

Anwendung modifizierter, magnetisierter Polymerpartikel als Trägermaterial
zur Enzymimmobilisierung und zur Zellkultivierung in einem magnetisch stabili-
sierten Bioreaktor

Dissertation



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Hendryk Aurich
geb. am 15.12.1964 in Zwickau

Gutachter:

1. Prof. Dr. H.-P. Kleber, Leipzig
2. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann, Halle
3. Doz. Dr. U. Rothe, Halle

Halle (Saale), Mai 1998

Abkürzungsverzeichnis

ε	spezifischer Absorptionskoeffizient
λ	Wellenlänge
Abb.	Abbildung
Carbogen	Atmosphäre aus 95 % O ₂ und 5 % CO ₂
Cyt. c	Cytochrom c
D	Energiedosis
DPG	Diphosphatidylglycerol
d. h.	das heißt
dest.	destilliert
D _L	Dosisleistung
DMPE	Dimyristoylphosphatidylethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
EDTA	Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat-2-hydrat
EGF	Endothelzell-Wachstumsfaktor
FFF	Fieldflow-Fraktionierung
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxypiperazin-N-2-ethansulfonsäure
IE	Internationale Einheiten
ip	interperitoneal
K _D	Dissoziationskonstante
kGy	KiloGray (=1000 J/kg)
konz.	konzentriert
KRP	Krebs-Ringer-Puffer
magn.	magnetisch
MEM	Minimales Essentielles Medium
MeOH	Methanol
min	Minute
Mio.	Millionen
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PE	Phosphatidylethanolamin
pH	Wasserstoffionenkonzentration

pK	Gleichgewichtsexponent, Dissoziationskonstante
pKa	Aciditätskonstante
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PP	Perfusionspuffer
PPP	Präperfusionspuffer
R	Korrelationskoeffizient
red	reduziert
resp.	respektive
s.	siehe
s. S.	siehe Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
U	Einheiten
u. a.	unter anderem, und andere
UDP	Uridin-5-diphosphat
UV	ultraviolett
vergl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	3
2.	Material und Methoden	12
2.1.	Polyacrylamidträger	12
2.2.	Herstellung magnetischer Polymerträger	13
2.3.	Fraktionierung der Polymerträger nach Partikelgröße und Magnetisierungsgrad	13
2.3.1.	Fieldflow-Fraktionierung (FFF)	13
2.3.2.	Aussieben	15
2.4.	Derivatisierung magnetischer Polyacrylamidträger	16
2.4.1.	Hydrazid-Derivat	16
2.4.2.	Succinyl-Derivat	16
2.4.3.	Naphtolsulfonsäure-Derivat	16
2.4.4.	Aminoethyl-Derivat	17
2.4.5.	Carboxyliertes Derivat	17
2.4.6.	Phosphat-Derivat	17
2.4.7.	Lipidiertes Derivat	18
2.4.8.	Albuminiertes Derivat	18
2.4.9.	Collagenisiertes Derivat	19
2.5.	Sterilisierung magnetischer Polymerträger-Derivate	19
2.6.	Immobilisierung von Rattenhepatozyten an magnetischen Polyacrylamidträgern	21
2.6.1.	Isolation von Rattenhepatozyten	21
2.6.1.1.	Substrate und Materialien	21
2.6.1.1.1.	Pufferlösungen	21
2.6.1.1.2.	Zellkulturmedien	21
2.6.1.2.	Leberperfusion	22
2.6.1.3.	Präperfusionsphase	23
2.6.1.4.	Leberperfusion mit collagenasehaltigem Perfusionspuffer	23
2.6.1.5.	Freisetzung der Leberzellen und Reinigung der Hepatozyten	24
2.6.1.6.	Kryokonservierung	25
2.6.2.	Kultivierung von Hepatozyten auf flachen Unterlagen und an Polyacrylamidträgern	26
2.6.2.1.	Monolayerkultivierung	26
2.6.2.2.	Kultivierung an Polyacrylamidpartikeln	26
2.6.3.	Ermittlung der Zellzahl in der Monolayerkultur und am Polymerträger	27
2.6.4.	Biochemisch-analytische Methoden	27
2.6.4.1.	Live/dead-Färbung	27
2.6.4.2.	Bestimmung der Konjugationskapazität kultivierter Hepatozyten	28
2.6.4.3.	Bestimmung der Harnstoffproduktion	29

2.7.	Aufbau eines magnetischen Gitterreaktors zur kontinuierlichen Zellzucht von Hepatozyten	30
2.8.	Immobilisierung von Rinderaugenlinsenepithelzellen und humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) an magnetischen Polyacrylamidträgern	33
2.8.1.	Zelllinien, Substrate und Kulturmedien	33
2.8.1.1.	Epithelzellen	33
2.8.1.2.	Endothelzellen	34
2.8.2.	Zellimmobilisierung an magnetischen und nichtmagnetischen Polymerpartikeln	35
2.9.	Immobilisierung von Cytochrom c-Oxidase an magnetischen Polymerträgern	35
2.9.1.	Reinigung von Cytochrom c	35
2.9.2.	Reinigung der Cytochrom c-Oxidase	36
2.9.3.	Enzymimmobilisierung	37
2.9.3.1.	Rohlipidisolierung und Reinigung	37
2.9.3.2.	Lipidierung der Polyacrylamidträger zur Enzymimmobilisierung	38
2.9.3.3.	Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase am lipidierten Träger	39
2.9.3.4.	Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Cytochrom c-Oxidase	39
3.	Ergebnisse und Diskussion	40
3.1.	Magnetisierte Polyacrylamidträger	40
3.2.	Verhalten magnetisierter Polymerpartikel am magnetischen Gitter	43
3.3.	Oberflächenmodifizierung von Polyacrylamidträgern	44
3.3.1.	Variation der Oberflächenladung am Träger für die Zellimmobilisierung	44
3.3.2.	Bindung von Phospholipid am modifizierten Polymerträger	50
3.3.3.	Bindung von Collagen am modifizierten Polymerträger	55
3.3.4.	Bindung von Albumin am modifizierten Polymerträger	58
3.4.	Immobilisierung und Kultivierung von Rattenhepatozyten an magnetischen Polymerträgern	59
3.4.1.	Medienzusammensetzung, Trägermodifizierung und Zellanhaftung	59
3.4.2.	Kulturmedium und Zusätze, Begasung	59
3.4.3.	Hepatozytenwachstum auf magnetischen Polymerpartikeln	62
3.5.	Langzeitkultivierung im magnetischen Gitterreaktor	68
3.6.	Immobilisierung Rinderaugenlinsenepithelzellen und humanen Nabelschnurvenenendothelzellen	72
3.7.	Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase	77
3.7.1.	Eigenschaften und Aufreinigung der Cytochrom c-Oxidase	77
3.7.2.	Eigenschaften und Aufreinigung von Cytochrom c	80
3.7.3.	Immobilisierung von Cytochrom c-Oxidase am lipidierten Polyacrylamidträger	82
4.	Zusammenfassende Diskussion	89
5.	Literatur	92

1. Einleitung

Enzyme werden durch die von ihnen katalysierten Reaktionen nicht verbraucht. Werden sie im gelösten Zustand eingesetzt, ist eine kontinuierliche und wiederholte Verwendbarkeit jedoch kaum möglich. Gleiches gilt auch für intakte Mikroorganismen, die wegen ihrer geringen Größe nicht ohne weiteres aus den Reaktionsansätzen abgetrennt werden können. Durch Immobilisierung werden Biokatalysatoren (Einzelproteine, Zellorganellen, Mikroorganismen sowie pflanzliche und tierische Zellen) in einen unlöslichen und reaktionsraumbegrenzenden Zustand gebracht. In dieser Form wird ein kontinuierlicher und wiederholter Einsatz der Katalysatoren möglich, da sie nunmehr leicht aus dem Reaktionsmedium abgetrennt werden können.

Die Immobilisierung biochemisch aktiver Substanzen (niedermolekulare Liganden, Enzyme, Zellen) stellt eine besondere Variante der chemischen Modifizierung biologischer Systeme dar, die in letzter Zeit große Bedeutung erlangt hat. Der Begriff immobilisierte Systeme umfaßt alle Präparate, in denen Substanzen (Liganden und Eiweiße) mit organischen oder anorganischen Polymeren (Trägermaterialien, Matrix, Support) kovalent zu einer Einheit verbunden sind. Durch die Fixierung wird die Substanz in ihrer Löslichkeit, Beweglichkeit aber auch ihre Zugänglichkeit zu Effektoren sowie bindenden und wechselwirkenden Liganden eingeschränkt, womit eine Veränderung der physikochemischen, chemischen und biologischen Eigenschaften des Immobilisats einher geht. Ist das Trägermaterial ein in Wasser unlöslicher Stoff, so verliert auch die zu immobilisierende Substanz ihre Löslichkeit und kann als Feststoff eingesetzt werden. Daraus ergeben sich viele Vorteile, die das matrixfixierte Biomolekül im Vergleich zur löslichen Form besitzt:

- Es besteht die Möglichkeit, die gebundenen biochemisch aktiven Substanzen nach der Reaktion aus dem Reaktionsmedium abzutrennen und einem weiteren Einsatz wieder zuzuführen.
- Es besteht die Möglichkeit einer kontinuierlichen Prozeßführung.
- Immobilisierte Präparate weisen häufig eine höhere Stabilität gegenüber chemischen und thermischen Belastungen auf.

Die folgende Übersicht demonstriert den vielfältigen Einsatz von immobilisierten (Bio-) Katalysatoren in verschiedenen Forschungszweigen:

1. Immobilisierung nieder- und höhermolekularer Liganden

- Polymere Katalysatoren
 - Polymere Phasentransferkatalysatoren
 - Polymere Basen und Säuren

- Immobilisierte Metallverbindungen und -komplexe
 - Festphasenproteinchemie
 - Affinitätschromatographie
 - Festphasensequenzanalyse
 - Festphasenimmunoassay
2. Immobilisierte Biokatalysatoren
- immobilisierte Enzyme
 - kontinuierliche Enzymkatalyse
 - Enzymmodifizierung mit mono- und bifunktionellen Reagenzien
 - Bindung an lösliche Träger
 - immobilisierte Zellfragmente
 - immobilisierte Zellen

Aufgrund der besonderen Eigenschaften immobilisierter Systeme stehen besonders matrixfixierte Enzyme im Blickpunkt des Interesses (MOSBACH 1976a, MOSBACH 1976b, POULSON 1984, HARTMEIER 1986).

Eine der ersten technischen Anwendungen eines immobilisierten Enzyms war die bereits 1969 eingeführte L-Aminosäureherstellung mittels immobilisierter L-Aminoacylase. Der Prozeß nutzt die Fähigkeit des Enzyms aus, nur die L-Form acetylierter Aminosäuren zu spalten, die dann als freie Aminosäuren leicht von der acetylierten D-Form abgetrennt werden kann.

Immobilisierte Isomerasen und Hydrolasen (Glucoseisomerase, -amylase) an Polymerträgern zur Herstellung fructosehaltiger Sirupe sind zu einem wichtigen Werkzeug in der Zuckerindustrie geworden. Die Spaltung von Lactose mit Hilfe der immobilisierten β -Galactosidase aus Hefe zu Glucose und Galactose ist in einigen Ländern großtechnisch verwirklicht.

Durch stereoselektive reduktive Aminierung können mit L-Aminosäuredehydrogenase, die zur Realisierung des Prozesses im industriellen Maßstab mit NADH₂ und Formiatdehydrogenase coimmobilisiert wird, aus α -Ketosäuren L-Aminosäuren hergestellt werden. Die Herstellung von L-Asparaginsäure erfolgt durch mikrobielle Fermentation oder mit immobilisierter L-Aspartase.

Ein weiteres technisches Verfahren mit immobilisierten Systemen gibt es bei der Penicillin-Derivatisierung (Spaltung von Penicillin G zu 6-Aminopenicillansäure). Man ist dazu übergegangen, immobilisierte Enzyme in der enzymatischen Analytik (Affinitätschromatographie, Sensortechnik, verschiedene Immunomethoden) und in der therapeutischen Medizin (intra- und extrakorporale Enzymtherapie, künstliche Organe) erfolgreich einzusetzen (BOWERS und CARR 1980, KURIYAMA et al. 1985, CHANG 1984, FREED et al. 1993, KOOPAL und NOLTE 1994, DORETTI et al. 1996).

Die Wiederverwendbarkeit und die Stabilität immobilisierter Enzyme und Zellen sowie die

Verminderung der Größe der Reaktionsvolumen stellen entscheidende Vorteile dar (VAN DER VELDEN DE GROOT 1995, FREED et al 1993, XIAO et al. 1994, DELOS-SANTOS et al. 1995, YAHI et al. 1995). Der Einsatz von Säulenbioreaktoren, die mit trägerfixierten Biomaterialien gefüllt sind, an denen das lösliche Substrat vorbeifließt, erweist sich als besonders leistungsfähig. Der Einsatz dieser Technik wird jedoch oft kompromittiert durch den Aktivitätsverlust der Enzyme bzw. das Absinken der Zellvitalität nach der Immobilisierung sowie durch die hohen Kosten der Trägermaterialien. Um den Aktivitätsverlust zu kompensieren, werden Mikrocarrier genutzt, die bei maximaler Beladung eine hohe Aktivität pro Partikelvolumen aufweisen.

Die geringe Dichte des Trägermaterials kann bei einzelnen Prozessen zur Folge haben, daß die Träger in viskosen Flüssigkeiten (Einsatz immobilisierter Enzyme in der Zuckerindustrie) nicht in der Lage sind, sich im Reaktorgefäß abzusetzen, was zu einem Ausspülen der Träger führen kann.

Dieses Problem kann mit dem Einsatz magnetischer Träger umgangen werden. Die hohe Dichte (bis $2,5 \text{ g/cm}^3$) des im Trägerkern eingeschlossenen Fe_3O_4 hat eine erhöhte Sedimentationsrate zur Folge. Zudem haben magnetische Partikel den Vorteil, daß sie leicht und schonend im Reaktionsmedium durch einfache Anwendung eines äußeren magnetischen Feldes abgetrennt werden können. Damit wird sowohl ihre Herstellung, die Immobilisierungsprozedur als auch deren Handhabung während des Reaktionsprozesses erleichtert. Die magnetische Separation schützt vor Verlusten an Zell- und Enzymaktivität, die bei klassischen Separationstechniken wie Zentrifugation oder Filtration aufgrund der Beschädigung der labilen dreidimensionalen Struktur durch Partikelkomprimierung oftmals zu beobachten sind. Besonders in Prozessen, bei denen unerwünschte kolloidale Stoffe oder vom Träger abgelöste Zellbestandteile als Verunreinigung im Reaktionsmedium auftreten, ist eine magnetische Separierung zweckdienlich. Diese Vorteile tragen dazu bei, die Kosten des Reaktionsprozesses beträchtlich zu senken.

Die Einführung von magnetischen Polymerträgern stellt somit eine Weiterentwicklung bei der Suche nach geeigneten Matrices zur Immobilisierung von Biomaterialien dar. Magnetische Partikel und Verkapselungen gelangen inzwischen auf wichtigen biotechnologischen Gebieten erfolgreich zum Einsatz:

- Enzymimmobilisierung (SAMBAMURTHY und VIJAYA 1987, PIETERS und BARDELETTI 1992, VARLAN et al. 1996)
- Affinitätsseparation (KIJAS et al. 1994, AASHEIM et al. 1994, O'BRIEN et al. 1996)
- Zellsortierung (SMELAND et al. 1992, SCHMITZ et al. 1994, HARADLSDOTTIR et al. 1995, CHA et al. 1996, MARKIEWICZ et al. 1996, YAMAGUCHI et al. 1997)
- Immunoassay (SUZUKI et al. 1993, ITAK et al. 1994, HOTTENSTEIN et al. 1995, LAWYER et al. 1996)
- als Träger retardierender Arzneistoffe (EDELMAN et al. 1983, POVEY et al. 1988, CHEN und LANGER 1997, GALLO und HÄFELI 1997)
- Krebstherapie (WONG et al. 1995, HÄFELI et al. 1995, MITSOMORI et al. 1996, PÄUSER

et al. 1997)

- Zellphysiologie - Untersuchungen zu mechanisch induzierten Streßsituationen (WANG und INGBER 1994, HERZOG et al. 1995, GLOGAUER et al. 1995, YOSHIDA et al. 1996)

Verschiedene Verfahren zur Herstellung mikrometergroßer magnetischer Partikel zur Enzymimmobilisierung sind erarbeitet und weiterentwickelt worden (PIETERS et al. 1992b). Die Silanisierung von zerstoßenem oder synthetisiertem Magnetit mit anschließender Derivatisierung mittels Glutaraldehyd gefolgt von einer adsorptiven Enzymimmobilisierung wurde beschrieben (SAMBAMURTHY und VIJAYA 1987, MATSUNAGA und KAMIYA 1987), führte jedoch nicht zu einer stabilen Oberflächenstruktur.

Eine kovalente Bindung von Enzymen an magnetische Polymerträger erhöht die Stabilität der Proteine am Träger während des Operationsprozesses (COLTON et al 1978, PIETERS et al. 1992a). Eine chemische Modifizierung des Enzyms geht jedoch häufig mit einer Abnahme der spezifischen Aktivität einher. Grund dafür sind chemische Reaktionen am Molekül, die das Reaktionszentrum des Enzyms irreversibel beeinträchtigen oder die den Substratzugang zum Reaktionszentrum erschweren oder ganz verhindern.

Der Erhalt der Enzymaktivität nach der Immobilisierung wird am besten gewährleistet, wenn das Protein nach der Bindung eine physiologische Umgebung vorfindet. Insbesondere bei der Immobilisierung von Membranenzymen kann dies erreicht werden, wenn an der Partikeloberfläche ein natives Milieu resp. eine Membranstruktur simuliert wird.

