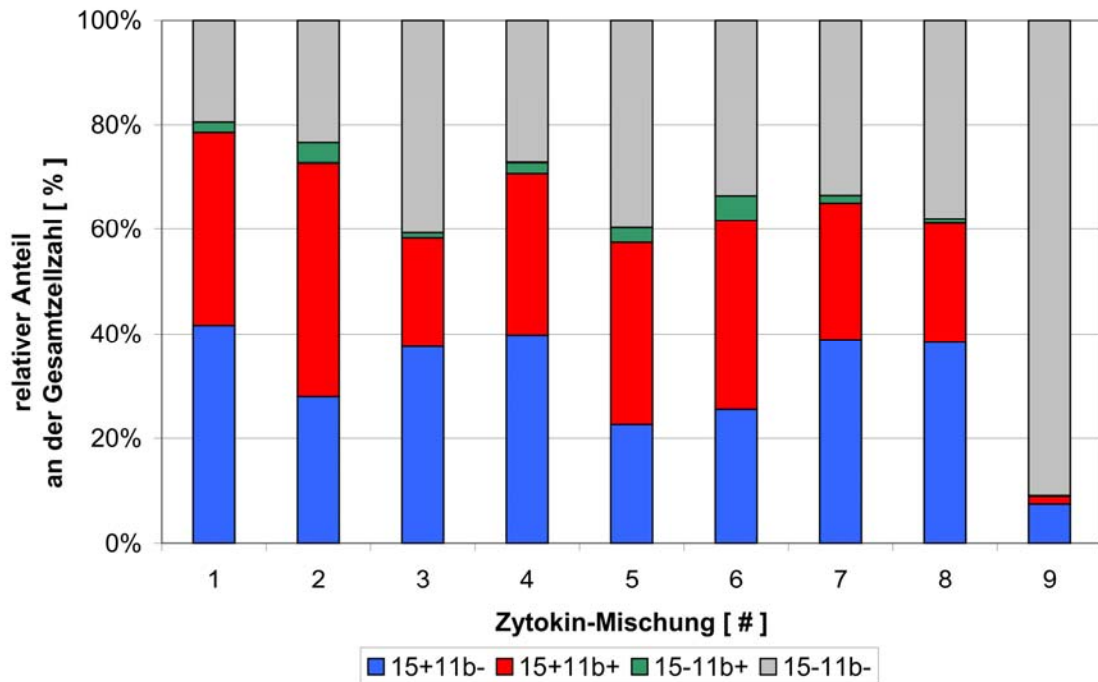


Abbildung 8-5: Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen: Expression von Differenzierungsmarkern

Im direkten Vergleich von #1 und #2 fällt eine geringfügig größere Menge an CD15⁺CD11b⁺ Zellen auf, die der monozytären Differenzierungslineie zuzuordnen sind. Dies ist auch bei einer weiteren Zytokinmischung (#6), die GM-CSF statt IL-6 enthält, festzustellen (Abbildung 8-5).

8.2.2 Kontroverser Einsatz von GM-CSF zur Expansion neutrophiler Zellen

Der Vergleich literaturbekannter Zytokinmischungen zeigt, daß Qualität und Quantität der verwendeten Zytokine einen deutlichen Einfluß auf Qualität und Quantität der generierten Zellpopulationen haben. Zu den absolut notwendigen Zytokine in der Wachstumsfaktormischung gehören das linienspezifische G-CSF, der multi-lineage Faktor SCF und das damit synergistisch wirkende IL-3. Der zusätzliche Einsatz von GM-CSF wird in der Literatur jedoch uneinheitlich gehandhabt. Dieser Faktor soll die Proliferation von sehr frühen Vorläufern neutrophiler Zellen, insbesondere der CFU-GM, stimulieren. Daneben hat GM-CSF jedoch auch eine Wirkung auf Zellen der monozytären Differenzierungslineie. Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten ebenfalls in diese Richtung.

Es wurde untersucht, welches der beiden Hämatopoietine, G-CSF oder GM-CSF das größere Potential zur spezifischen Expansion von neutrophilen Zelltypen besitzt. Dazu wurde eine identische Zytokin-Mischung aus IL-3, IL-6 und SCF mit G-CSF bzw. GM-CSF supplementiert. Die resultierenden Zellpopulationen wurden auf Markerantigene der granulozytären und monozytären Differenzierungslinie hin untersucht. Die Randbedingungen der Kultivierung sind in Tabelle 8-4 angegeben.

Tabelle 8-4: Kultivierungsparameter zum Vergleich von G-CSF und GM-CSF in der Zytokinmischung

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Zelldichte	1·10 ⁴ Z·mL ⁻¹
Wachstumsfaktoren	mit G-CSF: G-CSF, IL-3, IL-6, SCF mit GM-CSF: GM-CSF, IL-3, IL-6, SCF
Kultursystem	Gewebekulturflasche T25
Kulturvolumen	10 mL
Kulturdauer	10 Tage

Die Kulturansätze der beiden Zytokin-Mischungen weisen über die gesamte Kulturdauer ein ähnliches Wachstumsverhalten auf und liefern eine Expansion um Faktor 40 nach 196h Kultivierung. Diese Werte sind in Übereinstimmung mit den in Kap. 8.2.1 gefundenen Werten für ähnlich aufgebaute Zytokin-Mischungen. Abbildung 8-6 zeigt die Analyse ausgewählter Marker monozytärer und granulozytärer Differenzierung der verschiedenen Zellpopulationen. Der wichtigste neutrophile Differenzierungsmarker, CD15, ist bei Verwendung von GM-CSF auf weniger als 30% der expandierten Zellen zu finden, wohingegen bei der entsprechenden Kultivierung mit G-CSF mehr als doppelt so viele neutrophile Zelltypen expandiert werden. Auch der Anteil von Zellen, die den wichtigen intrazellulären Marker Myeloperoxidase aufweisen, ist bei Verwendung von GM-CSF um einen Faktor 2 geringer als bei Verwendung von G-CSF. Der exprimierte Phänotyp CD45⁺CD33⁺ läßt die Zuordnung von >95% aller expandierten Zellen beider Ansätze zu der granulo-monozytären Linien der myeloiden Differenzierung zu. Weniger eindeutig fällt die Identifizierung der reinen monozytären Differenzierung aus. Bei den mit GM-CSF kultivierten Zellen zeigt sich eine leicht erhöhte Expression von HLA-DR, das von Monozyten stärker exprimiert wird als von neutrophilen Zellen. Dagegen ist der klassische Monozytenmarker CD14 bei den beiden verglichenen Zytokin-Mischungen nur auf weniger als 20% der Zellen exprimiert.

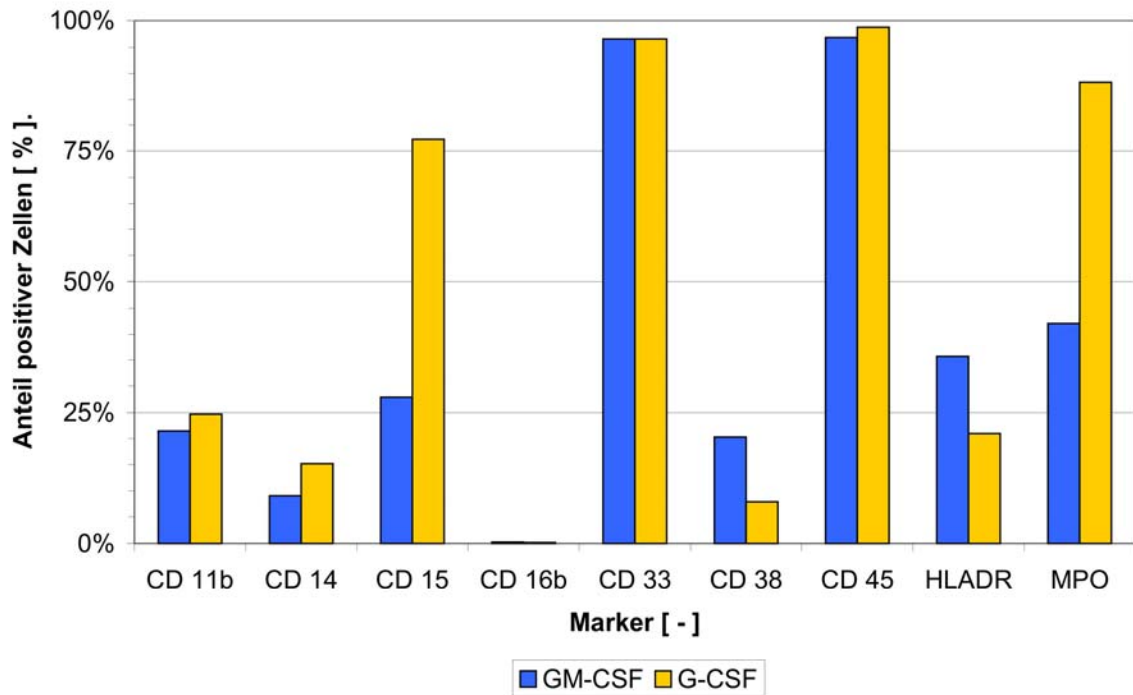


Abbildung 8-6: Markerexpression bei Kultivierung mit rhG-CSF oder rhGM-CSF

Offensichtlich vermittelt G-CSF den inkulierten Zellen einen stärkeren Reiz zur Differenzierung in Richtung des neutrophilen Zelltypus als GM-CSF. Die Zugabe von G-CSF erweist sich dadurch als wesentlich vorteilhafter für die Ziele der Kultivierung und wird daher dem GM-CSF vorgezogen.

8.2.3 S36G Mischung

Die Ergebnisse aus Kap. 8.2.1 und Kap. 8.2.2 legen dar, daß eine Zytokin-Mischung, die unter Einsatz möglichst weniger unterschiedlicher Zytokin-Qualitäten die Expansion einer möglichst großen Anzahl neutrophiler Zellen ermöglicht, zumindest IL-3, SCF und G-CSF enthalten muß. SCF und IL-3 stimulieren die Proliferation von CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen. Als linien-spezifisches Zytokin kommt G-CSF zum Einsatz. Als zusätzliches Zytokin zur Förderung der neutrophilen Differenzierung wird für die weiteren Kultivierungen IL-6 zugefügt. Dieses Zytokin bewirkt neben G-CSF die Induktion neutrophiler Differenzierung auf G-CSF-unabhängigen Signalwegen [Liu F, 1997]. Bereits beim Vergleich der literaturbekannten Zytokin-Mischungen wurde eine Abhängigkeit der maximalen Zellexpansion von der eingesetzten Gesamtmasse an Zytokin gezeigt (Kap. 8.2.1). Zur näheren Bestimmung der optimalen Zytokin-Konzentration im Kulturmedium wurde in einem Dosis-Wirkungs-Experiment die konzentrationsabhängige Zellexpansion mit der Mischung der 4 Zytokine SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (S36G) untersucht.

Die Zytokin-Mischung wurde unter sonst gleichen Bedingungen (sh. Tabelle 8-5) in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ den Kultivierungsansätzen zugefügt.

Tabelle 8-5: Kultivierungsparameter zur optimalen Konzentration der S36G Zytokinmischung

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Zelldichte	$1\cdot 10^4 \text{ Z}\cdot\text{mL}^{-1}$
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF im Konzentrationsbereich von 1 bis 300 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$
Kultursystem	Gewebekulturplatte
Kulturvolumen	2 mL
Anzahl Replikate	n = 2
Kulturdauer	6, 8, 10, 12 Tage

Abbildung 8-7 zeigt den Zelldichteverlauf für 6-, 8-, 10- und 12-tägige Kultivierungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Zytokin-Konzentration. Der Kurvenverlauf folgt einer Sättigungscharakteristik. Im Konzentrationsbereich von 1 bis 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (pro eingesetztem Zytokin) nimmt die erreichbare Zelldichte mit steigenden Zytokin-Konzentrationen stetig zu. Oberhalb des Schwellenwertes von 30 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (pro eingesetztem Zytokin) führt die weitere Erhöhung der Zytokin-Konzentration im Kulturmedium zu keinem weiteren Zuwachs der erreichbaren Zelldichte.

In Bezug auf die notwendigen Zytokin-Qualitäten zeigt sich, daß eine Mischung von SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (S36G) die Expansion von neutrophilen Zellen aus Nabelschnurblut ermöglicht. Es bleibt jedoch die Frage, ob die Zugabe weiterer literaturbekannter Zytokine die Gesamtexpansion an zellulärer Biomasse oder den Anteil neutrophil differenzierten Zellen weiter erhöhen kann. So soll das Interleukin 10 (IL-10) die Expansion der multiplen CFU-GM deutlich erhöhen [Wagner T, 2001]. Interleukin-12 ist als synergistisch mit SCF und IL-3 wirkendes Zytokin beschrieben, das die Myelopoese im Allgemeinen unterstützen soll [Ploemacher RE, 1993]. Flt3-L hat sich bei der Expansion von Nabelschnurblut-Stamm- und Vorläuferzellen als vorteilhaft erwiesen, um die Zellproliferation zusätzlich anzuregen. Interleukin-1 β ist ebenfalls als synergistisch wirkendes Zytokin zur Stimulation der Myelopoese beschrieben.

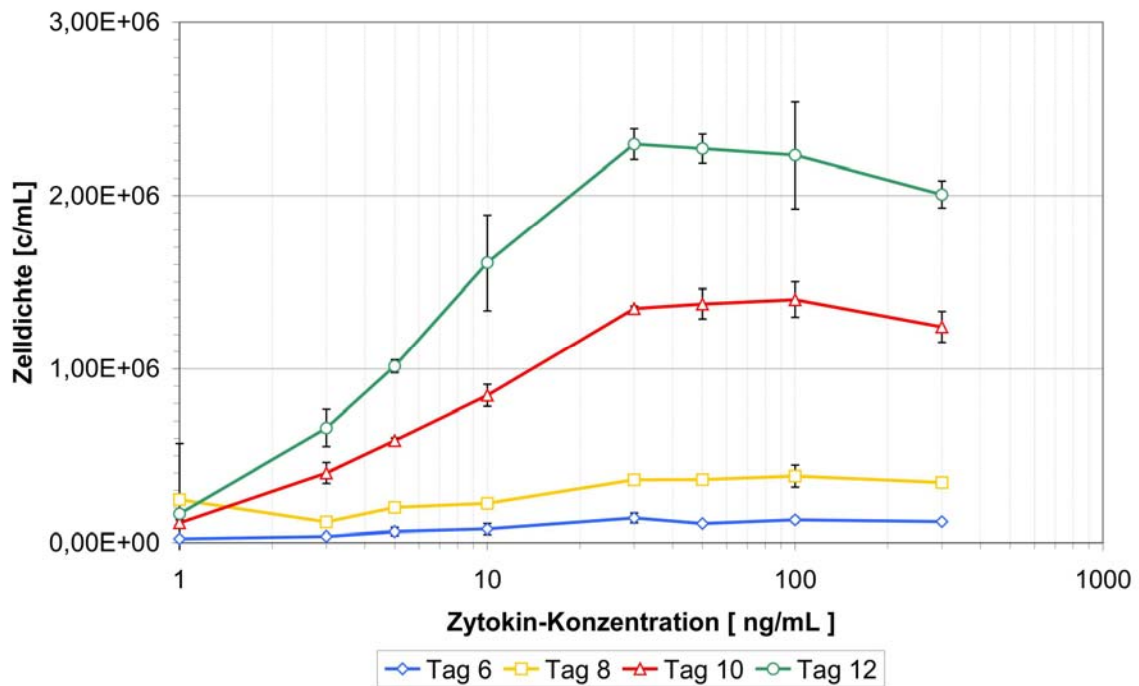


Abbildung 8-7: Optimierung der Konzentration einer S36G Zytokin-Mischung

Um zu überprüfen, ob diese Zytokine überhaupt einen Differenzierungsreiz in die neutrophile Linie bewirken können, wurden jeweils $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ der oben genannten Zytokine zu einer Mischung aus SCF und IL-3 (S3) hinzugefügt. SCF und IL-3 sind als multi-lineage CSF keine linienspezifischen Zytokine, sondern stimulieren allgemein die Proliferation von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Ein Zytokin, das einen neutrophilen Differenzierungsreiz setzt, müßte deutlich mehr neutrophil differenzierte Zellen hervorbringen als die S3 Mischung. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die einzelnen Zytokine ein synergistisches Potenzial haben. Durch zusätzliche Supplementierung zur oben austitrierten Zytokin-Mischung von jeweils $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (S36G) sollte sich zeigen, ob die zusätzliche Supplementierung eine Steigerung an neutrophiler Zellproduktion bewirken kann. Tabelle 8-6 gibt die gewählten Kultivierungsparameter wieder.

Im Vergleich der Gesamtzellexpansionen (Abbildung 8-8) zeigt sich, daß nur die Supplementierung von Flt-3-L eine deutliche Steigerung der gewinnbaren Zellzahl liefert. Die zugesetzten Interleukine hingegen zeigten nur geringfügig höhere Expansionsfaktoren als die beiden Referenzen (S3) und (S36G). Fügt man den Wachstumsfaktor Flt3-L zu einer Mischung aus den beiden multi-lineage Zytokinen SCF und IL-3 zu, so kann die Gesamt-Zellexpansion um einen Faktor $3,9 \pm 0,3$ gegenüber der S3-Referenz gesteigert werden.

Tabelle 8-6: Kultivierungsparameter zum Vergleich zusätzlicher Zytokine

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Zelldichte	1·10 ⁴ Z·mL ⁻¹
Wachstumsfaktoren	S3: SCF, IL-3 S36G: SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Versuchsansätze	zusätzliche Supplementierung von IL-1 β , IL-10, IL-12, Flt3-L (jeweils einzeln)
Kultursystem	Gewebekulturplatte
Kulturvolumen	2 mL
Anzahl Replikate	n = 2
Kulturdauer	10 Tage

Dieses Ergebnis kann bei Zugabe von Flt-3-L zu der S36G-Zytokin-Mischung nicht eingestellt werden. Bei diesen Ansätzen steigt die Gesamt-Zellexpansion durch Zugabe von Flt-3-L nur um einen Faktor von $1,9 \pm 0,1$ verglichen mit den Ansätzen ohne Flt-3-L. Bei der durchflußzytometrischen Analyse einer Probe an Tag 10 der Kultivierung zeigt sich, deutlich, daß der Anteil von CD15⁺ neutrophilen Zelltypen an dem Gesamt-Expansions-Ergebnis durch die Verwendung von Flt-3L gesenkt wird. Liegt der Anteil CD15⁺ Zellen bei der S36G Referenz bei ca. 60%, so wird er durch Zugabe von Flt3-L auf unter 20% gesenkt. Die untersuchten Interleukine können bei Zugabe zu der S3-Mischung den Anteil der CD15⁺ nicht über den Referenzwert von 26% der Gesamtzellpopulation steigern. Sie können also selbst keinen neutrophilen Differenzierungsreiz bei den Zellen setzen. Als Zusatz zu der S36G-Mischung kann draüber hinaus kein synergistischer Effekt der Interleukine gezeigt werden. Der Anteil an CD15⁺ Zellen sinkt bei der Verwendung von IL-10 und IL-12 sogar noch unter die Marke der Referenz.

Die vergleichenden Kultivierungsversuche zeigen, daß zur Expansion von neutrophilen Zelltypen aus CD34⁺ Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut die Kombination der Wachstumsfaktoren SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF ausreichend ist. Die qualitative Testung weiterer Zytokine ergab, daß durch Zugabe weiterer Zytokine keine weitere Ausbeutesteigerung an Zellen des gewünschten Phänotyps CD15⁺ erbracht werden kann.

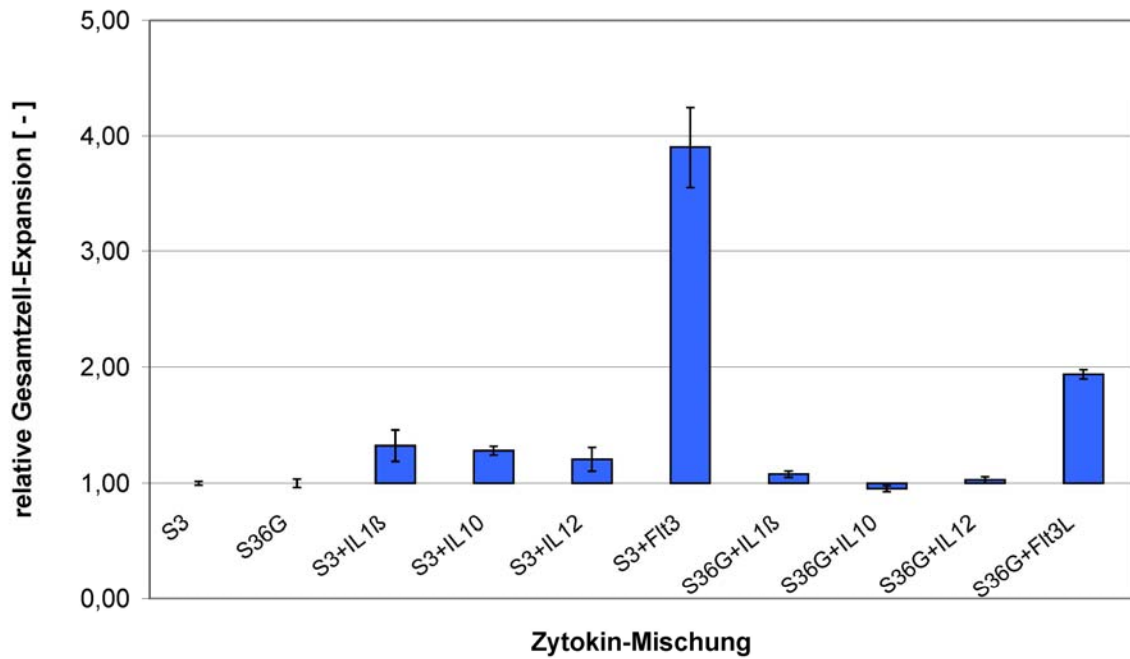


Abbildung 8-8: Gesamtzell-expansion bei Supplementierung von IL-1β, IL-10, IL-12 und Flt3-L zu einer Mischung von SCF und IL-3 (S3) bzw. SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (S36G)

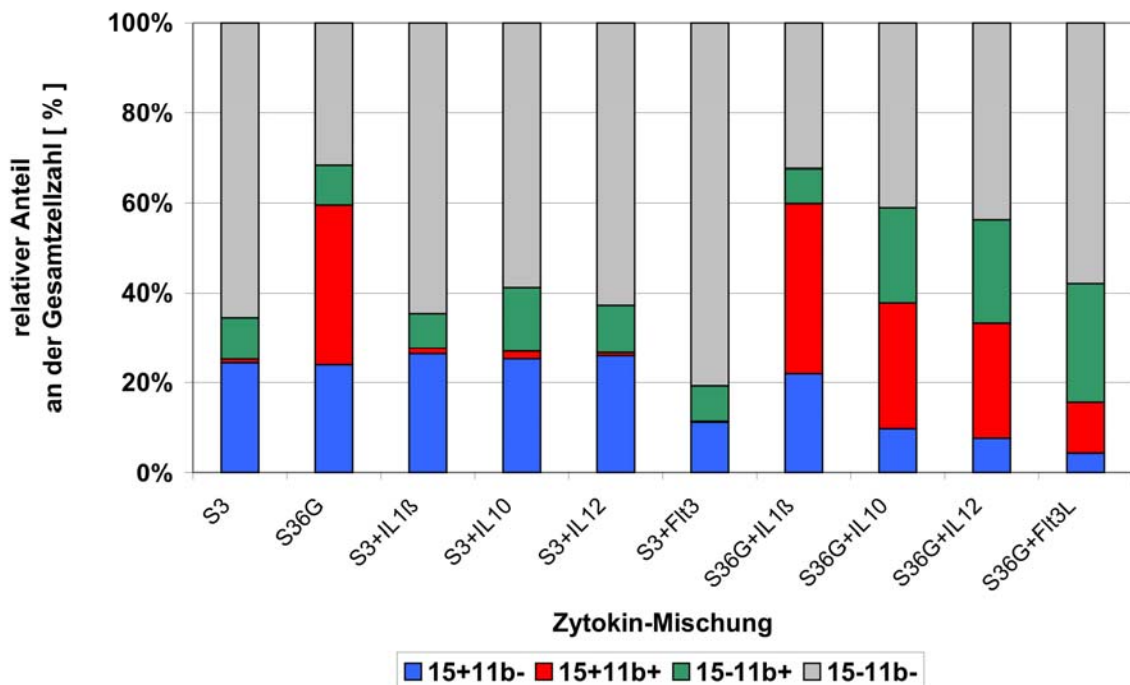


Abbildung 8-9: Expression extrazellulärer Marker bei Supplementierung von IL-1β, IL-10, IL-12 und Flt3-L zu einer Mischung von SCF und IL-3 (S3) bzw. SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF (S36G)

8.3 Supplementierung des Mediums

Die Zielsetzung, ein Kultivierungsprotokoll zur Generierung von Zellen für die klinische Anwendung zu erarbeiten, schränkt die Palette an möglichen Komponenten des Kultivierungsmediums erheblich ein (vgl. Kap. 8.1). Das Wachstum und die Erhaltung der Vitalität von primären hämatopoetischen Zelltypen sind jedoch abhängig von einem vielschichtigen Netzwerk biologischer Faktoren. Lösliche Faktoren spielen dabei eine große Rolle. Ihre Verfügbarkeit als rekombinante Proteine legt die Basis für ex-vivo Expansionen im isolierten Suspensionssystem. Dadurch ist das hochkomplexe Netzwerk der verschiedensten Faktoren aber nur ausschnittsweise in vitro abgebildet. Die in Kap. 8.1 beschriebenen, zulassungsfähigen Medien sind serumfreie Formulierungen. Obwohl in diesen Produkten die wachstumsfördernden Effekte von Serum durch Zugabe von isolierten, Proteinen (Albumin), Proteinhydrolysaten, Lipiden, Fettsäuren und Spurenelementen zumindest partiell wieder hergestellt werden können, wird in der klinischen Anwendung häufig auf Seren oder Serumkomponenten in der Kultivierung zurückgegriffen um eine Verbesserung der Proliferation und/oder Zellqualität zu erreichen. Klassischerweise werden in der Zellkultivierung bovine Seren, insbesondere fötales Kälberserum, als Medienkomponente eingesetzt, das eine Vielzahl an wachstumsfördernden Hormonen, Bindungs- und Transporterproteinen, anorganischen Salzen und Vitaminen enthält und damit die in vitro Situation der in vivo Situation annähert. In der Fermentation von rekombinanten Proteinen haben serum- und proteinfreie Medien serumhaltige Medien verdrängt, da somit die Produktaufarbeitung erheblich vereinfacht wird. Im Gegensatz dazu stellt Serum in der klinischen Anwendung kein Ausschlußkriterium für den Kultivierungsprozeß dar, solange das zugesetzte Serum den Anforderungen an transfundierbare Produkte (z.B. Blutplasma, Blutserumkomponenten) genügt. In Kap. 1.6.3.5 wurden bereits die Bedenken gegen Seren tierischen Ursprungs erläutert und mögliche Alternativquellen humanen Ursprungs genannt. In den hier beschriebenen Versuchen soll gezeigt werden, ob die Verwendung der klinisch einsetzbaren Serumalternativen einen meßbaren Vorteil bei der Generierung neutrophiler Zellen aus CB-CD34⁺ Zellen liefert. Zur Kultivierung wurden die in Tabelle 8-7 angegebenen Parameter eingestellt. Als Referenz wird fötales Kälberserum mitgeführt.

Tabelle 8-7: Kultivierungsparameter zum Vergleich von Seren als Medien-Supplemente

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, jeweils Einzelspender
Medium	SCGM Medium
Zelldichte	1·10 ⁴ Z·mL ⁻¹
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Versuchsansätze	serumfreie Referenz und Supplementierung von FBS, Biseko, allogenen und autologem Plasma
Kultursystem	Gewebekulturplatte
Kulturvolumen	2 mL
Anzahl Replikate	n = 2 (für allogene Seren: n=3 Spender einzeln getestet)
Kulturdauer	8, 10, 14 Tage
Fütterung	Verdünnen der Zellsuspension an Tag 10 mit Frischmedium (Endzelldichte: 1-3·10 ⁵ Z·mL ⁻¹)

Durch die Kultivierungsergebnisse wird bestätigt, daß die Supplementierung von fötalem Kälberserum die gewinnbare Zellbiomasse deutlich erhöhen kann. So steigert sich die Expansion der Gesamtzellzahl in Satzkultur nach 8 bzw. 10 Tagen (Satzkultivierung) um etwa 60% gegenüber einer vergleichbaren serumfreien Kultivierung (Abbildung 8-10). Bei Kultivierung über einen Zeitraum von 14 Tagen ist die Zellzahl der mit FBS supplementierten Ansätzen um einen Faktor von 3510 ± 1261 expandiert, während die Expansionsfaktoren der serumfreien Ansätze im gleichen Zeitraum um einen Faktor 2,5 niedriger liegen (1408 ± 695). Keine der humanen Serumalternativen kann die durch FBS erreichten Expansionswerte erlangen. Die Gesamtzell-Expansionen der Ansätze mit nicht hitze-inaktivierten allogenen und autologen Seren liegen im Mittel sogar noch unterhalb der serumfreien Kultivierung. Die Serumkomponente Biseko liefert gegenüber der serumfreien Kultivierung ebenfalls keine bessere Gesamtzell-Expansion.