DECUYPER et al. (1988, 1990 a,b) entwickelten eine Methode, bei der Phospholipide adsorptiv an 10-20 nm große Magnetitpartikel binden. Die so am Träger ausgebildete bilayerartige Struktur dient als physiologisches Ankermilieu für Membranproteine. Rein adsorptive Bindungen beeinträchtigen jedoch die Stabilität der Membranstruktur und somit das gesamte Immobilisierungssystem, da die Lipidmoleküle unter den Bedingungen des Mediumstroms und anderen mechanischen und chemischen Einflüssen abgewaschen werden könnten. Kuppelt man die Lipide jedoch kovalent an das Trägermaterial, sollte eine stabilere Struktur der membranähnlichen Struktur erreicht werden. KALLURY et al. (1993) beispielsweise koppelte Lipidmoleküle kovalent an nichtmagnetische Polymerträger, um so eine stabile bilayerartige Lipidhülle zu erzeugen. Nach anschließender Immobilisierung von Urease konnte eine deutlich höhere Stabilität des Enzyms nachgewiesen werden. An magnetischen Trägermaterialien sind diese Koppelungsversuche bislang noch nicht durchgeführt worden.

Im Gegensatz zum Rühr- oder Fließbettreaktor ist der immobilisierte Katalysator im Festbettreaktor (Packbettreaktor) als stationäre Schicht in einer Säule angeordnet und kann so in der dichtest möglichen Form angewandt werden. Das System befindet sich in einem stationären Zustand, bei dem sich die Konzentrationen aller beteiligten Substanzen an jedem Punkt zeitlich nicht ändern. Die Folge ist eine Erhöhung der Aktivität pro Reaktorvolumen verbunder höchsten Stoffumsatzmenge pro Zeiteinheit. Er erlaubt eine einfache und kontinuierliche Arbeits-

folge und wird daher in der Industrie bevorzugt angewendet. In der Vergangenheit wurden Methoden entwickelt, bei denen magnetisierte Trägerpartikel in der Reaktorsäule von Elektromagneten umgeben war, um so das Partikelbett zu stabilisieren und zu verdichten (HU und WU 1987).

Die Immobilisierung von Enzymen bezog sich in der Regel auf einfache Systeme, die mit nur einem Enzym arbeiteten.

Man fand jedoch auch Wege zur Kombination mehrerer Enzyme in immobilisierter Form, bei denen die gebundenen Proteine eine Reaktionsfolge katalysieren. Ein Beispiel dafür ist eine Variante der Herstellung von L-Alanin aus D,L-Lactat, das zunächst in Gegenwart von Lactatdehydrogenase unter Reduktion von NAD zu Pyruvat umgesetzt wird. Das NAD wird im Zuge der nachfolgenden, von L-Alanindehydrogenase katalysierten Umsetzung des Pyruvats zu L-Alanin regeneriert (MAKRYALEAS et al. 1985).

Mit der Fixierung von Mikroorganismen an festen Trägern ergab sich ein neuer Zweig der Immobilisierungstechnik. Ziel bei der Einführung dieses Prinzips war es, die Fähigkeiten der komplexen vitalen Zellsysteme für Produktsynthesen zu nutzen, die mit der Immobilisierung einzelner Enzyme oder Enzymkaskaden nicht realisierbar sind.

Durch die Immobilisierung lebender mikrobieller Zellen (Fixierung an Trägeroberflächen oder Einschluß im Trägermaterial) kann, im Gegensatz zu Bioreaktoren, in denen sich die Mikroorganismen frei im Medium bewegen, die Leistung eines Bioreaktors durch vereinfachten Reaktoraufbau und Produktgewinnung deutlich erhöht werden (MATTIASSON 1983). Ebenso ist eine erhöhte Plasmidstabilität durch fehlenden Selektionsdruck nachweisbar (DE TAXIS DU POET et al. 1986). In den vergangenen Jahren konnten fixierte mikrobielle Zellen im technischen Maßstab zur Produktion von Biochemikalien (Ethanol, L-Aspartat, L-Alanin, Amylase), zur Steroidumwandlung, zur Schmutzwasseraufbereitung oder zur Biomasseproduktion genutzt werden (SCOTT 1987, WOODWARD 1988, ORIEL 1988, PAULSSON et al. 1993, GRIFFITHS und BOSLEY 1993).

Die Kultivierung von Zellen höherer Organismen hat ihre Wurzeln im 19. Jahrhundert, als Wissenschaftler begannen, die Gewebe und Organe des Körpers in Glasgefäßen detailliert zu untersuchen. Sie erlaubte, Zellen für gewisse Zeit außerhalb des Körpers am Leben zu erhalten. In den 50er und 60er Jahren gelang es, Tumorzellen aus bösartigen Geschwülsten von Menschen und Tieren zu vermehren (GEY et al. 1952, MOOR et al. 1966). Die Zellkultur hat mittlerweile ein so hohes Niveau erreicht, daß es in vielen Bereichen als realistisches Ziel erscheint, die *in vivo*-Verhältnisse so zu imitieren, daß normale (nicht-transformierte) Zellen unter Kulturbedingungen wachsen und sich teilen. Es ist möglich, Dauer- (oder Langzeit-) Kulturen von Zellen anzulegen, die in vielerlei Hinsicht den *in vivo* gefundenen Zellen gleichen. Zellkulturen helfen, die Mechanismen und die Prinzipien des Zellzyklus zu analysieren und die auslösenden

Faktoren für die Vermehrung von Tumorzellen und die Steuerung der Genexpression zu finden. Die Zellkultur stellt ein geeignetes System dar, um Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge zu studieren. Es gibt Anwendungen, die ohne Zellkultur nicht möglich wären: transgene Tiere, die neue oder abgewandelte Gene exprimieren; das Einschleusen fremden Erbmaterials in Empfängerzellen; Untersuchungen zur Zellfusion; Zytotoxizitätstests.

Während nichtadhärente Zellen in Suspensionskulturen gezüchtet werden, sind adhärente Zellen befähigt, an geeignete Unterlagen zu binden. Für eine Kultivierung an festem Trägermaterial sind daher nur diese Zelllinien geeignet. Man züchtet sie als Monolayer in Rollerflaschen, Plastikflaschen oder Petrischälchen.

Zusätzlich haben sich für die Zellkultivierung adhärenter Zellen Mikrocarrier besonders bewährt. Die hohe Zelldichte an den dreidimensionalen Trägersystemen sowie die leichte Handhabung machen diese Art der Zellkultur nicht zuletzt aus Kostengründen insbesondere für mittlere und größere Kulturanlagen interessant. Stellen große Zellkulturflaschen eine maximale Fläche von 0,01-0,02 m² für das Zellwachstum zur Verfügung, so besitzen Mikrocarrier bei gegebener Konzentration eine Oberfläche von 0,25 m² pro 100 ml Kulturmedium („Superbead Microcarrier“ der Firma Flow Laboratories, BRD). Es kommen Mikrocarrier zur Anwendung, die bei geringer Dichte in Spinnerflaschen oder Wirbelbettreaktoren in Schwebelage gehalten werden können. Sie bestehen entweder aus Glas oder Dextran, die mit einer geeigneten (meist collagenbeschichteten), für adhärente Zellen attraktiven Oberfläche umhüllt sind. Kultiviert man Zellen in solch hoher Dichte, ist das Kulturmedium in geschlossenen Systemen schnell verbraucht. Daher muß das Kulturmedium oft gewechselt werden, wodurch eine kontinuierliche Zellzucht kaum realisierbar ist. Die mit Zellen bewachsenen Träger in einem Festbett zu kultivieren, bei dem das Nährmedium an den Zellen vorbeifließt, sichert eine kontinuierliche Zellzucht (YAMAJI und FUKUDA 1992, VAN DER VELDEN DE GROOT 1995). Für die Zellkultur ist zwar ein festes Partikelbett günstig, jedoch kann ein zu dicht gepacktes Bettvolumen die Ausbreitung der Zellen an der Trägeroberfläche behindern und die Verfügbarkeit der im Medium gelösten Nährstoffe einschränken (TRAMPER 1995). Zudem nimmt die mechanische Beanspruchung durch vermehrten Kontakt der immobilisierten Zellen zum benachbarten Partikel zu, was zu einer Beeinträchtigung der Zellvitalität führen kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll ein magnetisches Trägersystem entwickelt werden, das sowohl der Immobilisierung von Membranenzymen dient als auch zur Zellzucht eingesetzt werden kann. Die Bemühungen zielen auf eine kostengünstige Herstellung der magnetischen Trägermaterialien, welche gute mechanische und bioverträgliche Oberflächeneigenschaften aufweisen und biochemisch inert sein sollen.

Mit geeigneten Oberflächenmodifizierungen wird angestrebt, eine maximale Beladung der Träger mit Enzymproteinen und Zellen zu erreichen.

Zudem sollte ein Bioreaktor auf der Basis magnetischer Fixierung entwickelt werden, welcher

eine kontinuierliche Prozeßführung gewährleistet.

Polyacrylamid stellt ein ideales Material als feste Matrix zur Immobilisierung von niedermolekularen Liganden, Enzymen und Zellen dar. Das Polymer erfüllt alle für eine Immobilisierung geforderten Voraussetzungen: Es ist chemisch neutral, resistent gegen Mikroorganismen und enzymatischen Abbau und besitzt eine geringe unspezifische Adsorptionskapazität. Es ist preiswert in der Herstellung. Aufgrund der modifizierbaren Porosität der Polyacrylamidträger, die bei der Herstellung chemisch kontrolliert werden kann, ist es möglich, das Trägermaterial nachträglich unterschiedlich stark zu magnetisieren. Der Träger läßt sich leicht aktivieren und derivatisieren.

Cytochrom c-Oxidase dient als Modell für die erfolgreiche Immobilisierung eines Membranenzyms am magnetischen Polyacrylamidträger. Im Gegensatz zu löslichen Enzymen benötigen membranständige Enzyme zur Verankerung eine zweite, hydrophobe Phase, an deren Grenzfläche zur wässrigen Phase sich das Enzym ausrichtet. Eine unphysiologische, direkte kovalente Kupplung dieser Membranenzyme am Träger würde einen deutlichen Aktivitätsverlust des Proteins zur Folge haben. Eine kovalent gebundene, bilayerartige Lipidstruktur an der Partikeloberfläche bietet dem Enzym ein ideales und stabiles Milieu zur Verankerung am Träger, was den weitgehenden Erhalt dessen Struktur und Enzymaktivität gewährleistet. Dies stellt eine neuartige, für Membranenzyme konzipierte Immobilisierungsstrategie dar.

Die Eignung von magnetisierten Trägern nach Variation ihrer Oberflächenladung und -beschichtung für die Zellkultivierung soll am Beispiel einer primären Hepatozytenkultur gezeigt werden. Hepatozyten repräsentieren etwa zwei Drittel der gesamten Zellpopulation der Leber. Sie weisen eine Vielzahl biologischer Funktionen auf:

1. Kohlenhydratstoffwechsel: Glycolyse, Glyconeogenese, Citratzyklus
2. Lipidstoffwechsel: Synthese und Abbau von Fettsäuren, Triglyceriden und Phospholipiden; Synthese von Cholesterol und Gallensäuren; Umwandlung von Alkohol in Fett
3. Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsel: Abbau von Blutplasmaproteinen und Hämoglobin, Transaminierungen und Desaminierungen im Aminosäurestoffwechsel, Harnstoffsynthese
4. Regulierung zur Eliminierung und Wiederverwertung von Stoffwechselprodukten

Verglichen mit anderen Säugerzellen gelten Hepatozyten als eine der am schwierigsten zu kultivierenden Zellen unter künstlichen Bedingungen. Bisherige einfache Kultursysteme von frisch gewonnenen Leberzellen führen zu einem raschem Funktionsverlust dieser Zellen. Bereits nach 24-48 Stunden beträgt die Restfunktion nur noch ca. 80 %, und nach einer Woche ist ein Stand von ca. 10 % erreicht. Dazu gehört auch, daß die Zellen ihr gesamtes Cytochrom P-450 innerhalb weniger Tage verlieren und nicht mehr in der Lage sind, Pharmaka zu metabolisieren (MASLANSKY und WILLIAMS 1982, VAN 'T KLOOSTER et al. 1994). Hepatozytenkulturen sind durch einen sich kontinuierlich verändernden Phänotypus charakterisiert. Diese Problematik führte zu zahlreichen Ansätzen, die Leberzellfunktionen in Kultur zu stabilisieren.

So wurde zum Beispiel die Zugabe von Dimethylsulfoxid als Zusatz neben Hormonen im

Kulturmedium untersucht (ISOM et al. 1985). Der Sauerstoffradikalfänger fördert das Überleben der Zellen durch a) Einfluß auf die DNA-Synthese und b) Erhalt der Albuminproduktion auf einen höheren Level über einige Wochen hinweg als es die Zugabe von Hormonen allein vermag (CHAN et al. 1989).

Es wurde gezeigt, daß eine Ko-Kultivierung mit anderen Zellarten, wie Nichtparenchymzellen (VILLAFUERTE et al. 1994), Leber-Epithel-Zellen (GUGUEN-GUILLOUZO 1986), Leber-Endothel-Zellen oder embryonale Mausfibroblasten (GOULET 1988) die Entdifferenzierung der Hepatozyten verlangsamen.

Die Verwendung einer komplexen Unterlage (Matrigel) wurde erfolgreich für den Erhalt der Cytochrom P-450- und der Glucoronidierungsaktivität eingesetzt (GUZELIAN et al. 1988). Matrigel, ein von Sarkomzelllinien produziertes Basismaterial, führt zu qualitativen Veränderungen der Genexpression der Hepatozyten.

Leberzellen werden häufig in einschichtigen Monozellkulturen auf einer proteinhaltigen, extrazellulären Unterlage kultiviert. Diese Standardkonfiguration entspricht nicht der natürlichen Situation. Hepatozyten besitzen apikale und basale Pole, die in funktioneller Hinsicht verschieden sind. So werden über die basale Oberfläche Proteine in die Blutbahn sezerniert. Gallensäuren gelangen über die apikale Oberfläche in die Gallenkanälchen.

Deshalb gibt es verschiedene Versuche, die Proliferation und die Funktion von Hepatozyten aufrecht zu erhalten, indem man die In-vivo-Situation simuliert (DUNN et al. 1991, KOIDE et al. 1989, LANDRY et al. 1985, LEE et al. 1992, ROJKIND et al. 1980). Mit diesen Methoden gelang eine Stabilisierung der Hepatozytenfunktion über 20 Tage. Die beschriebenen Langzeitkultivierungen wurden jedoch nur mit einer vergleichsweise geringen Zellzahl auf flachen Kulturunterlagen durchgeführt.

Um die Zelldichte und damit die Effektivität der Zellzucht zu erhöhen und gleichzeitig die Funktionsleistung der Hepatozyten zu erhalten, wurden Kulturtechniken entwickelt, bei denen die Zellen an dreidimensionalen Strukturen gebunden oder in Gelmatrices eingeschlossen wurden. PARSONSWINGERTER und SALTZMAN (1993) beschreiben ein Verfahren, bei dem Hepatozyten im Sandwich-Verfahren in zwei Schichten von Collagen eingebettet wurden. Dabei gelang die bipolare Adhäsion an eine extrazelluläre Matrix, wie dies auch in vivo durch die extrazelluläre Matrix des Perisinoidalen Raumes vorgegeben ist. Im Gegensatz zu herkömmlichen Kulturtechniken konnte ein stabiler Phänotypus mit Ausbildung einer Plateauphase der untersuchten Funktionen erreicht werden. SUZUKI et al. (1997) gelangen durch Einschluß von Hepatozyten in Collagengel bei 4° C wichtige Zellfunktionen zu konservieren. Ein ähnliches Verfahren stellten YANAGI et al. (1989) vor, bei dem die Zellen in Hydrogel (Calcium-Alginat) eingeschlossen wurden. Mit der Immobilisierung von Hepatozyten an porösem Harz in einem Festbettreaktor erreichte MIYOSHI et al. (1994, 1996) eine maximale Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/cm³. Eine effiziente Methode der Langzeitkultivierung mit hoher Zelldichte und Differenzierungsgrad wurde von JAUREGUI et al. (1993) vorgestellt, bei der man Hepatozyten an von Medium durchströmten Hohlfasern kultivierte. Diese Strategie entwickelte sich in jüngerer

ster Zeit zu einem System, welches unter Verwendung von hybridisierten Hepatozyten als „künstliche Leber“ bereits in der Praxis zur Anwendung gelangte (GERLACH et al. 1996, GERLACH 1996, FLENDRIG et al. 1997).

AGIUS et al. (1985) beschrieben als erste eine Kultur nichtproliferierender Hepatozyten an collagenbeschichteten Microcarriern. DEMETRIOU et al. (1986) und BOSMAN et al. (1989) benutzten an collagenbeschichtete Carrier gebundene Hepatozyten für die Behandlung von Leberinsuffizienz an Ratten, indem sie i.p. transplantiert wurden. Zur Untersuchung des Metabolismus von Xenobiotika kultivierten VOSS und SEIBERT (1991), HUGHES und WILLIAMS (1996), KINO et al. (1996) und SUN et al. (1997) Hepatozyten in (Ko-)Kultur an collagenbeschichteten und makroporösen Dextranpartikeln. Diese Kulturen konnten über 48 Stunden aufrechterhalten werden.

Bei allen beschriebenen Kulturtechniken, bei denen *in vitro* eine dreidimensionale Mikroumgebung der Leberzelle imitiert wurden, fand man im Vergleich zu konventionellen Monolayerkulturen eine deutlich verlängerte stabile Stoffwechselaktivität.

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine neuartige Zellzuchttechnik, die die Vorteile eines Festbettreaktors (hohe Zelldichte, kontinuierlicher Mediendurchfluß) mit einer Rekonstruktion der Mikroumgebung *in vivo* (bipolarer Zellwuchs auf Collagenunterlagen) verbindet und dabei die metabolischen Funktionen der Zellen über längere Zeit auf hohem Niveau erhält. Die mit Zellen bewachsenen magnetischen Microcarrier werden im Reaktorraum durch ein äußeres Magnetfeld derart fixiert, daß eine lockere Beladung der Anlage gewährleistet wird und so eine optimale Nährstoffversorgung der Zellen gesichert ist. Beim Ausschalten des Magnetfeldes sinken die Trägerpartikel samt Zellen nach unten und können so aus der Anlage entfernt werden. Ein Vergleich mit anderen Zellzuchtmethoden soll die Effizienz des neuartigen Zellzuchtreaktors am Beispiel der Hepatozytenkultivierung aufzeigen.

Sollte die Langzeitkultivierung großer Hepatozytenpopulationen auf engstem Volumen bei weitgehendem Erhalt der Zelldifferenzierung gelingen, so wäre das ein Schritt zur Konstruktion eines künstlichen Leberorgans.

2. Materialien und Methoden

2.1. Polyacrylamidträger

Die Polyacrylamidträger, die in der vorliegenden Arbeit Anwendung gefunden haben, wurden von der Firma REANAL (Budapest, Ungarn) hergestellt und unter dem Handelsnamen Acrylex P4 vertrieben. Die Träger stellen ein Copolymerisat aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-acrylamid in Perlenform dar. Abb. 1 zeigt einen Ausschnitt aus der Polyacrylamidmatrix.

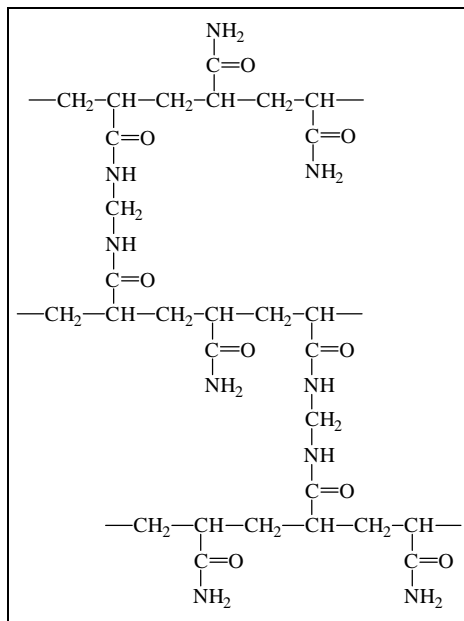


Abb. 1 Ausschnitt aus der Struktur der Polyacrylamidmatrix

Die Polyacrylamidperlen sind bis 150 °C lösungsmittel- und temperaturbeständig. Im Kontakt mit Wasser oder wässrigen Lösungen quellen die porösen Träger. Die Größe der Poren wird vom Vernetzungsgrad des Polymers bestimmt. Es werden engporige Träger mit einer Ausschlußgrenze von 4000 verwendet, das heißt, Makromoleküle mit einem Molekulargewicht über 4000 Da können nicht ins Innere der Partikel eindringen. Daraus resultiert auch der Einsatz solcher poröser Polyacrylamidgele als Materialien für die Gelfiltration. Der Durchmesser der Polymerpartikel variiert zwischen 40 und 120 µm (Trockengel). Im gequollenen Zustand erreichen die Partikel Größenordnungen zwischen 80 und 220 µm. Die Änderung der Oberflächenladung durch chemische Modifizierung der Träger kann eine Verschiebung der Größenverhältnisse des Polymermaterials zur Folge haben. Ist die Oberfläche weniger polar und/oder hat sie hydrophobe Moleküle gebunden, nimmt das Quellvermögen ab.

Zur Bestimmung der statistischen Größenverteilung werden jeweils etwa 500 trockene bzw. eingequollene Polymerpartikel bei 50-facher Vergrößerung mit Hilfe einer computerunterstützten

Bildauswertung (MIKRO, Imtronic Berlin) vermessen. Die Oberfläche kann als ideal kugelförmig angesehen werden. Zum Ermitteln des Verhältnisses von Gewicht und Sedimentationsvolumen gequollener Träger wird in 4 Meßzylinder so viel Trägersuspension überführt, daß nach einer einstündigen Standzeit Sedimentationsvolumina von jeweils 2, 3, 4 und 5 ml (cm^3) zu messen sind. Die Trägermengen werden in vorgewogenen Trockenröhrchen überführt und 5 Stunden bei 100 °C im Trockenschrank getrocknet und ausgewogen.

Vor der Weiterverarbeitung zur chemischen Modifizierung werden die Träger von Reagenzien und herstellungsbedingten Nebenprodukten befreit, indem sie über einen Filter mit Wasser gründlich gespült werden. Die Träger werden getrocknet oder in 0,1 M NaCl bei 4 °C aufbewahrt.

2.2. Herstellung magnetischer Polymerträger

4 g trockene Polyacrylamidpartikel werden in einer Mischung aus 10 ml wäßriger 1 M FeCl_3 -Lösung und 4 ml 0,5 M FeSO_4 , gelöst in 0,1 N H_2SO_4 , eingequollen. Dann überführt man die feuchten Träger in 10 ml 25 %ige Ammoniaklösung. Die Träger färben sich sofort schwarz, was von der Bildung feiner Fe_3O_4 -Präzipitate in den Poren zeugt. Die Träger werden intensiv mit Wasser gespült, bis der Überstand klar und pH-neutral bleibt und die äußere Partikeloberfläche frei von Eisenoxidpräzipitaten gewaschen ist. Der Grad der Eisenbeladung ergibt sich aus der Differenz der jeweiligen Trockengewichte der beladenen und unbeladenen Trägermaterialien.

Die so mit ferromagnetischen Eisenpräzipitaten beladenen Polyacrylamidpartikel orientieren sich im Magnetfeld. Sie dienen als Ausgangsmaterial für weitere Derivatisierungen und Oberflächenmodifizierungen.

2.3. Fraktionierung der Polymerträger nach Partikelgröße und Magnetisierungsgrad

2.3.1. Fieldflow-Fraktionierung (FFF)

Die Methode der Fieldflow-Fraktionierung erlaubt ein Separieren der Polymerpartikel nach Größe und Magnetisierungsgrad. Das Prinzip beruht im ersten Schritt auf dem Abtrennen der magnetischen von den nicht- oder nur schwach magnetischen Partikeln (magnetische Separierung). Dabei fixiert ein an der Gefäßwand angelegter Permanentmagnet die magnetischen Partikel, während andere Partikel in Suspension bleiben. Nach kurzem Spülen sind die magnetischen von den nichtmagnetischen Partikeln getrennt. Eine Separierung der Partikel nach ihrem Durchmesser erfolgt im weiteren nach dem Prinzip der sterischen FFF (steric Fieldflow-Fractionation, steric FFF; GIDDINGS UND MYERS 1978). Dabei wird ein Partikelgemisch in das Lumen eines schmalen Kanals eingebracht, durch das gleichmäßig eine Flüssigkeit strömt und die Partikel je nach Größe unterschiedlich schnell lateral in Bewegung versetzt. Partikel mit größerem Durchmesser verlassen den Kanal zuerst. Die kleineren Partikel folgen in späteren Frak-

tionen. Dieses Prinzip ist in Abb. 2 dargestellt. Es wird deutlich, daß große Partikel schneller bewegt werden als kleinere Partikel. Die Geschwindigkeit, mit der ein Partikel im

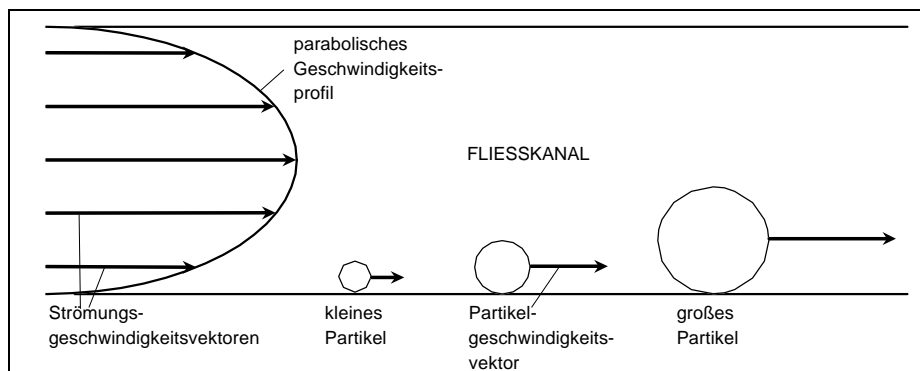


Abb. 2: Schematische Darstellung der Seitenansicht eines FFF-Kanals. Gezeigt sind die relativen Unterschiede der Geschwindigkeitsvektoren des Fließmediums, die die Bewegung der Partikel bestimmen.

Flüssigkeitsstrom vorantreibt, wird neben der Viskosität des Fließmediums von der Breite des Kanals (b) und vom Radius des Partikels (r) bestimmt. Ist r zu klein, befindet sich das Partikel in einem kanalwandnahen Bereich, in dem die Strömungsgeschwindigkeit kleiner als die Brownsche Molekularbewegung des Partikelteilchens ist. Auf zu große Partikel in zu breiten Kanälen haben die Effekte der wandnahen Strömungsunterschiede keinen separierenden Einfluß mehr. Es konnte ermittelt werden, daß die besten Fraktionierungsergebnisse bei einem b/r -Verhältnis zwischen 12 und 120 zu verzeichnen sind (GIDDINGS und MYERS 1978), wobei der Kanalquerschnitt b nicht größer als 1 mm sein soll. Daraus ergeben sich gute Trennergebnisse von Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 1 bis 200 μm .

Experimentell stehen zwei Möglichkeiten zur Realisierung der sterischen FFF zur Verfügung. GIDDINGS und MYERS (1978) benutzten einen Fließkanal bestehend aus mehreren übereinandergeschichteten, durch Spacer getrennten Glasplatten.

Eine andere Methode besteht darin, für den Fließkanal Schläuche zu verwenden, deren Innendurchmesser 1 mm betragen. Bei einer Schlauchlänge von 180 cm ergibt sich ein Fließkanalvolumen von insgesamt 5,64 ml. Mittels einer Peristaltikpumpe wird ein gleichmäßiger Mediumstrom erzeugt, der mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min durch den Fließkanal strömt. Eine schematische Darstellung der Fraktionierungsanlage ist in Abb. 3 gezeigt.

Die sterische Fieldflow-Fraktionierung erlaubt die größenbezogene Auftrennung von Partikeln, die in Suspension vorliegen und nicht getrocknet werden können. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß nur ein vergleichsweise kleines Trägervolumen aufgetrennt werden kann.

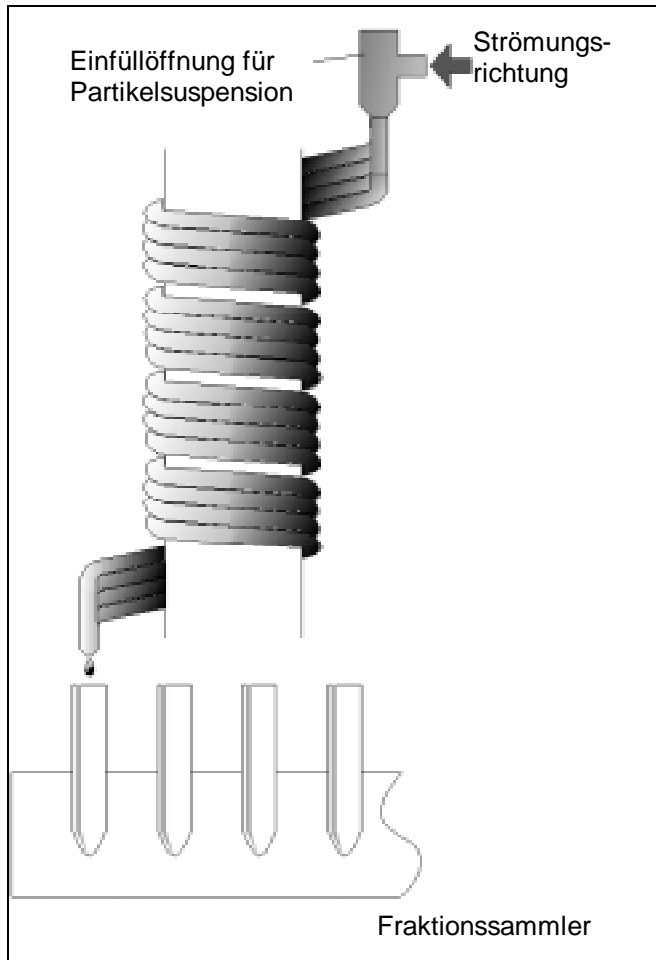


Abb. 3 Schematische Darstellung der Anlage zur sterischen FFF
Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wird ein Fließstrom erzeugt, der die Partikel aus der Suspension unterschiedlich schnell bewegt. Die getrennten Partikel werden in Fraktionssammlerröhrchen aufgefangen.

2.3.2. Aussieben

Eine einfache Methode zur größenbezogenen Auftrennung trockener Polymerträger besteht in einfachem Aussieben der Polyacrylamidpartikel. Zunächst werden die magnetischen von den nicht- oder nur gering magnetischen Partikeln mit Hilfe von Permanentmagneten abgetrennt. Dazu werden 3 g des trockenen Trägergemisches auf einem Blatt Papier dünn und gleichmäßig verteilt. Unter das Blatt positioniert man eine Anzahl aneinander gelegter Magneten, so daß eine Fläche von etwa 50 cm² zur Fixierung der magnetischen Partikel gebildet wird. Durch sehr sanftes Ausblasen können die nichtmagnetischen Träger entfernt werden.

Die zurückgehaltenen magnetischen Partikel werden auf übereinandergestapelte Siebe mit abnehmender Maschengrößen gegeben, wobei das Sieb mit den größten Maschen an die oberste Position gesetzt wird. Der mit magnetisierten Partikeln beladene Siebstapel wird auf einen Rüttler befestigt und 24 Stunden gerüttelt. Während dieser Zeit verteilen sich die Polymerträger ihrer Größe nach auf die entsprechenden Etagen. Je geringer die Differenz der Maschengrößen

der einzelnen Siebe in den Etagen ist, desto genauer erfolgt die Fraktionierung der Partikel entsprechend ihrer Durchmesser.

Mit dieser Methode ist man in der Lage, pro Ansatz vergleichsweise große Partikelmengen (bei einem Siebdurchmesser von 15 cm bis zu 10 g) zu fraktionieren. Allerdings können nur absolut trockene Partikel ausgesiebt werden.

2.4. Derivatisierung magnetischer Polyacrylamidträger

2.4.1. Hydrazid-Derivat

Etwa 3 g trockene Polyacrylamidträger werden in eine auf 50 °C erwärmte 4,5 M Hydrazinhydratlösung gegeben und im Wasserbad 5 Stunden gerührt. Am Ende der Reaktion wäscht man die Träger mit 0,1 M NaCl zunächst über einen Filter, später durch einfaches Sedimentieren. Die Waschvorgänge werden so oft wiederholt, bis der Sedimentationsüberstand frei von Hydrazinhydrat bleibt, was durch Ausbleiben der dunkelroten Färbung nach Zugabe von wenigen Tropfen 3 %iger Natrium-2,4,6-trinitrobenzensulfonsäure gelöst in einer gesättigten Natriumborat-Lösung kontrolliert werden kann. Die Träger werden gewaschen und getrocknet oder in 0,1 M NaCl bei 4°C aufbewahrt.

2.4.2. Succinyl-Derivat

Etwa 1 g trockene Hydrazidträger werden in 0,1 M NaCl gewaschen, in ein Becherglas überführt und in 30 ml 0,1 M NaCl-Lösung suspendiert. Während die Suspension intensiv gerührt wird, gibt man im Zeitraum von 10 Minuten kleine Portionen pulverisiertes Bersteinsäureanhydrid hinzu (insgesamt etwa 1 g). Durch Zugabe von 2 N NaOH wird der pH auf 4,0 gehalten. Der Abschluß der Reaktion wird durch den Nachweis von nichtumgesetztem Hydrazid mit Natrium-2,4,6-trinitrobenzensulfonsäure überprüft (s. 2.4.1.). Färben sich die Träger rötlich, ist eine weitere Zugabe von Bernsteinsäureanhydrid erforderlich. Bei negativem Farbttest wird die Suspension noch weitere 2 Stunden langsam gerührt.

Da die Reaktion vom Hydrazid- zum Succinylderivat quantitativ mit einer Ausbeute von 100% erfolgt, ist die Anzahl der Carboxylgruppen am Succinylderivat, ermittelt durch Titration, identisch mit der Kapazität der funktionellen Gruppen des Hydrazidderivates.

2.4.3. Naphtolsulfonsäure-Derivat

1 g trockene Hydrazidträger werden mit 0,1 M NaCl und mit 0,25 N HCl gewaschen. Anschließend suspendiert man die Träger in 50 ml 0,25 N HCl, kühlt auf 0 °C ab und gibt schnell 4 ml 0,1 M Natriumnitrit zu. Nach 2 Minuten werden der Suspension 5 g Aminonaphtolsulphonsäure, gelöst in 16 ml 0,1 M Natriumtetraborat (pH 9,3), zugefügt. Unter langsamen Rühren beläßt man das Gemisch 70 Minuten bei 0 °C. Schließlich werden die Träger nochmals mit 0,25 N HCl und mit 0,1 M NaCl gewaschen.

Zur Bestimmung der spezifischen Kapazität der Naphtolsulfonsäure-Träger titriert man zunächst mit 1 N HCl von pH 8,2 bis pH 2,8, um die Konzentration der freien Carboxylgruppen zu erfassen. Aufgrund des sehr niedrigen pK-Wertes ist eine direkte Titration der Naphtolsulfonsäuregruppen nicht möglich. Jedoch kann die Bestimmung der Naphtolsulfonsäuregruppen aufgrund der Bildung des Pyridiniumsalzes durch Titration des Pyridiniumkations zu Pyridin erfolgen (INMAN und DINTZIS 1969). Dabei überführt man die Träger auf eine Glasfritte, wäscht sie mit kleinen Portionen (insgesamt 200 ml) 0,1 M Pyridiniumhydrochlorid (Pyridin + HCl, pH 2,8) und spült anschließend mit Wasser. Die Trägersuspension wird vorsichtig in ein Becherglas überführt und in 8 ml einer 2 M NaCl-Lösung suspendiert. Titriert wird mit 1 N NaOH bis pH 8,2. Die Kapazität an Naphtolsulfonsäuregruppen kann aus der Differenz von zugefügtem NaOH und dem Milliäquivalent der Carboxylgruppen, ermittelt aus der ersten Titration, bestimmt werden.