Die Betrachtung der wichtigsten Differenzierungsmarker CD15 und CD11b zeigt eindeutig, daß die Kultivierung von Zellen unter den gegebenen Parametern mit nativen Seren (FBS, humane Seren) den Anteil der gewünschten, neutrophil differenzierten Zellen (CD15⁺) deutlich schmälert. In allen Ansätzen ist der Anteil der monozytär differenzierenden Zellen (CD15⁺CD11b⁺) beträchtlich höher als unter serumfreien Bedingungen. Einzig die aufgearbeitete Serumkomponente BISEKO liefert eine Zellpopulation, deren Markerexpression mit der serumfreien Kultivierung korreliert. Mit dem Phänotyp CD33⁺CD45⁺ sind die Zellen aller Ansätze eindeutig der myeloiden Differenzierungsreihe zuzuordnen (Abbildung 8-11).

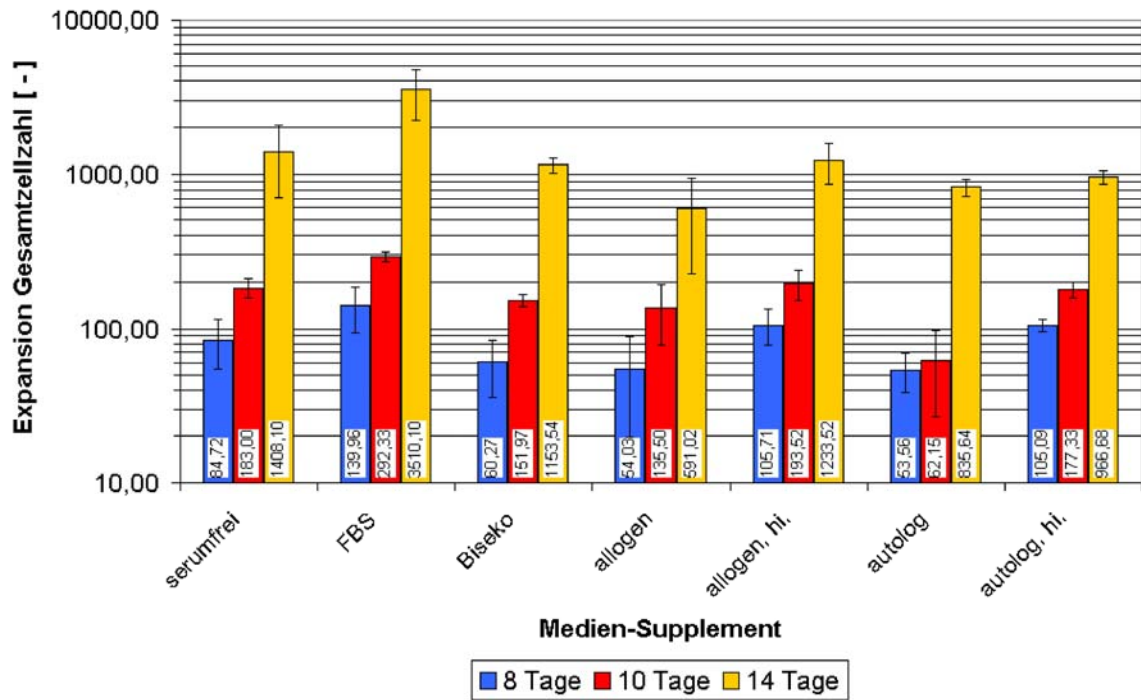


Abbildung 8-10: Einfluß von Seren auf das Expansionsergebnis der Gesamtzellzahl

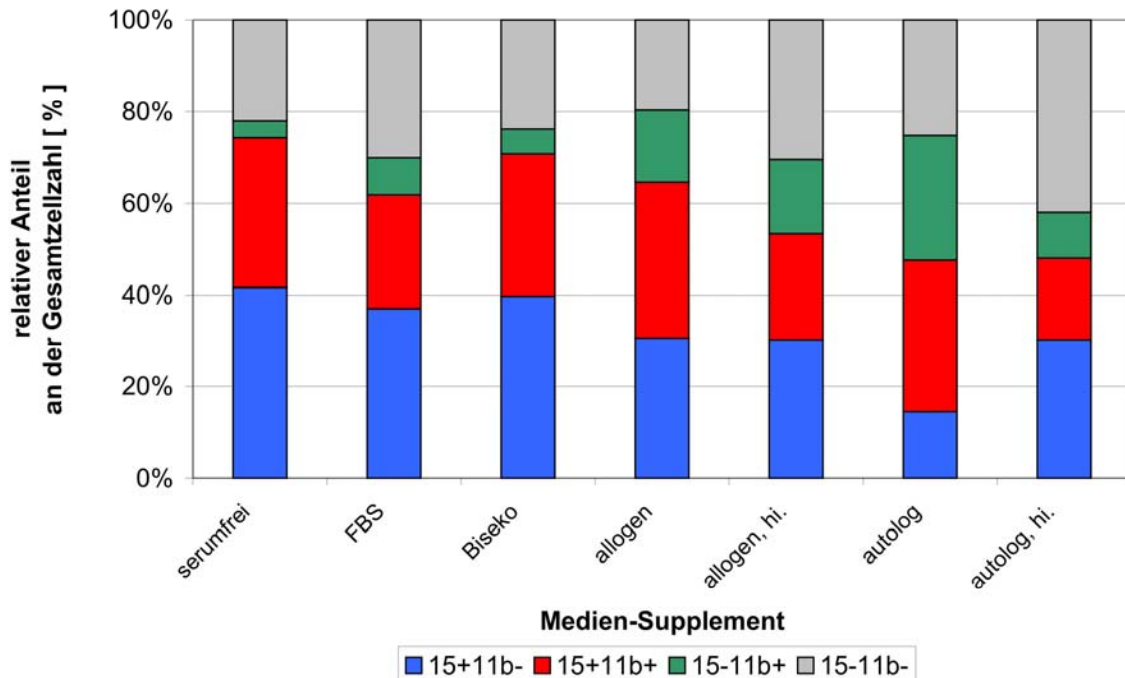


Abbildung 8-11: Einfluß von Serum auf die Expression von Differenzierungsmarkern ex vivo expandierter Zellen

Der Einsatz von Seren als zusätzliche Mediumkomponente erscheint für die Expansion neutrophiler Zellen aus Nabelschnurblut nicht sinnvoll. Die serumfreie Kultivierung erlaubt höhere Gesamtausbeuten an neutrophil differenzierten Zellen bei besserer klinischer Anwendbarkeit des Kultivierungsprotokolls.

8.4 Temperatur

Die Erhöhung der Temperatur ist die natürliche Reaktion des Körpers auf Infektionen. Lokal, im Gebiet des Entzündungsherd, bewirkt die Temperaturerhöhung den Anstieg der Aktivität von Immunzellen und eine „hitze“-bedingte Hemmung von Mikroorganismen. Die systemische Temperaturerhöhung auf Temperaturen $> 38,5^{\circ}\text{C}$ (Fieber) steigert alle biochemischen Reaktionen des Körpers gemäß der RGT Regel und unterstützt die Ausbildung einer Immunantwort, z.B. durch die Steigerung der Wachstumsgeschwindigkeit von T-Lymphozyten.

In diesem Kapitel wird der Einfluß der Temperatur auf das Wachstum und die Differenzierung von neutrophilen Zellen untersucht. Es ist durchaus vorstellbar, daß die Temperatur als ein Signal zur bedarfsgerechten, vermehrten Produktion von Immunzellen im Knochenmark dient. Untersucht werden drei verschiedene Temperaturen: 37°C (normale Körpertemperatur und Standardtemperatur für die Zellkultur), $38,5^{\circ}\text{C}$ (Fieber), 40°C (stark erhöhte Fiebertemperatur), die weiteren Kultivierungsparameter sind in Tabelle 8-8 gegeben.

Tabelle 8-8: Kultivierungsparameter zur Untersuchung des Temperatureinflusses

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Zelldichte	$1 \cdot 10^4 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Versuchsansätze	Temperatureinstellung des Brutschrankes auf 37°C , $38,5^{\circ}\text{C}$ und 40°C
Kultursystem	Gewebekulturflasche T25
Kulturvolumen	10 mL
Kulturdauer	14 Tage

Im Verlauf der 14tägigen Kultivierung konnte der modulierende Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der hämatopoetischen Zellen gezeigt werden (Abbildung 8-12). Eine Erhöhung der Kultivierungstemperatur auf $38,5^{\circ}\text{C}$ bewirkte die Verkürzung der „lag“-Phase zu Beginn der Kultivierung und ein insgesamt schnelleres Wachstum der Zellen. Die maximale Wachstumsrate ist um 65% höher als bei Kultivierung bei 37°C ($0,0288 \text{ h}^{-1}$ vs. $0,0174 \text{ h}^{-1}$). Die maximal

erreichbare Gesamtzell-Expansion ist jedoch bei der Kultivierungstemperatur von 38,5°C um einen Faktor von 1,23 niedriger als bei Kultivierung bei 37°C (Expansionsfaktoren: 3840fach (38,5°C) vs. 3110fach (37°C)), da bei der erhöhten Kultivierungstemperatur die Absterbephase 48 Stunden früher einsetzt. Die bei 40°C kultivierten Zellen konnten nicht expandiert werden und verlieren über die Kulturdauer auch ihre Vitalität. Physiologisch bedeutet die erhöhte Kultivierungstemperatur erheblichen Hitzestress für die Zellen, dem sie in vitro ohne die unterstützenden Stromazellen und Strukturen wahrscheinlich nur unzureichend begegnen können. Die Proliferation der Zellen wird dadurch gehemmt bzw. sie bleibt völlig aus.

In Abbildung 8-13 werden die spezifischen Differenzierungsmarker zum Zeitpunkt der maximal erreichbaren Zelldichte verglichen. Da bei 40°C kein Wachstum beobachtet werden konnte, ist die immunphänotypische Analyse dieser Zellen nicht möglich. Interessanterweise wird die Expression der linienspezifischen Marker CD15, CD11b und dem intrazellulären funktionalen Marker Myeloperoxidase (MPO) durch Variation der Temperatur nicht beeinflusst. Das spricht für eine generelle Beschleunigung des zellulären Wachstums bei erhöhter Temperatur ohne Spezifität für bestimmte Zelltypen des Immunsystems.

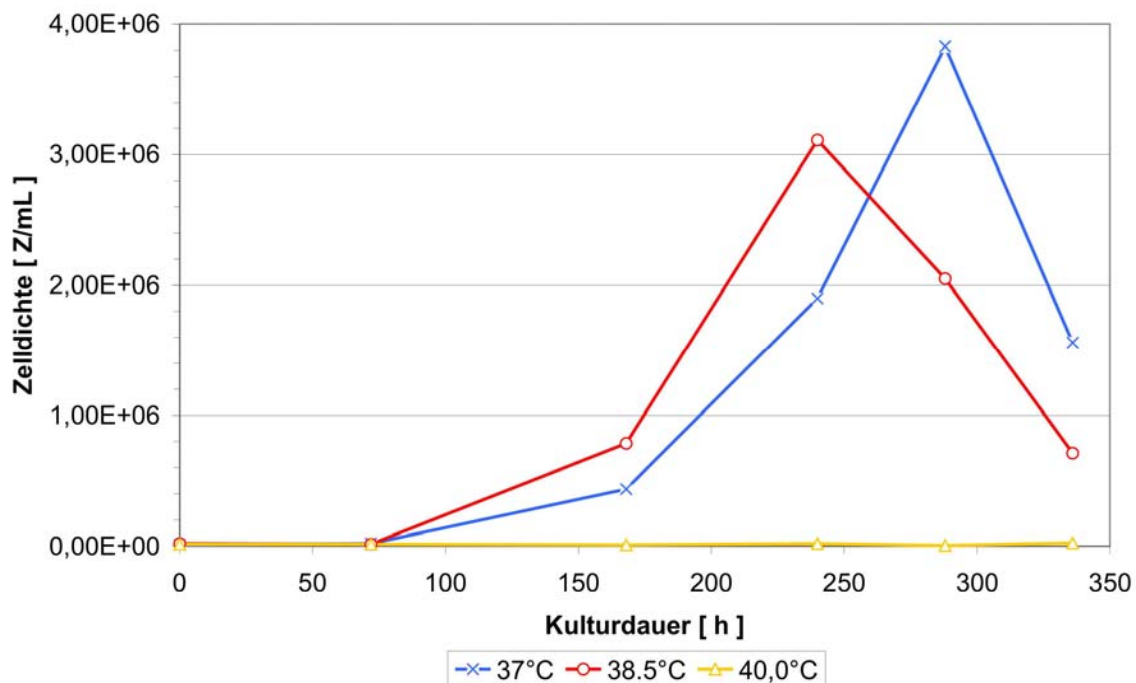


Abbildung 8-12: Einfluß der Temperatur auf das Wachstum von neutrophil differenzierenden Zellen

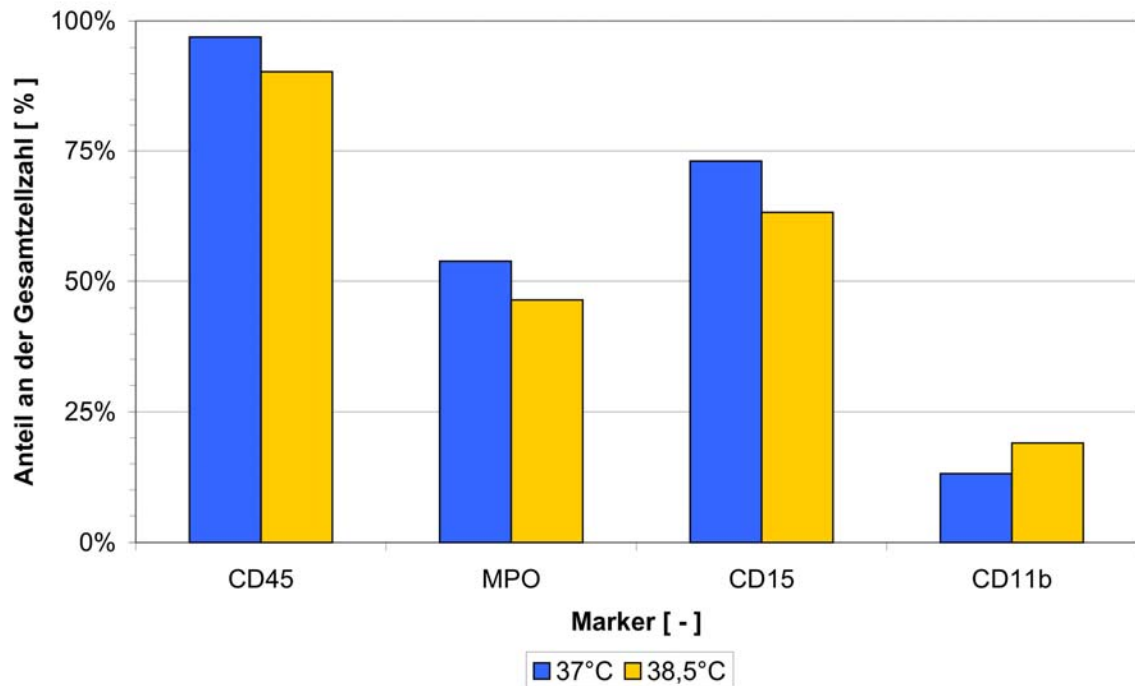


Abbildung 8-13: Vergleich der Expression von Markerantigenen bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen

8.5 pH-Wert und Gelöstsauerstoffkonzentration

Obwohl die Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle beim Erhalt der Vitalität sowie der Stimulation von Proliferation und Differenzierung spielen, sind sie nur ein Ausschnitt des regulatorischen Netzwerkes der Hämatopoese. In Kap. 1.6 wurde bereits auf die Bedeutung des pH-Wertes und der Gelöstsauerstoffkonzentration in vivo und in vitro auf die Granulopoese hingewiesen. Bei der Übersicht über die Literatur ist jedoch nicht zu übersehen, daß eine kontrollierte und isolierte Beurteilung dieser Effekte bisher mangels geeigneter Kultivierungssysteme nicht möglich war.

Mit dem in dieser Arbeit konstruierten und etablierten Mini-Spinner steht erstmals ein Kultivierungssystem zur Verfügung, das zusammen mit der cellform pro Anlage (DASGIP) die geregelte und kontrollierte Kultivierung von primären hämatopoetischen Zellen in einem vierfachparallelen Ansatz ermöglicht. Der Mini-Spinner wurde in diesen Versuchen als geschütteltes System mit einem minimalen Arbeitsvolumen von 20 mL betrieben. Ausgehend von einem Inokulum-Volumen von 35 mL sind somit im Verlauf der Kultivierung mehrere Probenahmen auch größeren Volumens für durchflußzytometrische Analysen möglich.

Zur Untersuchung des Einflusses des pO_2 -Wertes auf das Wachstumsverhalten und die Differenzierung neutrophiler (Vorläufer-) Zellen wurden $CD34^+$ hämatopoetische Zellen im Mini-Spinner

inokuliert und mit dem Fermentationssystem cellferm pro (DASGIP) über einen Zeitraum von 14 Tagen pH- und pO_2 - kontrolliert kultiviert. In den untersuchten Ansätzen wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium durch Variation des Sauerstoffanteils in der Zuluft für jedes Gefäß individuell geregelt. Die Gelöstsauerstoffkonzentrationen im Medium wurden im Bereich von DO = 5%, 25%, 50% und 75% variiert (luftgesättigtes Medium enthält unter Normalbedingungen etwa $8,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Sauerstoff; dieser Wert wird 100% DO (dissolved oxygen) gesetzt). Die weiteren Parameter der Kultivierung sind in Tabelle 8-9 zusammengefaßt.

Tabelle 8-9: Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Proliferation und Differenzierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34⁺ Zellen

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Ausgangszell-dichte	$1 \cdot 10^4 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Versuchsansätze	Gelöstsauerstoff des Mediums über den O_2 -Anteil in der Zuluft geregelt auf 5 %DO 25% DO 50% DO 95% DO (luftgesättigtes Medium bei Standardbedingungen ist 100% DO gesetzt)
Kultursystem	Mini-Spinner, ohne Rührung, auf Schüttelplatte
Kulturvolumen	30 mL
Kulturdauer	14 Tage

Die Gesamtzell-Expansion variierte deutlich mit der eingestellten Sauerstoffkonzentration (Abbildung 8-14). Für die beiden mittleren eingestellten Gelöstsauerstoffkonzentrationen (25% DO und 50% DO) konnten die höchsten Zelldichten und damit die höchsten Gesamtzellzahlen erreicht werden. Die niedrigste eingestellte Sauerstoffkonzentration lieferte auch die niedrigsten Zellzahlen. Alle Ansätze erreichen ihre maximale Wachstumsrate nach 168 h Kultivierung. Die deutlich bessere Zellproduktion der auf 50% bzw. 25% DO geregelten Ansätze zeigt sich erst nach ca. 200 h. Danach bleibt die Staffelung der Zell-Expansionen für die restliche Kulturdauer erhalten. Interessanterweise nimmt die Vitalität der inokulierten Zellen in allen Ansätzen von Tag 0 bis Tag 5 ab, erholt sich jedoch nach Überwinden der lag-Phase und bleibt auf relativ hohem Niveau von ca. 80% bis zum Abbruch der Kultivierung nach 14 Tagen erhalten.

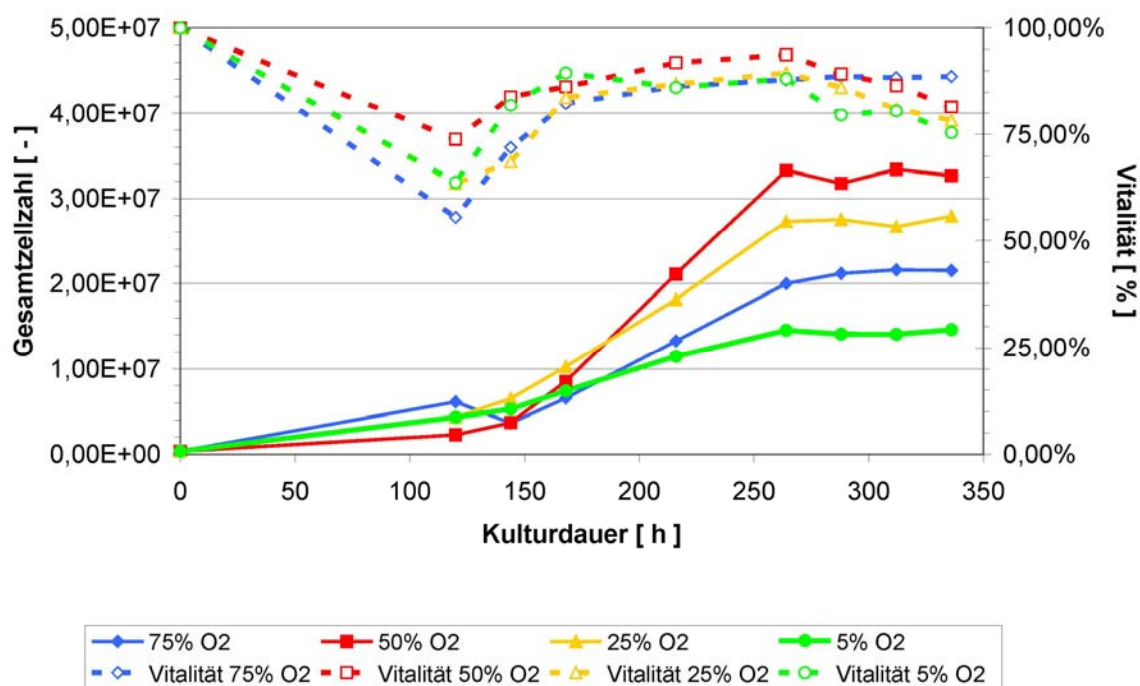


Abbildung 8-14: Einfluß der Gelöstsauerstoffkonzentration auf Gesamtzellzahl und Vitalität bei der Generierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34⁺ Zellen

Der Anteil an neutrophilen Vorläuferzellen an der Gesamtzell-Population wurde am Ende der lag-Phase nach 168 h Kultivierung, inmitten der exponentiellen Wachstumsphase (216 h) und zu Beginn der Plateauphase nach 264 h bestimmt. Tabelle 8-10 zeigt den Anteil der Zellen mit dem neutrophilen Differenzierungsmarker CD15 an der Gesamtzellpopulation. Abgesehen von der niedrigsten Gelöstsauerstoff-Konzentration wächst der Anteil der neutrophil differenzierenden Zellen in den Ansätzen mit 75% DO, 50% DO bzw. 25% DO auf > 60% an. Die niedrigste Sauerstoff-Konzentration liefert über die gesamte Kulturdauer hinweg geringere Mengen an CD15⁺ Zellen. Der Anteil an CD15⁻CD11b⁺ Zellen, die der monozytären Differenzierungsrichtung zuzuordnen sind, liegt hingegen bei Kultivierung mit 5% DO durchweg höher als bei den verglichenen Ansätzen. Nach 216 h Kultivierung bei 5% DO erreicht der Anteil der CD15⁻CD11b⁺ Zellen ein Maximum von 20,6% der Gesamtzellzahl.

Tabelle 8-10: Einfluß der Gelöstsauerstoff-Konzentration auf den Anteil neutrophiler Zellen an der Gesamtzellzahl

Kulturdauer [h]	Anteil neutrophiler Zellen (CD15+) an der Gesamtzellzahl			
	75% DO	50% DO	25% DO	5% DO
168 (Tag 7)	49,1	51,5	51,5	50,8
216 (Tag 9)	62,9	62,1	61,6	55,9
264 (Tag 11)	63,6	60,67	66,32	53,13

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß des pH-Wertes auf die Proliferation und Differenzierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34⁺ Zellen untersucht. Die Kultivierung erfolgte ebenfalls unter pH- und pO₂-kontrollierten Bedingungen in Mini-Spinner unter Verwendung der cellferm pro Anlage. Die Kultivierungsparameter sind in Tabelle 8-11 angegeben.

Tabelle 8-11: Kulturparameter zur Untersuchung des Einflusses des pH-Wertes auf Proliferation und Differenzierung humaner neutrophiler Zellen aus CD34⁺ Zellen

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Ausgangszell-dichte	1 · 10 ⁴ Z · mL ⁻¹
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Versuchsansätze	pH-Wert des Mediums über den CO ₂ -Anteil in der Zuluft geregelt auf pH 6,7 pH 7,0 pH 7,3 pH 7,5
Kultursystem	Mini-Spinner, ohne Rührung, auf Schüttelplatte
Kulturvolumen	30 mL
Kulturdauer	14 Tage

In dem Versuch ist ein signifikantes Zellwachstum nur in dem auf pH 7,3 geregelten Mini-Spinner (Abbildung 8-15) zu registrieren. In dem Ansatz wird eine Gesamtzell-Expansion um einen Faktor von 67,9 erreicht. Der Vergleich des Immunphänotyps dieser Zellen mit in einer T-Flasche (ungeregelt) kultivierten Zellen zeigt in etwa den gleichen Anteil an neutrophil differenzierenden CD15⁺ Zellen an der Gesamtzellpopulation (67% T-Flasche vs. 61% bei kontrollierter Kultivierung). Lediglich der Anteil CD15⁻CD11b⁺ Zellen (monozytär differenzierende Zellen) ist beim Mini-Spinner um etwa denselben Betrag erhöht (8% T-Flasche vs. 13% Mini-Spinner). Im Ansatz mit dem Medium-pH-Wert von pH 7,5 zeigen die inokulierten Zellen geringe Proliferation. Hier wird nur eine 26fache Expansion der Gesamtzellzahl erreicht. Die beiden auf pH 6,7 und pH 7,0 geregelten Ansätze zeigen kein signifikantes Wachstum. Die Vitalität Zellen in den Medien mit dem pH-Wert von pH 6,7 und pH 7,0 nimmt deutlich ab, wohingegen die beiden Ansätze mit proliferierenden Zellen Vitalitäten von > 75% aufweisen.

Das ausbleibende Wachstum der Zellen könnte darauf zurückzuführen sein, daß zur Einstellung des pH-Wertes im Medium der CO₂-Gehalt in der Gasphase genutzt wurde. Dabei müssen insbesondere für die beiden niedrigen pH-Werte (pH 6,7 und pH 7,0) relativ hohe Gasphasen-CO₂-Werte (20-33%) eingestellt werden. Die Modulation des pH-Wertes zu niedrigeren Werten

bringt also auch eine deutliche Erhöhung des pCO_2 mit sich. Bei solch hohen CO_2 -Mengen im Medium ist jedoch nicht auszuschließen, daß inhibitorische oder cytotoxische Effekte eine Rolle spielen und somit ein Wachstum der Vorläuferzellen aus der $CD34^+$ Population unterbleibt. Andererseits könnte jedoch auch das pH-Fenster innerhalb dessen eine Proliferation der Vorläuferzellen möglich ist, sehr schmal begrenzt sein.