2.4.4. Aminoethyl-Derivat

20 ml wasserfreies Ethylendiamin wird im Wasserbad auf 90 °C erhitzt. Unter Rühren erfolgt langsam die Zugabe von 1 g trockener Polyacrylamidträger. Während der Reaktionszeit von 6 Stunden ist auf die Konstanz der Temperatur von 90 °C zu achten. Anschließend ist es erforderlich, das Reaktionsgefäß im Eisbad unter Zugabe von etwa 15 g zerschlagenem Eis rasch auf 0 °C abzukühlen. Im folgenden werden die Träger mit 0,1 M NaCl über einen Filter und durch Sedimentation gewaschen bis der Überstand frei von Ethylendiamin bleibt, was durch einen negativen Farbtest mit Natrium-2,4,6-trinitrobenzensulfonsäure (s. 2.4.1.) nachgewiesen wird.

Zur Ermittlung der Aminoethylgruppen - Konzentration am Träger titriert man eine Trägerprobe zwischen pH 11,0 und pH 6,2 in 0,2 M KCl.

2.4.5. Carboxyliertes Derivat

Zur Desamidierung wird 1 g trockenes Polyacrylamidträgermaterial in 20 ml 0,5 M Karbonatpuffer pH 10,3 bei 60 °C suspendiert und 3 Stunden gerührt. Dabei wird der Träger einer teilweisen Hydrolyse unterzogen. Danach werden die Träger mit 0,1 M NaCl gewaschen, bis der Überstand einen neutralen pH aufweist. Zur Bestimmung der Carboxylgruppenkonzentration ist eine Titration von pH 6,2 bis pH 2,7 mit 1 N HCl erforderlich.

2.4.6. Phosphoryliertes Derivat

Etwa 100 mg trockene Hydrazidträger werden in 5 ml wasserfreies Chloroform gegeben. 5 ml wasserfreies, frisch destilliertes Phosphoroxychlorid (POCl_3) und 100 μl N,N-Di-isopropylethylamin, gelöst in 5 ml Chloroform, werden der Trägersuspension zugeführt. Man rührt das Gemisch anschließend über Nacht. Nach der anschließenden Zugabe von 20 ml 0,1 M NaOH zur Suspension wird diese durch intensives Schütteln durchmischt. Die Träger werden

filtriert und mit Wasser gewaschen.

Die Anzahl gebundener Phosphatgruppen ermittelt man nach der Methode von AMES (1966) (s. 2.4.7.).

2.4.7. Lipidiertes Derivat

Eine kovalente Kopplung von Phospholipiden an die Polyacryl-Trägermatrix gelingt sowohl am Aminoethyl- als auch am Hydrazid-Derivat. Aufgrund der höheren Reaktivität ist dem Hydrazid der Vorzug zu geben. Als Kopplungsreagenz dient ein Phosphatidylethanolamin. Da ver-esterte Phospholipide (z.B. 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) unter unphysiologischen Bedingungen (erhöhte Temperatur, hoher oder niedriger pH, Trockenheit, lange Lagerung) instabil sind (Hydrolyse der Esterbindung), sollte man für die Lipidkopplung ver-etherte Phospholipide (z.B. 1,2-Dihexadecyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin) einsetzen. 1 g Hydrazidträger wird in 20 ml wasserfreiem Dioxan intensiv gerührt. Zur Suspension gibt man 100 µl N,N-Diisopropylethylamin und 1 g Cyanurchlorid und rührt die Suspension bei Raumtemperatur über Nacht. Im folgenden wird der Überstand abgesaugt, zunächst mit Dioxan und anschließend mit Chloroform gewaschen. Die Resuspendierung der Träger erfolgt in 20 ml wasserfreiem Chloroform, in dem 50 mg 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin gelöst sind. Nach der Zugabe von 100 µl N,N-Diisopropylethylamin und Rühren bei Raumtemperatur über Nacht, werden die Träger mit Chloroform gewaschen und über eine absteigende Alkoholreihe ins wässrige Milieu überführt.

Die Ermittlung des gebundenen Phospholipids erfolgt in Abwandlung einer von AMES (1966) beschriebenen Methode zur quantitativen Bestimmung phosphathaltiger Substanzen. Zu etwa 10 mg trockenem lipidierten Trägermaterial, suspendiert in 50 µl Wasser, sowie zu 50 µl Phosphatstandard (Eichwert) gibt man 50 µl Veraschungsreagens (8 M H₂SO₄/6 M Perchlorsäure im Verhältnis 1:5, v/v) und verascht das Gemisch vollständig bei 320 °C. Nach erfolgter Abkühlung werden 20 µl konzentrierter H₂SO₄ zu jeder Probe gegeben und 5 Minuten inkubiert. 2,2 ml eines Gemisches aus 16 g K₂S₂O₅, 0,252 g 1-Amino-2-hydroxy-naphtalin-4-sulfonsäure und 0,5 g Na₂SO₃ ad 100 ml und 50 ml einer 0,26 %igen wässrigen Ammoniummolybdat-Lösung ergeben ein „Farbreagens“, von dem 1 ml jeder Probe zugefügt wird. Nach erfolgter Inkubation der Proben (20 min bei 90 °C) und deren Abkühlen wird die Absorption der Proben innerhalb einer Stunde im Spektralphotometer bei λ=820 nm vermessen. Bezugnehmend auf die mitgeführten Eichwerte kann auf den Phosphatgehalt der Proben geschlossen und die entsprechende Lipidmenge der eingesetzten Proben errechnet werden.

2.4.8. Albuminiertes Derivat

Die kovalente Bindung von Albumin erfolgt über eine Acylazid-Aktivierung der Hydrazid-Derivate der Polymermatrix und anschließender Kupplung mit Aminogruppen des Proteins. Dafür werden 1 g des Hydrazidträgers zunächst in 0,1 M NaCl und danach in 0,25 N HCl (ca.

50 ml) gewaschen. Die Träger resuspendiert man in 50 ml 0,25 N HCl, kühlt diese im Eisbad auf 0 °C ab, fügt 10 ml einer 1 M Natriumnitrit-Lösung hinzu und rührt anschließend 10 min im Eisbad. Danach werden die Träger mit eiskaltem 0,25 M HCl und Wasser gewaschen und im folgenden in 50 ml einer eiskalten 1 %igen Rinderserumalbumin-Lösung in 0,1 M Natriumtetraborat resuspendiert. Nachdem die Träger 1 Stunde im Eisbad gerührt wurden, gibt man 10 ml eines Gemisches aus 1M NH₄OH und 3 M NH₄Cl hinzu, um unreaktives Azid zu konvertieren. Die Träger werden weitere 60 Minuten gerührt und dann mit 0,1 M NaCl und Wasser gewaschen.

Zur Bestimmung des gebundenen Albumins ermittelt man die Differenz der Eiweißkonzentrationen im Überstand vor und nach der Kopplungsreaktion nach der Methode von LOWRY (1951).

2.4.9. Collageniertes Derivat

2 g aminoethylierte Polymerträger werden in 20 ml 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0 suspendiert und gerührt. 3 ml einer Collagenlösung (2 mg/ml Collagen Typ IV (Collagen R, SERVA, Deutschland) in 50 mM Essigsäure pH 3,0) fügt man hinzu und rührt die Suspension 16 Stunde. Danach werden die Träger zunächst mit 0,1 M Acetatpuffer pH 5,0, dann mit 0,1 M NaCl gewaschen.

Das am Träger gebundene Collagen wurde mit einer neu entwickelten turbidimetrischen Methode bestimmt, die im Gegensatz zur herkömmlichen Hydroxyprolin-Methode nach WOESSNER (1961), bei dem das Collagen gemeinsam mit den Polyacrylamidträgern hydrolysiert wurde, keine störende Hintergrundfärbung aufweist.

Zu 100 µg collageniertem Trägermaterial gibt man 200 µl einer Lösung aus 36 % Harnstoff, 3 % SDS und 30 % Trichloressigsäure in Wasser und schüttelt die Suspension 5 min. 100 µl des Überstandes werden mit 100 µl einer Lösung versetzt, die aus 3 % SDS und 30 % Trichloressigsäure, gelöst in Wasser, besteht. Die Bestimmung der entstandenen Trübung im Überstand erfolgt spektrofotometrisch bei $\lambda=405$ nm. Die am Träger gebundene Collagenmenge wird anhand einer durch mitgeführten Collagenstandard erstellten Eichkurve ermittelt.

2.5. Sterilisierung magnetischer Polymerträger-Derivate

Die Gewährleistung einer kontinuierlichen Langzeitkultivierung tierischer Zellen an magnetischen sowie nichtmagnetischen Polymerträgern setzt steriles Polymermaterial voraus. Im folgenden werden Methoden beschrieben, die eingesetzt werden können, um potentielle Kontaminanten (Bakterien, Pilzsporen), die am Trägermaterial haften, zu töten.

- organische Lösungsmittel

Träger-Derivate, die Lösungsmittelresistenz aufweisen (ausgenommen sind Säurederivate [Hydrolysegefahr], lipidierte Derivate und mit Proteinen beschichtete Träger), können mit 70 % Ethanol gewaschen, unter sterilen Bedingungen in die wäßrige Phase überführt und in sterilem Medium unter eventuellem Zusatz von NaN₃ und/oder Antibiotika bei 4 °C gelagert werden.

Zudem besteht die Möglichkeit, anstatt 70 %igen Ethanol sauberes, frisch destilliertes Chloroform zu verwenden. Unter dem Einfluß organischer Lösungsmittel denaturieren die Proteine der Kontaminanten. Die Mikroorganismen werden somit abgetötet.

- Autoklavierung

Die Temperaturbeständigkeit der Polyacrylamidträger gestattet deren Autoklavierung. Dazu überführt man die Träger in dest. Wasser und läßt sie 1 Stunde einquellen. Danach wird die Suspension 20 min lang in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, bei 121 °C und einem Druck von 104 kPa entkeimt. Unter solchen Bedingungen können Bakterien, Pilze sowie deren Sporen, Viren und Mycoplasmen nicht überleben, da ihre Proteine in der „feuchten Hitze“ denaturieren. Die Träger überführt man anschließend in ein mit Antibiotika versetztes Medium. Ausgenommen von der Autoklavierung werden lipidierte und mit Protein beschichtete Trägerderivate (Denaturierungsgefahr).

- Bestrahlung

Setzt man lebende Organismen intensiver kurzwelliger Strahlung aus, können ihre Zellen aufgrund schwerer Schädigung, verursacht durch Radikalbildung, Basenpaarvernetzungen und DNA-Punktmutationen, abgetötet werden. Diese Eigenschaften von UV- und harter γ -Strahlung setzt man daher erfolgreich für Sterilisationszwecke ein. Die schwächere ultraviolette Strahlung, die ähnliche Wirkungen aufweist, besitzt ein geringeres Durchdringungsvermögen und ist somit nur für die Sterilisation von Oberflächen, jedoch nicht für optisch dichte, poröse Polymerkugeln geeignet.

Proben aller Trägerderivate wurden in der Bestrahlungsanlage „Panorama“ im IOM Leipzig bestrahlt. Jeweils 5 g (Feuchtwicht) jeder Partikelcharge wurden dazu in 10 ml-Plastikröhrchen gefüllt und luftdicht verschlossen. Die Bestrahlungszeit betrug 1:49 h bei einer Energiedosisleistung von $D_L=13,7$ kGy/h und einer resultierenden Energiedosis von $D=25$ kGy.

Die nach der Bestrahlung collagenbeschichteter Träger auftretenden Verklumpungen der Partikel lösen sich bei kurzer Einwirkung von Ultraschall schnell auf.

2.6. Immobilisierung von Rattenhepatozyten an magnetischen Polyacrylamidträgern

2.6.1. Isolation von Rattenhepatozyten

2.6.1.1. Substrate und Materialien

2.6.1.1.1. Pufferlösungen

I. Krebs-Ringer-Puffer (KRP), Ca²⁺-frei

NaCl	7,00 g/l
KCl	0,36 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,30 g/l
KH ₂ PO ₄	0,163 g/l
NaHCO ₃	2,02 g/l

II. Präperfusionspuffer (PPP), Ca²⁺-frei

500 ml KRP werden mit 50 mg EDTA auf 37 °C erwärmt. Die Lösung begast man 30 min mit Carbogen (5 % CO₂/95 % O₂) wobei sich ein pH von 7,4 einstellt.

III. Perfusionspuffer (PP), Ca²⁺- und collagenasehaltig

200 ml KRP werden mit 118 mg CaCl₂ und 714 mg HEPES versetzt. Mit 2 M NaOH wird der pH auf 7,5 eingestellt. Nach 30 minütiger Einleitung von Carbogen gibt man zur Lösung 80-100 mg einer geeigneten Collagenasecharge (z.B. Collagenase Typ IV, Sigma Chemical Co., USA) hinzu.

Alle Pufferlösungen werden vor jeder Perfusion frisch hergestellt und sterilfiltriert.

2.6.1.1.2. Zellkulturmedien

Zum Waschen der Hepatozyten und bei der Kultivierung verwendet man William's Medium E (Sigma Chemical Co., USA) mit folgenden Substanzen auf 1l:

NaHCO ₃	2,20 g	[26,2 mM]
HEPES	2,38 g	[10,0 mM]
Na ₂ SeO ₃	17,30 µg	[100,0 nM]
Gentamycin	50,00 mg	[50 µg/ml]
Fetales Kälberserum	10,0 ml	[1%]

Nach Einstellung des Basismediums auf pH 7,4 erfolgt eine Sterilisierung des Mediums durch Filtrieren über einen 0,2 µm-Membranfilter.

Folgende Zusätze bereitet man als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen vor:

100 μ M Dexamethason	(0,039 mg in 1 ml DMSO; selbststerilisierend)
100 μ M Insulin	(6 mg in 2 ml 0,01 M HCl werden mit 0,15 M NaCl zu 10 ml aufgefüllt)
1 μ M Glucagon	(0,035 mg in 10 ml 0,15 M NaCl)
5 μ M Endothelzell-Wachstumsfaktor	(0,3 mg in 10 ml 0,15 M NaCl)
1 mM Ethanolamin	(0,61 mg in 10 ml 0,15 M NaCl)
5 mg/ml Apo-Transferrin	(50 mg in 10 ml 0,15 M NaCl)

Alle Stammlösungen (außer Dexamethason) werden durch Filtrieren der Lösungen durch einen 0,2 μ m Membran-Filter sterilisiert. 100 μ l jeder Stammlösung gibt man zu 100 ml Basismedium hinzu.

2.6.1.2. Leberperfusion

Die Gewinnung von Leberparenchymzellen erfolgt durch eine Collagenaseperfusion der Leber *in situ* nach einer leicht abgewandelten Methode von BRÖMME und WILSCHINSKI (1992) basierend auf einer Methode nach SEGLEN (1976).

Eine männliche Wistar ratte mit einem Körpergewicht zwischen 260 und 350 g wird durch eine Injektion (ip) mit Thiopental (10-13 mg/100 g Körpergewicht) narkotisiert. Nach geeigneter Fixierung des Tieres auf dem Operationstisch erfolgt eine gründliche Desinfektion des Bauchfells. Das Bauchfell wird im Bereich des Operationsfeldes entfernt und der Bauchraum eröffnet, indem ein Schnitt in die Bauchdecke entlang der Linea alba bis zum Sternum geführt wird, ohne dabei den Brustraum zu verletzen. Es folgt eine doppelte Ligatur der Speiseröhre und der zum Magen laufenden Gefäße. Die Speiseröhre wird zwischen den Ligaturen zertrennt und der Magen gemeinsam mit den Darmschlingen nach rechts exponiert. Die nun freiliegende Portalvene (Vena portae) wird zunächst zweimal lose ligiert: Die erste Ligatur bringt man distal zur Milzvene an. Die zweite wird 1,5 cm distal zur ersten gesetzt. Danach erfolgt die Unterbindung des Blutflusses der Milzvene (Vena lienalis) und der Zuführgefäße der Leberarterie (Arteria hepatica) durch jeweils eine feste Ligatur. Anschließend setzt man eine lose Ligatur suprarenal um die untere Hohlvene (Vena cava inferior). Über eine Punktierung der unteren Hohlvene erfolgt zunächst eine Applikation von 500 μ l einer Suspension magnetischer Mikropartikel (1 mg/ml Dynabeads[®] in 0,9 M NaCl-Lösung). Diese Mikropartikel werden von den Kupfferschen Sternzellen phagozytiert. Nach 10 min werden 0,2 ml Heparin (1000 U) ebenfalls in die untere Hohlvene injiziert. Nach weiteren 5 min schließt man die distal gelegte Ligatur um die Portalvene und führt eine mit dem Vorratsgefäß (vgl. Abb. 4) über einen Silikongummischlauch verbundene Metallkanüle vorsichtig in die Portalvene ein. Durch Zuziehen der zweiten Ligatur wird die Kanüle fest eingebunden. Zu dieser Zeit sind Schlauch und Kanüle bereits luftblasenfrei mit PPP (37 °C) gefüllt. Nachfolgend öffnet man den Brustraum mit einem Scherenschlag und bindet die untere Hohlvene zwischen Zwerchfell und Herz ab. Durch einen weiteren Scherenschlag eröff-

net man die untere Hohlvene unterhalb der suprarenal lose vorgelegten Ligatur und bindet anschließend eine zweite Kanüle in die Hohlvene ein, die durch Zuziehen der Ligatur fest fixiert wird.



Abb. 4 Kanülierung im geöffneten Bauchraum der Ratte

2.6.1.3. Präperfusionsphase

Die Durchflußrate des PPP kann jetzt auf 35-40 ml/min erhöht werden. Der Perfusionsdruck beträgt 15-20 cm Wassersäule. Nach einmaliger Leberpassage fließt der PPP über die in die untere Hohlvene eingeführte Kanüle ab. Der Erfolg der Blutfreispülung ist an der Aufhellung und leichten Anschwellung der Leber nach wenigen Sekunden sichtbar.

2.6.1.4. Leberperfusion mit collagenasehaltigem Perfusionspuffer

Nach 10 min ist die Präperfusionsphase beendet. Es erfolgt nun die Zuleitung des collagenasehaltigen PP durch Schließen des Schlauches A und Öffnen des Schlauches B (vgl. Abb 5). Die Durchflußgeschwindigkeit von 30-40 ml/min kann über einen Quetschhahn an Schlauch B gesteuert werden. Nach wenigen Minuten ist der Erfolg der Desintegration der Leber sichtbar. Die Leber ist deutlich angeschwollen und weist dunkle Desintegrationsfelder auf. Aufgrund der zunehmenden collagenasebedingten Verdauung der Blutgefäße ist ein ungewollter Austritt des PP möglich.

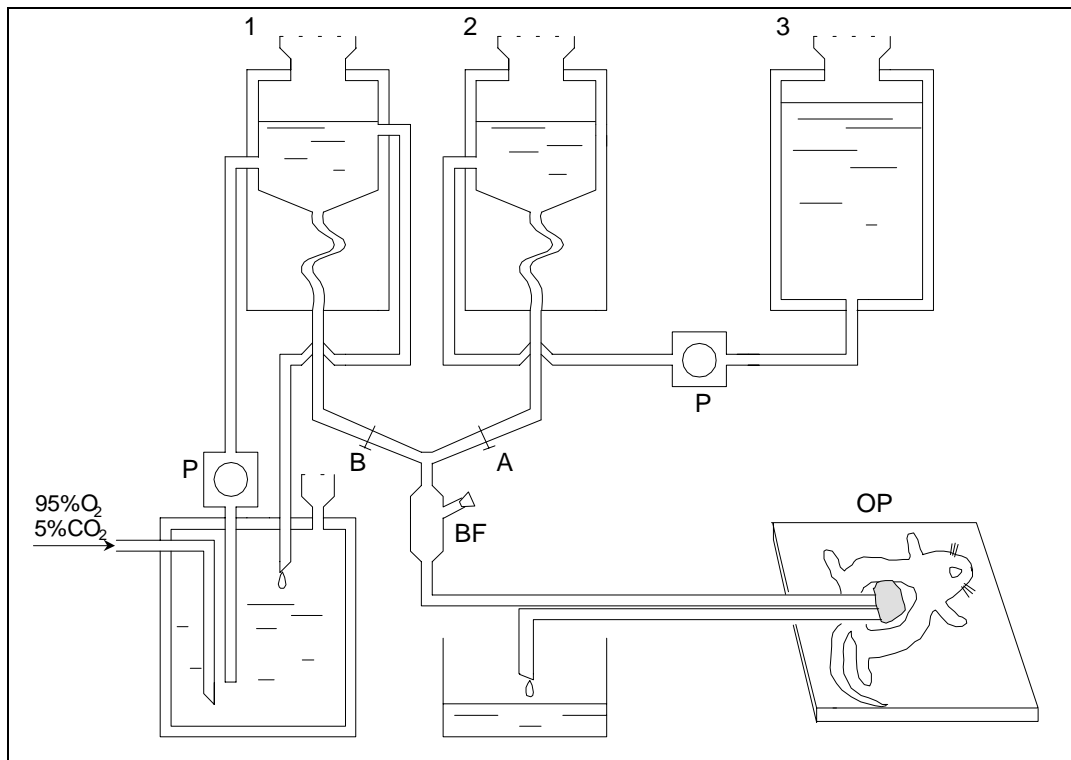


Abb. 5 Aufbau der Anlage zur in situ Perfusion der Rattenleber

- 1 - Thermostatierbares Zulaufgefäß zur Aufnahme des collagenasehaltigen Perfusionspuffers
- 2 - Thermostatierbares Zulaufgefäß zur Aufnahme des Präperfusionspuffers
- 3 - Thermostatierbares Reservoir des Präperfusionspuffers
- 4 - Thermostatierbares Reservoir des collagenasehaltigen Perfusionspuffers
- A,B Quetschhähne
- BF Blasenfalle
- P Peristaltikpumpe
- OP Operationstisch

2.6.1.5. Freisetzung der Leberzellen und Reinigung der Hepatozyten

Der Perfusionszufluß wird nach 6-10 min gestoppt, und die beiden Kanülen werden entfernt. Danach präpariert man die Leber aus der Bauchhöhle heraus, wäscht sie kurz in KRP und überführt sie in 50 ml Williams' Medium E. Mit einer Lanzette ritzt man die Leberkapsel vorsichtig auf. Das an der Leber noch anhaftende Zwerchfell wird mit einer Pinzette gefaßt und im Medium langsam hin und her geschwenkt. Dabei werden die Hepatozyten und ein Großteil der Nichtparenchymzellen freigesetzt. Das Leberstruma (Restleber) wird verworfen. Aus einem 12 g schweren Organ können so 400-500 Mio. Zellen gewonnen werden. Die freigesetzten Zellen werden im weiteren durch ein Nylonsieb (Porengröße 280 µm) von größeren Zellaggregationen befreit. Zur Bestimmung der Hepatozytenvitalität wird aus der Zellsuspension (Primärsuspension) eine Probe von 100 µl entnommen und in 300 µl 0,5 % Trypanblaulösung gegeben. Nach 5 min Inkubation kann die Gesamtzellzahl und die Vitalitätsrate mit Hilfe einer NEUBAUER-Zählkammer ermittelt werden (dunkelblau gefärbte Zellen sind geschädigt). Mit dem beschriebenen Isolationsverfahren erreicht man reproduzierbar eine Vitalität von 80-90 %. Inzwischen

wird die Primärsuspension für 10 min erschütterungsfrei abgestellt. Die intakten Hepatozyten und ein Großteil der Kupfferschen Sternzellen setzen sich aufgrund ihrer höheren Dichte als lockerer Bodensatz ab. Der Überstand beinhaltet Endothelzellen und Lipozyten sowie geschädigte Hepatozyten. Er wird abgesaugt und verworfen. Man fügt weitere 50 ml Medium hinzu. Durch vorsichtiges Schwenken der Zellen werden diese im frischen Medium erneut homogen verteilt. Diesen Waschprozeß wiederholt man zweimal.

Aufgrund der phagozytierten magnetischen Microbeads können die Kupfferschen Sternzellen mit Hilfe eines Magnetseparators leicht entfernt werden (Abb. 6). Die vorliegende finale Zellsuspension ist somit stark aufgereinigt und besteht zu über 97 % aus Hepatozyten.

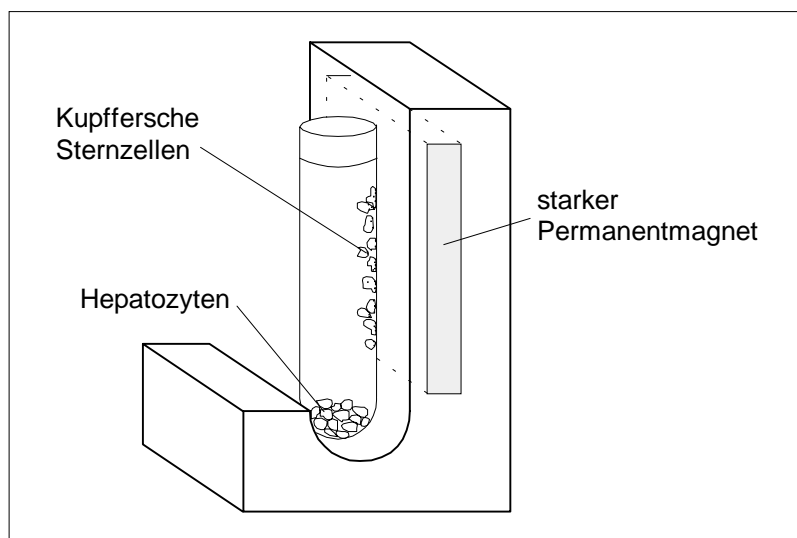


Abb. 6 Anlage zur Separation Kupfferscher Sternzellen von Hepatozyten. Die mit magnetischen Mikropartikeln beladenen Kupfferschen Sternzellen werden von einem starken Permanentmagneten an die Glaswand des Röhrchens gezogen, während die nichtbeladenen Hepatozyten auf den Röhrchenboden absinken.

2.6.1.6. Kryokonservierung

Die Möglichkeit, Hepatozyten über längere Zeit ohne Funktionsverlust zu lagern, ist von großer Bedeutung. Die Kryokonservierung ist eine Methode, bei der man die Zellen bei sehr tiefen Temperaturen in eine Art Kältestarre versetzt. Nach dem Auftauen können zu jeder Zeit Untersuchungen an Hepatozyten vorgenommen werden, ohne dabei jedesmal von aufwendigen Leberperfusionsprozeduren abhängig zu sein (KOEBE et al. 1996, NAIK et al. 1997). MAGANTO beschrieb 1990 eine Technik, die leicht abgewandelt im folgenden beschrieben wird.

Frisch isolierte gesunde Hepatozyten werden im Eisbad in eiskaltem Williams' Medium E / fetalem Kälberserum (3:1) resuspendiert. Ein gleiches Volumen eiskaltes Williams' Medium E / DMSO (3:1) wird hinzugegeben, so daß man eine finale Zellkonzentration von $2-3 \cdot 10^6$ Zellen/ml erreicht. Die Suspension wird portionsweise zu je 1 ml in vorgekühlte Kryoröhrchen (Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland) überführt. Von besonderer Wichtigkeit ist der nachfol-

gende Einfrierprozeß, bei dem das Zellgut mit einer Abkühlrate von 1 °C/min auf -196 °C gebracht werden sollte. Die Prozedur besteht aus folgenden Schritten: 30 min bei 0-4 °C (Eisbad); 60 min bei -20 °C (Tiefkühlschrank) und 6-12 h in der Gasphase des Flüssig-N₂-Behälters. In diesem Zeitraum ist ein genügend langsames Abkühlen auf -180 °C gewährleistet. Danach werden die Röhrcchen in geeignete Gefäße direkt in den flüssigen Stickstoff gegeben (-196 °C). Die Hepatozyten sollten nicht länger als 3 Wochen im tiefgefrorenen Zustand aufbewahrt werden.

Das Auftauen der Zellen erfolgt so schnell wie möglich direkt im Wasserbad bei 37 °C. Danach wischt man die Röhrcchen kurz mit einem in 70 % Alkohol getränktem Tuch ab. In einer Laminarbox wird der Inhalt des Kryoröhrcchens in ein steriles 10-ml-Zentrifugenröhrcchen überführt, das 5 ml Williams' Medium E enthält. Für 5 min werden die Zellen bei 150-200 g abzentrifugiert und das Pellet in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Vor der Inkubation bestimmt man Zellzahl und Vitalität (Trypanblau-Methode, s. 2.6.1.5.) und sät die Zellen dann in einem geeigneten Kulturschälchen in subkonfluenter Dichte aus (s. 2.6.2.1.). Nach 12 bis 15 Stunden ist ein erneuter Medienwechsel durchzuführen. Dabei sind die im Überstand schwimmenden geschädigten Zellen zu entfernen.

2.6.2. Kultivierung von Hepatozyten auf flachen Unterlagen und an Polyacrylamidträgern

2.6.2.1. Monolayerkultivierung

Die finale Hepatozytensuspension wird mit Kulturmedium, dem zusätzlich 5% fetales Kälberserum zugefügt wurde, derart verdünnt, daß man eine Suspension mit einer Konzentration von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml erhält. In jeweils ein Plastikkulturschälchen (Durchmesser 3 cm, Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland) gibt man 2 ml dieser Hepatozytensuspension. Man läßt die Schälchen 2 Stunden im Inkubator in Carbogenatmosphäre (37 °C) stehen. Während dieser Zeit setzen sich die Zellen an der Plastikunterlage der Schälchen fest und beginnen sich abzuflachen. Danach werden die Zellen, die sich noch im Überstand befinden, durch Medienwechsel entfernt. Nach jeweils 2 Tagen erfolgt ein erneuter Medienwechsel.

2.6.2.2. Kultivierung an Polyacrylamidpartikeln

Um zu ermitteln, welche Polyacrylamidderivate für eine Hepatozytenkultivierung geeignet sind, werden jeweils 100 mg folgender Trägerchargen, welche gründlich 3-4 mal in sterilem Medium gewaschen werden, in Zellkulturschälchen (3,5 cm Durchmesser, Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland) überführt:

- ◆ Amid
- ◆ Hydrazid
- ◆ Bernsteinsäurehydrazid

- ◆ Naphtolsulfonat
 - ◆ Aminoethyl-Derivat
 - ◆ Carboxyl-Derivat
 - ◆ Phosphat
- sowie
- ◆ lipidierte Träger
 - ◆ albuminierte Träger
 - ◆ collagenierte Träger

Von jedem Trägerderivat wird sowohl die Fe₃O₄-haltige als auch zum Vergleich die nicht-magnetisierte Form eingesetzt. Jedes Schälchen versetzt man mit 2 ml Zellsuspension (Zell-dichte: 5·10⁵ Zellen/ml) und läßt es 2 h bei 37 °C in 5 % CO₂ stehen. Nach dieser Zeit haben sich die Zellen an der Schälchenunterlage und am Träger festgesetzt. Die nichthaftenden Zellen saugt man anschließend mit dem Überstand unter Verwendung einer spitzen Pipette ab. Dabei können die magnetischen Träger mit Hilfe eines Permanentmagneten an der Schälchenunterlage fixiert werden. Die mit Zellen bewachsenen Träger überführt man in ein zweites Kulturschälchen und gibt 2 ml Kulturmedium zu. Der Medienwechsel wird nach jeweils 2 Tagen wiederholt.

Die Kultivierung erfolgt im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.6.3. Ermittlung der Zellzahl in der Monolayerkultur und am Polymerträger

Nach mehreren Tagen Zellwachstums im Kulturschälchen und am Magnetträger kann unmittelbar keine exakte Aussage über die Anzahl der Zellen an der Kulturunterlage getroffen werden. Um die adhärennten Zellen zählen zu können, ist es notwendig, sie zunächst von der Unterlage abzulösen. Dazu dekantiert man das Kulturmedium aus dem Kulturschälchen, gibt etwa 1 ml 0,02 %iges EDTA (w/v) in calcium- und magnesiumfreier Salzlösung zu, schwenkt etwa 30 sec und dekantiert wieder vorsichtig. Die zellbewachsenen Trägerproben werden etwa 1 min in der EDTA-Lösung gespült. Danach inkubiert man die inzwischen auf der Unterlage leicht abgerundeten Zellen für 2 min in einer in 0,02 % calcium- und magnesiumfreiem EDTA-Lösung, der 2 mg Trypsin (Sigma Chemical Co., USA) zusetzt wurde, bei 37 °C. Dabei lösen sich die Zellen restlos von der Unterlage und liegen in Suspension vor. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wird die Trypsinaktivität gehemmt. Die Zellzahl wird mit Hilfe einer herkömmlichen Zählkammer nach NEUBAUER ermittelt und in Bezug zum Suspensionsvolumen gesetzt.

2.6.4. Biochemisch-analytische Methoden

2.6.4.1. Live/dead-Färbung

Die gängige Trypanblau-Färbung, mit der bei Suspensionskulturen die Vitalität der Zellen bestimmt wird, kann für die Vitalitätscharakterisierung konfluenter, am magnetischen Polymerpar-

tikel wachsender Zellen keine Verwendung finden. Aufgrund der Eigenfärbung der Polymerträger können die anhaftenden Zellen nicht sichtbar gemacht und damit nicht charakterisiert werden.

Bei gleichzeitiger Zugabe von Ethidiumhomodimer (Phenanthridinium, 5,5'-(1,2-ethandiylobis(imino-3,1-propandiylobis(3,8-diamino-6-phenyl, dichlorid, hydrochlorid) und Calcein AM (Calceinacetoxymethylester) (LIVE/DEADTM, Molecular Probes, Inc.; Eugene, Oregon, USA) zu suspendierten oder am Träger gebundenen Zellen können parallel tote und lebende Zellen unterschieden werden, wobei zwei charakteristische Vitalitätsparameter der Proben bestimmt werden:

- (1) die intrazelluläre Esteraseaktivität
- (2) die Plasmamembranintegrität.

Das nichtfluoreszierende, membranpenetrierende Calcein AM wird in der lebenden Zelle durch im Cytosol befindliche Esterasen gespalten. Das stark grün (530 nm) fluoreszierende Polyanion Calcein vermag die intakte Cytoplasmamembran nicht zu durchdringen und wird in der Zelle akkumuliert.

Das hydrophile Ethidiumhomodimer hingegen kann nur durch die geschädigte Membran toter Zellen eindringen und bindet dort an Nucleinsäuren des Zellkerns, wobei es eine vierzigfache Verstärkung der intensiv roten Eigenfluoreszenz (>600 nm) erfährt. Intakte Membranen lebender Zellen vermag Ethidiumhomodimer nicht zu durchdringen.

Proben von je 20 mg (feucht) zellbewachsener Polymerträger werden in Williams' Medium E gewaschen und in 1 ml des Mediums resuspendiert. Zu jeder Probe pipettiert man 2 µl einer 2 mM Ethidiumhomodimerlösung in 1:4 DMSO/H₂O und 1 µl einer 4 mM Calcein AM-Lösung in trockenem DMSO. Die Proben werden vorsichtig geschwenkt, um eine unnötige mechanische Beanspruchung zu vermeiden. Nach 15-minütiger Inkubation können die Proben am Fluoreszenzmikroskop (Laserscanning-Mikroskop; Carl-Zeiss Oberkochen, BRD) untersucht werden.

	<u>Anregungswellenlänge</u>	<u>Emissionswellenlänge</u>
Ethidiumhomodimer	540 nm	=600 nm
Calcein AM	480 nm	≈530 nm

2.6.4.2. Bestimmung der Konjugationskapazität kultivierter Hepatozyten

Der Sulfonsäurefarbstoff Phenolsulfonphthalein (Phenolrot) wird als pH-Indikator den meisten kommerziell verfügbaren Zellkulturmedien, so auch dem Williams' Medium E zur Hepatozytenkultur, zugesetzt. Es ist gezeigt worden, daß Hepatozyten in der Lage sind, den anionischen Farbstoff zu metabolisieren (SPERBER 1957, KIM und HONG 1962). Chromatographische Untersuchungen ergaben, daß der als pH-Indikator eingesetzte Farbstoff durch die Leber teilweise mit Glucuronsäure konjugiert wird (DHUMEAUX 1968). Dabei geht das Phenolrot in einen farblosen Komplex über (Abb. 7). Der Anteil an umgesetztem Farbstoff kann mit Hilfe einfacher colori-

metrischer Bestimmungsmethoden ermittelt werden (DRISCOLL et al. 1982).