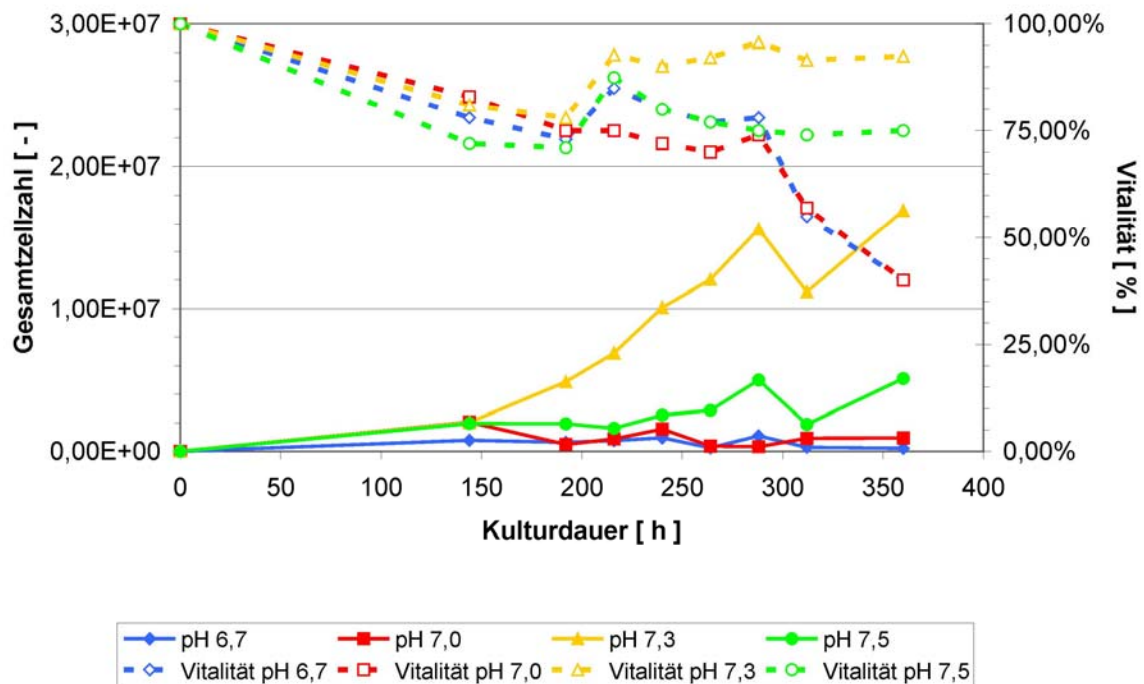


Abbildung 8-15: Einfluß des Medium pH-Wertes auf Gesamtzellzahl und Vitalität bei der Generierung humaner neutrophiler Zellen aus $CD34^+$ Zellen

8.6 Verfahrensweise der Kultivierung

Das Wachstum von Zellen in vitro ist abhängig von einer ausreichenden Versorgung mit niedermolekularen Substraten wie Glukose (Kohlenstoffquelle) und Aminosäuren (Proteinbausteine, Stickstoffquelle) und hochmolekularen Faktoren wie Hormonen und Zytokinen. Substratlimitierungen, Mangel an Wachstumsfaktoren und die Akkumulation von Stoffwechselmetaboliten im Kultivierungsmedium wirken wachstumshemmend. Die Fütterungsstrategie spielt eine zentrale Rolle bei der Bereitstellung optimaler Bedingungen für das zelluläre Wachstum und Differenzierungsfähigkeit. Die bisherigen Untersuchungen von verfahrenstechnisch relevanten Parametern wurden in Satzkultur durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß das Wachstum der Zellen nach 10-12 Tagen verebt. Es ist davon auszugehen, daß sich Limitierungen und Inhibierungen

einstellen, die die Proliferationsfähigkeit der Zellen einschränken. In einem Satz von Experimenten sollen ein optimiertes Fütterungsprotokoll erarbeitet werden, das einerseits die weitere Untersuchung der herangezogenen Zellpopulationen ermöglicht und andererseits zur Maßstabsvergrößerung sowie der Automatisierbarkeit der Kultivierung beiträgt.

8.6.1 Zytokin-Kinetiken

In Kapitel 8.2 konnte gezeigt werden, daß die Gegenwart von SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF im Kultivierungsmedium notwendig ist, um die Produktion neutrophiler Zellen aus CD34⁺ Zellen effektiv zu unterstützen. Um die konstante Versorgung mit diesen Wachstumsfaktoren über einen längeren Kultivierungszeitraum sicherzustellen, werden in den folgenden Versuchen der Verbrauch an Wachstumsfaktoren während der Kultivierung und deren Stabilität bzw. Zerfallskinetiken im Kultivierungsmedium ohne zelluläre Verbraucher charakterisiert. Dazu wird die Konzentration an den jeweiligen Wachstumsfaktoren im Medium mit Hilfe von ELISA-Tests quantifiziert. Zerfallende Zytokine müßten über den Kultivierungszeitraum nachgefüttert werden, was jedoch zu zusätzlichen Manipulationen an der Kultur führt. Automatisierte, kontinuierliche Kultivierungen könnten mit einem vorgefertigten und gekühlt gelagerten Zytokin-Konzentrat versorgt werden. Dafür ist jedoch ebenfalls die Stabilität der Zytokine in wäßriger Lösung über einen längeren Zeitraum sicherzustellen.

Zur Untersuchung der Stabilität der Wachstumsfaktoren im Kultivierungsmedium wurde das Kultivierungsmedium mit Zytokinen versetzt und ohne Zugabe von Zellen in den für die Kultivierung verwendeten Gefäßen bei 37°C im Brutschrank bzw. bei 0°C im Kühlschrank inkubiert. Medienproben wurden täglich genommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Der Verlauf der mittels ELISA bestimmten Medienkonzentrationen zeigt, daß die beiden Interleukine (IL-3 und IL-6) im untersuchten Zeitraum von 20 Tagen sehr stabil sind, wohingegen die nachweisbare Konzentration der beiden koloniestimulierenden Faktoren G-CSF und SCF im Beobachtungszeitraum deutlich abnimmt (Abbildung 8-16). Alle Wachstumsfaktoren sind jedoch bei niedrigen Temperaturen auch im wäßrigen Medium stabil.

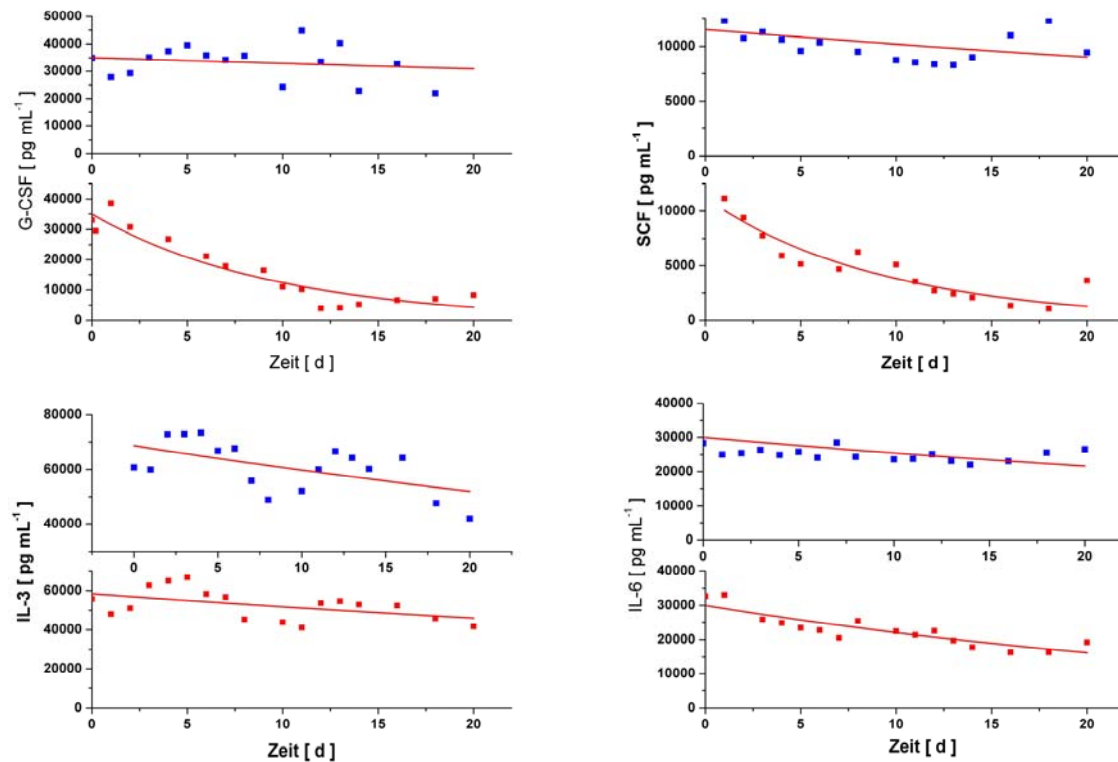


Abbildung 8-16: Zytokin-Stabilitäten in Medium ohne zellulären Konsumenten

Aus den bestimmten Konzentrationsprofilen wurden unter Annahme einer Zerfallskinetik 1. Ordnung die Halbwertszeiten der Zytokine im Medium bestimmt. Tabelle 8-12 faßt die Ergebnisse zusammen. Mit Hilfe des verwendeten ELISA-Tests kann keine Aussage darüber getroffen werden, welche Ursache die geringe Stabilität von G-CSF und SCF hat. Sowohl das Hydrolysieren der Primärstruktur als auch Umfaltungsprozesse in der Tertiärstruktur verursachen die Zerstörung von Antigen-Epitopen. Aufgrund der bestimmten Kinetiken kann jedoch davon ausgegangen werden, daß es sich nicht um ein passives Anheftungsphänomen (z.B. hervorgerufen durch elektrostatische Wechselwirkungen) an die Oberfläche des Kultivierungsgefäßes handelt, da diese Prozesse sehr viel rascher und auch bei niedrigen Temperaturen ablaufen sollten.

Tabelle 8-12: Zerfallskonstante (k) und Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) von Zytokinen in Medium ohne zellulären Konsumenten

	37 °C		0 °C	
	k [1/d]	t _{1/2} [d]	k [1/d]	t _{1/2} [d]
SCF	0,10772 ± 0,01397	6,4 ± 0,7	0,01266 ± 0,00619	56,5 ± 18,9
G-CSF	0,10414 ± 0,00927	6,7 ± 0,6	0,01248 ± 0,00794	55,5 ± 21,5
IL-3	0,01207 ± 0,00561	57,4 ± 18,2	0,01398 ± 0,00542	49,6 ± 13,8
IL-6	0,03081 ± 0,00578	22,5 ± 3,1	0,01627 ± 0,00258	42,6 ± 5,8

Nach der Bestimmung der Zytokin-Stabilitäten sollte in weiteren Versuchen die Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren in Satzkultur untersucht werden. Aus der Bilanzierung der Wachstumsfaktorkonzentrationen mit und ohne zellulärem Verbraucher können dann die Verbrauchsrate der Wachstumsfaktoren bestimmt werden. Dazu wurden in $n = 2$ Ansätzen CD34⁺ Zellen in SCGM Medium mit der in Kapitel 8.2 bestimmten Zytokin-Mischung (SCF, IL-3, IL-6, G-CSF, jeweils 30 ng·mL⁻¹) kultiviert. An Tag 5 und Tag 10 der Satzkultivierung wurden Proben entnommen und bis zur weiteren Analyse mittels ELISA gefroren gelagert.

Die Gesamtzellzahlen der untersuchten Ansätze liegt an Tag 5 bei $1,56 \pm 1,47 \cdot 10^5$ Zellen an Tag 10 bei $2,7 \pm 0,5 \cdot 10^6$ Zellen. Die durchflußzytometrische Analyse der Zellen an Tag 10 der Kultivierung ergab einen Anteil der CD15⁺ neutrophil differenzierenden Zellen an der Gesamtzellpopulation von $68 \pm 5 \%$. Abbildung 8-17 zeigt die im Kulturüberstand mittels ELISA detektierten Zytokin-Konzentrationen. Die beiden Interleukine IL-3 und IL-6 werden nur in geringem Umfang verbraucht. Die Restkonzentrationen der beiden koloniestimulierenden Faktoren SCF und G-CSF sinken hingegen auf Werte von $< 30\%$ ihrer Ausgangskonzentrationen. Auffällig ist, daß an Tag 5 der Kultivierung mehr als die inokulierte Menge an IL-6 im Medium nachgewiesen werden kann. Hier könnte es sich um autokrine Sekretion des Wachstumsfaktors handeln. Anhand der oben bestimmten Zerfallskonstanten wird die zerfallende Menge an Zytokin bestimmt und diese mit den gemessenen Restkonzentrationen verglichen. Anhand dieser Daten kann ein Zytokin-Verbrauch ermittelt werden. Tabelle 8-13 faßt die Ergebnisse zusammen.

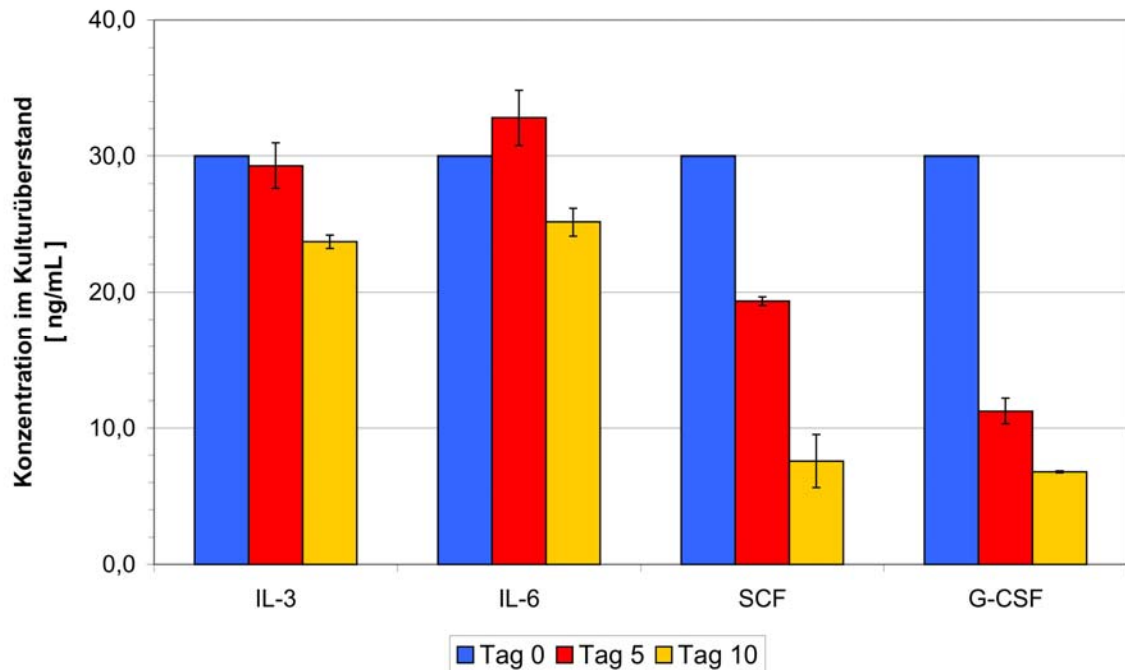


Abbildung 8-17: Endpunktbestimmung der Zytokinkonzentrationen von SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF an Tag 5 und Tag 10 nach Kultivierung

Tabelle 8-13: Mittlerer Zytokin-Verbrauch (10 Tage Kultivierung, ohne Zerfall)

	Verbrauch (ohne Zerfall) [ng]
IL-3	2,9 ± 0,5
IL-6	autokrine Bildung (3,0 ± 1,0)
SCF	2,6 ± 1,9
G-CSF	3,8 ± 0,1

Der Verbrauch an Zytokinen ist verglichen mit der eingesetzten Zytokinmenge deutlich geringer. Hierbei muß jedoch beachtet werden, daß, wie im Fall von IL-6 auch eine autokrine Sekretion der Zytokine erfolgen kann. Darüber hinaus ist auch denkbar, daß die Zellen Faktoren (z.B. lösliche Zytokin-Rezeptoren) sekretieren, die freie Zytokine in Lösung stabilisieren. Somit läge der tatsächliche Zytokinverbrauch höher als die oben berechneten Werte. Eine Limitierung an Wachstumsfaktoren kann also für die bis zu 10tägige, satzweise Kultivierung ausgeschlossen werden. Ein Nachfüttern von Zytokinen erübrigt sich hier.

Aus eigenen Versuchen ist bekannt, daß ein völliger Verzicht auf die beiden Zytokine IL-3 und IL-6 im Kultivierungsansatz einen negativen Einfluß auf die Expansion neutrophil differenzierter Zellen nach sich zieht. Untersuchungen von MAKINO et al. mit CD34⁺ Zellen aus peripherem Blut G-CSF mobilisierter erwachsener Spender kommen zu ähnlichen Ergebnissen [Makino S, 1997]. Der mäßige Verbrauch an IL-3 bzw. die autokrine Bildung von IL-6 legen jedoch nahe, die eingesetzte Zytokinmenge zu reduzieren. In entsprechenden Versuchen wurde die eingesetzte Menge an IL-3 und IL-6 von 30 ng·mL⁻¹ auf 5 ng·mL⁻¹ reduziert. Die Konzentrationen an SCF und G-CSF wurden bei 30 ng·mL⁻¹ belassen. Die mittlere Expansion (n=2 Versuche mit 6 Spendern) neutrophil differenzierter Zellen bei 10tägiger Kultivierung wird durch die Reduktion der IL-3 und IL-6 Menge nicht beeinflusst (Gesamtzellexpansionen: IL-3, IL-6 je 5 ng·mL⁻¹: 304 ± 126 fach vs. IL-3, IL-6 je 30 ng·mL⁻¹: 296 ± 116 fach).

8.6.2 Substratlimitierung & Metabolitinhibierung bei Satzkultivierung

Die wichtigste Voraussetzung für zelluläres Wachstum ist im Allgemeinen die Versorgung mit Wachstumssubstraten. Neben der Hauptquelle für Kohlenstoff, der Glukose, sind auch einige Aminosäuren essentiell wichtig für die Aufrechterhaltung der Proliferationsfähigkeit von Zellen. Überschreiten die Medienkonzentrationen von Stoffwechselmetaboliten (z.B. Laktat, Glutamat) einen gewissen Schwellenwert, so ist von einem inhibierenden Effekt dieser Moleküle zu rechnen. Mit den im Folgenden dargestellten Versuchen soll untersucht werden, inwieweit die Versorgung mit Nährstoffen über eine 10tägige Satzkultivierung gewährleistet ist bzw. die Anhäufung von Metaboliten eine Fütterung bzw. Verdünnung der Kulturen nötig machen.

CD34⁺ Zellen von wurden in SCGM Medium mit der in Kapitel 8.2 bestimmten Zytokin-Mischung (SCF, IL-3, IL-6, G-CSF, jeweils 30 ng·mL⁻¹) kultiviert (n=2). Die Kultivierung erfolgte satzweise über einen Zeitraum von 16 Tagen. Der zeitliche Verlauf der Gesamtzellzahl und der Vitalität einer Kultivierung sind in Abbildung 8-18 dargestellt. Exponentielles Wachstum wird über den Zeitraum von Tag 5 bis Tag 11 registriert. Mit Beginn der Plateau-Phase an Tag 11 geht auch die Vitalität der Zellen deutlich zurück.

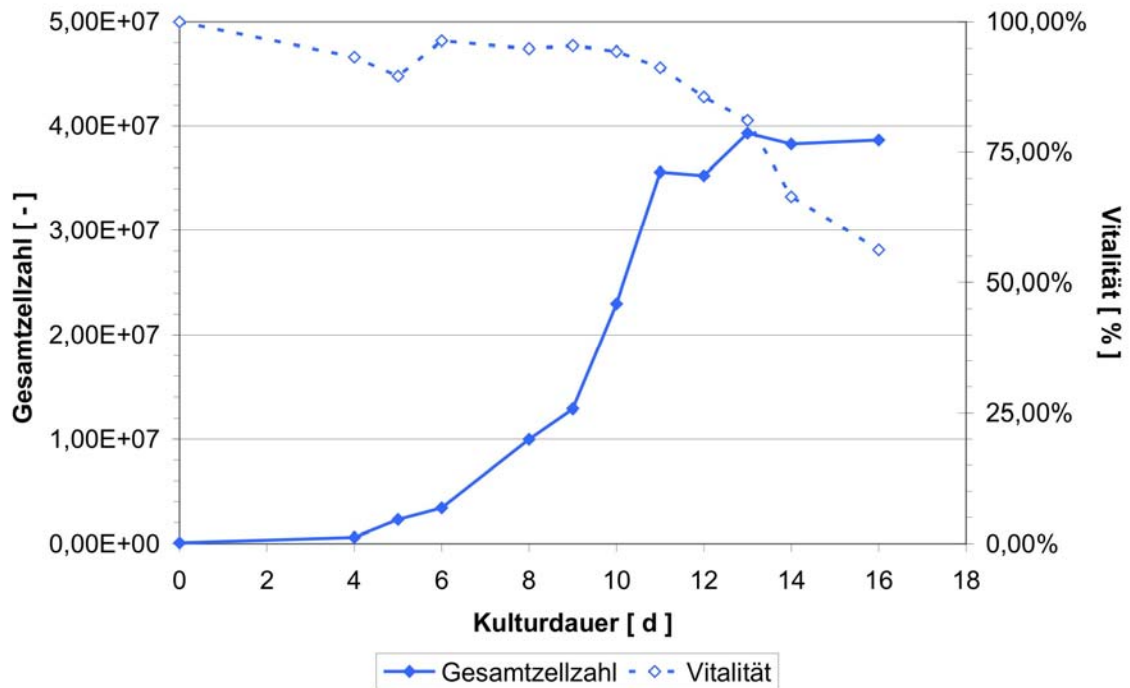


Abbildung 8-18: Verlauf von Gesamtzellzahl und Vitalität bei satzweiser Kultivierung (repräsentatives Kultivierungsergebnis)

Im Kulturüberstand wurden über den Kultivierungszeitraum die Konzentrationen an Glukose und der freien Aminosäuren bestimmt. Abbildung 8-18 zeigt den zeitlichen Verlauf für diejenigen Substrate, die über den Kultivierungszeitraum um mehr als die Hälfte der ursprünglichen Konzentrationen ausgezehrt werden. Zu diesen Substraten gehört die Glukose, deren Konzentration von 25 mM bis auf 5 mM abnimmt. Die Aminosäuren Serin und Glutamin werden bis zu einer Restkonzentration von 0,2 mM bzw. 0,7 mM im Medium verbraucht. Die Aminosäure Asparagin wird sogar bis unterhalb der Nachweisgrenze (0,01 mM) der HPLC basierten Aminosäure-Analyse konsumiert. Anhand der Konzentrationsprofile zeigt sich, daß das Ende der exponentiellen Wachstumsphase an Tag 11 und die Limitierungen der Aminosäurekonzentrationen zeitlich zusammentreffen. Die Glukose-Restkonzentration im Kulturüberstand beträgt zu diesem Zeitpunkt noch 11 mM und nimmt bis Tag 14 kontinuierlich bis auf 5,9 mM ab. Es ist daher auszuschließen, daß es sich um eine Glukoseabhängige Limitierung handelt.

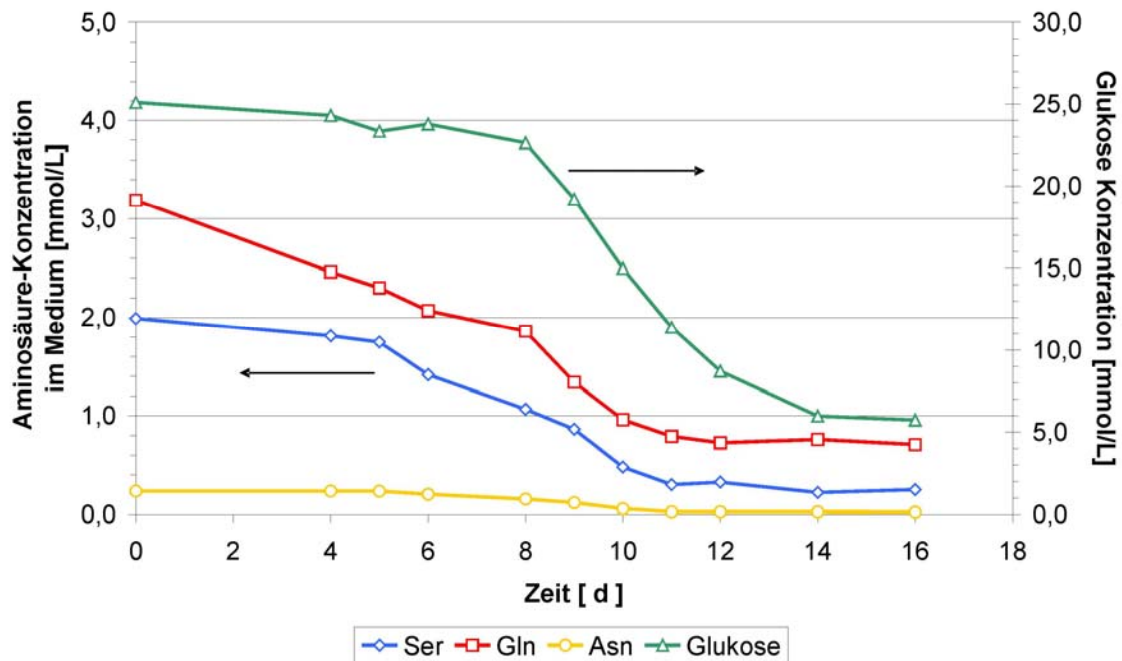


Abbildung 8-19: Substratverbrauch bei satzweiser Kultivierung

Neben den Limitierungen durch Substratverbrauch wurden auch die Bildung von wachstumshemmenden Metaboliten wie Laktat und Glutamat untersucht. Während Glutamat nur moderat von 0,6 bis auf 0,85 mM zunimmt, erreicht die Laktatkonzentration im Medium bereits an Tag 11 einen Wert von 26 mM und strebt im weiteren Verlauf der Kultivierung einem Maximalwert von 39 mM entgegen. Untersuchungen von OZTURK und CRUZ an Produktionszelllinien zeigten, daß ähnlich hohe Konzentrationen an Laktat den zellulären Stoffwechsel inhibieren können [Ozturk SS, 1990; Cruz HJ, 2000]. Darüber hinaus wird die Pufferkapazität des Mediums durch Freisetzung großer Mengen dieses sauren Metaboliten erschöpft.

8.6.3 Vergleich von Fütterungsstrategien

Die Analyse der satzweisen Kultivierung der CD34⁺ Zellen zu neutrophilen Zellen zeigt, daß bei den gewählten Bedingungen eine 10tägige Kultivierung der Zellen ohne zusätzliche Fütterungen möglich ist. Fütterungen stellen eine zusätzliche Manipulation an der Kultur dar, die den Kultivierungsablauf in der klinischen Anwendung komplizieren. Ab Tag 11 der Kultivierung stellen sich jedoch Substrat-Limitierungen und Inhibitionen durch akkumuliertes Laktat ein. Das Wachstum der Zellen wird dadurch negativ beeinflusst und in der späteren Folge auch die Vitalität der Zellen beeinträchtigt.

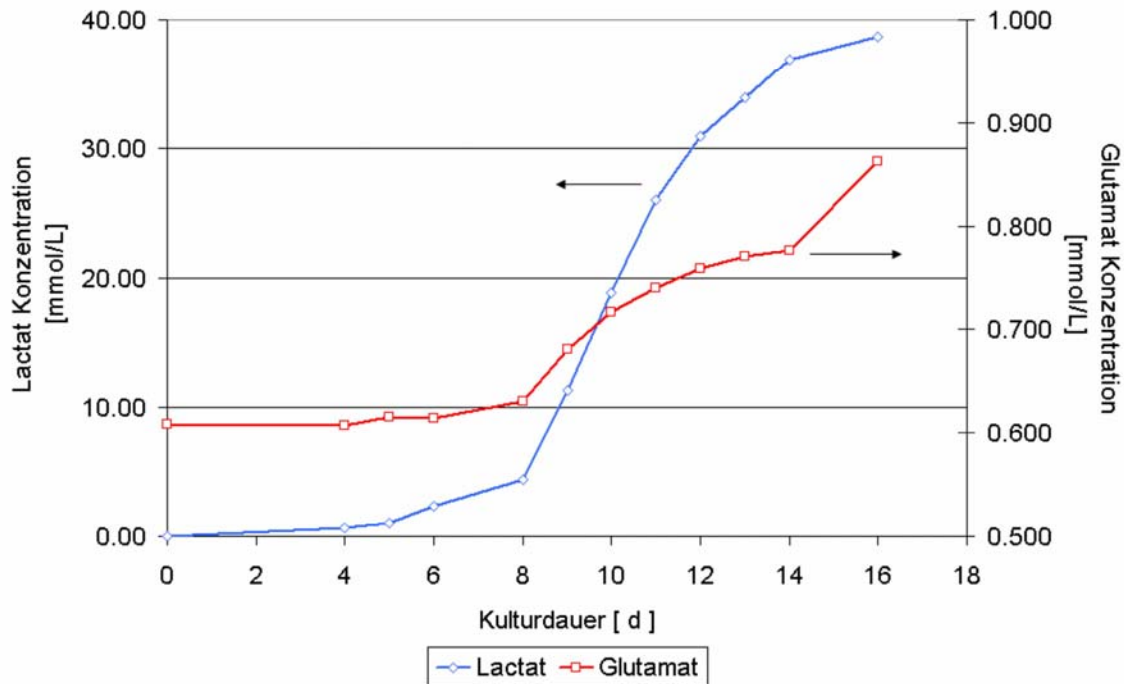


Abbildung 8-20: Anhäufung von Metaboliten im Kulturmedium bei satzweiser Kultivierung

Damit ist die mögliche Kultivierungsdauer in Satzkultur bei 11 Tagen beschränkt. Ebenso ist die maximale Zellexpansion begrenzt. Da sich jedoch das Proliferations-Potential der Zellen noch nicht erschöpft hat, soll versucht werden durch Fütterung ein Gleichgewicht von Substratversorgung und Metabolitverdünnung zu erhalten. In den folgenden Versuchen wird der Einfluß von verschiedenen Fütterungsstrategien untersucht. Alle Fütterungen werden mit Frischmedium inklusive Zytokinen durchgeführt und beginnen in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase (Tag 9-10). Verglichen werden einmalige Fütterungen mit unterschiedlich hoher Frischmedienzugabe und die intermittierende, zweitägige Fütterung mit einer satzweisen Kultivierung (Tabelle 8-14). Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 8-21 die sich ergebenden Kulturvolumina über die Zeit dargestellt.