Dazu entnimmt man 400 μl Kulturmedium, und stellt diese mit Essigsäure auf einen pH von 5,0 ein. Die eingestellte Probe wird in zwei Röhrchen aufgeteilt. Zu einem Röhrchen gibt man 10 μl einer Lösung von 10 mg/ml γ -Glucuronidase (Sigma Chemical Co., USA) in 0,2 M Acetat-Puffer (pH 5,0). Das Gemisch wird bei 37 °C 1,5 bis 2 h inkubiert.

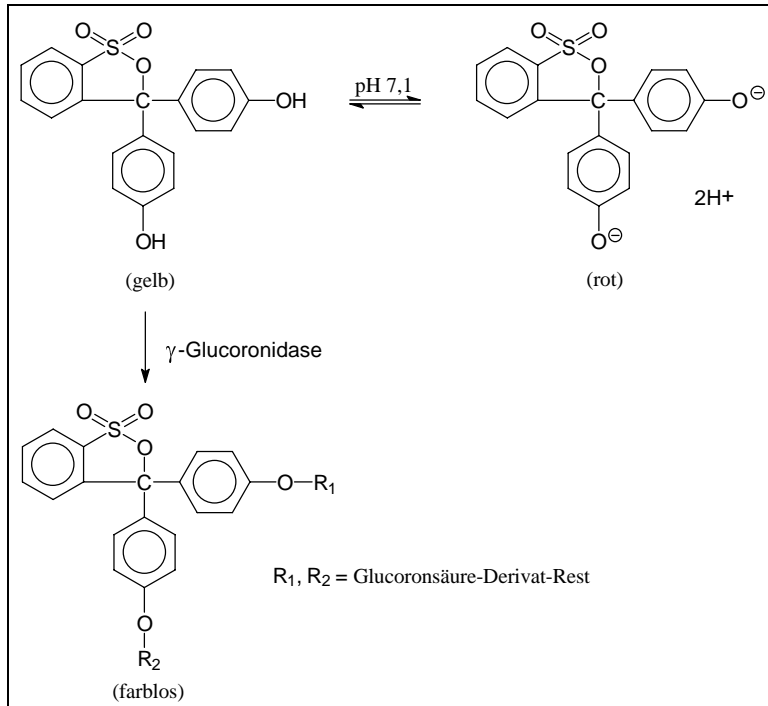


Abb. 7 Phenolrot-Derivate im Medium

Während der protonierte und der nichtprotonierte Phenolrot-Anteil vom pH abhängig ist, bestimmt die metabolische Kompetenz der Hepatozyten den Anteil an farblosem, glucuronidiertem Phenolrot-Derivat.

Das mit Kulturmedium gefüllte zweite Röhrchen wird als Leerwert herangezogen, das man mit 0,2 M Acetat-Puffer ohne Enzymeinwirkung inkubiert. Bezogen auf das Kontrollserum (ohne Zellen) kann die Phenolrotmetabolisierung nach Zugabe von jeweils 800 μl 0,1 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10,0) zu jeder Probe und Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 560 \text{ nm}$ nach folgender Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{Absorbtion des enzyminkubierten Mediums} - \text{Absorption des Mediums ohne Enzyminkubation}}{\text{Absorption des Kontrollmediums ohne Zellen}} \times 100$$

2.6.4.3. Bestimmung der Harnstoffproduktion

Zum Nachweis der Fähigkeit intakter Hepatozyten zur Ammoniummetabolisierung wurde die Konzentration an Harnstoff, dem Endprodukt des Ammoniumstoffwechsels, im Medium bestimmt. Um die maximale Umsatzrate ermitteln zu können, erfolgte eine Zugabe von 1 mM ste-

riem Ammoniumchlorid zum Kulturmedium. Die Harnstoffkonzentration im Medium wurde mit Hilfe des kommerziell verfügbaren Harnstoff-Stickstoff-Testes (Diacetylmonoxim-Methode, COULOMBE UND FAVREAU 1963) (Sigma Chemical Co., USA) colorimetrisch bei $\lambda = 535$ nm bestimmt.

2.7. Aufbau eines magnetischen Gitterreaktors zur kontinuierlichen Zellzucht von Hepatozyten

Der magnetische Gitterreaktor (im folgenden Reaktorkammer genannt) besteht aus mehreren Etagen parallel liegender, sich nicht berührender Edelstahlstäbe, die in einem Glasrohr eingebunden sind (Abb. 8). Am oberen und unteren Ende des Glasrohres wird durch zwei Dreiwegehähne die Zufuhr des Mediums kontrolliert. Die Parameter des Reaktorraumes sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tab. 1 Reaktorraumparameter

totale Reaktorraumlänge	24 cm
effektive Reaktorraumlänge	10 cm
Innendurchmesser/Außendurchmesser	1,8 cm / 2,0 cm
Anzahl der Metallstäbe je Etage	7
Abstand zwischen den Metallstäben einer Etage	1,25 mm
Anzahl der Etagen	10
Abstand zwischen den Etagen	4,2 mm
Durchmesser der Metallstäbe	1,2 mm
effektives Innenraumvolumen	12,8 cm ³
maximales Beladungsvolumen	11,5 cm ³
optimales Beladungsvolumen	8,0 cm ³
maximale Trägerbeladung (\varnothing Partikeldurchmesser = 150 μ m)	1,7·10 ⁶ Träger
optimale Trägerbeladung (\varnothing Partikeldurchmesser = 150 μ m)	1,2·10 ⁶ Träger

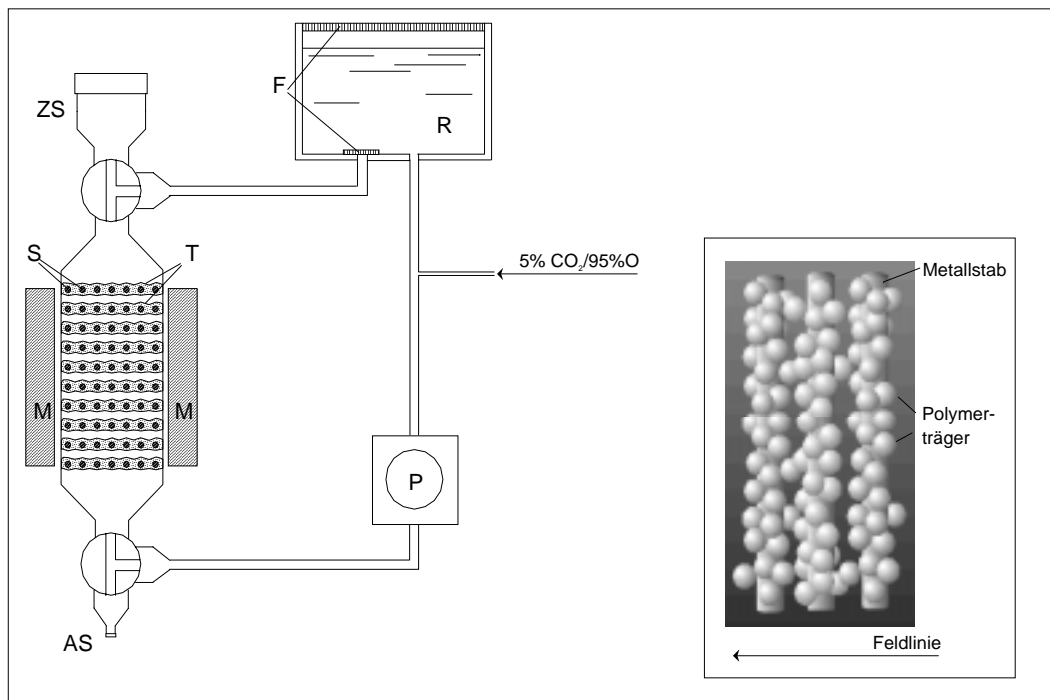


Abb. 8 Schematischer Aufbau und Geräteanordnung des magnetischen Zellzuchtreaktors

AS	Ablaufstutzen
F	Filter
M	Permanentmagnet
P	Pumpe
R	Medienreservoir
S	Metallstäbe
T	fixiertes Polymerträgermaterial

Abb. 8a (integrierte Abbildung) Die magnetisierten Polymerpartikel orientieren sich im Magnetfeld und werden an den Metallstäben fixiert

Die Reaktorkammer wird derart in einem gleichmäßigen Magnetfeld platziert, daß die Feldlinien die Metallstäbe senkrecht schneiden. Dadurch werden die Stäbe magnetisiert und bauen um sich ein Magnetfeld auf (Abb. 9). Die zugeführten magnetischen, mit Zellen besetzten Polymerpartikel richten sich im Magnetfeld aus und werden an den Metallstäben fixiert (Abb. 8a).

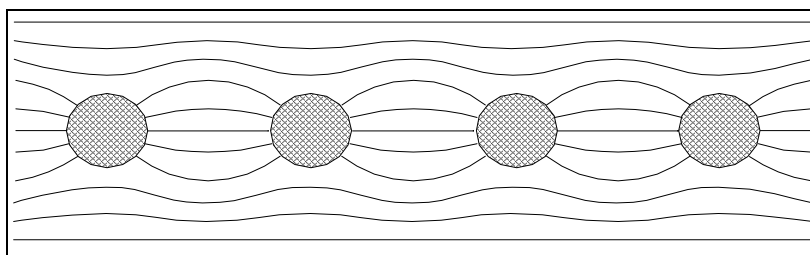


Abb. 9 Feldlinienverlauf an 4 Metallstäben des Reaktorinnenraumes

Die Feldlinien werden in den querliegenden Stäben gebündelt, wodurch die Stäbe ein eigenes Magnetfeld aufbauen.

Die Partikel können aus dem Reaktorraum entfernt werden, indem die Position des Reaktors innerhalb des Magnetfeldes um 90° verdreht wird. Dadurch werden die Metallstäbe parallel zu den Feldlinien des Magnetfeldes plaziert, das magnetische Feld zwischen den Stäben geht verloren. Den gleichen Effekt erzielt man, wenn das Magnetfeld gänzlich entfernt wird. Die magnetisierten Polyacrylamidträger lösen sich von den Metallstäben und können am Reaktorboden über einem Ablaufstutzen aus dem System entfernt werden. Die Gefahr einer Kontamination des Systems bleibt sehr gering.

Zur der Fixierung nanometergroßer Magnetpartikel im Magnetfeld ihres Reaktors benutzten DE CUYPER und JONIAU (1990a) statt parallel angeordneter Metallstäbe. Auch hier banden die Partikel aufgrund des aufgebauten Magnetfeldes an den Metallfäden. Für die Fixierung von 100-200 μm großen Polyacrylamidpartikeln erwies sich jedoch diese Methode als uneffektiv, da ein Großteil der Fäden der Metallwolle im Reaktor parallel zu den Feldlinien des äußeren Magnetfeldes ausgerichtet ist. Diese Bereiche bilden selbst kein eigenes Magnetfeld - die Partikel würden nicht infolge magnetischer Wechselwirkungen binden. Aufgrund der Größe der Polymerpartikel wäre darüber hinaus mit einer Filterwirkung durch die Metallwolle zu rechnen, die die Partikel rein mechanisch zurückhält. Die Vorteile einer magnetischen Fixierung im Reaktor gingen verloren. Zudem ist eine kontinuierliche Arbeitsweise nicht möglich, da die Partikel nur durch Entfernen der Metallwolle nach Öffnen des Behälters aus dem System entfernt werden kann.

Das mit Carbogen begaste Kulturmedium wird mit Hilfe einer Peristaltikpumpe aus einem Reservoir mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/min durch den Reaktorraum gepumpt, so daß die Zellen gleichmäßig mit frischem Medium umströmt werden. Es kann auf die Peristaltikpumpe bei Bedarf auch verzichtet werden, wenn der Carbogengasstrom in den Verbindungsschlauch zwischen Reaktor und Medienreservoir eingeleitet wird. Die gebildeten Blasen sichern einen gleichmäßigen und leicht zu kontrollierenden Flüssigkeitsstrom. Vom Träger abgelöste, geschädigte Zellen oder Zelltrümmer werden im Medienstrom aus dem Reaktorraum ins Reservoir gespült und dort von einem Filter zurückgehalten.

Zur Bestückung werden 9 g (feucht) zellbewachsene Magnetpartikel mit einer Zelldichte von durchschnittlich 7 Zellen/Partikel (Gesamtzellzahl $8,4 \cdot 10^6$) in den Reaktorraum über den Zuführungstutzen unter sterilen Bedingungen eingebracht (vgl. Abb. 4). Medienwechsel erfolgt alle 6 Tage.

2.8. Immobilisierung von Rinderaugenlinsenepithelzellen und humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC) an magnetischen Polyacrylamidträgern

2.8.1. Zelllinien, Substrate und Kulturmedien

2.8.1.1. Epithelzellen

Die Eignung magnetischer Polymerträger zur Kultivierung weiterer Zelllinien sollte im folgenden anhand des Wachstums von Zellen des Augenlinsenepithels von Rindern untersucht werden.

Die primäre Zelllinie erhielt man aus Linsen 1- bis 3-jähriger Rinder, die nach einer Methode von GLÄSSER et al. (1972, 1975) gewonnen wurde. Die Zellpräparate werden 2 bis 4 h nach dem Tod der Tiere hergestellt. Alle Präparationsschritte erfolgen unter sterilen Bedingungen. Dabei werden die Cornea und die Iris entfernt und der vordere Teil der Kapsel im Abstand von 5 mm vom Äquator kreisförmig durchtrennt. Danach wird das einschichtige Epithel von der Kapsel abgeschabt (vgl. Abb. 10).

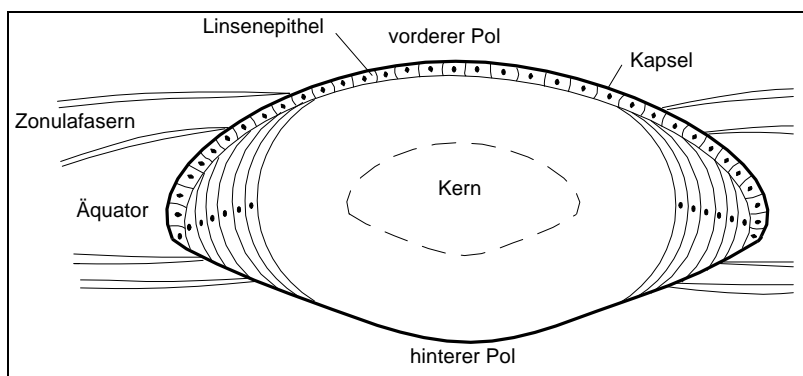


Abb. 10 Schematische Darstellung einer Rinderaugenlinse

Die so gewonnenen Zellaggregate werden in 2 ml MEM (Zellzuchtungsmedium nach EAGLE, pH 7,8; SERVA, Deutschland), dem 15 %iges fetales Kälberserum (FKS), 100 IE Penicillin sowie 100 µg Streptomycin pro ml zugesetzt wurden, aufgenommen. Nach 10 bis 30 h Kultivierung bei 37 °C und 2 % CO₂ haben sich die Zellen auf den Boden der Petrischale angehaftet und zu einer geschlossenen Monolayer ausgebreitet.

2.8.1.2. Endothelzellen

Humane Nabelschnurvenenendothelzellen* erhält man aus Nabelschnüren Neugeborener nach normaler Entbindung oder Kaiserschnitt. Die Isolierung erfolgt in modifizierter Form nach einer Methode von JAFFE et al. (1973) und GIMBRONE et al. (1974).

Danach werden unter sterilen Bedingungen Nabelschnurabschnitte von bis zu 20 cm gewonnen, die nach maximal achtstündiger Lagerung in eiskaltem Inkubationspuffer (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 11 mM D-Glucose, 10 mM HEPES, pH 7,3, 100 IE Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin) weiterverarbeitet werden (HINSBERGH et al. 1991). Die Nabelschnurvene wird kanüliert und mit 200-400 ml Inkubationspuffer gespült, um alle restlichen Blutzellen aus dem Gefäß zu entfernen. Das Venenlumen (Abb. 11) wird mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, der 5 mM CaCl₂ und 1 mM MgSO₄ sowie 1 mg/ml Collagenase Typ IV (Sigma Chemical Co., USA) enthält, gefüllt.