Abbildung 8-22 zeigt den Zelldichteverlauf repräsentativer Ansätze über die Kulturdauer von 16 Tagen. Typischerweise erreichen Satz-Kulturen eine Zelldichte von $2,5\text{-}3,0 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ zwischen Tag 11 und Tag 12 und gehen, ohne eine stationäre Phase zu durchlaufen, direkt in die Absterbephase über. Die einmalig gefütterten Ansätze (A) zeigen ähnliche Verläufe von Zelldichten und Wachstumscharakteristik wie die ungefütteten Satzkulturen, allerdings ist das Ende der exponentiellen Wachstumsphase um 2 bis 3 Tage auf Tag 13-14 der Kultivierung verschoben.

Tabelle 8-14: Kulturparameter zur Untersuchung verschiedener Fütterungsstrategien

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Ausgangszell-dichte	$1 \cdot 10^4$ Z/mL ⁻¹
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Versuchsansätze	A Verdopplung des Kulturvolumens einmalig an Tag 10 B Verdopplung des Kulturvolumens an Tag 10, 12, 14 usw. C Verdünnen auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Z/mL an Tag 10 D Verdünnen auf eine Zelldichte von $3 \cdot 10^5$ Z/mL an Tag 10
Anzahl Replikate	n = 2
Kultursystem	Gewebekulturflasche T25
Kulturvolumen	10 mL
Kulturdauer	16 Tage

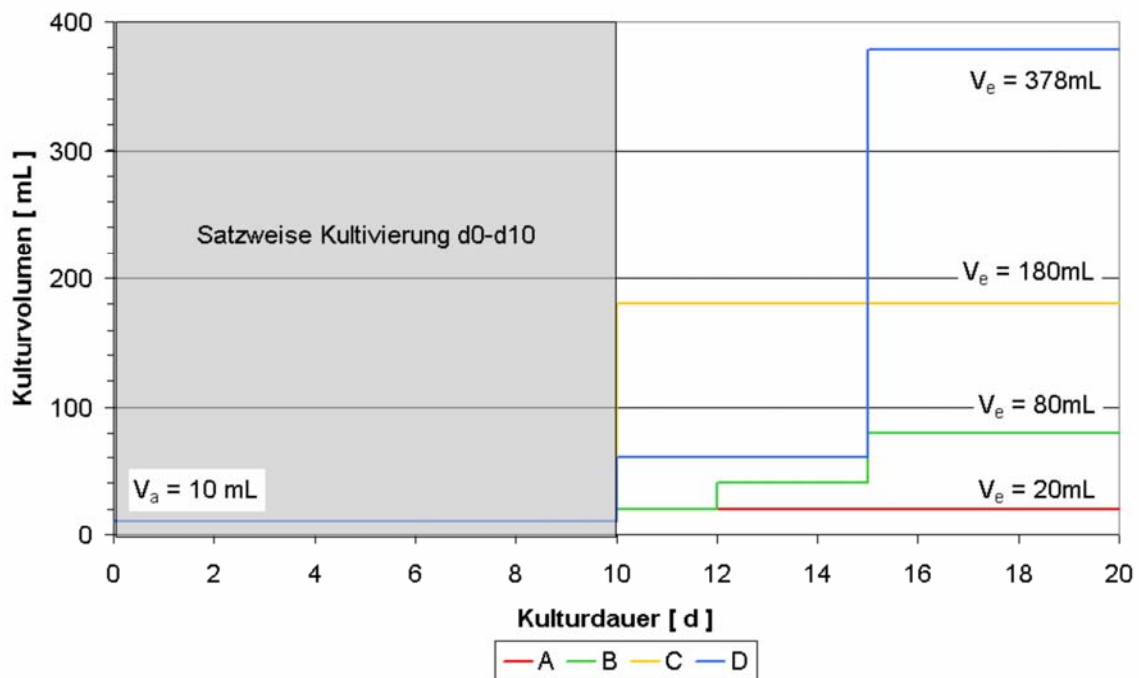


Abbildung 8-21: Resultierende Kulturvolumina im Vergleich unterschiedlicher, diskontinuierlicher Fütterungsstrategien

Satzweise Kultivierung über 10d in einem Ausgangsvolumen von $V_a = 10$ mL. Die resultierenden Endvolumina (V_e) der verschiedenen Fütterungsstrategien sind angegeben.

Durch Verdopplung des Kulturvolumens im zweitäglichen Rhythmus (Ansatz B) wurde die Zelldichte im zeitlichen Mittel annähernd konstant gehalten. In diesem Fall ist die Rate der Frischmediumzugabe in der gleichen Größenordnung wie die Wachstumsrate der Zellen in der Kultur. Das mathematische Mittel der Zelldichte liegt bei dieser Fütterungsstrategie quasi stationär bei $1,42 \pm 0,6 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Die Ansätze der Gruppe C wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bis auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^5 \text{ Z/mL}$ verdünnt und erreichen unter erneutem exponentiellem Wachstum bis Tag 16 eine vitale Zelldichte von $1,2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$. Das Fütterungsprotokoll D entspricht der Kultivierungsstrategie für die standardmäßige Kultivierung von Zelllinien. Hier werden die Zellen bis auf eine Zelldichte von $3 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit Frischmedium verdünnt. Dieser Vorgang wird bei Erreichen einer Zelldichte von ca. $2 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ wiederholt. Auch hier zeigt sich ein exponentielles Wachstum wie in dem niedriger verdünnten Ansatz. Da die Zellen jedoch bedingt durch das größere Inokulum bereits an Tag 15 eine Zelldichte von $1,8 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ erreichten wurde die Verdünnung auf $3 \cdot 10^5 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ zu diesem Zeitpunkt erneut vorgenommen. Während die Vitalitäten bei der satzweisen Kultivierung mit dem Ende des exponentiellen Wachstums konstant sinken, kann bereits in dem einmal an Tag 10 gefütterten Ansatz A die Vitalität der Zellen bis Tag 14 über 85% erhalten werden. Auch die drei anderen untersuchten Ansätze (B, C und D) erhalten die Vitalitäten über den gesamten Kultivierungszeitraum bei Werten von $\geq 90\%$.

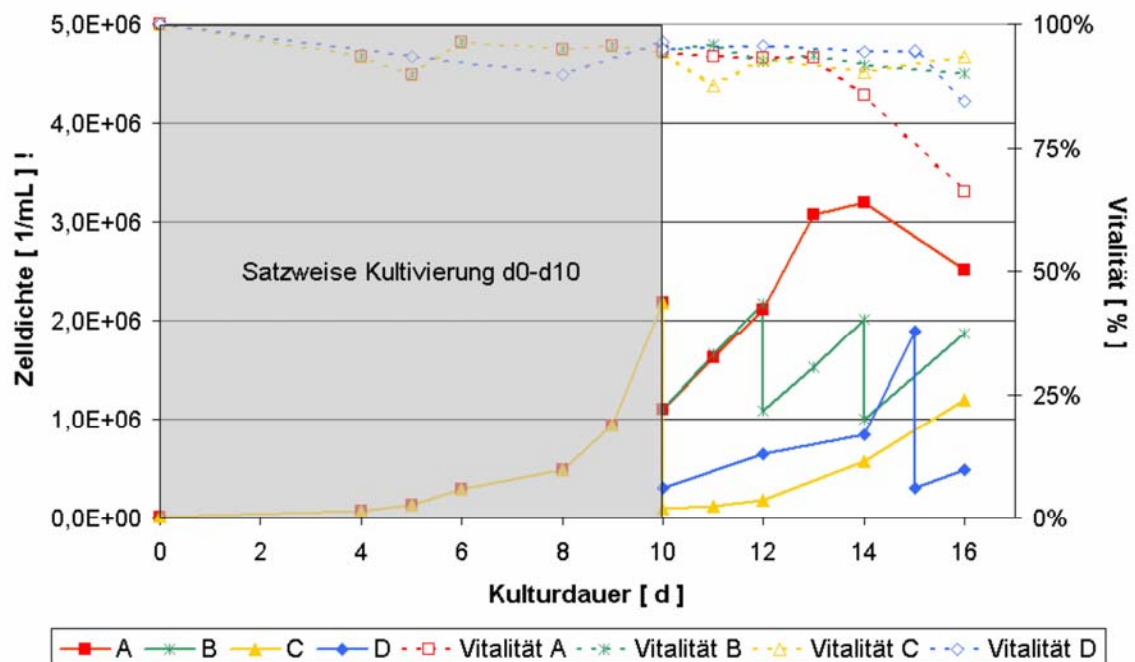


Abbildung 8-22: Vergleich des Zelldichteverlaufs bei verschiedenen Fütterungsstrategien (repräsentative Kurvenverläufe eines Kulturansatzes)

Die Fütterungen erfolgten unter Konstanthaltung des Kulturvolumens, was gleichzeitig eine Entfernung von Zellen aus dem Kulturansatz bedeutet. Die Gesamtzellexpansionen wurden am Ende der Kultivierung entsprechend den durchgeführten Verdünnungen extrapoliert. Die so ermittelten Gesamtzell-Expansionen sind in Tabelle 8-15 als Mittelwerte aller durchgeführten Replikate zusammengestellt.

Tabelle 8-15: Vergleich von Fütterungsstrategien: Gesamtzell-Expansionen (16 Tage Kultivierung)

Ansatz	Gesamtzell-Expansion	Volumen eingesetztes Medium	Produzierte Zellen pro mL Medium
A	438 ± 286	20 mL	2,2·10 ⁶
B	1.150 ± 420	80 mL	1,4·10 ⁶
C	3.310±1940	186 mL	1,8·10 ⁶
D	2.830 ± 934	422 mL	6,7·10 ⁵

Die größte Expansion innerhalb von 16 Tagen zeigt Ansatz C mit einer mittleren Gesamtzell-expansion um den Faktor 3310. Etwa 40% weniger Zellen liefert im Mittel der Ansatz D. Die intermittierende Fütterung (Ansatz B: zweitägliche Verdopplung des Kulturvolumens) ergibt nach 16 Tagen der Kultivierung nur eine Gesamtzell-expansion um den Faktor 1150. Der einmalig gefütterte Ansatz A erreicht nur Zellexpansionen um den Faktor 438. Die sich aus den Versuchs-replikaten ergebenden mittleren Gesamtzell-expansionen zeigen starke Schwankungen, teilweise um mehr als die Hälfte des Mittelwertes. Diese sind auf Spendervariabilitäten zurückzuführen, die sich um so mehr auswirken, je länger der Kultivierungszeitraum ist. Trotzdem sind die sich ergebenden relativen Abstufungen der verschiedenen Fütterungsstrategien unabhängig vom verwendeten Spenderpool. Große Unterschiede ergeben sich auch bei der Betrachtung der Medienausnutzung durch die Zellen. Hier wurde die pro mL eingesetzte Frischmediummenge produzierte Zellbiomasse bestimmt. Die einmalige Fütterung an Tag 10 der Kultivierung schneidet mit 2,2·10⁶ Z·mL⁻¹ relativ besser ab als die Ansätze, die über einen längeren Zeitraum die Proliferation der Zellen unterstützen. In diesem Ansatz ist jedoch die Kultivierungsdauer ebenso limitiert. Die Expansionsfähigkeit der Zellen nimmt also über die Zeit ab. Es zeigt sich, daß von den Ansätzen, die für eine längerfristige Kultivierung geeignet sind (B-D), Ansatz C die bessere Ausbeute an Zellen liefert.

Der Verbrauch der wichtigsten Substrate Glukose und Glutamin sowie die Bildung des Metabo-liten Laktat sind exemplarisch für eine Kultivierung in Abbildung 8-23 gezeigt. Während der Satzkultivierung beginnend vom Inokulum bis Tag 10 der Kultivierung nimmt der Glukosegehalt

im Medium von 25 mM auf 15 mM ab. Abhängig von der Menge zugegebenen Frischmediums steigt die Glukosekonzentration wieder auf Werte zwischen 20 mM (Ansätze A und B) und 24 mM (Ansatz C). Während die Glukose im einmalig an Tag 10 gefütterten Ansatz A bis auf 7 mM abnimmt, wird die Glukosekonzentration in den Ansätzen B bis D auf einem Niveau > 12 mM aufrecht erhalten. Die intermittierende, zweitägliche Fütterung erhält den Glukosegehalt des Mediums relativ konstant in einem Korridor zwischen 20 mM und 13 mM. Bei keinem der Ansätze kann davon ausgegangen werden, daß Glukose einen limitierenden Faktor darstellt. In Bezug auf die Anhäufung von Laktat im Medium verhalten sich die neutrophil differenzierenden Primärzellen analog zu bekannten Zelllinien. Bis Tag 10 erreicht die Laktatkonzentration im Medium einen Wert von 19 mM. Einzig durch die hohe Verdünnung der Kultur in Ansatz C kann der Laktatgehalt des Mediums bis Tag 14 der Kultivierung unterhalb von 10 mM gehalten werden. Alle anderen Fütterungsstrategien zeigen im Mittel deutlich höhere Laktatkonzentrationen im Medium. Der einmalig an Tag 10 gefütterte Ansatz A erreicht eine maximale Konzentration von 29 mM Laktat im Medium. Durch intermittierende Fütterung (Ansatz B) kann die produzierte Menge an Laktat nicht völlig ausverdünnt werden, weshalb im Mittel ein leichter Anstieg der Laktatkonzentration über den Kultivierungszeitraum zu verzeichnen ist. Für die Aminosäure Glutamin ergibt sich ein ähnliches Bild wie für die Glukose. Bereits durch die einmalige Fütterung an Tag 10 kann die Glutaminkonzentration im Medium auf einem Niveau von $> 1,2$ mM erhalten werden. Von Seiten des Glutaminbedarfs der Zellen ist eine zweitägliche Fütterung unnötig, was durch die ansteigenden Meßpunkte für Ansatz B zu erkennen ist. Auch die anderen untersuchten Fütterungsstrategien können die Glutamin-Konzentration im Medium auf Werten $> 1,3$ mM und darüber erhalten, so daß auch hier Limitierungen ausgeschlossen werden können. Das Glutamin-Konzentrationsprofil ergibt sich auch entsprechend für die Aminosäuren Serin und Asparagin. Tabelle 8-16 zeigt das Ergebnis der Endpunktbestimmungen an Tag 16 für die untersuchten Medienbestandteile aller durchgeführten Replikate.

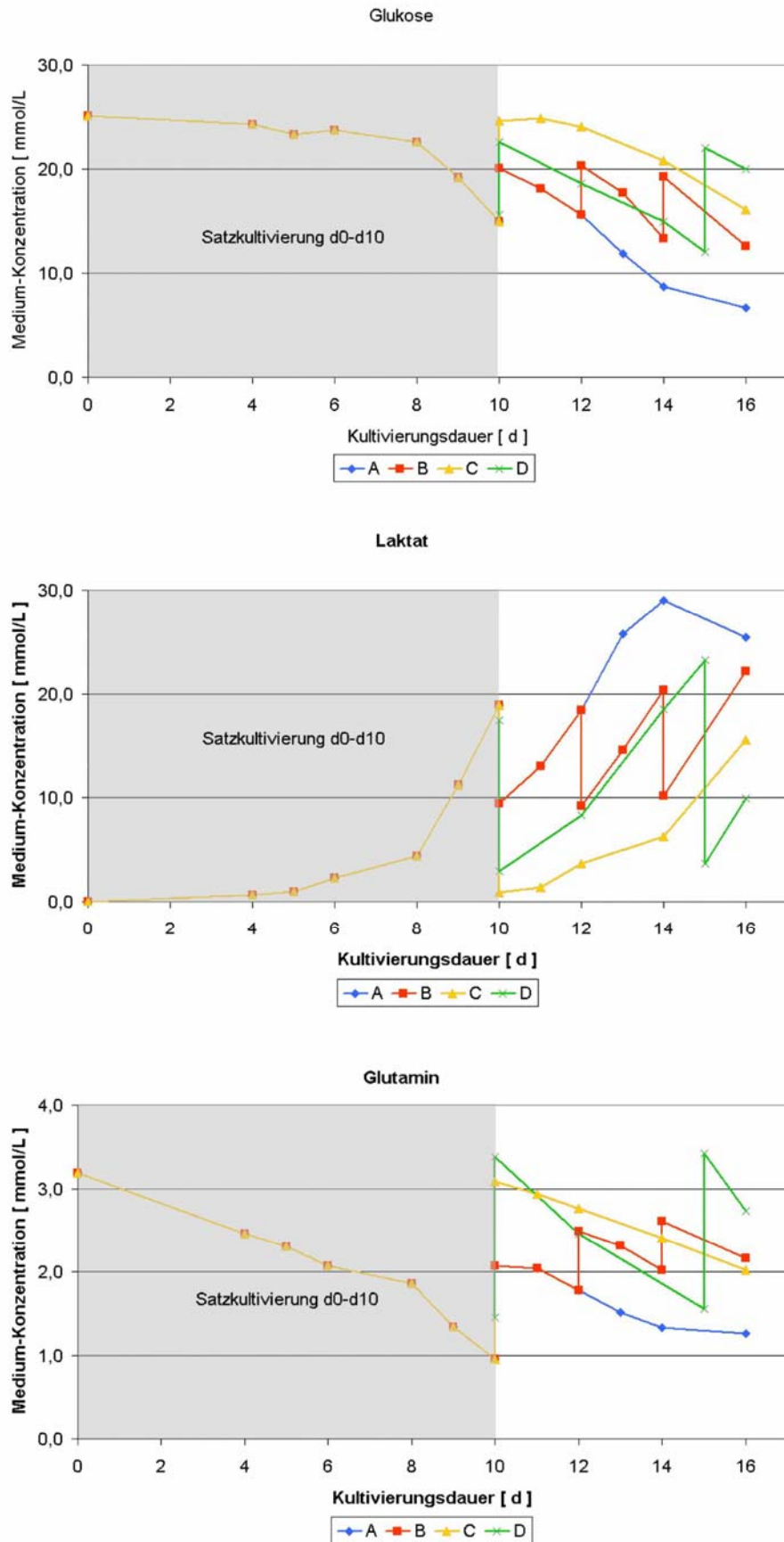


Abbildung 8-23: Vergleich von Fütterungsstrategien: Substratverbrauch und Bildung von Laktat

Tabelle 8-16: Vergleich von Fütterungsstrategien: Endpunktbestimmung der Medienkonzentration von Substraten und Metaboliten

Ansatz	Medium-Konzentration [mM]					
	Glukose	Laktat	Glutamin	Glutamat	Serin	Asparagin
Tag 0	25,0	0,0	3,0	0,0	1,20	0,20
A	9,4±3,9	24,5±1,4	1,1±0,2	0,5±0,01	0,3±0,2	0,05±0,05
B	14,6±2,9	19,2±4,1	0,8±0,2	0,4±0,05	0,5±0,5	0,1±0,01
C	15,6±18,9	14,8±10,3	0,6±0,9	0,4±0,5	0,5±0,7	0,09±0,1
D	18,5±2,1	12,2±3,1	1,2±0,01	0,7±0,02	0,2±0,04	0,9±0,01

8.7 Vergleich klinikrelevanter Kultur-Systeme

Für die Übertragung der bisher erzielten Ergebnisse in den therapeutischen Maßstab stellt sich die Frage nach einem geeigneten Kultivierungssystem, das sowohl die therapeutisch notwendige Zellzahl liefern kann, als auch den Anforderungen an Sterilität, geschlossener Kultivierung und Handhabbarkeit in der Klinik genügt. Bei Betrachtung der bisherigen Ergebnisse muß festgestellt werden, daß eine Kultivierung unter möglichst gleichbleibenden Umgebungsbedingungen wünschenswert ist. Insbesondere die notwendige Fütterung der Zellen zur Versorgung mit Wachstumsfaktoren und -substraten sowie der Verdünnung von inhibierenden Metaboliten und die genaue Einstellung von pH und Gelöstsauerstoff im Medium lassen den Einsatz von automatisierten Kultivierungssystemen sinnvoll erscheinen. Im klinischen Alltag und der Forschung ist bisher die unkontrollierte Kultivierung in T-Flaschen sowie in Teflon-Kulturbeuteln üblich. Entsprechend existiert auch eine Geräteinfrastruktur, die zumindest bei denbeutelbasierten Kultivierungen die Verarbeitung der Zellen von der Entnahme beim Spender bis zur Bereitstellung beim Empfänger im vollständig abgeschlossenen System gewährleistet. Dem gegenüber stehen diverse Formen von Suspensionsbioreaktoren. Die Spanne reicht vom einfachen Magnetklöppel-Spinner bis hin zu Reaktor-Systemen, die eigens für die Kultivierung von Zellen im therapeutischen Maßstab ausgehend von den geringen Zellzahlen einer Zellspende konzipiert sind. In der AG Zellkulturtechnik ist ein solches Suspensionsreaktorsystem entwickelt worden, das erfolgreich für die ex-vivo Expansion von T-Lymphozyten getestet werden konnte [Schmidt S, 2000, Hilbert U, 2001]. In diesem Versuch sollte geklärt werden, welches Bioreaktor-Konzept, insbesondere im Hinblick auf die Materialwahl, sich für die Skalierung der in vitro Generierung von neutrophilen Zellen in den klinischen Maßstab am besten eignet. Mit der T-Flaschen-Kultivierung wurden einerseits die Kultivierung in Teflonbeuteln und die Kultivierung in Glasgefäßen verglichen. Der Mini-Spinner diente hier als Modell für den Suspensionsreaktor, da er aus den gleichen Materialien (Reaktorgefäß: Borosilikatglas, Rührung: PTFE ummantelter

Magnetrührer) aufgebaut ist, jedoch mit deutlich geringerem Gesamt-Kulturvolumen auskommt. Um zu überprüfen inwieweit die Rührung einen Einfluß auf das Kultivierungsergebnis hat, wurden ebenso Ansätze verglichen, die keine Rührung enthielten, dafür jedoch auf der Schüttelplatte bewegt wurden. Die Parameter der Kultivierung sind in Tabelle 8-17 angegeben. Um gleiche Randbedingungen zu schaffen, wurden alle Ansätze unkontrolliert durchgeführt.

Tabelle 8-17: Kulturparameter zum Vergleich klinikrelevanter Kultursysteme

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Ausgangszelldichte	1 · 10 ⁴ Z · mL ⁻¹
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Versuchsansätze	Gewebekulturflasche T25 Teflon-Kulturbeutel Borosilikat-Glaskörper (Mini-Spinner) gerührter Mini-Spinner (30 rpm)
Anzahl Replikate	n = 2
Kulturvolumen	10 mL
Kulturdauer	8, 14 Tage

Abbildung 8-24 zeigt den Vergleich der erreichten Zellexpansionen in den verschiedenen Kultursystemen. Obwohl die Kultivierung im Teflonbeutel ähnlich hohe Expansionswerte der Gesamtzellexpansionen zeigt, ist bei der 14tägigen Kultivierung aufgefallen, daß die Zellen im Teflonbeutel sehr viel stärker zur Aggregation neigen als in der T-Flasche. Durch die unvermeidliche Faltenbildung sammeln sich die Zellen (statische Kultivierung) an den tiefsten Stellen des Beutels und haben so wesentlich weniger Platz zur Verfügung als die Zellen in der T-Flasche. Durch mehrmaliges Resuspendieren mit der Pipette konnten die Zellen jedoch wieder voneinander getrennt werden. Im Glasgefäß (Glasspinner nicht gerührt) ist die Expansionsfähigkeit der Zellen deutlich geringer als in den auf organischen Polymeren (PTFE bzw. PS) basierenden Kultivierungssystemen. Es zeigt sich, daß das verwendete Borosilikatglas sich nur bedingt für den Expansionsansatz von neutrophilen Zellen aus CD34⁺ Zellen eignet. Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen von LALUPPA et al. und SCHMIDT, die bei der Expansion von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen eine signifikant schlechtere Zellexpansion in Gegenwart von Glasmatrix feststellten [Laluppa JA, 1996; Schmidt S, 2000]. Quasi überhaupt kein Wachstum kann in den Glasspinnern mit zusätzlich installierter Rührung festgestellt werden. Ob diese Wachstumsdepression auf Materialeinflüsse aus dem eingesetzten Rührer (mechanisch bearbeitetes PTFE-Material) oder als direkte Konsequenz des durch die Rührung hervorgerufenen Scherstress zu sehen ist, konnte nicht letztgültig geklärt werden. Der Versuch zeigt klar, daß

noch erheblicher Bedarf für die Weiterentwicklung eines klinisch einsetzbaren Kultivierungssystems für Zellen im relevanten Volumenmaßstab besteht. Die untersuchten Kultivierungssysteme sind für den klinischen Maßstab nur unzulänglich für die *in vitro* Generierung von neutrophilen Zellen brauchbar. Geregelte und automatisierte Systeme (Spinner und Rührkessel) sind nicht in den für die Generierung von neutrophilen Zellen optimaleren organischen Polymermaterialien (PTFE oder PS) kommerziell erhältlich. Aber auch in dem am weitesten verbreiteten klinischen Kultivierungssystem, dem PTFE Kulturbeutel, müssen Lösungen gefunden werden, um eine Aggregatbildung der Zellen zu vermeiden.

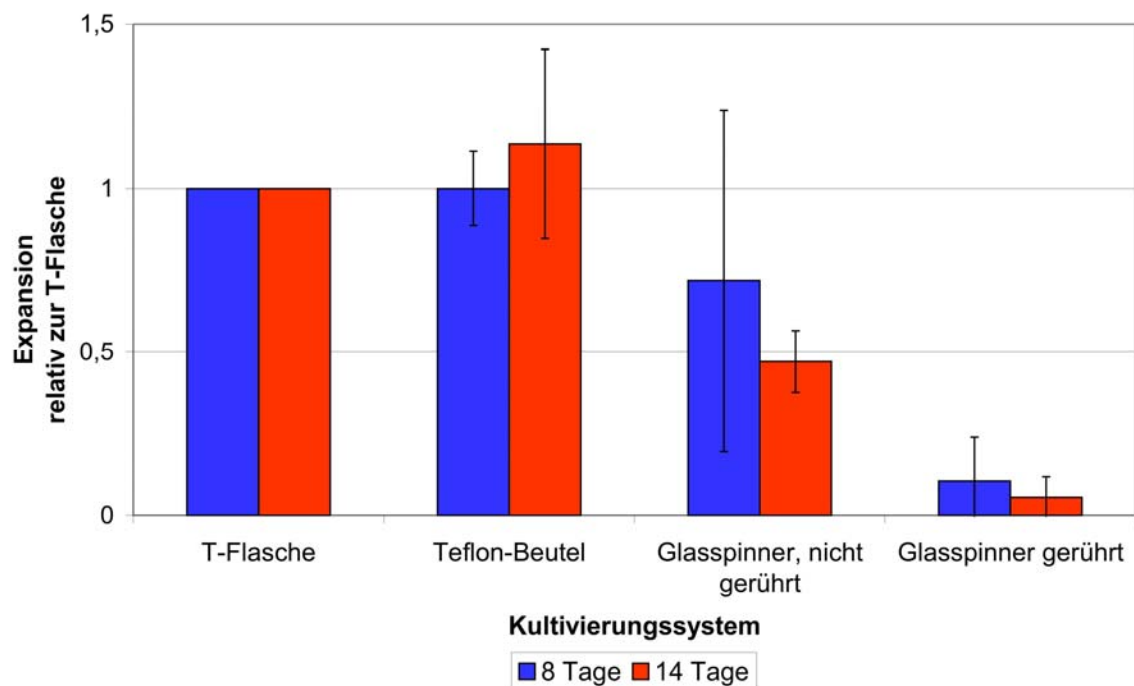


Abbildung 8-24: Vergleich klinikrelevanter Kultursysteme

8.8 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels

Die Einflüsse wichtiger biologischer und physiko-chemischer Prozeßparameter auf die Proliferation, Differenzierung und Reifung von neutrophilen Zellen aus CD34⁺ Zellen des Nabelschnurblutes wurden untersucht. Durch vergleichende Kultivierungen konnte aus einer Auswahl von 12 kliniktauglichen Kultivierungsmedien das Medium SCGM als optimales Medium für die gewünschte Anwendung identifiziert werden. Das Medium liefert in jedem Fall deutlich mehr Zellbiomasse als das in der Gruppe bereits bekannte und als Referenzmedium eingesetzte X-Vivo 10. Darüber hinaus stehen dem klinischen Einsatz der produzierten Zellen von Seiten des Herstellers keine Bedenken gegenüber. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine Supplementierung des Mediums mit kliniktauglichen, humanen Seren oder Serumkomponenten keinen meßbaren Vorteil gegenüber der serumfreien Kultivierung in SCGM bietet.