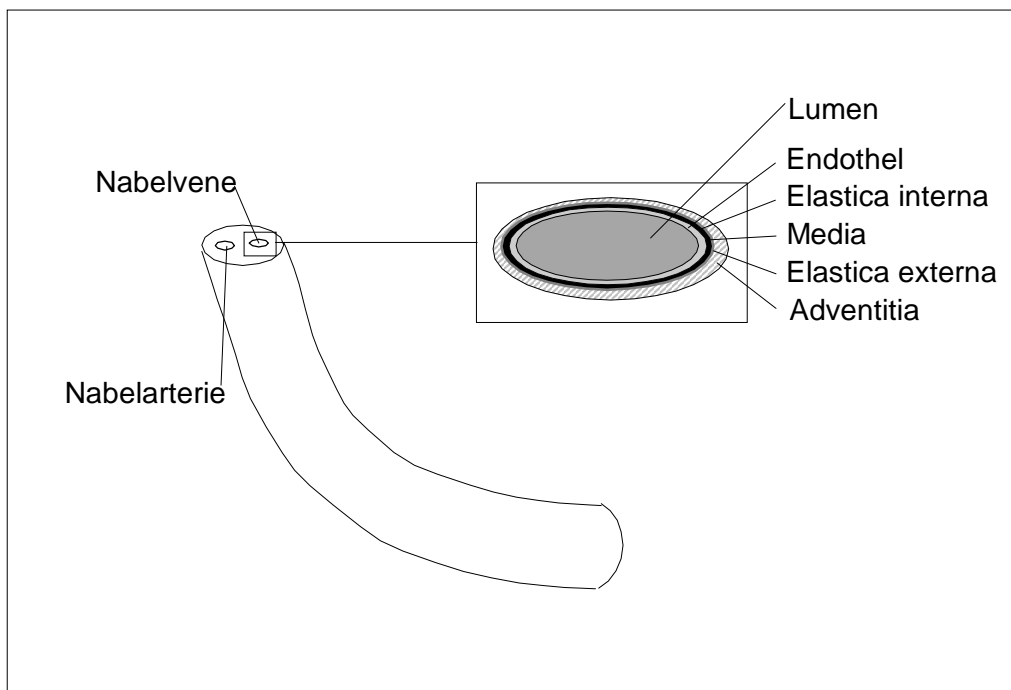


Abb. 11 Schematische Darstellung einer Nabelschnurvene im Querschnitt

Nach 20-30 min Inkubation bei 37 °C wird vorsichtig der Veneninhalte mit gleichem Volumen Hanks Salzlösung (Ca²⁺-, Mg²⁺-frei) herausgespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 200 g zentrifugiert. Man erhält ein weißes Pellet, das in Kulturmedium (Medium 199 mit 20 % FKS, 15 mM HEPES, pH 7,4, sowie 60 IE Penicillin und 120 mg/l Streptomycin) aufgenommen wird. Mit einer Zelldichte von 3-5·10⁵ Zellen/ml werden 4 ml der Suspension in eine Kulturflasche (25 cm²) gegeben. Nach 12 h wird das Medium und mit ihm die nichtadhärenten Zellen entfernt. Man spült dreimal mit Hanks Lösung und füllt mit 4 ml frischem Kulturmedium

* Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Endothelzellen wurden mit freundlicher Unterstützung aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Heider, Institut für Pathologische Biochemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, zur Verfügung gestellt.

auf. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Weitere Medienwechsel erfolgen im Abstand von 2-3 Tagen.

Nach 6-10 Tagen erscheint die primäre Zellkultur als gleichmäßig geschlossene Monolayer. Bei Einwirkung von 0,25 % Trypsin in 0,05 % EDTA-haltiger, physiologischer NaCl-Lösung lösen sich 60-80 % der Zellen von der Unterlage. Diese werden in das 10-fache Volumen Medium 199 supplementiert, mit 20 % FKS versetzt, zentrifugiert, in Medium 199 mit 10 % FKS resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

2.8.2. Zellimmobilisierung an magnetischen und nichtmagnetischen Polymerpartikeln

Die adhären Zellen werden nach 6 Tagen von der Schälchenunterlage abgelöst. Dazu spült man die Zellen mit 0,02 % (w/v) EDTA-haltiger calcium- und magnesiumfreier Salzlösung. Danach schließt sich eine Inkubation (2 min) der inzwischen leicht abgerundeten Zellen in 500 µl Hanks Lösung mit 2 mg Trypsin (Sigma Chemical Co., USA) und 0,02 % EDTA bei 37 °C an. Die nunmehr in Suspension vorliegenden Zellen werden mit dem jeweiligen serumhaltigen Medium auf eine Konzentration von $3\cdot 10^5$ Zellen/ml verdünnt. Die Trypsinaktivität wird dabei gestoppt.

Jeweils 1 g magnetischer als auch nichtmagnetischer Polymerträger verschiedener Trägerchargen werden in mit 15 % FKS komplementiertem MEM (Epithelzellen) bzw. mit 20 % FKS komplementiertem Medium 199 (Endothelzellen) gründlich gewaschen und in eine Kulturflasche überführt. Danach gibt man jeweils 5 ml Zellsuspension hinzu. Bei 37 °C beläßt man die Träger/Zell-Suspension für 2 Stunden im Inkubator. In dieser Zeit setzt sich ein Großteil der Zellen auf der Trägeroberfläche fest. Im Anschluß erfolgt ein Medienwechsel, wobei der FKS-Anteil im neu zugesetzten Medium 5 % im Falle der Epithelzellen bzw. 10 % im Falle der Endothelzellen beträgt.

Zur Zellzählung löst man die Zellen von der Trägerunterlage mit einer trypsinhaltigen Lösung ab oder färbt die Zellen mit Calcein (s. 2.6.4.1.), um die Anzahl der am Träger haftenden Zellen direkt zu ermitteln.

2.9. Immobilisierung von Cytochrom c-Oxidase an magnetischen Polymerträgern

2.9.1. Reinigung von Cytochrom c

Die enzymatische Aktivität der Cytochrom c-Oxidase bei der Oxidation von Cytochrom c hängt u.a. vom Verhältnis an reduziertem zu oxidiertem Cytochrom c im Ansatz ab (OSHEROFF et al. 1983, VEERMAN et al. 1983). Daher ist es angebracht, vollständig reduziertes Cytochrom c zur kinetischen Untersuchung einzusetzen.

Es werden 85 mg lyophilisiertes Cytochrom c, isoliert aus Pferdeherzen (Typ IV, Sigma Chemical Co., USA), in 1,5 ml entgastem 50 mM Tris/Acetat-Puffer, pH 7,4, gelöst und durch Zugabe von einigen Körnchen Natriumdithionit (etwa 3 mg) restlos in den reduzierten Zustand überführt. Die Entgasung des Puffers erfolgt durch Erhitzung und nachfolgendem Abkühlen unter Stickstoffzuführung. Die Trennung des reduzierten Cytochrom c von Natriumdithionit wird säulenchromatographisch bei 4°C durchgeführt. 1,5 ml des Cytochrom c/Natriumdithionit-Lösungsgemisches wird auf eine 2 x 35 cm-Säule mit ca. 13 g (Trockengewicht) in entgastem 50 mM Tris/Acetat-Puffer pH 7,5 eingequollenem und mit 100 mM Cholinhydrochlorid eluiertem Sephadex G25 gegeben. Mit einer Geschwindigkeit von 420 µl/min werden 90 Fraktionen mit je 2,1 ml gesammelt.

Die Cytochrom c-Konzentration kann über die Extinktionsdifferenz des reduzierten (Zugabe von Natriumdithionit) und des oxidierten Cytochrom c (Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat[III]) bei $\lambda=550$ nm bei einem Extinktionskoeffizient von $\varepsilon=18,7$ mM⁻¹·cm⁻¹ (MICHEL und BOSSHARD 1984) ermittelt werden.

Drei der eluierten Fraktionen enthalten zu 98 % reduziertes Cytochrom c mit einer Konzentration von etwa 0,9 mM. Diese Fraktionen mit hoher Cytochrom c-Konzentration werden zusammengefaßt, unter Sauerstoffausschluß portionsweise ampulliert und bei -20 °C gelagert.

2.9.2. Reinigung der Cytochrom c-Oxidase

Für eine effektive funktionelle Rekonstitution der Cytochrom c-Oxidase aus Rinderherz (SERVA, Deutschland) in der Phospholipidmembran am Polymerträger war eine Aufreinigung und Konzentrierung des Enzymmaterials notwendig. Die Aufarbeitung erfolgte nach einer leicht abgewandelten Methode nach LI et al. (1987).

44 mg Enzymmaterial werden in 1 ml 25 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0, der 5 mM EDTA enthält, gelöst. Zu dieser Lösung fügt man 52,8 mg Laurylmaltosid (1,2 mg/mg Protein) hinzu. Das Gemisch wird 20 min gerührt. Das nach Zentrifugation (40 min, 12000 g,) am Röhrchenboden abgesetzte weiße Pellet wird verworfen. Der braungrünliche, helle Überstand wird mit 25 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,0) mehrmals gespült (Ultrafiltration, Amicon Diaflow). Überschüssiges Laurylmaltosid und EDTA wird weitgehend aus der Enzymlösung entfernt. Die konzentrierte Enzympräparation (Oxidasekonzentration beträgt 23 µM) kann bei -78 °C über viele Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Die Konzentration der Cytochrom c-Oxidase wurde über die Bestimmung des Gehaltes an Häm a im Protein errechnet ($\varepsilon_{605\text{nm}(\text{reduziert})}=20,5$ mM⁻¹·cm⁻¹; YONETANI 1960). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von LOWRY (1951).

2.9.3. Enzymimmobilisierung

2.9.3.1. Rohlipidisolierung und Reinigung

Die Gewinnung von Rohlipid erfolgte aus frischem Eidotter nach einer von SINGELTON et al. (1965) beschriebenen Methode.

Es werden 12 frische (nicht älter als zwei Tage) Eidotter in 200 ml MeOH gelöst. Unter Rühren gibt man 400 ml Chloroform hinzu. In einem Scheidetrichter läßt man das Gemisch bei Raumtemperatur eine Stunde lang stehen. Anschließend wird die untere Phase von der oberen abgetrennt und verworfen. Die obere Phase wird erneut mit Chloroform extrahiert. Die gewonnenen Fraktionen werden vereinigt und im Rotationsverdampfer auf 100 ml eingeeengt. Bei langsamer Zugabe von 600 ml eiskaltem Aceton fällt das Rohlipid als hellgelber Niederschlag aus. Über eine engporige Fritte saugt man das Rohlipid in der Kälte ab und wäscht mit eiskaltem Aceton. Das Lipid wird in 50 ml Diethylether aufgelöst und erneut mit 150 ml eiskaltem Aceton ausgefällt. Dieses Verfahren wird sooft wiederholt, bis das Rohlipid weiß erscheint. Die Lipidlösung wird schließlich bis zur völligen Trockne eingeeengt. Es kann so unter Feuchtigkeitsausschluß bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Die Auftrennung des Rohlipids zur Gewinnung von reinen Phosphatidylcholin(PC)- und Phosphatidylethanolamin(PE)-Fraktionen erfolgt säulenchromatographisch über Kieselgel 60 (Merck). 200 g Kieselgel 60 werden bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 4 h aktiviert und in entwässertem Chloroform eingequollen. Luftblasenfrei füllt man eine Mitteldruck-Chromatographiesäule (Thomachrom MPLC, 26 x 815 mm) mit dem eingequollenem Gel. 6 ml Rohlipid werden in 20 ml Chloroform gelöst und auf die Säule gebracht und mit Chloroform nachgespült. Mit einer Geschwindigkeit von 3 ml/min eluiert man zunächst mit 500 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80:20) (Gewinnung der PE- und Lyso-PE-Fraktionen) und danach mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (75:25) (Gewinnung der PC- und Lyso-PC-Fraktionen). Das Fraktionsvolumen beträgt 15 ml. Die entsprechenden Fraktionen werden zusammengefaßt und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt, in definierten Volumina wasserfreien Chloroforms gelöst und portionsweise ampulliert. Der Lipidgehalt ist graphimetrisch zu ermitteln und die Reinheit der Fraktionen dünnschichtchromatographisch zu untersuchen. Als Laufmittel dient hierbei $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ im Verhältnis 65:25:4. Die Färbung der Substanzflecken auf der Dünnschichtplatte erhält man entweder in gesättigter Iodatmosphäre (Iodkammer) oder durch Besprühen der Platte mit geeignete Farbreagenzien:

- Ninhydrin-Lösung

25 mg Ninhydrin in 10 ml Aceton/Lutidin (9:1) lösen; auf das Chromatogramm sprühen; 1-2 min auf $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmen

(blauviolette Färbung von Lipidbestandteilen mit freien Aminogruppen, z.B. PE und Lyso-PE)

- Dragendorff-Reagenz

Zu 340 mg $\text{Bi}(\text{NO})_3$ gelöst in 20 ml 20 %iger Essigsäure und 2 g KI in 5 ml Wasser werden

70 ml Wasser geben; Chromatogramm besprühen; Färbung nach wenigen Minuten (orange Färbung cholinhaltiger Lipide, z.B. PC und Lyso-PC)

- Phosphat-Reagenz

12 ml 2,5 % $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ und 10 ml 0,85 % NaCl mischen und mit 2 ml konz. H_2SO_4 versetzen; Chromatographieplatte einsprühen; 2 min bei 100 °C erwärmen; nach Abkühlen mit 4% SnCl_2 -Lösung besprühen; Färbung nach einigen Minuten (blaue Färbung der Phospholipide, z.B. PE, PC und ihre Lysoformen)

2.9.3.2. Lipidierung der Polyacrylamidträger zur Enzymimmobilisierung

Die Lipidierung von magnetischen und nichtmagnetischen Polyacrylamidträgern zwecks nachfolgender Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase erfolgte auf zwei chemisch verschiedene Wege.

Die erste Variante, bei der das Lipid an die mit Cyanurchlorid aktivierte Oberfläche kovalent gebunden wird, ist bereits in Kapitel 2.4.7. beschrieben worden.

Ein zweiter Weg führt über die Methode der Azidkupplung in einer wasserfreien organischen Phase (THF) zu kovalent am Polymerträger gebundenem Phosphatidylethanolamin.

Zur Trocknung von THF werden 200 ml mit 7 g festem KOH versetzt und abdestilliert. Dabei soll ein Rückstand von 50 ml im Kolben belassen werden. Dem abgekühltem Destillat fügt man etwa 2 g frisch geschnittenes Natrium hinzu und kocht 2 h unter Rückfluß. Anschließend wird das THF überdestilliert. Es kann gut verschlossen nur kurze Zeit aufbewahrt werden.

Triethylamin (TEA) wird getrocknet, indem man zu 200 ml 7 g KOH hinzugibt, über Nacht inkubiert und danach destilliert. (TEA ist sehr hygroskopisch und sollte dicht verschlossen bei 4 °C nicht länger als eine Woche aufbewahrt werden.)

Zur Herstellung einer 2 N HCl/THF-Lösung leitet man aus konz. H_2SO_4 und NaCl gebildetes und über konz. H_2SO_4 getrocknetes HCl-Gas in 100 ml wasserfreies THF. Die während des Einleitens in THF auftretende Gewichts Differenz von 7,2 g entspricht einer 2 N HCl/THF-Lösung. Sie sollte frisch verwendet werden.

2 g magnetisierte Polyacrylamidpartikel werden in das Hydrazidderivat überführt (s. 2.4.1.) und bei -20 °C (Trockeneis/Aceton) in 20 ml frisch hergestelltem 2 N HCl/THF suspendiert. Der Suspension wird 0,3 ml vorgekühltes t-Butylnitrit hinzugefügt. Nach 15 min neutralisiert man die Lösung durch tropfenweise Zugabe von 5,8 ml vorgekühltem wasserfreiem TEA. Danach wird der Suspension 150 mg Phosphatidylethanolamin, gelöst in 2 ml wasserfreiem THF, zugegeben. Der Ansatz wird über Nacht geschüttelt, wobei das Reaktionsgemisch langsam innerhalb einer Stunde auf 4 °C erwärmt werden kann. Anschließend wäscht man die Träger mit 100 ml THF und überführt sie über eine absteigende Ethanolreihe in die wäßrige Phase. Die lipidierten

Träger können in physiologischer NaCl-Lösung bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.9.3.3. Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase am lipidierten Träger

Das gereinigte Membranenzym Cytochrom c-Oxidase rekonstituiert man im Zuge einer Detergensedialyse, bei der in Gegenwart von detergensgelöstem Lipid große, unilamellare Vesikel gebildet werden, die das Enzym inkorporieren. Diese Vesikel können in der Folge nach Fusion fest über hydrophobe Wechselwirkungen am lipidierten Polymerträger binden.

10 mg trockenes PC wird in 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 1,5 % Natriumcholat unter Einwirkung von Ultraschall (4 °C, 5 min) gelöst. Der Lösung werden 10 mg gereinigtes Enzym in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) zugesetzt und erneut Ultraschall ausgesetzt (verändert nach RIGELL et al. 1985). Danach führt man 500 mg lipidierten Polyacrylamidträger hinzu und dialysiert 12 h gegen 7 l 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,5) um das Detergens zu entfernen.

2.9.3.4. Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Cytochrom c-Oxidase

Der Meßansatz zur Aktivitätsbestimmung des am Träger immobilisierten Enzyms setzt sich wie folgt zusammen:

In 1,5 ml 50 mM entgastem Tris/Acetat-Puffer (pH 7,3) werden 50 µl einer 0,3 mM Cytochrom_{red}-Stammlösung zugesetzt. Es werden 25 mg enzymladenes Trägermaterial zugegeben. Die Trägersuspension wird mit Hilfe eines Magnetrührers in der Küvette aufgewirbelt. Alle 10 sec wird der Überstand photometrisch vermessen, indem man das Rühren unterbricht und die Träger kurz absetzen läßt. Die Zunahme des oxidierten Cytochrom c ermittelt man anhand der Extinktionszunahme bei $\lambda=550$ nm gegen $\lambda=500$ nm ($\epsilon=19,2$ mM⁻¹cm⁻¹).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Magnetisierte Polyacrylamidträger

Der in der vorliegenden Arbeit zur Zellkultivierung eingesetzte Polymerträger ACRYLEX P4 (REANAL, Budapest, Ungarn) stellt ein Copolymerisat aus Acrylamid und N,N'-Methylen-bis-acrylamid in Perlenform dar (Abb. 1). Variiert man bei der Herstellung das Konzentrationsverhältnis von Acrylamid und dem Vernetzungsreagenz, erhält man Perlen unterschiedlicher Festigkeit und Porengröße. P4-Partikel besitzen eine Porengröße, die vom Hersteller mit einer Ausschlußgrenze von 4000 angegeben wird, d.h. Moleküle mit einem Molekulargewicht von größer als 4000 Da können nicht ins Trägerinnere eindringen (s. Tab. 2, Abb. 9). Daraus resultiert der Einsatz dieser Polyacrylamidgele als Material für die Gelfiltration. Die Porosität und die Oberflächenladung der Partikel bestimmen ihr Quellvermögen, das eine zwei- bis dreifache Volumenzunahme nach Wasseraufnahme zuläßt.