Der Vergleich der Literaturstellen zur ex vivo Expansion von neutrophilen Zellen bringt eine Reihe von Zytokinen hervor, die für die Kultivierung verwendet werden. Ein direkter Vergleich der Literaturstellen um die möglichst optimale Zytokin-Kombination zu identifizieren ist jedoch nicht möglich. Die weiteren Rahmenbedingungen der Kultivierungen (Medien, Fütterungsstrategien, Kulturdauer, Supplementierung des Mediums etc.) sind dafür zu verschieden. Aus diesem Grund wurde im standardisierten Kultivierungssystem ein Vergleich von verschiedenen Zytokinmischungen durchgeführt. Bereits das Ergebnis dieses Vergleichs hat zeigt, daß die Ausbeute an Zellen zwar in gewisser Weise mit der eingesetzten Menge an Zytokinen korreliert. Die notwendigen Zytokin-Qualitäten lassen sich jedoch auf relativ wenige „multi-lineage“ Zytokine (SCF und IL-3) sowie linienspezifische Zytokine (G-CSF, GM-CSF, IL-6) eingrenzen. Weitere Untersuchungen haben ergeben, daß die Verwendung von GM-CSF neben den neutrophilen Zellen auch Zellen der myelomonozytären Differenzierungslinie zum Wachstum stimulieren, was den Anteil an neutrophilen Zellen am Fermentationsprodukt schmälert. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen, die zur Expansion von neutrophilen Progenitoren an CD34⁺ Zellen aus mobilisiertem peripherem Blut durchgeführt wurden [Scheding S, 2000]. Weitere Versuche ergaben, daß eine ausreichende Wirkung auf Proliferation und neutrophile Differenzierung einer Mischung von SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF bei einer Einsatzmenge von jeweils 30 ng·mL⁻¹ gegeben ist. Es muß festgehalten werden, daß es eine „optimale“ Wachstumsfaktorzusammensetzung in der isolierten Suspensionskultur nicht geben kann. Die Zellen durchlaufen ein hochkomplexes biologisches Programm um von der Stammzelle zur ausgereiften Zelle zu differenzieren. Es ist eine allgemein anerkannte Annahme, daß sich die einzelnen Schritte der Hämatopoese genauso wie die unterschiedlichen hämatopoetischen Linien in distinkten Arealen des Knochenmarks stattfinden. Dabei liegt auf der Hand, daß die Anforderungen der Zellen an

ihre Umgebung - insbesondere an die Wachstumsfaktoren - sich ständig ändern. Diesen fortwährend sich wandelnden Bedarf der hämatopoetischen Zellen „optimal“ zu decken erreicht nur das stromale Netzwerk in vivo, das darauf spezialisiert ist, die hämatopoetischen Zellen in ihren Nischen zu umgeben und zu ernähren.

Die genaue Einstellung und Regelung von wichtigen physiko-chemischen Parametern wie pH-Wert und Gelöstsauerstoffkonzentration im Kultivierungsmedium ist seit langem Standard in der industriellen Zellkultivierung. Die Granulopoese findet im Knochenmark in Regionen statt, die weit von den Umgebungsbedingungen im Blutsinus entfernt sind [Hevehan DL, 2000]. In vitro wurden jedoch bisher keine Untersuchungen zum Einfluß der Parameter auf Wachstum und Differenzierung der Zellen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Durch Entwicklung des Mini-Spinners (siehe Kapitel 0) in dieser Arbeit ist es erstmals möglich vergleichende Kultivierungen mit verschiedenen pH und pO_2 Werten im Kultivierungsmedium für neutrophil differenzierende CB-CD34⁺Zellen durchzuführen. Mit einem Arbeitsvolumen von 20 bis 50 mL ist das System klein genug um die Kosten der Kultivierung zu begrenzen, es bleibt jedoch genügend Volumen für Probenahmen zur FACS-Analyse, die eine relativ hohe Gesamtzellzahl benötigen. Die ersten Versuche haben einen deutlichen Einfluß der beiden Prozeßparameter auf das Wachstum von neutrophilen Zellen aus CD34⁺ Zellen gezeigt. So liegt ein optimaler Gelöstsauerstoffwert bei 50%DO. Dies konkretisiert Ergebnisse, die unter unkontrollierten Medienbedingungen bei deutlich abgesenktem Sauerstoffanteil im Brutschrank bessere Expansionsergebnisse erzielen konnten als bei Kultivierung unter Atmosphärenbedingungen [Hevehahn DL, 2000]. Bei der Untersuchung des pH-Wertes wurde ein enges Fenster bei pH 7,3 identifiziert, innerhalb dessen die Proliferation der Zellen unterstützt wird. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den Untersuchungen von HEVEHAN et al., die über einen weiteren pH-Bereich Wachstum in allerdings unkontrollierten Ansätzen feststellten [Hevehahn DL, 2000]. Es ist anzunehmen, daß die unterschiedlichen Rahmenbedingungen der Versuche einen Grund für diese Abweichungen darstellen könnten (z.B.: Glas-Kulturgefäß vs. Gewebekulturflasche; pH Regelung über CO_2 im Zugas vs. Titration des Mediums mit HCl).

Um die kontinuierliche Versorgung der Zellen mit Wachstumssubstraten und -faktoren über einen längeren Zeitraum als 10-12 Tage zu gewährleisten, wurden wichtige Medien-Parameter, die zur Entwicklung von optimalen Fütterungsstrategien notwendig sind, untersucht. Es zeigt sich, daß für eine 10 bis 12 tägige Kultivierung der Zellen keine Fütterung notwendig ist. Bei längerdauernder satzweiser Kultivierung werden jedoch einige Aminosäuren (Glutamin, Serin, Asparagin) sowie die Kohlenstoffquelle Glukose in hohem Maße verbraucht bzw. vollständig ausgezehrt. Darüber hinaus sammeln sich große Mengen an Laktat an, das auf blutbildende Vorläuferzellen wachstumshemmend wirkt [Collins PC, 1998; Patel SD, 2000]. Es wurden

Fütterungsprotokolle untersucht, die auch eine längerfristige Kultivierung der Zellen ohne diese Limitierungen ermöglichen. Die untersuchten Fütterungsprotokolle unterscheiden sich stark in Bezug auf die maximal möglichen Zellexpansionen und Kultivierungsdauer. Welches Protokoll für eine endgültige klinische Anwendung zum Einsatz kommt, hängt daher stark davon ab, aus welchen Zelltypen das zelluläre Produkt zusammengesetzt sein soll.

Die Skalierung in größere Volumenmaßstäbe, die die Generierung therapeutisch relevanter Zellmengen ermöglichen, setzt ein geeignetes Kultivierungssystem voraus. Bei dem Vergleich verschiedener klinikrelevanter Kultivierungssysteme zeigten sich in Glasgefäßen im Vergleich zur Gewebekulturflasche und dem Teflon-Kulturbeutel erheblich geringere Zellexpansionen. Damit wird für neutrophil differenzierende Zellen ein Ergebnis bestätigt, das aus eigenen Arbeiten und Studien von LALUPPA et al. und SCHMIDT für hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen gefunden wurde. Die Expansion von CD34⁺ Zellen liefert in Glaskultursystemen deutlich schlechtere Ergebnisse als in konventionell in der Klinik eingesetzten kunststoffbasierten Einmal-Systemen [Schmidt S, 2000; Laluppa J, 1996]. Die Skalierung des erarbeiteten Kultivierungsprotokolls in Systeme, die auf Glaskörpern basieren, erscheint deshalb als nicht sinnvoll. Vor dem Hintergrund, daß die Generierung der klinisch benötigten großen Zellmengen (im Bereich von 10¹⁰ Zellen und mehr) nur unter kontrollierten Bedingungen möglich ist, tut sich hier eine Lücke in dem Bereich der großvolumigen Kultivierungssysteme für den klinischen Bedarf auf. Es existiert auf dem Markt kein vollständig kontrolliertes, als geschlossenes System zu betreibendes pH- und pO₂ geregeltes Kultivierungssystem, das vollständig aus zellkulturgetesteten Kunststoffen aufgebaut ist (Stichwort: „geregelter Einweg-Bioreaktor“). Systeme wie das Aastrom Repl-cell-Kultivierungssystem arbeiten ohne Kontrolle von Medienparametern automatisiert ein vorgegebenes Kultivierungsprotokoll ab [Koller MR, 1993]. Die Fütterungsrate kann so eingestellt werden, daß auch bei stark proliferierenden Zellen Limitierungen im Wachstum ausgeschlossen werden können. Dies könnte aber vor dem Hintergrund der hier gefundenen Ergebnisse nur eine Notlösung darstellen, da eine optimale Ausnutzung des teuren Kulturmediums nicht gewährleistet wäre und das System selbst hohe Investitions- und Verbrauchsmaterialkosten verursacht.

9 Charakterisierung der aus CB-CD34⁺ ex vivo generierten Zellen

Mit den in Kapitel 1 erarbeiteten Kultivierungsparametern ist es möglich, CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut zu neutrophil differenzierenden Zellen in vitro zu expandieren. Durch ein entsprechendes Fütterungsprotokoll können die Kultivierungsbedingungen auch über einen längeren Zeitraum hinweg so gestaltet werden, daß eine optimale Balance zwischen dem Verbrauch von Wachstumssubstraten und der Bildung von Metaboliten erreicht werden kann. Da somit die „technischen“ Voraussetzungen für eine Kultivierung geschaffen wurden, soll nun die Biologie des Systems im Vordergrund der Untersuchungen stehen. Für die Anwendung der Zellen ist es von großer Bedeutung wie groß ihr Teilungspotential nach Kultur noch ist, ob und wann die in vitro generierten Zellen ihren funktionalen Status erreichen und welche Zelltypen zu welchem Zeitpunkt der Kultivierung vorherrschen. Dazu soll im Folgenden die Wachstumscharakteristik, die Expressionsprofile phänotypischer Marker und typischer Morphologien myeloider Zellen in in vitro Kultur unter Anwendung des erarbeiteten Kultivierungsprotokolls bestimmt werden. Aus diesen Daten soll sich das Zeitfenster ergeben, innerhalb dessen eine Kultivierung sinnvoll durchgeführt werden kann.

9.1 Proliferationsfähigkeit

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Proliferationsfähigkeit neutrophiler Vorläuferzellen im Knochenmark mit fortschreitendem Differenzierungsprozeß abnimmt und in den Reifestadien der Neutrophilen ganz zum Erliegen kommt. Es stellt sich jedoch die Frage, wie sich dieser Prozeß unter den gewählten Kulturbedingungen in vitro abbildet. In Langzeitversuchen wurden CD34⁺ Zellen mit den in Tabelle 9-1 angegebenen Kultivierungsparametern bis zum Eintreten der zellulären Seneszenz kultiviert.

Abbildung 9-1 zeigt den typischen Zelldichteverlauf einer Kultivierung über einen Zeitraum von 40 Tagen. Die Proliferationsfähigkeit der Kultur bleibt bis etwa Tag 25 erhalten. Danach setzt die replikative Seneszenz der Zellen ein. Bis zu diesem Zeitpunkt erhält sich die Vitalität der Zellen auf einem Niveau von $\geq 85\%$. Danach sinkt die Vitalität der Zellen kontinuierlich bis auf $< 50\%$ an Tag 42. Zur näheren Charakterisierung dieses Wachstumsverhaltens wurden für zwei Langzeitkultivierungen in Intervallen von 10 Tagen die mittleren und maximalen Wachstumsraten ermittelt (Tabelle 9-2).

Tabelle 9-1: Kulturparameter für die Langzeitkultivierung

Zellen	CD34 ⁺ Zellen aus CB, 3 Spender
Medium	SCGM Medium
Ausgangszell-dichte	1·10 ⁴ Z·mL ⁻¹
Wachstumsfaktoren	SCF, IL-3, IL-6, G-CSF
Anzahl Replikate	n = 2
Kultursystem	Gewebekulturflasche T25
Kulturvolumen	10 mL
Kulturdauer	bis zu 42 Tage
Fütterung	Verdünnen der Zellsuspension mit Frischmedium (Endzell-dichte: 1-3·10 ⁵ Z·mL ⁻¹) wenn eine Zell-dichte > 1,8·10 ⁶ Z·mL ⁻¹ im Versuchsansatz erreicht ist

Die Werte für die Wachstumsraten nehmen über den gesamten Kultivierungszeitraum kontinuierlich ab. Entsprechend steigen die Verdopplungszeiten von etwa einer Verdopplung pro Tag (Tag 6-8 der Kultivierung) bis über 96 Stunden (Tag 22-28 der Kultivierung).

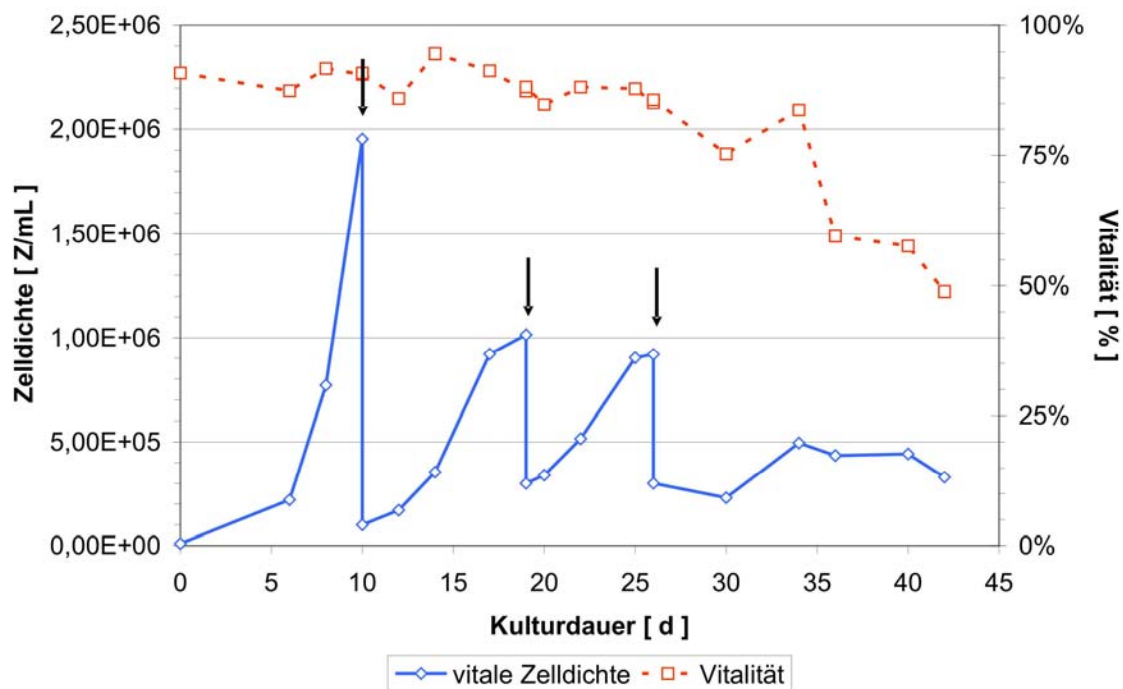


Abbildung 9-1: Zelldichte- und Vitalitätsverlauf bei Langzeitkultivierung

Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten erfolgte Zugabe von Frischmedium und damit eine entsprechende Verdünnung der Zelldichte

Tabelle 9-2: Spezifische Wachstumsraten bei Langzeitkultivierung

	Tag 0-10	Tag 10-20	Tag 20-30
maximale Wachstumsrate μ_{\max} [h ⁻¹]	0,0257 ± 0,0006	0,0209 ± 0,0079	0,0072 ± 0,0021
mittlere Wachstumsrate μ [h ⁻¹]	0,0210 ± 0,0018	0,0123 ± 0,0042	0,0055 ± 0,0024
minimale Verdopplungszeit [h]	27,0 ± 0,1	33,2 ± 2,2	96,6 ± 2,9
mittlere Verdopplungszeit [h]	32,9 ± 0,5	56,3 ± 2,5	126,4 ± 4,9

Bei den gegebenen Kulturparametern erstreckt sich also ein sinnvolles Zeitfenster für die Kultur bis zu Tag 20 bis 25 nach dem Inokulum der CD34⁺ Zellen. Danach erschöpft sich die Proliferationsfähigkeit der Zellen. Auch die Vitalität der Zellen kann nicht lange über diesen Zeitraum hinaus aufrecht erhalten werden.

9.2 Phänotypisierung

Die inokulierten CD34⁺ Zellen stellen eine heterogene Population dar. Die Population enthält einen Teil der hämatopoetischen Stammzellen aber auch Zelltypen, die ihr Selbsterneuerungspotential bereits verloren haben und sich einer der myeloiden Differenzierungslinien zuordnen. Durch das angewendete Kultivierungsprotokoll, insbesondere durch die Wahl der Wachstumsfaktoren, wird die Proliferation und Differenzierung der neutrophilen Zellen gefördert. Die pleiotropen Effekte der Hämatopoietine bewirken jedoch auch bei anderen myeloiden Zelltypen eine, wenn auch nicht optimale, Stimulation des Wachstums. Insbesondere die myelomonozytären Zellen sind hier zu nennen, da sie über weite Strecken der zellulären Entwicklung aus den gleichen Vorläuferzellen wie die neutrophilen Granulozyten hervorgehen. Die oben gezeigte Wachstumsdynamik der Gesamtzellpopulation einer Langzeitkultivierung könnte sich nun homogen für alle enthaltenen Zelltypen gleich verhalten oder eine „Summenfunktion“ sich überlagernder Wachstumscharakteristiken der verschiedenen proliferierenden, differenzierenden und reifenden Zelltypen sein. Zur weiteren Aufklärung und Charakterisierung der ex vivo expandierten Zellbiomasse wurden die wichtigsten Markerantigene der neutrophilen und der monozytären Differenzierung auf den generierten Zellen immuncytometrisch über den Zeitraum einer 40tägigen Kultivierung vermessen.

In

Abbildung 9-2 ist die zeitliche Entwicklung der Markerantigene CD15, CD11b, CD14 und HLA-DR bezogen auf die Gesamtzellexpansion beginnend mit Tag 10 bis Tag 40 der Kultivierung

dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Anteil der Zellen, die das neutrophile Markerantigen CD15 tragen, an Tag 15 sein Maximum erreicht. Beginnend mit der Probe von Tag 20 nimmt der Anteil der Zellen, die diesen Marker deutlich exprimieren ab. Im Gegensatz dazu nimmt die Expression des Reifungsmarkers CD11b, der auf neutrophilen wie auf monozytären Zellen exprimiert wird, mit längerer Kultivierungsdauer zu. CD11b wird bei neutrophilen Zellen erst ab dem Stadium des Myelocyten zusammen mit CD15 koexprimiert, bei monozytären Zellen hingegen wird CD11b mit Beginn der Differenzierung ohne CD15 exprimiert. Das Antigen CD14 ist ein klassischer Marker von Monozyten, es wird jedoch in geringem Umfang auch auf neutrophilen Zellen exprimiert. Die expandierten Zellen zeigen eine eindeutig positive, aber schwache Expression von CD14 an Tag 10 (zwischen der ersten und zweiten Dekade der logarithmischen Skala relativer Fluoreszenzintensität). Diese verschiebt sich jedoch, insbesondere ab Tag 20 der Kultivierung zu höheren Intensitäten. Der ebenfalls bevorzugt auf Monozyten und frühen granulomonocytyären Vorläuferzellen exprimierte Marker HLA-DR wird ab Tag 10 der Kultivierung auf einem wachsenden Anteil von Zellen exprimiert. Durch Methylcellulose-Assays, die auf biologische Weise koloniebildende Progenitorzellen nachweisen können, ist gezeigt, daß ab Tag 12 bis 15 der Kultivierung der Anteil dieser Zelltypen an der Gesamtzellzahl verschwindend gering ist (< 1%). Die HLA-DR exprimierenden Zelltypen sind also nicht den Vorläuferzellen, sondern eher der monozytären Differenzierung zuzuordnen.

Anhand dieser Ergebnisse kann vermutet werden, daß es sich bei der Wachstumscharakteristik der Gesamtzellpopulation um eine Überlagerung des Wachstums von neutrophilen und monozytären Zelltypen handelt. Beide Zelltypen sind terminal ausreifende Zellen, d.h. nach Beendigung des Differenzierungs- und Reifungsprogramm sind sie nicht mehr teilungsfähig. Typische Monozyten-Antigene (CD14, HLA-DR) tauchen in der Kultur erst zu späteren Zeitpunkten auf, was bedeuten könnte, daß unter den gegebenen Kulturbedingungen neutrophile Zellen rasch und in großer Anzahl gebildet werden und das Differenzierungsprogramm bis zur Reife (und damit dem Proliferationsstopp) durchlaufen. Monozytäre Zellen, die von den zugegebenen Wachstumsfaktoren weniger gut unterstützt werden, würden langsamer wachsen, träten aber später in den Proliferationsstopp und könnten dadurch ihren Anteil an der Gesamtzellpopulation für längere Kultivierungszeiträume kontinuierlich erhöhen.

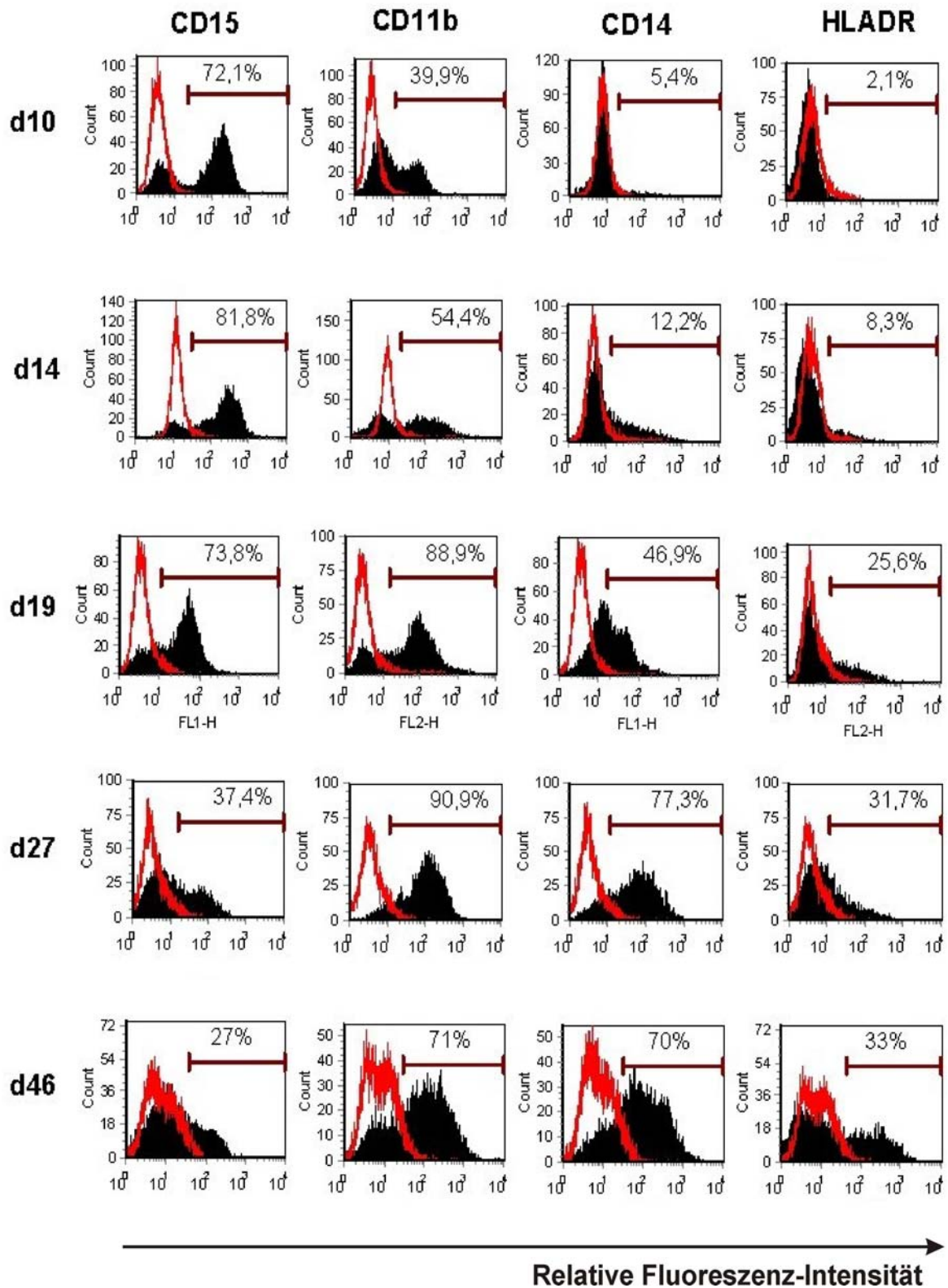


Abbildung 9-2: Expression neutrophiler und monozytärer Markerantigene über einen Kultivierungszeitraum von > 40 Tagen

Zur näheren Überprüfung der Vermutung sollen die Zellen einer Kultivierung an Tag 10 nach dem Inokulum immunphänotypisch charakterisiert und in neutrophil differenzierende und nicht neutrophil differenzierende Zellen aufgetrennt werden. Als Sortierkriterium dient das Differenzierungsantigen CD15. Durch parallele Kultivierung und weitere Charakterisierung können unterschiedliches Proliferationsverhalten und Markerexpression eindeutig einer der beiden Zellgruppen zugeordnet werden. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob die Population der CD15⁻CD11b⁻ im Verlauf der weiteren Kultivierung neutrophile oder monozytäre Zellen hervorbringt.

An Tag 10 einer Kultivierung wurde die gesamte Zellpopulation mit Hilfe des MACS-Selektionssystems nach dem Antigen CD15 aufgetrennt. Das Verfahren ist prinzipiell vergleichbar mit der Aufreinigung von CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut. Zur Verbesserung der Reinheit der CD15⁺ und CD15⁻ Populationen wurde die magnetische Separation für beide Ansätze zweimal durchgeführt. Das Separationsergebnis ist in Abbildung 9-3 gezeigt. Der Anteil an neutrophil differenzierenden Zellen in der Ausgangszellpopulation beträgt 76,3%. Die unreiferen CD15⁺CD11b⁻ Zellen (Promyelozyten, Myelozyten) machen dabei 44,7%, die weiter differenzierteren CD15⁺CD11b⁺ Zellen (Metamyelozyten) einen Anteil von 31,6% der Gesamtzellzahl aus. Etwa 4% der Zellen sind zu diesem Zeitpunkt dem monozytären Differenzierungsmuster zuzuordnen (CD15⁻CD11b⁺) und ein Fünftel der Zellen (19,4%) exprimiert keinen der beiden Differenzierungsmarker.

Nach der zweifach durchgeführten magnetischen Separation konnte eine gute Trennung zwischen CD15⁺ und CD15⁻ Zellen erreicht werden. Die durchflußzytometrisch bestimmte Reinheit der CD15⁻ Zellfraktion beträgt 99,5%, die der CD15⁺ Zellfraktion 93,6%. Es zeigt sich, daß durch die magnetische Separation in der Fraktion der CD15⁺ Zellen bevorzugt reifere Zelltypen mit dem Immunphänotyp CD15⁺CD11b⁺ angereichert werden. Ihr Anteil an der resultierenden Zellpopulation beträgt 75,6%. Dies könnte einerseits mit einer etwas höheren Expression von CD15 und damit mehr gebundenen supramagnetisch markierten Antikörpern an diesen Zelltypen erklärt werden. Es ergibt sich in der nach CD15 separierten Population ein Verhältnis von CD15⁺CD11b⁺ Zellen zu CD15⁺CD11b⁻ Zellen von ca. 4:1, während es in der Ausgangszellpopulation bei 3:2 liegt (Abbildung 9-3). Die Zellen beider Fraktionen wurden parallel unter gleichen Kulturbedingungen weiterkultiviert. Eine Referenzprobe von unbehandelten und mit supramagnetischen Separationsantikörper behandelten - aber nicht separierten - Zellen zeigte, daß das Separationsverfahren selbst keinen Einfluß auf das Kultivierungsergebnis hat (Daten nicht gezeigt).

An Tag 16 erfolgte erneut eine immunocytochemische Analyse der Zellen. Die Zellen der CD15⁺ Fraktion haben alle im Verlauf der weiteren Kultivierung den Marker CD11b angenommen, sind also in ihrer Differenzierung weiter vorangeschritten und haben das Stadium der Metamyelozyten überschritten. Die Fluoreszenzintensität der mit anti-CD15-FITC markierten Zellen hat interessanterweise von Tag 10 bis Tag 16 deutlich abgenommen. Wird die Fluoreszenzintensität aller CD15⁺ Zellen an Tag 10 noch in der 3. Dekade detektiert, so sind an Tag 16 bereits ein Teil der Zellen in der 2. Dekade und darunter zu identifizieren. Ein Anteil von 11,7% der Zellen ist als CD15⁻CD11b⁺ einzustufen. Nur durch die zuvor an Tag 10 erfolgte Aufreinigung nach CD15 und Charakterisierung der Zellen ist es möglich, diese Zellen als neutrophil differenzierte Zellen zu identifizieren. Bei Vermessung einer nicht separierten Gesamtzellpopulation wären diese Zellen nicht von monozytär differenzierenden Zellen (Immunophänotyp: CD11b⁺ aber CD15⁻) zu unterscheiden. Die CD15⁻ Zellfraktion zeigt an Tag 16 der Kultivierung einen sehr diversen Immunophänotyp. Ein Anteil von 71,6% der resultierenden Zellen ist neutrophil differenziert und hat den Marker CD15 exprimiert. 31,4% der Zellen sind auch schon in den späteren Phasen der Differenzierung angelangt und exprimieren zusätzlich zu CD15 auch CD11b auf ihrer Zelloberfläche. Im Gegensatz zu dem Bild, das sich an Tag 10 der Kultivierung bietet, ist an Tag 16 ein größerer Anteil von 11,4% der Zellen dem monozytären Differenzierungsmuster mit dem Phänotyp CD15⁻CD11b⁺ zuzuordnen.

Um zu überprüfen, ob die ex vivo expandierten Zellen der CD15⁺ Zellfraktion tatsächlich in den finalen Reifungsprozeß eingetreten sind, wurde versucht den Marker CD16 immunocytochemisch auf den Zellen nachzuweisen. CD16 ist als Marker von reifen neutrophilen Granulozyten im peripheren Vollblut beschrieben [Elghetany MT, 2002]. Die Expression von CD16 konnte auf den Zellen allerdings nicht nachgewiesen werden, weshalb auf die morphologische Analyse der Zellen zurückgegriffen wurde. Die Zellen der CD15⁺ Fraktion wurden an Tag 16 der Kultivierung auf einem Objektträger fixiert und mittels May-Grünwald-Giemsa gefärbt. In dem Präparat können eindeutig Zellen mit der charakteristischen Kernfaltung von polymorphkernigen Granulozyten identifiziert werden (Abbildung 9-4).

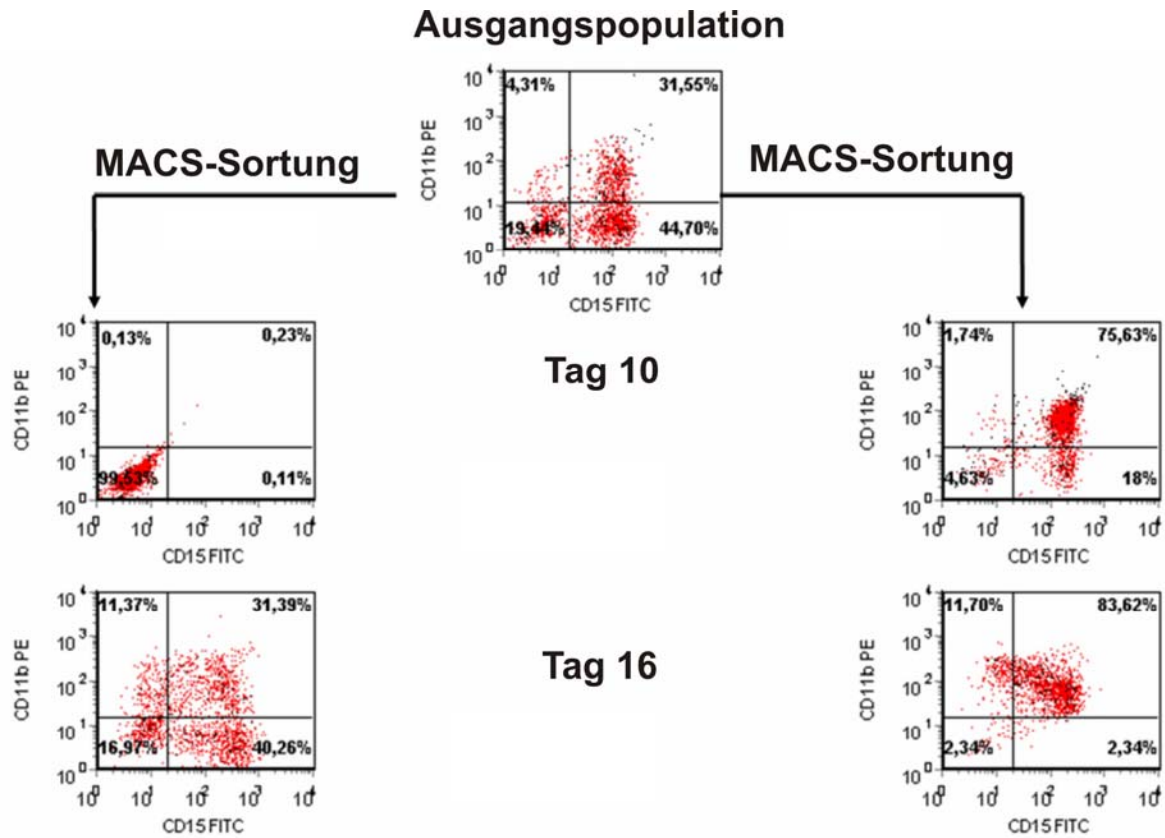


Abbildung 9-3: Separation nach CD15

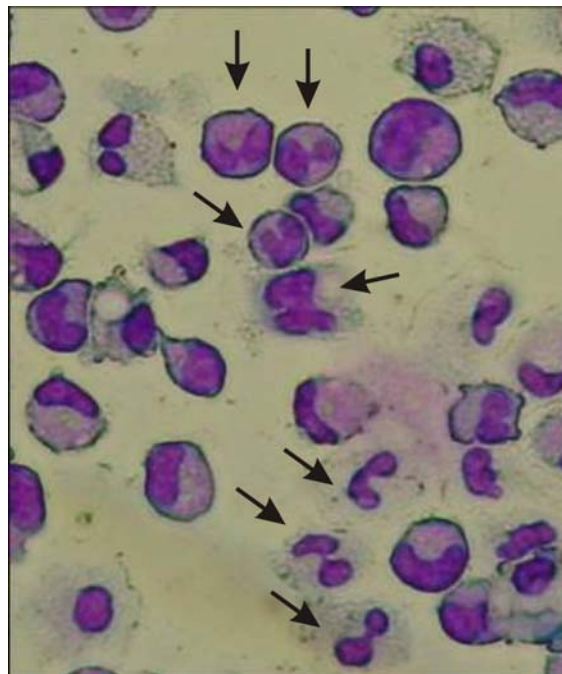


Abbildung 9-4: Zellen der CD15⁺-Fraktion an Tag 16 der Kultivierung (May-Grünwald-Giemsa-Färbung), eindeutig identifizierbare, segmentierte Kerne von reifen Granulozyten sind gekennzeichnet)

9.3 Funktionale Charakterisierung

Neben der eindeutigen Charakterisierung des immunologischen und morphologischen Phänotyps der Zellen ist für die Anwendung natürlich von großem Interesse, ob die ex vivo expandierten Zellen auch einen funktionalen Status erreichen. Nur wenn die ex vivo expandierten Zellen in der Lage sind, ihre biozide Funktion aufzunehmen und gegen mikrobielle Targets zu richten, sind die kultivierten Zellen auch von therapeutischem Nutzen. Im folgenden werden Populationen von ex vivo expandierten Zellen, die an Tag 10 der Kultivierung nach CD15⁺ aufgetrennt und weiterkultiviert wurden (sh. Kap. 9.2), untersucht. Dabei wird die Ausstattung der Zellen mit funktionell wichtigen Proteinen qualitativ mit Hilfe der Immunzytometrie bestimmt. Die Überprüfung komplexer zellulärer Effektor-Leistungen erfolgt am Beispiel der Phagozytose und der Sauerstoff-Freisetzung aufgrund unterschiedlicher mikrobieller Stimuli.

9.3.1 Ausstattung mit funktionalen Proteinen

Unabdingbare Voraussetzung für das Funktionieren der Zellen ist die Ausstattung der Zellen mit den bioziden Effektorproteinen. Die Effektorproteine lassen sich zwei Funktionskreisen, den sauerstoffabhängigen und den sauerstoffunabhängigen Reaktionen zuordnen. Zu den Proteinen, die die sauerstoffunabhängigen Reaktionen vermitteln, gehören eine Vielzahl lytischer Enzyme. Sie nehmen die Permeabilisierung und den Abbau von mikrobiellen Strukturen, wie der Zellwand oder Zellmatrixbestandteilen vor. Die Sauerstoffabhängigen Enzyme konvertieren in einer Reihe von Reaktionen molekularen Sauerstoff zu reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die starke biozid und desintegrierende Wirkung haben.

Hier werden stellvertretend für die Proteinklasse der sauerstoffunabhängigen Reaktionen die Enzyme Lysozym und Lactoferrin nachgewiesen. Lysozym - auch Muramidase genannt - spaltet spezifisch den Bakterienzellwandbestandteil Muramin zu Disacchariden und permeabilisiert damit die Zellwand des Bakteriums. Das Enzym Lactoferrin gehört zur Familie der Eisenbindenden und -transportierenden Proteine. Seine biozide Funktionalität im neutrophilen Granulozyten wird auf seine starke Bindungsaffinität zu Eisenionen zurückgeführt, die für Proliferation und Adhäsion von Mikroorganismen unabdingbar sind. Als zentrales Enzym der sauerstoffabhängigen Reaktionen wird der Nachweis auf die Myeloperoxidase geführt. Sie setzt das relativ schwach biozide Wasserstoffperoxid mit Halogeniden und Pseudohalogeniden zu ROS um, die hochgradig biozid wirken.

In der Abbildung 9-5 ist das Ergebnis der immunzytometrischen Analyse für zwei unabhängige Experimente gezeigt. Das zentrale Enzym der sauerstoffabhängigen Reaktionen, die Myeloperoxidase, tritt als konstituierendes Enzym der primären Granula auf. Es wird daher schon zu frühen

Zeitpunkten der Kultivierung exprimiert. Entsprechend groß ist auch der Anteil an Zellen der Gesamtpopulation, die an Tag 14 der Kultivierung dieses Antigen tragen. Lysozym und Lactoferrin werden erst zu späteren Zeitpunkten der Granulopoese gebildet. Beide Enzyme sind in der immunzytometrischen Analyse der ex vivo expandierten Zellen nachweisbar. Die Intensität mit der die beiden Antigene exprimiert werden, ist jedoch deutlich geringer als die der Myeloperoxidase. Dies kann seinen Grund in der späteren Expression der Proteine während des Kultivierungsverlaufes und in einem insgesamt geringeren Gesamtgehalt der Proteine in den Zellen, verglichen mit Myeloperoxidase, haben.

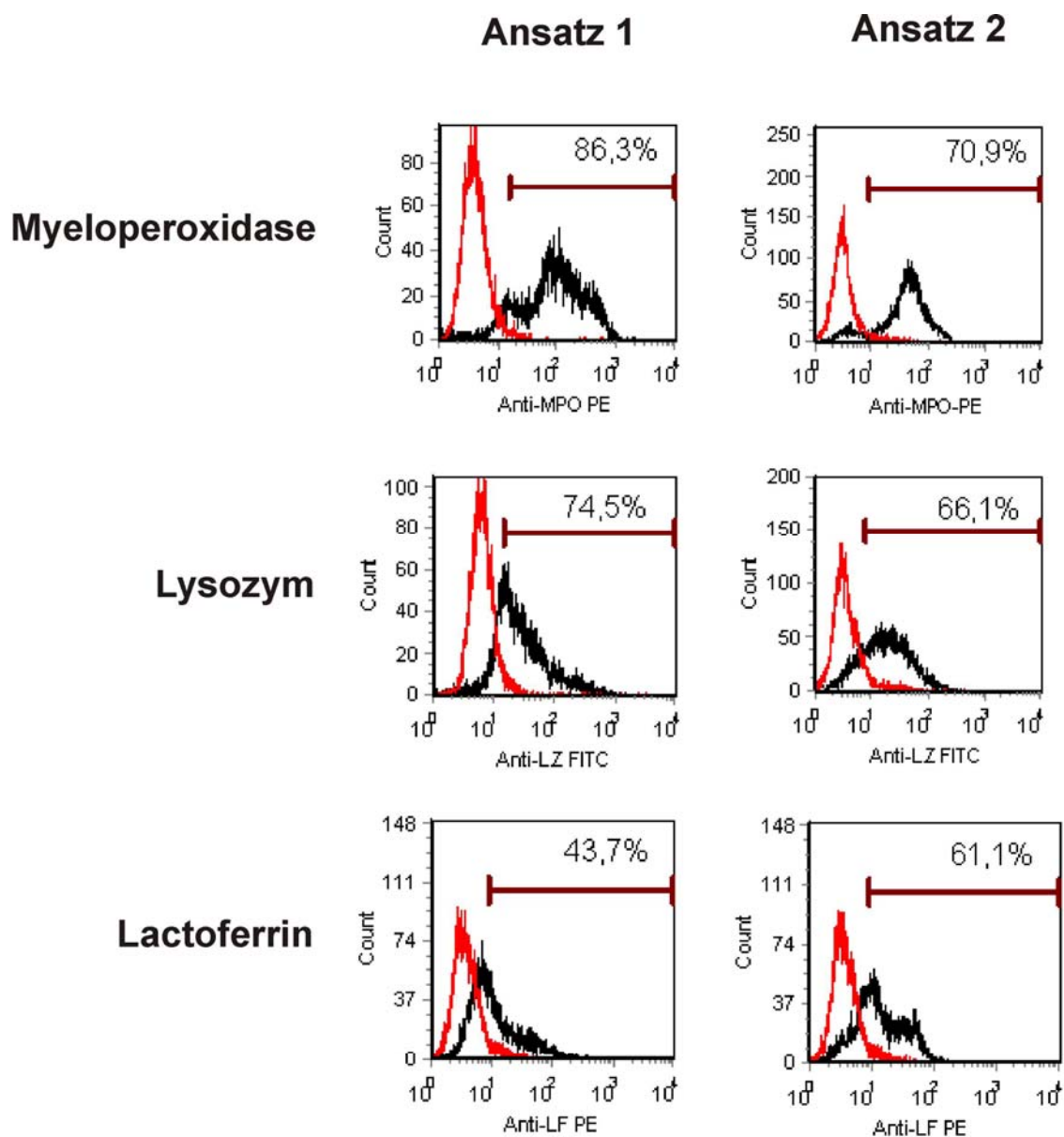


Abbildung 9-5: Immuncytometrischer Nachweis intrazellulärer Antigene

9.3.2 Phagozytose-Leistung

Die Phagozytose-Leistung der Zellen wurde mit Hilfe des in Kap. 6.3.1 etablierten durchflußzytometrischen Test durchgeführt. Die ex vivo generierten Zellen wurden in zwei Ansätzen im Verhältnis 1:10 mit fluoreszenzmarkierten E.coli-Bakterien inkubiert. Einer der beiden Ansätze wurde bei 0°C auf Eis inkubiert, um den aktiven Prozeß der Phagozytose zu unterbinden und die unspezifische Bindung von Bakterienzellen an die Oberfläche der ex vivo expandierten Zellen nachzuweisen. Abbildung 9-6 zeigt das Ergebnis der durchflußzytometrischen Analyse einer Zellprobe an Tag 15 der Kultivierung. Während die bei 0°C inkubierten Zellen nur einen kleinen Anteil der fluoreszierenden E.coli an sich heften, ist in dem bei 37°C inkubierten Ansatz die Aufnahme von fluoreszierenden Partikeln deutlich nachweisbar. Damit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die in zytokinsupplementierter Suspensionskultur generierten Zellen die Fähigkeit zur Phagozytose erwerben.

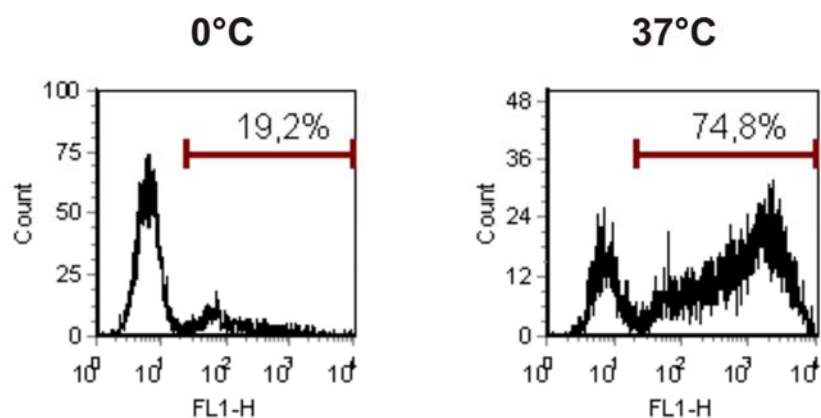


Abbildung 9-6: Durchflußzytometrischer Nachweis der Phagozytose-Leistung

9.3.3 Oxidative Burst-Leistung

Neben dem Nachweis der Aufnahme von fluoreszierenden mikrobiellen Partikeln durch die generierten Zellen ist auch die Fähigkeit der Zellen, ihr biozides Arsenal in Gang zu setzen von Wichtigkeit. Diese Eigenschaft der Zellen wird mit dem Test auf freigesetzte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (sh. Kap. 6.3.2) nachgewiesen. Abbildung 9-7 zeigt den Verlauf des Chemolumineszenz-Signals von Proben einer CD15+ und einer CD15- sortierten Fraktion. Es zeigt sich ganz klar, daß beide Zellfraktionen in der Lage sind, aufgrund des extrazellulären Stimulus Zymosan ROS freizusetzen. Dieses Ergebnis ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass CD15⁻ Zellen zu monozytären Zelltypen, die ebenfalls zur ROS freisetzung befähigt sind, heranreifen. Kon-

trollansätze, die anstelle des Stimulus mit PBS inkubiert wurden, zeigen über den Testzeitraum kein Chemolumineszenzsignal.

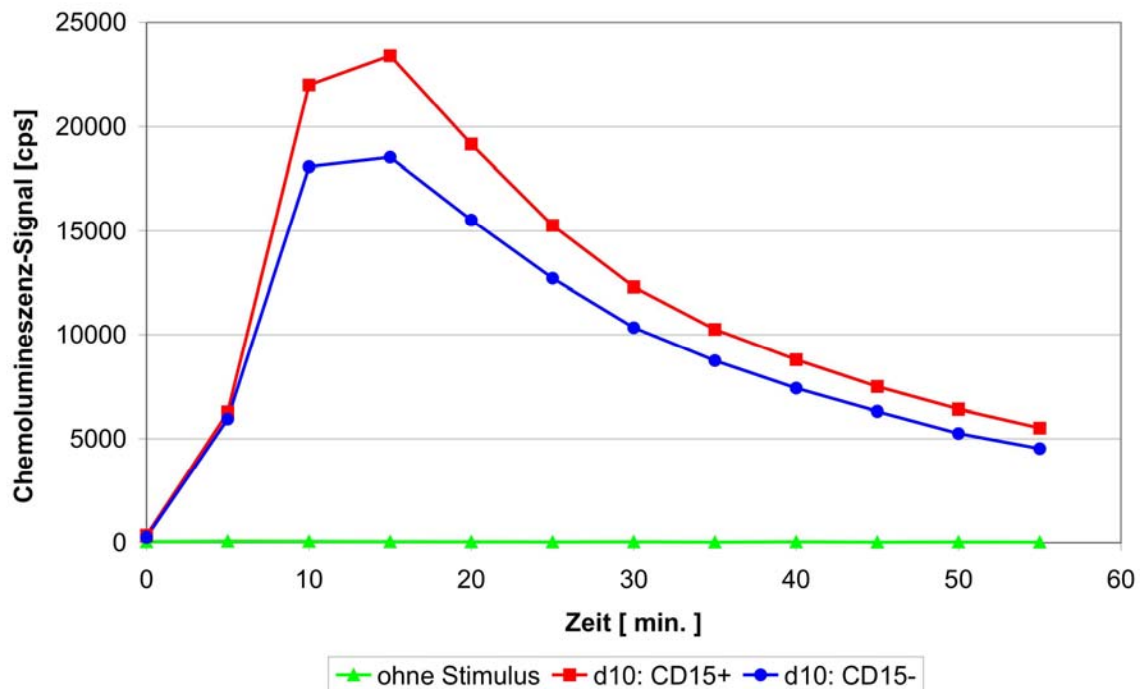


Abbildung 9-7: Nachweis der Oxidative-Burst-Leistung durch Chemolumineszenz

9.4 Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse dieses Kapitels

Die Zusammensetzung des zellulären Produkts ist ein medizinischer Parameter, der den therapeutischen Erfolg maßgeblich beeinflusst. Da sich die Zusammensetzung der Zellpopulation mit der Zeit ändert, legt der therapeutische Bedarf den zeitlichen Rahmen fest, innerhalb dessen eine Kultivierung überhaupt sinnvoll durchführbar ist. In Langzeitkultivierungen wurde festgestellt, daß die Wachstumsrate der Zellen über den Kultivierungszeitraum kontinuierlich sinkt und die proliferative Seneszenz der Gesamtzellpopulation ab Tag 30 der Kultivierung eintritt.

In weiterführenden Untersuchungen wurden die neutrophil differenzierenden CD15⁺ Zellen von den restlichen CD15⁻ Zellen der Gesamtzellpopulation getrennt. Beide Zellpopulationen wurden parallel weiterkultiviert und verglichen. Es zeigte sich, daß die Produktion von Neutrophilen Zellen in den frühen Phasen der Kultivierung dominierend ist. Nach 10 Tagen Kultivierung sind ca. 70% der Gesamtzellpopulation CD15⁺ und damit der neutrophilen Differenzierungslinie zuzuordnen. Das zeigen auch weitere Marker wie CD33 (myelomonozytärer Marker) und das

Abnehmen der CD34-Expression. Ein Teil der Zellen hat bereits an Tag 16 der Kultivierung einen morphologisch reifen und funktionalen Status erreicht. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von DEBRUYN et al. an neutrophil differenzierten CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und HINO et al. an Kulturen aus CD34⁺ aus dem peripheren Blut erwachsener Spender [DeBruyn CD, 2003; Hino M, 2000].

An Tag 16 der Kultivierung wurden durch FACS-Analyse noch neutrophile Vorläuferzellen (Myelocyten, Metamyelocyten) in der Kultur nachgewiesen. Der Anteil der monozytär differenzierenden Zellen nimmt jedoch mit wachsender Kultivierungsdauer deutlich zu. Vorausgesetzt, daß die an Tag 16 morphologisch und funktional ausgereiften neutrophilen Zellen in vitro eine in vivo vergleichbare Lebensdauer besitzen (wenige Tage), ist davon auszugehen, daß ein signifikanter Anteil der Zellpopulation ab Tag 16 zugrunde geht. Die inokulierte CD34⁺ Zellpopulation stellt ein heterogenes Gemisch von verschiedenen Zellen unterschiedlicher Differenzierungsgrade dar. Unter der Annahme, daß alle reifen Zelltypen die gleiche Anzahl an Teilungen durchlaufen haben bis sie einen reifen, funktionalen Status erreichten, ist es nicht verwunderlich, daß, über ein sehr breites Zeitintervall verteilt, neutrophile Zellen der unterschiedlichen Differenzierungsstadien im Kultivierungsprodukt vorliegen. Vorläufer, die zwar dem CD34⁺ Phänotyp angehören, aber bereits einige Schritte auf dem Differenzierungsweg zurückgelegt haben, werden früher reifere Zellen liefern als CD34⁺ Zellen, die beim Inokulum der Kultur noch ihre gesamten Stammzeleigenschaften besitzen.

In den Untersuchungen von HINO et al. befanden sich die Zellen die über die gesamte Kultivierungsdauer von 14 Tagen mit SCF, IL-3, GM-CSF und G-CSF kultiviert wurden in einem aktivierten Zustand [Hino M, 2000]. Das bedeutet, daß sie ihre ROS-Freisetzung auch unspezifisch - ohne mikrobiellen Stimulus - in Gang setzen können. Zytokinaktivierte neutrophile Zellen können ein Problem für die Infusion in den Patienten darstellen, da sie das Gefäßsystem schädigen und unvorhergesehene Reaktionen des Körpers auslösen können [Ricevuti G, 1997]. Mit Zellen, die nach dem hier entwickelten Kultivierungsprotokoll hergestellt wurden, gab es keine Anzeichen für eine unspezifische Aktivierung der Zellen. In den hier kultivierten Zellen konnten die wichtigsten Enzyme (Myeloperoxidase, Lysozym, Lactoferrin) der sauerstoffabhängigen und -unabhängigen bioziden Effektormechanismen intrazellulär nachgewiesen werden. Die ex vivo generierten Zellen haben das Potential für Phagozytose- und spezifische ROS-Freisetzung zeigen.

10 Schlußfolgerungen und Ausblick

Die vorliegende Arbeit ist mit ihrem Themengebiet an der interdisziplinären Nahtstelle von Ingenieurwissenschaften, Medizin und Biologie angesiedelt. Das vornehmlich verfolgte Ziel ist es, am Beispiel der ex vivo Generierung von neutrophilen Zellen die Bedeutung von verfahrenstechnisch wichtigen Kultivierungsparametern zu untersuchen und damit Kultivierungsprotokolle zu entwickeln, die in möglichst direkter Linie in eine kliniktaugliche Anwendung übertragen werden können. Aus der Bearbeitung dieser konkreten Fragestellungen ergeben sich stetig neue Herausforderungen auf den verschiedensten Feldern der wissenschaftlichen Disziplinen, die für mich den besonderen Reiz dieses Themas ausmachten. Im folgenden sei dies überblickend und ausblickend für die vorgelegte Arbeit dargestellt.

10.1 Der Mini-Spinner

Für viele Untersuchungen, nicht nur im Bereich der beiden konkurrierenden Konzepte der Genereierung neutrophiler Zellen, ist die kontrollierte Kultivierung wünschenswert. Nur wenn die Randparameter einer Kultivierung bekannt sind, ist eine rationale Maßstabsvergrößerung der erhaltenen Ergebnisse möglich. In der vorliegenden Arbeit gab es sowohl im Primärzell- als auch im Bereich der Zelllinie HL-60 Limitierungen, die kontrollierte Kultivierungen im kleinen Maßstab notwendig machten. Die zur Verfügung stehende Zellzahl an Nabelschnurblut CD34⁺ Zellen ist begrenzt (durch die Zahl der freiwilligen Spender und durch die Kosten für die Aufarbeitung). Für kontrollierte Kultivierungen in standardmäßigen Spinnergefäßen hätten die Zellen von 5 bis 10 Spendern über einen Zeitraum von 2 bis 3 Monaten für einen einzigen Versuch gesammelt werden müssen. Eine weitere Limitierung im Primärzellularbereich sind die extrem hohen Medienkosten, verursacht durch die rekombinanten Wachstumsfaktoren. Diese Limitierung ist bei den anspruchsloseren, da ohne Wachstumsfaktoren wachsenden, HL-60 Zellen nicht gegeben. Hier sind jedoch bei den Versuchen zur ATRA-induzierten Funktionalisierung Zelldichten von $1 \cdot 10^6 \text{ Z} \cdot \text{mL}^{-1}$ beim Inokulum eingestellt worden. Bei standardmäßigen kontrollierten Spinnerkultivierungen wäre dafür eine Stammhaltung im Litermaßstab notwendig gewesen.

Als Konsequenz wurde der Mini-Spinner entwickelt, der es erstmals ermöglicht, in relativ kleinen Volumina Untersuchungen unter kontrollierbaren und skalierbaren Bedingungen durchzuführen. Der Mini-Spinner besetzt als Kultivierungssystem eine Lücke, die zwischen kleinvolumigen, aber

unkontrollierten, statischen Kultivierungssystemen wie T-Flaschen und größeren, typischerweise in der Prozeßentwicklung benutzten, geregelten Spinnern und Bioreaktoren besteht. Das kleine Arbeitsvolumen erlaubt neuartige Anwendungen für das Prinzip der multiparallelen Fermentation. Dazu zählen z.B. Prozeßentwicklungen für Primärzellen, Experimente mit markierten Substraten, Kontrollierte Kultivierung von der revitalisierten Zellprobe bis in den industriellen Maßstab, Optimierung von Zell-Engineering Schritten (z.B. Transfektion) oder Screening-Experimente. Diese Breite der möglichen Anwendungen für den Mini-Spinner und die einfache Integrierbarkeit des Systems in bestehende Fermentationsumgebungen machen den Mini-Spinner auch für einen breiteren Markt in Forschung und Industrie interessant. Das System wird bereits von der Firma DASGIP AG kommerziell vermarktet.

Die weitere Entwicklung des Mini-Spinners kann sicherlich in Richtung eines echten Mini-Bioreaktors weitergetrieben werden. So könnte durch eine Zellabscheidung (z.B. realisierbar durch Sedimentation der Zellen in einem Steigrohr) im Mini-Spinner eine perfundierte Betriebsweise realisiert werden. Für die in dieser Arbeit besprochenen Anwendungen ist das minimale Arbeitsvolumen des Systems ausreichend gering. Eine weitere Reduktion wäre nur durch Umstieg auf andere Sensorsysteme als die konventionellen Elektroden möglich. Faseroptische Optoden bieten hier in Zukunft eine interessante Möglichkeit [Wittmann C, 2003]. Allerdings müssen auch für diese Systeme wichtige Fragen wie die Anbindung an bestehende Fermentationsanlagen und Software sowie die Sterilsicherheit wie für konventionelle Elektroden gewährleistet werden.

10.2 Biotechnologische Herstellung neutrophiler Zellen

Die Zellkulturtechnik zur ex vivo Bereitstellung von neutrophilen Zellen kann nicht von reifen neutrophilen Zellen als Ausgangsmaterial ausgehen. Diese Zellen haben jegliches Proliferationspotential verloren und haben nach der vollständigen Reife auch nur eine geringe Lebenserwartung von wenigen Tagen. Demgegenüber existieren keine Zellen mit Proliferationspotential, die die biologische Funktionalität zur Verfügung stellen. Ausgangsmaterial für in vitro generierte neutrophile Zellen können daher nur primäre hämatopoetische Stammzellen oder eine permanente myeloide Zelllinie sein, die beide in vitro vermehrt werden können. Damit ergeben sich zwei unterschiedliche Strategien zur Bereitstellung von Neutrophilen:

Werden hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen als Ausgangszellmaterial herangezogen, so muß im Verlaufe der Kultivierung die Granulopoese in vitro nachempfunden werden. Die Herausforderung bei diesem Konzept liegt darin, daß der inokulierte Zelltypus per definitionem

ein anderer ist als der zu erntende. Auch im Verlauf der Kultivierung befindet sich die gesamte Zellpopulation im „biologischen Fluß“ der Granulopoese. Daher bietet sich auch die Verwendung des Terminus „Generierung“ neutrophiler Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen eher an als von einer „Expansion“ zu sprechen. Expansion impliziert die morphologische und funktionale Identität des kultivierten Zelltypus vor und nach der Kultivierung. In der vorliegenden Arbeit wurden biologische und physiko-chemischen Parameter der Kultivierung untersucht und optimiert. Das bereitgestellte Wachstums- und Differenzierungsmilieu der Zellen kann jedoch nur ein Kompromiß für die unterschiedlichen Zelltypen der Gesamtzellpopulation darstellen. Je nach der Kultivierungsdauer kann in der hier verwendeten isolierten Suspensionskultur eine Gesamtzellexpansion von >400 bis >3.000 fach erreicht werden. Stromahaltige Ko-Kultivierungen kommen dem biologischen Bedarf der hämatopoetischen Zellen sicher näher als isolierte Suspensionskulturen und könnten eine Option auf größere Expansionen bieten. Diese Kultivierungskonzepte sind jedoch von einer klinischen Anwendbarkeit noch weiter entfernt als isolierte Suspensionssysteme.

Die Untersuchungen zu den Phänotypisierungen der Zellen (Kapitel 9.2) sowie darauf basierenden Vergleiche von TERSTAPPEN et al. an Knochenmarkzellen und in vitro kultivierten Zellen belegen, daß die Population kultivierter primärer Zellen stets eine Mischung unterschiedlicher Differenzierungslinien (neutrophil/monozytär) darstellt [Terstappen, 1992]. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, daß auch die verschiedenen Differenzierungsstadien nicht einheitlich von allen Zellen der Population gleichzeitig durchschritten werden. Die Zusammensetzung des zellulären Produktes hängt also stark von der Kultivierungsdauer ab. Damit ergibt sich die optimale Kultivierungsdauer aus dem medizinischen Bedarf. Dieser läßt sich jedoch nur durch in vivo Studien mit Sicherheit erheben, wofür es noch einen erheblichen Bedarf an entsprechenden Studien gibt.

Die permanente, myeloide Zelllinie HL-60 kann im Gegensatz zu den primären Zellen in vitro klonal expandiert werden. Diese Krebszellen haben jedoch keine funktionale Fähigkeiten. Diese werden in einem zweiten Reifungsschritt mit dem Reifungsinduktor ATRA induziert. Hier wurde ein Kultivierungsprotokoll untersucht, das basierend auf zwei aufeinanderfolgenden Satzkultivierungen (Zellexpansion/Zellfunktionalisierung) die Herstellung von einheitlich funktionalen Zellen des neutrophilen Typus ermöglicht.

Nimmt man die für eine Therapie notwendigen hohen Zellzahlen ($>10^9$ bis 10^{10}) und wirtschaftliche Überlegungen als Randbedingungen, so bieten sich Angriffspunkte, den Produktionsprozeß weiter auszugestalten. Als Ausblick soll hier eine Überlegung angebracht sein. Mit dem gegebenen Kultivierungsprotokoll ist eine Erhöhung der Produktionskapazität nur durch

zusätzliche Investitionen in größere Fermentationskapazitäten möglich. Als Alternative bietet sich eine perfundierte Kultivierung an, da hier in relativ kleinen Gesamt-Volumina große Zelldichten erreicht werden können. Darüber hinaus reduziert sich der Aufwand für Chargenkontrollen, da pro Ansatz mehr Zellen gewonnen werden können. Dem steht eine technisch aufwändigere (und nicht unproblematische) Prozeßführung mit geringerer Ausnutzung des Kultivierungsmediums gegenüber, das bei der Kultivierung einer Zelllinie den Hauptanteil der Ausgangsstoffkosten darstellt (im Gegensatz dazu bei Primärzellen: rekombinante Wachstumsfaktoren).

Am Beispiel der Kultivierung von HL-60 läßt sich aber auch verdeutlichen, daß verfahrenstechnische und/oder biologische Vorteile für den Kultivierungsprozeß im klinischen Umfeld nicht das Maß aller Dinge darstellen: Das Medium ProCHO4-CDM erlaubt die Kultivierung und Funktionalisierung der HL-60-Zellen (nicht gezeigt). Es ist im Vergleich mit der verwendeten serumhaltigen Medienformulierung („BasalC“ + BISEKO) oder serumfreien Kultivierungsmedien (SCGM, X-Vivo) deutlich preiswerter, was bei den im großtechnischen Maßstab umzusetzenden Volumina einen nicht unerheblichen ökonomischen Vorteil brächte. Zudem ist es vielfach in der Fermentation von rekombinanten Proteinen erprobt. Trotzdem bestehen bei der Verwendung der „Zelle als Produkt“ der Fermentation mit diesem Medium so große medizinische Bedenken gegen Inhaltsstoffe dieses Mediums, daß ein darauf aufbauender Prozeß niemals die Chance auf klinische Anwendbarkeit hätte.

Die vorliegende Arbeit ist Teilprojekt des BMBF-Verbundprojektes „Entwicklung von biotechnologisch hergestellten Granulozyten für die intravenöse Anwendung zur Prävention und Therapie von Infektionen, insbesondere bei Tumorpatienten mit Neutropenie im Rahmen der Knochenmark- oder Stammzelltransplantation“. In diesem Zusammenhang soll auch die Machbarkeit der Herstellung bzw. Anwendbarkeit der biotechnologisch hergestellten neutrophilen Zellen kritisch betrachtet werden.

10.2.1 Anwendung in der Therapie der Sepsis

Als Ersatz für reife, funktionale Spendergranulozyten zur Therapie der Sepsis erscheint die Generierung von neutrophilen Zellen aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen weniger geeignet. Prinzipieller Vorteil der primären Zellen ist, daß sie eine eingeschränkte Lebensdauer haben und damit keine potentielle Gefahr für den Patienten darstellen (so wie eine Krebszelllinie). Die Zellen aus Nabelschnurblut bergen auch ein wesentlich geringeres Risiko der Kontamination mit Krankheitserregern und die Qualität des zellulären Produktes kann vor der Anwendung am Patienten ausführlich getestet werden. Die Zellen erreichen jedoch nicht zu einem einheitlichen Zeitpunkt ihre phänotypische und funktionale Reife sondern über einen relativ großen Zeitraum verteilt. Darüber hinaus ist die Proliferationsfähigkeit begrenzt und

damit die pro Nabelschnurblutspende mögliche Zell-Ausbeute. Nicht zu vergessen sind die immens hohen Kosten, die für das Medium und die notwendigen Wachstumsfaktoren anfallen. Zusammengefaßt ist unter den gegebenen Voraussetzungen die Kultivierung von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen zu einer einheitlich reifen und funktionalen neutrophilen Zellpopulation wirtschaftlich und technisch wenig aussichtsreich.

Die gewünschten therapeutischen Mengen an Zellen mit den benötigten Funktionalitäten lassen sich technisch leichter durch Vermehrung von myeloiden Zelllinien erreichen. Tierexperimentelle Studien ermittelten eine Spendergranulozytendosis von $2 \cdot 10^8$ Zellen pro kg Körpergewicht um eine lethale Infektion zu überleben [Appelbaum, 1978; Epstein, 1981]. Die hier hergestellten neutrophilen Zellen können zu einer einheitlichen Reife gebracht werden und sind damit ein adäquaterer Ersatz für primäre Spendergranulozyten. Die Bewertung der Sicherheit intravenöser Anwendung von funktionalisierten HL-60 Zellen ist ebenfalls Teil des BMBF Verbundprojektes und wird in entsprechenden Studien der Projektpartner untersucht. Daher soll hier nur kurz auf prinzipielle Überlegungen eingegangen werden. Die intravenöse Gabe von Krebszellen ist nicht ohne ein gewisses Restrisiko verbunden, so daß gewährleistet sein muß, daß im Zellprodukt keine Zelle mit Proliferationspotential mehr enthalten ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten zeigen, daß der ATRA-induzierte Proliferationsstopp der Gesamtzellpopulation durchaus etwa durch den pH-Wert des Mediums moduliert werden kann (Kap. 7.2.2). Auch bei einer sicherheitshalber durchgeführten Bestrahlung muß sichergestellt werden, daß alle - auch ruhende Zellen - durch die Strahlung geschädigt werden, ohne daß es zu einem Funktionsverlust der Zellen kommt.

Bei Verwendung des EISS-Systems ist jedoch eine andere Ausgangslage gegeben. Hier sind die Spendergranulozyten extrakorporal durch mechanische Barrieren vom Körper des Patienten getrennt. Die biotechnologisch hergestellten neutrophilen Zellen aus HL-60 stellen in diesem Set-up eine logistisch einfacher handhabbare und sicherheitstechnisch besser kontrollierbare Alternative zu primären Spendergranulozyten dar.

10.2.2 Anwendung in der Prävention der Sepsis

Die Gabe der ex vivo generierten primären neutrophilen Zellen als Supplement zu einer Stammzelltransplantation, um die neutropene Phase nach HDCT zu überbrücken, erscheint sinnvoll und machbar. Diese Anwendung setzt ein zelluläres Produkt voraus, das in der Lage ist, über einen Zeitraum von einigen Tagen bis zu einer Woche eine genügend hohe Anzahl an reifen, funktionalen neutrophilen Granulozyten zu generieren, um den Neutrophilenspiegel des Patienten konstant oberhalb der kritischen Schwelle von 1.000 Neutrophilen pro μL Vollblut zu halten. Zellen ohne Proliferationspotential, wie funktionalisierte und eventuell bestrahlte HL-60

Zellen scheiden hier schon prinzipiell aus. Es existieren noch keine Studien über die notwendige Zelldosis für die Sepsisprävention nach HDCT durch Gabe von primären neutrophilen Postprogenitoren. Daher ist für diesen Bereich eine Bewertung der Skalierbarkeit noch nicht machbar. Die Zusammensetzung des zellulären Produktes und die maximale Zellexpansion könnte durch Variation der Kultivierungsdauer den therapeutischen Notwendigkeiten angepaßt werden. Ob eine einzige Nabelschnurblutspende ausreicht, um genügend Zellen für einen Patienten herzustellen, läßt sich zudem nur klären, wenn ein geeignetes großvolumiges Kultivierungssystem zur Verfügung steht.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die biotechnologische Generierung von neutrophilen Zellen durchaus eine sinnvolle Alternative zu primären Spendergranulozyten darstellen kann. Dazu wurden in dieser Arbeit sowohl ausgehend von primären CD34⁺ Zellen als auch ausgehend von einer myeloiden Zelllinie Rahmenbedingungen entwickelt, die eine Umsetzung in den klinisch relevanten Maßstab ermöglichen. Dabei sind die beiden Strategien zur Bereitstellung von Neutrophilen nach den hier vorliegenden Ergebnissen nicht als konkurrierend sondern als sich ergänzend anzusehen. Das Ergebnis dieser Arbeit trägt dazu bei die nächsten Schritte dieses mit Erfolg angegangenen Weges in die verschiedenen wissenschaftlichen Disziplinen zu weisen. Auf medizinischem Gebiet werden tierexperimentelle Studien Informationen zur optimalen Zusammensetzung eines präventiv wirksamen Zellproduktes liefern, die die Rahmenparameter der Kultivierung setzen. Die ingenieurwissenschaftliche Herausforderung wird sicherlich in der Entwicklung eines kliniktauglichen Kultivierungssystems für die kontrollierte und möglichst weitestgehend automatisierte Kultivierung der primären Zellen liegen.

11 Literaturverzeichnis

- Abraham, E., K. Reinhart, et al. (2003). "Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial." Jama **290**(2): 238-47.
- Achtz, B., K. Russ, et al. (2001). "Multifold Cell Culture System for Bioprocess Optimization with Chinese Hamster Ovary Cells." Genetic Engineering News **21**(18): 50.
- Altrichter, J. (2004). "persönliche Mitteilung."
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, et al. (2001). "Epidemiology of neonatal respiratory failure in the United States: projections from California and New York." Am J Respir Crit Care Med **164**(7): 1154-60.
- Appelbaum, F. R., C. A. Bowles, et al. (1978). "Granulocyte transfusion therapy of experimental Pseudomonas septicemia: study of cell dose and collection technique." Blood **52**(2): 323-31.
- Batard, P., M. Jordan, et al. (2001). "Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection." Gene **270**(1-2): 61-8.
- Benito, A. I., M. A. Diaz, et al. (2004). "Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results." Bone Marrow Transplant **33**(7): 675-90.
- Bernard, G. R., J. L. Vincent, et al. (2001). "Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis." N Engl J Med **344**(10): 699-709.
- Birt, D. F. (1997). "Methodologic issues, theoretical considerations, and design criteria for experimental animal and cell culture experiments." Am J Clin Nutr **66**(6 Suppl): 1506S-1512S.
- Blair, A. L., I. A. Cree, et al. (1988). "Measurement of phagocyte chemiluminescence in a microtitre plate format." J Immunol Methods **112**(2): 163-8.
- Bohnenkamp, H., U. Hilbert, et al. (2002). "Bioprocess development for the cultivation of human T-lymphocytes in a clinical scale." Cytotechnology **38**: 135-145.
- Borregaard, N. and J. B. Cowland (1997). "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte." Blood **89**(10): 3503-21.
- Breitman, T. R., S. E. Selonick, et al. (1980). "Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) by retinoic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(5): 2936-40.
- Broxmeyer, H. E., S. Cooper, et al. (1990). "Enhanced stimulation of human bone marrow macrophage colony formation in vitro by recombinant human macrophage colony-stimulating factor in agarose medium and at low oxygen tension." Blood **76**(2): 323-9.
- Brun-Buisson, C. (2000). "The epidemiology of the systemic inflammatory response." Intensive Care Med **26 Suppl 1**: S64-74.
- Burg, M. B., E. D. Kwon, et al. (1997). "Regulation of gene expression by hypertonicity." Annu Rev Physiol **59**: 437-55.
- Busund, R., V. Koukline, et al. (2002). "Plasmapheresis in severe sepsis and septic shock: a prospective, randomised, controlled trial." Intensive Care Med **28**(10): 1434-9.
- Cabrita, G. J., B. S. Ferreira, et al. (2003). "Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor." Trends Biotechnol **21**(5): 233-40.
- Canconeri, M. (2003). Ex vivo Expansion neutrophiler Zellen - Beiträge zur Prozessentwicklung - . Jülich, Fachhochschule Aachen.

- Caruso, A., S. Licenziati, et al. (1997). "Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation." Cytometry **27**(1): 71-6.
- Chen, R., A. A. Asante, et al. (2002). Evaluation of Mini-Fermentation/Cell culture System. 224th ACS National Meeting, Boston.
- Collins, P. C., L. K. Nielsen, et al. (1998). "Characterization of hematopoietic cell expansion, oxygen uptake, and glycolysis in a controlled, stirred-tank bioreactor system." Biotechnol Prog **14**(3): 466-72.
- Collins, S. J., K. A. Robertson, et al. (1990). "Retinoic acid-induced granulocytic differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells is mediated directly through the retinoic acid receptor (RAR-alpha)." Mol Cell Biol **10**(5): 2154-63.
- Cotter, T. G., R. S. Fernandes, et al. (1994). "Cell death in the myeloid lineage." Immunol Rev **142**: 93-112.
- Cruz, H. J., C. M. Freitas, et al. (2000). "Effects of ammonia and Laktate on growth, metabolism, and productivity of BHK cells." Enzyme Microb Technol **27**(1-2): 43-52.
- De Bruyn, C. (2003). "Ex vivo expansion of neutrophil precursor cells from fresh and cryopreserved cord blood cells." Cytotherapy **5**(1): 1.
- De Leon, A., H. Mayani, et al. (1998). "Design, characterization and application of a minibioreactor for the culture of human hematopoietic cells under controlled conditions." Cytotechnology **28**: 127-138.
- Dresch, C., A. Faille, et al. (1980). "Bone marrow cell kinetics and culture in chronic and subacute myelomonocytic leukemia. Physiopathological interpretation and prognostic importance." Leuk Res **4**(1): 129-42.
- Ehrlich, P. (1879). "Über die spezifischen Granulationen des Blutes." Archiv für Anatomie und Physiologie Physiologische Abteilung(Supplementum): 571.
- Elghetany, M. T. (2002). "Surface Antigen Changes during Normal Neutrophilic Development: A Critical Review." Blood Cells Mol Dis **28**(2): 260-74.
- Epstein, R. B. and H. S. Chow (1981). "An analysis of quantitative relationships of granulocyte transfusion therapy in canines." Transfusion **21**(3): 360-2.
- Frison, A. and K. Memmert (2002). "Fed-Batch Process for Mab Production." Genetic Engineering News **22**(11): 66-67.
- Gaines, P. and N. Berliner (2003). "Retinoids in myelopoiesis." J Biol Regul Homeost Agents **17**(1): 46-65.
- Gallagher, R., S. Collins, et al. (1979). "Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia." Blood **54**(3): 713-33.
- Haylock, D. N., L. B. To, et al. (1992). "Ex vivo expansion and maturation of peripheral blood CD34+ cells into the myeloid lineage." Blood **80**(6): 1405-12.
- Heine, H. (1998). Inhibierungen bei Hochzellichten Hybridomakulturen. Forschungszentrum Jülich, IBT-2. Aachen, RWTH Aachen.
- Hevehan, D. L., E. T. Papoutsakis, et al. (2000). "Physiologically significant effects of pH and oxygen tension on granulopoiesis." Exp Hematol **28**(3): 267-75.
- Hilbert, U. (2001). Expansion spezifischer T-Zellen im Bioreaktor.
- Hino, M., K. Suzuki, et al. (2000). "Ex vivo expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34+ haematopoietic progenitor cells." Br J Haematol **109**(2): 314-21.

- Hirata, R. K., S. T. Chen, et al. (1993). "Expression of granule protein mRNAs in acute promyelocytic leukemia." Hematol Pathol **7**(4): 225-38.
- Hu, W. S., J. Meier, et al. (1986). "Use of surface aereator to improve oxygen transfer into cell culture." Biotechnol Bioeng **28**: 122-125.
- Hübel, K. and A. Engert (2003). "Granulocyte Transfusion Therapy for Treatment of Infections after Cytotoxic Chemotherapy." Onkologie **26**: 73-79.
- Ishikawa, Y. and T. Ito (1988). "Kinetics of hemopoietic stem cells in a hypoxic culture." Eur J Haematol **40**(2): 126-9.
- Jelinek, J. and J. T. Prchal (2004). "Oxygen-dependent regulation of erythropoiesis." Methods Enzymol **381**: 201-10.
- Jelinek, N. (2000). Kokultur hämatopoetischer Zellen im Festbettreaktor.
- John, G. T., D. Goelling, et al. (2003). "PH-sensing 96-well microtitre plates for the characterization of acid production by dairy starter cultures." J Dairy Res **70**(3): 327-33.
- John, G. T., I. Klimant, et al. (2003). "Integrated optical sensing of dissolved oxygen in micro-titer plates: a novel tool for microbial cultivation." Biotechnol Bioeng **81**(7): 829-36.
- Jones, S. A. and S. Rose-John (2002). "The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex." Biochim Biophys Acta **1592**(3): 251-63.
- Kastner, P., M. Mark, et al. (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?" Cell **83**(6): 859-69.
- Kearns, M. J. (1990). "Integrated design for mammalian cell culture." Biotechnology (N Y) **8**(5): 409-13.
- Koller, M. R., J. G. Bender, et al. (1992). "Reduced oxygen tension increases hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from cord blood and bone marrow." Exp Hematol **20**(2): 264-70.
- Koller, M. R., S. G. Emerson, et al. (1993). "Large-scale expansion of human stem and progenitor cells from bone marrow mononuclear cells in continuous perfusion cultures." Blood **82**(2): 378-84.
- Kopprasch, S., J. Pietzsch, et al. (2003). "Validation of different chemilumigenic substrates for detecting extracellular generation of reactive oxygen species by phagocytes and endothelial cells." Luminescence **18**(5): 268-73.
- Krauss, G. (1997). Biochemie der Regulation und Signaltransduktion, Wiley VCH, Weinheim.
- Kumar, S., C. Wittmann, et al. (2004). "Minibioreactors." Biotechnol Lett **26**(1): 1-10.
- Kunkel, J. P., D. C. Jan, et al. (1998). "Dissolved oxygen concentration in serum-free continuous culture affects N-linked glycosylation of a monoclonal antibody." J Biotechnol **62**(1): 55-71.
- Labrecque, J., D. Allan, et al. (1998). "Impaired granulocytic differentiation in vitro in hemato-poietic cells lacking retinoic acid receptors alpha1 and gamma." Blood **92**(2): 607-15.
- Laluppa, J. A., E. T. Papoutsakis, et al. (1998). "Oxygen tension alters the effects of cytokines on the megakaryocyte, erythrocyte, and granulocyte lineages." Exp Hematol **26**(9): 835-43.
- Lavery, M. and A. W. Nienow (1987). "Oxygen transfer in animal cell culture medium." Biotechnol Bioeng **30**: 368-373.
- Lee, G. M., E. J. Kim, et al. (1999). "Development of a serum-free medium for the production of erythropoietin by suspension culture of recombinant Chinese hamster ovary cells using a statistical design." J Biotechnol **69**(2-3): 85-93.

- Lindl, T. (2000). Zell- und Gewebekultur, Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Linenberger, M. L., F. W. Jacobson, et al. (1995). "Stem cell factor production by human marrow stromal fibroblasts." Exp Hematol **23**(10): 1104-14.
- Link, T., M. Backstrom, et al. (2004). "Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium." J Biotechnol **110**(1): 51-62.
- Liu, F., J. Poursine-Laurent, et al. (1997). "Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation." Blood **90**(7): 2583-90.
- Maeda, H., T. Hotta, et al. (1986). "Enhanced colony formation of human hemopoietic stem cells in reduced oxygen tension." Exp Hematol **14**(10): 930-4.
- Maianski, N. A., A. N. Maianski, et al. (2004). "Apoptosis of neutrophils." Acta Haematol **111**(1-2): 56-66.
- Makino, S., D. N. Haylock, et al. (1997). "Ex vivo culture of peripheral blood CD34+ cells: effects of hematopoietic growth factors on production of neutrophilic precursors." J Hematother **6**(5): 475-89.
- Martin, G. R. and R. K. Jain (1994). "Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio imaging microscopy." Cancer Res **54**(21): 5670-4.
- McAdams, T. A. (1997). The Characterization of Extracellular pH and Medium Osmolality as Important Parameters in the Culture of Human Hematopoietic Cells. Evanston, North Western University.
- McNiece, I. and R. Briddell (2001). "Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells and mature cells." Exp Hematol **29**(1): 3-11.
- McNiece, I., D. Kubegov, et al. (2000). "Increased expansion and differentiation of cord blood products using a two-step expansion culture." Exp Hematol **28**(10): 1181-6.
- Meissner, P., H. Pick, et al. (2001). "Transient gene expression: recombinant protein production with suspension-adapted HEK293-EBNA cells." Biotechnol Bioeng **75**(2): 197-203.
- Miller, W. M., H. W. Blanch, et al. (2000). "A kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous suspension culture: effect of nutrient concentration, dilution rate, and pH. Reprinted from Biotechnology and Bioengineering, Vol. 32, Pp 947-965 (1988)." Biotechnol Bioeng **67**(6): 853-71.
- Miller, W. M., C. R. Wilke, et al. (1987). "Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture." J Cell Physiol **132**(3): 524-30.
- Moerer, O., A. Schmid, et al. (2002). "Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use." Intensive Care Med **28**(10): 1440-6.
- Moore, K. A. and I. R. Lemischka (2004). "'Tie-ing" down the hematopoietic niche." Cell **118**(2): 139-40.
- Muroi, K., R. Sasaki, et al. (1989). "Medium pH determines the differentiation of human promyelocytic leukemia cells to basophils or eosinophils by culturing in a protein- and serum-free medium." Leuk Res **13**(2): 157-63.
- Murthy, U., D. J. Rieman, et al. (1990). "Inhibition of TGF alpha-induced second messengers by anti-EGF receptor antibody-425." Biochem Biophys Res Commun **172**(2): 471-6.

- Nauseef, W. M. (1986). "Myeloperoxidase biosynthesis by a human promyelocytic leukemia cell line: insight into myeloperoxidase deficiency." Blood **67**(4): 865-72.
- Nelson, K. L. and S. Geyer (1991). "Bioreactor and process design for large-scale mammalian cell culture manufacturing." Bioprocess Technol **13**: 112-43.
- Nilsson, S. K. and P. J. Simmons (2004). "Transplantable stem cells: home to specific niches." Curr Opin Hematol **11**(2): 102-6.
- Noll, T., N. Jelinek, et al. (2002). "Cultivation of hematopoietic stem and progenitor cells: biochemical engineering aspects." Adv Biochem Eng Biotechnol **74**: 111-28.
- Oda, T. and H. Maeda (1986). "A new simple fluorometric assay for phagocytosis." J Immunol Methods **88**(2): 175-83.
- Olpin, J. L. and T. Mainprize (1993). "Process optimization in animal cell culture using a small-volume stirred tank reactor." Am Biotechnol Lab **11**(12): 68-9.
- Ostby, I., L. S. Rusten, et al. (2003). "A mathematical model for reconstitution of granulopoiesis after high dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation." J Math Biol **47**(2): 101-36.
- Ozturk, S. (1992). "Effects of Ammonia and Laktate on hybridoma growth." Biotech Bioeng **39**(4): 418-431.
- Ozaki, K. and W. J. Leonard (2002). "Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy." J Biol Chem **277**(33): 29355-8.
- Ozturk, S. S. and B. O. Palsson (1990). "Effects of dissolved oxygen on hybridoma cell growth, metabolism, and antibody production kinetics in continuous culture." Biotechnol Prog **6**(6): 437-46.
- Patel, S. D., E. T. Papoutsakis, et al. (2000). "The Laktate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and Glukose metabolism in hematopoietic cell cultures." Biotechnol Prog **16**(5): 885-92.
- Ploemacher, R. E., P. L. van Soest, et al. (1993). "Interleukin-12 synergizes with interleukin-3 and steel factor to enhance recovery of murine hemopoietic stem cells in liquid culture." Leukemia **7**(9): 1381-8.
- Pschyrembel (1990). "Klinisches Wörterbuch."
- Reinhart, K. and F. M. Brunkhorst (2002). "Die Sepsis." Zentralblatt Chirurgie **127**: 161-163.
- Ricevuti, G. (1997). "Host tissue damage by phagocytes." Ann N Y Acad Sci **832**: 426-48.
- Richards, M. K., F. Liu, et al. (2003). "Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway." Blood **102**(10): 3562-8.
- Rowley, S. D. (2002). "Regulation of hematopoietic stem cell processing and transplantation." Int J Hematol **75**(3): 237-45.
- Samkiewitz, C. (1999). "Alexander Maximows Beitrag zur Theorie der monophyletischen Blutentstehung." Diss. Med. Fak. Univ. Bochum.
- Sato, T., T. Ishii, et al. (2001). "In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency." Biomaterials **22**(15): 2075-80.
- Savill, J. (1997). "Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Br Med Bull **53**(3): 491-508.
- Sawai, N., K. Koike, et al. (1999). "Neutrophilic cell production by combination of stem cell factor and thrombopoietin from CD34(+) cord blood cells in long-term serum- deprived liquid culture." Blood **93**(2): 509-18.

- Scheding, S., B. Meister, et al. (2000). "Effective ex vivo generation of granulopoietic postprogenitor cells from mobilized peripheral blood CD34(+) cells." Exp Hematol **28**(4): 460-70.
- Schmidt, S. (2000). Verfahrenstechnik für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen. Forschungszentrum Jülich, IBT-2. Jülich. **3830**.
- Schofield, R. (1983). "The stem cell system." Biomed Pharmacother **37**(8): 375-80.
- Schwabe, J. O., H. Matsuoka, et al. (1999). A novel conical shaped bioreactor for small-scale investigations under defined conditions. Animal cell technology: Products from cells, cells as product, Lugano, Kluwer Academic.
- Silverstein, A. M. (1979). "History of immunology." Cell Immunol **42**(1): 1-2.
- Smith, H. M. and T. M. Burrows (1966). "Improvements in the design of laboratory apparatus for the suspended culture of tissue cells." Lab Pract **15**(8): 864-6.
- Tagliasacchi, D. and G. Carboni (2004). Blood Cells. www.funsci.com/fun3_en/blood/blood.htm.
- Terstappen, L. W., S. Buescher, et al. (1992). "Differentiation and maturation of growth factor expanded human hematopoietic progenitors assessed by multidimensional flow cytometry." Leukemia **6**(10): 1001-10.
- Toksoz, D., K. M. Zsebo, et al. (1992). "Support of human hematopoiesis in long-term bone marrow cultures by murine stromal cells selectively expressing the membrane-bound and secreted forms of the human homolog of the steel gene product, stem cell factor." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7350-4.
- van Eeden, S. F., M. E. Klut, et al. (1999). "The use of flow cytometry to measure neutrophil function." J Immunol Methods **232**(1-2): 23-43.
- Wagner, T., G. Fritsch, et al. (2001). "IL-10 increases the number of CFU-GM generated by ex vivo expansion of unmanipulated human MNCs and selected CD34+ cells." Transfusion **41**(5): 659-66.
- Ward, A. C., D. M. Loeb, et al. (2000). "Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals." Leukemia **14**(6): 973-90.
- Weigand, M. A., H. J. Bardenheuer, et al. (2003). "[Clinical management of patients with sepsis]." Anaesthesist **52**(1): 3-22.
- Werdan, K. (2001). "Pathophysiology of septic shock and multiple organ dysfunction syndrome and various therapeutic approaches with special emphasis on immunoglobulins." Ther Apher **5**(2): 115-22.
- Wittmann, C., H. M. Kim, et al. (2003). "Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks." Biotechnol Lett **25**(5): 377-80.
- Wurm, F. and A. Bernard (1999). "Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production." Curr Opin Biotechnol **10**(2): 156-9.
- Xu, Z., A. Rollins, et al. (1998). "A novel fiber-optic pH sensor incorporating carboxy SNAFL-2 and fluorescent wavelength-ratiometric detection." J Biomed Mater Res **39**(1): 9-15.
- Yeghen, T. and S. Devereux (2001). "Granulocyte transfusion: a review." Vox Sanguinis **81**(2): 87.
- Zimmerman, T. M., J. G. Bender, et al. (1996). "Large-scale selection of CD34+ peripheral blood progenitors and expansion of neutrophil precursors for clinical applications." J Hematother **5**(3): 247-53.

12 Anhang

12.1 Häufig verwendete Puffersysteme

12.1.1 PBS

In 1 L Reinstwasser für die Zellkultur werden gelöst:

- 80 g NaCl
- 0,917 g Na₂HPO₄
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,2 g KCl

Der pH-Wert wird auf 7,2 bis 7,3 eingestellt. Lagerung bei Raumtemperatur

12.1.2 MACS-Puffer

445 mL steriles PBS (Gibco) werden unter der Sterilwerkbank versetzt mit

- 50 mL 5%(w/v) Human-Serumalbumin-Lösung (Biotest)
- 5 mL 200 mM EDTA-Lösung, steril

Die gut durchmischte Lösung wird in Portionen zu 50 mL aliquotiert und bei 2-8°C gelagert.

12.1.3 0,5% (w/v) Paraformaldehyd-Puffer (FACS-FIX)

Zur Herstellung einer 2% (w/v) FACS-FIX-Stammlösung werden in 500 mL PBS 10 g Paraformaldehyd suspendiert und die Lösung unter Rühren im Abzug vorsichtig erwärmt, bis aller Feststoff aufgelöst ist. Nach dem Abkühlen wird der pH-Wert kontrolliert (pH 7,2-7,5).

Die Gebrauchslösung wird aus der Stammlösung durch Verdünnen mit PBS hergestellt. Die Stammlösung und die Gebrauchslösung werden bei 2-8°C gelagert.

12.1.4 Annexin-Bindepuffer

In 1L Reinstwasser werden gelöst:

- 2,61g HEPES
- 8,19 g NaCl
- 0,278 g CaCl₂

Der pH-Wert der Lösung wird auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wird bei 2-8°C gelagert.

12.1.5 Chemolumineszenzpuffer

In 1 L Reinstwasser werden gelöst:

- 80 g NaCl
- 0,917 g Na_2HPO_4
- 0,2 g KH_2PO_4
- 0,2 g KCl
- 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 0,1 g CaCl_2
- 1,0 g Glukose

Der pH-Wert der Lösung wird eingestellt auf pH 7,2 bis pH 7,4. Die Lösung wird bei 2-8°C gelagert.

12.1.6 Analysator-Puffer

In 1 L Reinstwasser werden gelöst:

- 5,1 g NaCl
- 5,0 g Na_2HPO_4
- 1,0 g NaH_2PO_4
- 0,3 g Na-Benzooat
- 0,5 g Na_2 -EDTA

Der pH-Wert wird auf pH 7,3 eingestellt. Unverbrauchte Pufferreste werden maximal 1 Tag bei RT aufbewahrt, danach verworfen.

12.1.7 MA-Puffer

In 1 L Aqua dest. werden gelöst:

- 5,8 g NaCl
- 2,0 g Na_2HCO_3

Der pH-Wert wird auf pH 7,5 eingestellt. Unverbrauchte Pufferreste werden verworfen.

12.2 Medienzusammensetzungen

12.2.1 Hybridoma-Kultivierungsmedium

Gebrauchsfertiges IMDM-Basalmedium wird vor der Verwendung mit 1% (v/v) hitzeinaktiviertem FBS steril versetzt.

12.2.2 CHO-Kultivierungsmedium

Das gebrauchsfertige Medium ProCHO4 CDM (chemisch definiertes Medium) wird versetzt mit:

- 13,6 mg·L⁻¹ Hypoxanthin
- 7,6 mg·L⁻¹ Thymidin
- 0,6 g·L⁻¹ L-Glutamin

Das Medium wird sterilfiltriert und bei 2-8°C bis zur Verwendung gelagert. Für die Stammhaltung wird außerdem Geneticin 418 Sulphat zugefügt.

12.2.3 HL-60 Kultivierungsmedium

Die Kultivierung und Stammhaltung von HL-60 erfolgte, wenn nicht anders angegeben unter Verwendung der proprietären Medienformulierung Basal C des Projektpartners TERAKLIN AG. Vor der Verwendung wird das Basalmedium mit 10% (v/v) Biseko versetzt.

12.2.4 Medien zur Kultur primärer T-Lymphozyten

Die Stimulation primärer T-Lymphozyten wurde in dem Medium AIM-V (Gibco), das mit 100 U·mL⁻¹ IL-2 , 0,5 µg·mL⁻¹ und 10% FBS supplementiert wurde, durchgeführt.

Die anschließende Kultivierung erfolgte in dem Medium AIM-V (Gibco), das mit 100 U·mL⁻¹ IL-2 und 10% FBS supplementiert wurde.

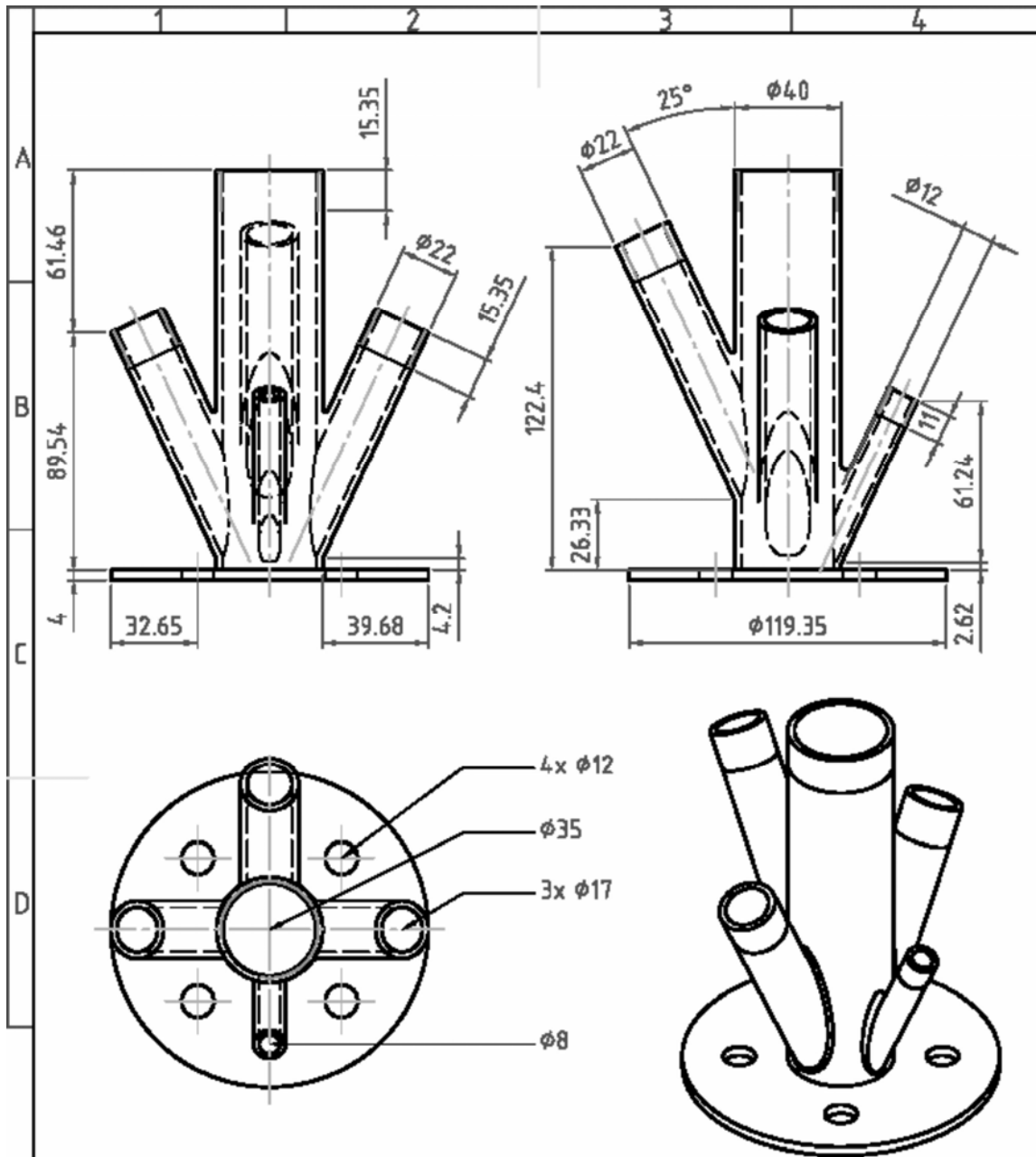
12.2.5 HL60 - Auftaumedium

Das Auftauen von HL-60 wurden gemäß einem von TERAKLIN freigegebenen Protokoll durchgeführt. Als Auftaumedium wird eine 1:1 Mischung aus Basalmedium C und Biseko jeweils frisch hergestellt und auf 2-8°C temperiert.

12.3 Reagenzien für die Produkttiterbestimmung mit ELISA

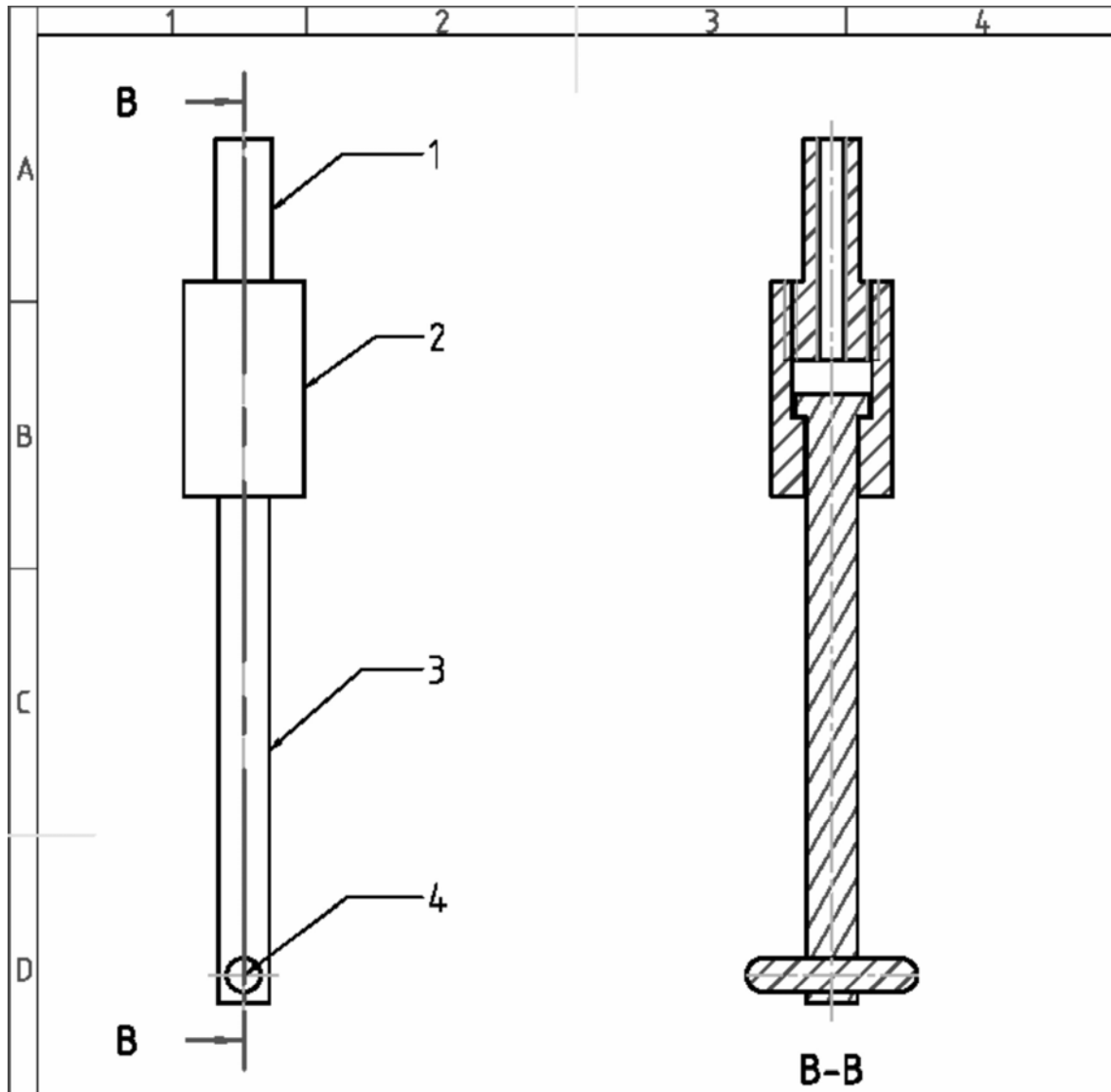
		Bestimmung des MUC1-IgG2a	Bestimmung des Maus-IgG
Lösung 1	PBS 10x	80,0 g/L NaCl 11,5 g/L Na ₂ HPO ₄ 2,0 g/L KCl 2,0 g/L KH ₂ PO ₄	80,0 g/L NaCl 11,5 g/L Na ₂ HPO ₄ 2,0 g/L KCl 2,0 g/L KH ₂ PO ₄
Lösung 1b	PBS 1x	100 mL 10x Konzentrat mit H ₂ O auf 1L füllen	100 mL 10x Konzentrat mit H ₂ O auf 1L füllen
Lösung 2	Blockierungspuffer	1% (v/v) BSA in PBS (1x)	1% (v/v) BSA in PBS (1x)
Lösung 3	Waschpuffer	0,05% (v/v) Tween20 in PBS 1x	0,05% (v/v) Tween20 in PBS 1x
Lösung 4	Beschichtungs-antikörper [Sigma M-8642]	1 mg goat anti-mouse-IgG in 1 mL 135 mM NaCl-Lösung rekonstituieren; vor Gebrauch mit H ₂ O bidest auf 3 µg/mL verdünnen	1 mg goat anti-mouse-IgG in 1 mL 135 mM NaCl-Lösung rekonstituieren; vor Gebrauch mit H ₂ O bidest auf 3 µg/mL verdünnen
Lösung 5	Antikörperstandard	570 µg/mL MUC1-IgG2a Standard mit Lösung 6 auf 1 µg/mL verdünnen	10 mg Maus-IgG in 2 mL H ₂ O lösen und mit PBS (1x) auf 10 mL auffüllen; mit Lösung 6 auf 1,5 µg/mL verdünnen
Lösung 6	Verdünnungspuffer	0,1% (v/v) BSA in PBS (1x)	0,1% (v/v) BSA in PBS (1x)
Lösung 7	Konjugatantikörper [Sigma A-5153]	goat anti-mouse-IgG + alkaline Phosphatase-Konjugat; 1:1000 mit Lösung 6 verdünnen	goat anti-mouse-IgG + alkaline Phosphatase-Konjugat; 1:1000 mit Lösung 6 verdünnen
Lösung 8	Substratpuffer (pNPP-Puffer)[Sigma N-2770]	1 Tris Puffer Tablette in 20 mL H ₂ O lösen; anschließend 1 pNPP-Tablette darin lösen	1 Tris Puffer Tablette in 20 mL H ₂ O lösen; anschließend 1 pNPP-Tablette darin lösen
Lösung 9	Stopp-Lösung	1M NaOH (M _r = 40,0g/L)	1M NaOH (M _r = 40,0g/L)

12.4 Konstruktionszeichnungen des Mini-Spinners



Gewinde nach DIN 13-1

				Oberfläche		Maßstab 1:1		Position - Menge	
								Borosilikatglas	
				Datum		Name		Minispinner	
				Bearb. 30.09.2003		M Caszowari			
				Gepr. 30.09.2003		D Kornel			
				Norm					
								Blatt 1/1	
								Bl	
								30.09.2003	
Zust. Änderungen		Datum		Name		Datum			



4	1	Magnetrührer	1000.04	PTFE
3	1	Rührstab	1000.03	PTFE
2	1	Lager	1000.02	PTFE
1	1	Schraube	1000.01	S 235 JR
Pos.	Anz	Beschreibung	Norm	Material
		Oberfläche	Maßstab 1:1	Position - Menge 1
		Datum	Name	
		Bearb. 30.09.2003	M Caszneri	
		Gespr. 30.09.2003	O Karnal	
		Norm		
			1000.00	Statt 1/1
				BL
Zust.	Änderungen	Datum	Name	Datums
				30.09.2003

Magnetrührer mit Lager und Aufhängung

12.5 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Chemikalien:

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
Aceton	Merck, Darmstadt
Casyton	Schärfe System, Reutlingen
D-Glukose	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, CH
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
EDTA	Serva, Heidelberg
Erythrosin B	Serva, Heidelberg
Essigsäure 96%	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
FACS-Clean	BD PharMingen, Heidelberg
FACS-Flow	BD PharMingen, Heidelberg
FACS-Safe	BD PharMingen, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, Berlin
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Genitacin 418 Sulphat	Gibco BRL, Eggenstein
Glycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES, Dinatriumsalz	Biochrom, Berlin
Hypoxanthin	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid	Fluka, Buchs, CH
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Asparagin-Monohydrat	Fluka, Buchs, CH
L-Glutamat	Serva, Heidelberg
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
L-Laktat	Fluka, Buchs, CH
L-Phenylalanin	Serva, Heidelberg
L-Serin	Fluka, Buchs, CH
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbenzoat	Sigma-Aldrich-Chemie, Steinheim
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid	Biochrom, Berlin
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natrium-EDTA	Serva, Heidelberg
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Fluka, Buchs, CH
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck, Darmstadt
Optilyse	Beckman Coulter, Krefeld
Phenolrot	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
pNPP	Sigma, Steinheim
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Serin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Thymidin	Fluka, Buchs, CH
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Zytokine:

<i>Zytokin</i>	<i>Hersteller</i>
G-CSF	Chugai Pharma, Frankfurt
GM-CSF	Novartis, Nürnberg
IL-1	R&D Systems, Wiesbaden
IL-3	R&D Systems, Wiesbaden
IL-6	R&D Systems, Wiesbaden
IL-10	R&D Systems, Wiesbaden
IL-12	R&D Systems, Wiesbaden
EPO	R&D Systems, Wiesbaden
Flt3-L	R&D Systems, Wiesbaden
SCF	R&D Systems, Wiesbaden

Antikörper:

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>
α -hu-CD3-CyChrome	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD4-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD8-PE	BD PharMingen, Heidelberg

α -hu-CD11b-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD14-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD14-PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD15-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD15-PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD16b-FITC	Beckman, Krefeld
α -hu-CD24-PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD25-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD34-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD34-PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD33-PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD38-CyChrome	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD45-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD45-PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD66-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-CD71-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-HLADR-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-HLADR-PE	BD PharMingen, Heidelberg
α -hu-HLADR-CyChrome	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-Myeloperoxidase-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-Myeloperoxidase-PE	BD PharMingen, Heidelberg
anti-human-Lysozym	Caltag, Hamburg
anti-human-Lactoferrin	Caltag, Heidelberg
anti-mouse-IgG-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
anti-mouse-IgM-FITC	BD PharMingen, Heidelberg
anti-mouse-IgG-PE	BD PharMingen, Heidelberg
anti-mouse-IgG-CyChrome	BD PharMingen, Heidelberg
Beschichtungsantikörper anti-mouse-IgG	Sigma, Deisenhofen
Sigma M-8642	
Konjugatantikörper goat-anti-mouse-IgG + alkaline Phosphatase-Konjugat	Sigma, Deisenhofen
Sigma A-5153	

Zellkulturmedien:

<i>Medium</i>	<i>Hersteller</i>
AIM-V	Invitrogen, Karlsruhe
Basal C	Biochrom AG, Berlin
CellGro SCGM	CellGenix Technologie Transfer, Freiburg
HL-1	Cambrex, Verviers, Belgien
IMDM	Invitrogen, Karlsruhe
Makrophage SFM	Invitrogen, Karlsruhe
Methylzellulose-Medium, MethoCult GF H4434	CellSystems Biotechnologie Vertrieb, St. Katharinen
ProCHO4 modified	Cambrex, Verviers, Belgien
Stem-Line	Sigma, Deisenhofen
StemPro34 SFM	Invitrogen, Karlsruhe
StemSpan	CellSystems, St. Katharinen
TB-1	Promocell, Heidelberg
X-Vivo 10	Cambrex, Verviers, Belgien
X-Vivo 15	Cambrex, Verviers, Belgien
X-Vivo 20	Cambrex, Verviers, Belgien

Blutprodukte, Seren und Plasma:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Fötales Rinderserum (FBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Humanes Serum und Plasma von erwachsenen Spendern	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Humanes Serumalbumin, 5%	Biotest, Frankfurt/Main
Biseko	Biotest, Frankfurt/Main

Geräte:

Gerät	Hersteller
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Deckel und Dichtungen für Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Washer Titertek	ICN Flow Biochemicals, Meckenheim
Einfrierbox für Kryoröhrchen	Nalgene, Wiesbaden
Einwegsterilfilter (0,2 μ m)	Pall Deutschland, Dreieich
FACS-Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Falconröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Finn-Pipetten	Labsystem, Helsinki, Finnland
Fluorometer, Wallac Victor ²	PerkinElmer Life Sciences, Bad Wildbad
Gewebekulturflaschen	Greiner, Solingen
Gewebekulturplatten (6-well)	Greiner, Solingen
Gewebekulturplatten (12-well)	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturplatten (24-well)	Greiner, Solingen
Gewebekulturplatten (48-well)	Greiner, Solingen
Gewebekulturplatten (96-well)	Greiner, Solingen
Gewebekulturschalen (\varnothing 35mm)	Greiner, Frickenhausen
Glasflaschen	Schott Glaswerke, Mainz
Glukose Analysator, Ebio Compact	Eppendorf, Hamburg
Glutamin/Glutamat Analysator	Yellow Springs Instruments, Bergisch Gladbach
Invertmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Düren
Kühlzentrifuge	Beckman-Coulter, Unterschleissheim
Laborzentrifuge, Typ 302	Sigma Laborzentrifugen, Osterode/Harz
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Laktat Analysator	Yellow Springs Instruments, Bergisch Gladbach
Laminar-Flow Werkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Leucosep-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen

Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Magnetic Cell Separator, Vario MACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipetten	Biohit Deutschland, Köln
Mini-Spinner	Forschungszentrum Jülich, Jülich
Neubauer-Zählkammer, Hämozytometer	Faust, Köln
Osmometer, Osmomat O30	Gonotec, Berlin
Parallele Spinnerkultivierungsanlage	DASGIP, Jülich
cellferm-pro	
Partikelzählgerät, CASY1	Schärfe System, Reutlingen
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, Düsseldorf
pH-Elektrode	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
pH-Meter und Zubehör	Metrohm, Filderstadt
Photometer	Perkin Elmer Life Science, Wildbad
Pipetten, verschiedene Volumina	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner, Solingen und Eppendorf, Hamburg
pO ₂ -Elektrode	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Schüttler	Janke & Kunkel, Staufen
Stickstofftank	Messer Griesheim, Krefeld
Tischzentrifuge	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Wasserbad	MGW Lauda, Königshoven
Wasserbeständiger Sterilfilter	Sartorius, Göttingen
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Solingen

Sonstiges:

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
MACS-CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS-Trennsäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Opteia Human-IL-3-ELISA Kit	BD PharMingen, Heidelberg
Opteia Human-IL-6-ELISA-Kit	BD PharMingen, Heidelberg
G-CSF-ELISA development kit	R&D Systems, Wiesbaden
SCF-ELISA development kit	R&D Systems, Wiesbaden

Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Wandrey für die Übernahme des Hauptreferates und eine Arbeitsumgebung, die keine Wünsche offen ließ.

Herrn Prof. Herzog möchte ich vielmals für die Übernahme des Co-Referates und sein Interesse an meiner Forschungsarbeit danken.

Meinen Dank für Herrn Dr. Thomas Noll müsste ich auf mehreren Seiten ausbreiten, um ihm gerecht zu werden. Vielen Dank für Deine hervorragende wissenschaftliche und menschliche Begleitung.

Den Werkstätten und technischen Betrieben, insbesondere Herrn Ruhrig und Herrn D'Orasneo, will ich für viele gute Ideen und die technische Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Genauso wäre diese Arbeit unmöglich gewesen ohne die Bereitschaft der vielen Eltern, das Nabelschnurblut ihrer Kinder für die Forschung zu spenden und der Geburtshilfe-Teams, die Spenden zu sammeln. Ihnen allen gebührt ein ganz dickes Dankeschön.

Frau Bianca Klein möchte ich für ihre vielen helfenden Hände, ihren Einsatz und eine gute Arbeitsatmosphäre danken.

Herrn Michelangelo Canconeri für seinen temperamentvollen Einsatz bei der Durchführung seiner Diplomarbeit.

Der ganzen Zelli-Family danke für den vielen Spaß, das große Interesse und die moralische Unterstützung.

Den Mitarbeitern der Firma Teraklin AG, allen voran Herrn Dr. Jens Altrichter, für einen lehrreichen und heiteren Forschungsaufenthalt in Rostock, ein immer offenes Ohr und fruchtbare Gespräche.

All meinen Freunden und Bekannten für die schöne Zeit mit ihnen und ihre Geduld mit mir und meinem Dickschädel.

Mein größter Dank gilt meinem verstorbenen Vater und meiner Mutter für ihre Kraft, Zuversicht und Liebe. Ihr habt mich auf den richtigen Weg gesetzt und kräftig angeschoben.