Tab. 2 Parameter magnetischer und nichtmagnetischer Polyacrylamidträger (P4)

Parameter		nichtmagnetische Träger (Ausgangsträger)	magnetischer Träger (mit Eisenpräzipitaten beladen)
Durchmesser	gequollen	70-220 μm	100-220 μm
	trocken	40-120 μm	80-160 μm
Porengröße	gequollen	Ausschlußgrenze für Proteine mit MG > 4000 Da	
	trocken ⁽¹⁾	$2 \cdot 10^{-3} - 2 \cdot 10^{-2} \mu\text{m}$	$1 \cdot 10^{-3} - 6 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}$
Sedimentationsvolumen			
je g Träger	gequollen	1,72 cm^3	0,89 cm^3
	trocken	12,48 cm^3	1,91 cm^3
Dichte ρ		1,25 g/cm^3	1,42 g/cm^3
Quellungsfaktor		4,4	3,5
Trägerzahl / g	gequollen	258.000	133.200
	trocken	1.935.000	998.600
Trägeroberfläche / g ⁽²⁾			
	gequollen	182,24 cm^2	94,15 cm^2
	trocken	1.367,77 cm^2	705,87 cm^2

⁽¹⁾ Die Werte wurden porosimetrisch ermittelt.

⁽²⁾ In die Berechnung zur Ermittlung der Partikeloberfläche ging zum einen das innere Porenvolumen und die daraus geschätzte Fläche der Porenwandung (porosimetrische Messungen) und zum anderen die äußere Oberfläche des Modells einer angenommenen idealen Kugel ein.

Die Größe der trockenen Acrylex P4-Partikel variieren im Bereich zwischen 40 und 120 μm . Im gequollenen Zustand erreichen sie Durchmesser zwischen 70 und 220 μm . In Abhängigkeit der am Träger durchgeführten chemischen Modifizierungen können deren Quelleigenschaften jedoch stark verändert werden. Ist die Oberfläche weniger polar und/oder haben hydrophobe Moleküle gebunden, nimmt das Quellvermögen ab (AURICH 1991).

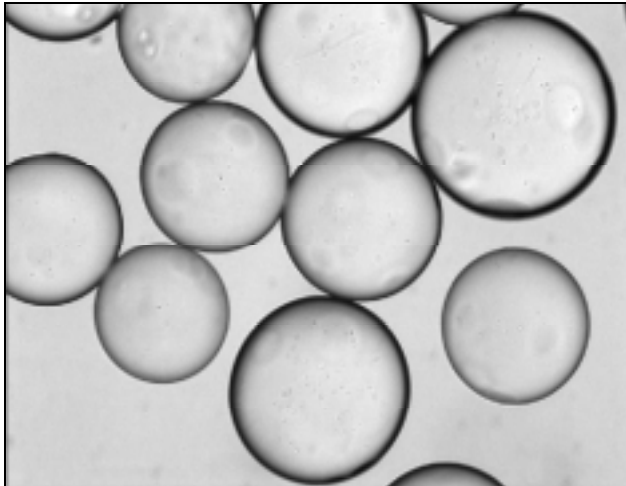


Abb. 12. Unbehandelte P4-Partikel

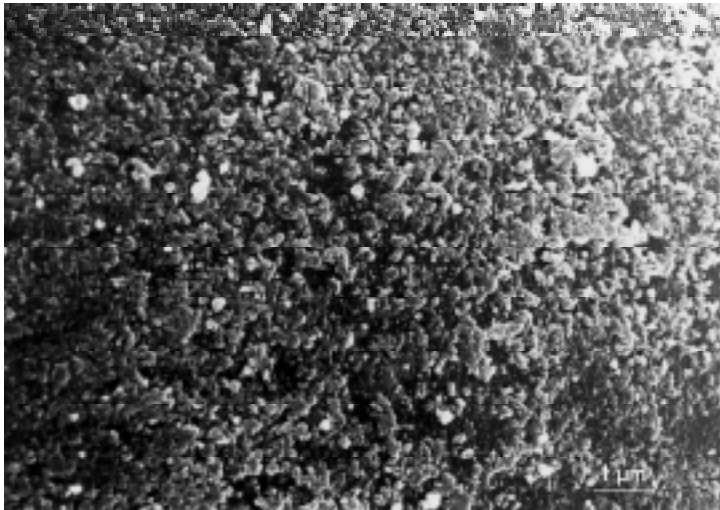


Abb. 13 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines P4-Partikels

Zur Magnetisierung der Polymerpartikel wird ihr großes Quellvermögen genutzt, um kleinste Präzipitate magnetisierbaren (ferrimagnetischen) Materials in die Poren einzuführen. Nach Einquellen der Träger in einer $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ -Salzlösung und anschließender Überführung in alkalisches Milieu werden feine Fe_3O_4 -Präzipitate ausgefällt (DE CUYPER und JONIAU 1990a,b, 1988; FAHLVIK et al. 1990), die nicht mehr ausgewaschen werden, da sie sich den Poren anpassen und deren Volumen größtenteils ausfüllen. Die Quelleigenschaften der Träger ändern sich (Tab. 2). Das anschließende kräftige Waschen der Träger nach der Präzipitatbeladung gewährleistet eine

weitgehende Säuberung der Partikeloberfläche von anheftenden Eisen(II,III)-oxid-Bestandteilen. Somit kann das außen freiliegende Polymergerüst ungehindert chemischen Modifizierungen unterzogen werden.

Fe_3O_4 ist ein tiefschwarzes, komplexes Eisenoxidgemisch mit ferrimagnetischen Eigenschaften. Herstellungsbedingt enthält der Eisenoxidkomplex zusätzlich Spuren von rotbraunem $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Diese Eisenverbindungen gehen nur sehr schwer in Lösung und gelten im neutralen pH-Bereich als chemisch inert.

Aufgrund der ins Partikelinnere eingebrachten Fe_3O_4 -Präzipitate zeigen die beladenen Polymerpartikel paramagnetisches Verhalten. Befinden sich die Partikel in einem Magnetfeld bauen sie ein Dipolmoment auf, das verloren geht, wenn das Magnetfeld entfernt wird.

Ferromagnetismus ist eine bei Eisen, Nickel und Cobalt und deren Legierungen auftretende Kristalleigenschaft, die bewirkt, daß diese Stoffe, setzt man sie einem äußeren Magnetfeld aus, ein eigenes Magnetfeld aufbauen. Ursache sind kleine, durch rotierende oder kreiselnde Elektronenbewegungen erzeugte Ringströme. Innerhalb kleiner Bereiche des Gitters (Weiß-Bezirke) sind alle Spinrichtungen parallelisiert. Unter Einfluß eines Magnetfeldes können die verschiedenen Spinrichtungen aller Weiß-Bezirke in eine *einheitliche* Richtung „umklappen“, sodaß eine homogene und permanente Magnetisierung entsteht.

Bei Kristallen mit ferrimagnetischen Eigenschaften sind die Beträge der Magnetisierung der Untergitter verschieden. Ferrimagnetische Materialien sind Verbindungen mit der allgemeinen Zusammensetzung $\text{Me}^{\text{II}}\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{O}_4$. Me^{II} bezeichnet ein zweiwertiges Metallion wie Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} und Ni^{2+} . Wärmebewegung wirkt der Ausrichtung der Gitter entgegen. Ferro- und Ferrimagnetismus sind daher temperaturabhängig.

Zur Bildung magnetischer Verbindungen können neben Eisen andere Übergangsmetalle verwendet werden. Dabei müssen zumindest zwei Bedingungen erfüllt sein. Erstens muß die Endverbindung der Kopräzipitationsreaktion eine oder mehrere ungepaarte Elektronen beinhalten. Zweitens muß das Kopräzipitat in der Lage sein, kubisch oder hexagonal dicht gepackte kristalline Strukturen zu bilden.

OWEN et al. (1989) beschreibt eine Reihe anderer Metallionen-Kompositionen, die neben Eisen zur Herstellung magnetischer Präzipitate Verwendung finden können.

Die Kraft, mit der ein mit Fe_3O_4 -Präzipitaten beladener Polymerträger von einem Magneten definierter Induktionsstärke (magnetische Induktion des in allen Versuchen verwendeten Permanentmagneten: 0,45 Tesla) angezogen zu werden, hängt hauptsächlich vom Beladungsgrad der Polymerpartikel ab. Dieser wiederum wird neben der Porengröße durch die Menge der Eisensalzlösung gegebener Konzentration, die einer definierten Partikeleinwaage angeboten wird, bestimmt. Bei Zugabe von kleinen Mengen Fe(II)/Fe(III)-Lösung, bei denen die Partikel nur die Hälfte ihrer maximalen Quellkapazität erreichen, nehmen die Partikel nach Überführung in stark alkalisches Medium eine braune Färbung an und geben keine meßbare magnetische Reaktion unter unseren Versuchsbedingungen. Quellen dagegen die Polymerpartikel bis zur Sätti-

gung in Salzlösung ein, ist eine maximale Beladung erreicht. Das wird an der tiefschwarzen Färbung der Polymerkugeln sichtbar. Diese erfahren im Magnetfeld eines Permanentmagneten eine deutliche Ablenkung. Gleichzeitig erhöht sich mit zunehmender Eisenoxid-Beladung die Dichte des Trägermaterials. Beträgt ρ beim unbeladenen Träger $1,25 \text{ g/cm}^3$, so erhöht sich der Wert beim beladenen Träger um $0,17 \text{ g/cm}^3$ auf $1,42 \text{ g/cm}^3$ (vergl. Tab. 2). Um die Träger im wässrigen Milieu in homogener Suspension zu halten, ist mit zunehmendem Eisenoxidgehalt eine intensivere Verquirlung des Milieus resp. mechanische Beanspruchung notwendig. Abb. 10 zeigt den Zusammenhang zwischen Eisenoxidbeladung und Gewichtszunahme der Träger auf. Eine maximale Beladung ist erreicht, wenn der prozentuale Gewichtsanteil an Fe_3O_4 etwa 12 % beträgt. Die Poren der porösen Matrix sind maximal gefüllt.

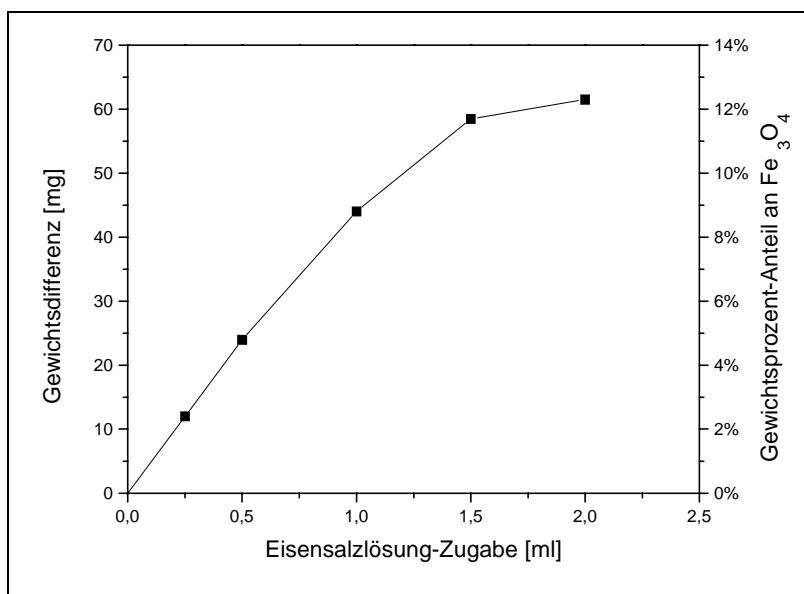


Abb. 14 Abhängigkeit der Beladung und der resultierenden Gewichts-differenz von 0,5 g Trägermaterial von der Zugabe an $\text{FeCl}_3/\text{Fe}_3\text{SO}_4$ -Lösung

Eine Überbeladung hätte zur Folge, daß sich Eisenoxidpräzipitate an der Trägeroberfläche anlagern, die aber durch intensives Waschen des Materials leicht wieder entfernt werden können und die Polymermatrix ist an der Trägeroberfläche wieder frei zugänglich.

Entfernt man das äußere Magnetfeld, welches die mit Eisenoxid beladenen Träger umgibt, geht auch das magnetischen Verhalten der Polymerkugeln verloren, da die Restmagnetisierung (Remanenz) der eingeschlossenen Präzipitate vernachlässigbar klein ist. Die Partikel liegen vereinzelt in der Suspension vor und aggregieren nicht.

3.2. Verhalten magnetisierter Polymerpartikel am magnetischen Gitter

Parallel angeordnete Metallstäbe aus Eisen- und/oder Nickellegierungen bilden, wenn sie senkrecht in ein Magnetfeld gebracht werden, ein eigenes Magnetfeld aus (Abb. 9). Mit Eisenoxid beladene Polymerträger werden dann von diesen Metallstäben angezogen und setzen sich dort

fest. Ordnet man mehrere Schichten dieser Metallstabgitter in geringem Abstand übereinander, so erhält man ein System, das dem Aufbau eines magnetischen Festbettreaktors entspricht. Je nach Anzahl der Gitter ist das System in der Lage mehr oder weniger viele magnetisierte Polymerträger zu binden und aufzunehmen. Dreht man das Gittersystem derart, daß die Metallstäbe längs zu den äußeren Magnetfeldlinien plaziert sind, geht das Gittermagnetfeld verloren und die Polymerträger fallen durch die Stäbe. Die Größe der magnetischen Induktion innerhalb des Gittersystems läßt sich nur schwer bestimmen, da das Feld durch die Metalldrähte modifiziert wird. Die Induktionsgröße von 0,45 Tesla der von uns verwendeten anliegenden Permanentmagneten ist daher für das Gittersystem nur als Näherung zu betrachten, zumal das an den Drähten entstehende Magnetfeld abhängig von der Entfernung der Permanentmagneten zum System ist. Die magnetischen Polymerpartikel werden bei angelegtem Magnetfeld an den Metallstäben fixiert und füllen aufgelockert den Reaktorraum (Abb. 8).

Dadurch können die Partikel von allen Seiten und ortsunabhängig von Medium oder Reaktionspuffer gleichmäßig umspült werden, ohne einen nennenswerten Substratgradienten durch Substratverbrauch in Fließrichtung zu verursachen.

3.3. Oberflächenmodifizierung von Polyacrylamidträgern

Das Kohlenwasserstoffgerüst der Polyacrylamidträger und deren endständige Carboxylamid-Seitengruppen sind weitgehend chemisch stabil gegen Hydrolyse im pH-Bereich zwischen 1 und 10. Der Amidstickstoff kann jedoch auf verschiedene Weise durch andere Stickstoffverbindungen ersetzt werden. Dadurch wird erreicht, daß die Oberfläche der Träger unterschiedliche Ladungen erhält und so einer Vielzahl von zu bindenden Liganden zugänglich werden kann. Das schnelle Adhären als Bedingung für eine erfolgreiche Mikrocarrier-Kultur von Zellen ist entscheidend abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit der Matrix. Das Zellanheften an die Trägeroberfläche ist ein physikalischer Prozeß unter Beteiligung von van der Waals-Interaktionen (GERSON 1981), aber auch Medienzusammensetzung, pH-Wert (CLARK und HIRTENSTEIN 1981), Oberflächenkrümmung der Trägeroberfläche und Bewegungsintensität der Partikel im System haben einen großen Einfluß auf die Zellhaftung am Mikrocarrier.

Umfangreiche Untersuchungen zur Derivatisierung von Polyacrylamidpartikeln führten INMAN und DINTZIS (1969) durch. Über chemische Modifizierungen erzeugten sie dabei Ionenaustauschmaterialien verschiedener Kapazitäten. Zudem gelang es ihnen, über reaktive Polyacrylamidderivate Proteinstrukturen kovalent zu binden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit lag unser Bemühen in der Herstellung eines geeigneten Trägermaterials zur Immobilisierung adhärenter Zellen (Rinderaugenlinsenepithelzellen und Hepatozyten) und zur Immobilisierung membranständiger Enzyme (Cytochrom c Oxidase).

3.3.1. Variation der Oberflächenladung am Träger für die Zellimmobilisierung

Das Anhaften und das Wachstum adhärenter Zellen an eine Matrix hängt im entscheidenden

Maße von deren Oberflächenbeschaffenheit und -ladung, sowie von den Eigenschaften der gebundenen Liganden ab. Das Adhären von Zellen wird durch Adhäsionsproteine (Collagen (Typ I, Typ IV), Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Entactin, Osteonectin, Chondronectin, Thrombospondin) vermittelt, welche mit anderen Proteinen des Mediums um die Adsorption an die Polymeroberfläche konkurrieren. Die Zusammensetzung der Proteinschicht an der Oberfläche wird von den Eigenschaften des Polymers beeinflusst (STEELE et al. 1993, GRIESSER et al. 1994, LEE et al. 1994). Für die verschiedenen Adhäsionsproteine konnten in den Zellen Rezeptoren nachgewiesen und zum Teil isoliert und charakterisiert werden (BUCK UND HORWITZ 1987a,b; HUGHES et al. 1987; SMALHEISER und SCHWARTZ 1987). Der Zell-Substrat-Kontakt führt über eine Matrix/Adhäsionsprotein/Rezeptor-Bindung zur Ausbildung eines Adhäsionsplaques. Im weiteren Verlauf bildet die Zelle eine große Anzahl dieser Verankerungspunkte. Die Haftung der Zellen an der extrazellulären Matrix ist von grundlegender Bedeutung für die Zellform, das proliferative Wachstum und die Zelldifferenzierung. Es ist daher notwendig, eine für die Adsorption der Adhäsionsproteine geeignete Unterlage zu finden, um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten.

Mit der Modifizierung der Oberflächenladung des Polyacrylamidträgers sollte untersucht werden, welcher Ladungsbereich und damit welches Polymerderivat für eine Zellimmobilisierung sich als am geeignetsten erweist. Die Modifizierung der Polymerpartikel erfolgte sowohl vor als auch nach der Magnetisierung der Träger. Die ermittelten Seitengruppenkapazitäten waren in beiden Fällen gleich, wie der im folgenden aufgeführten Tab. 3 zu entnehmen ist.

Die Carboxylamid-Seitengruppen des Polyacrylamid-Kohlenstoffgerüsts können auf unterschiedliche Weise durch andere Stickstoffverbindungen ersetzt werden. Dabei wird erreicht, daß die Trägermatrix unterschiedliche Oberflächenladungen aufweist und über reaktivere Seitengruppen weiteren chemischen Reaktionen leichter zugänglich werden. Beispiele sind Reaktionen mit wasserfreiem Ethylendiamin und wäßrigem Hydrazin. Im stark alkalischen Medium können die Carboxylamidgruppen in reaktivere Carboxylgruppen überführt werden (Abb. 15).

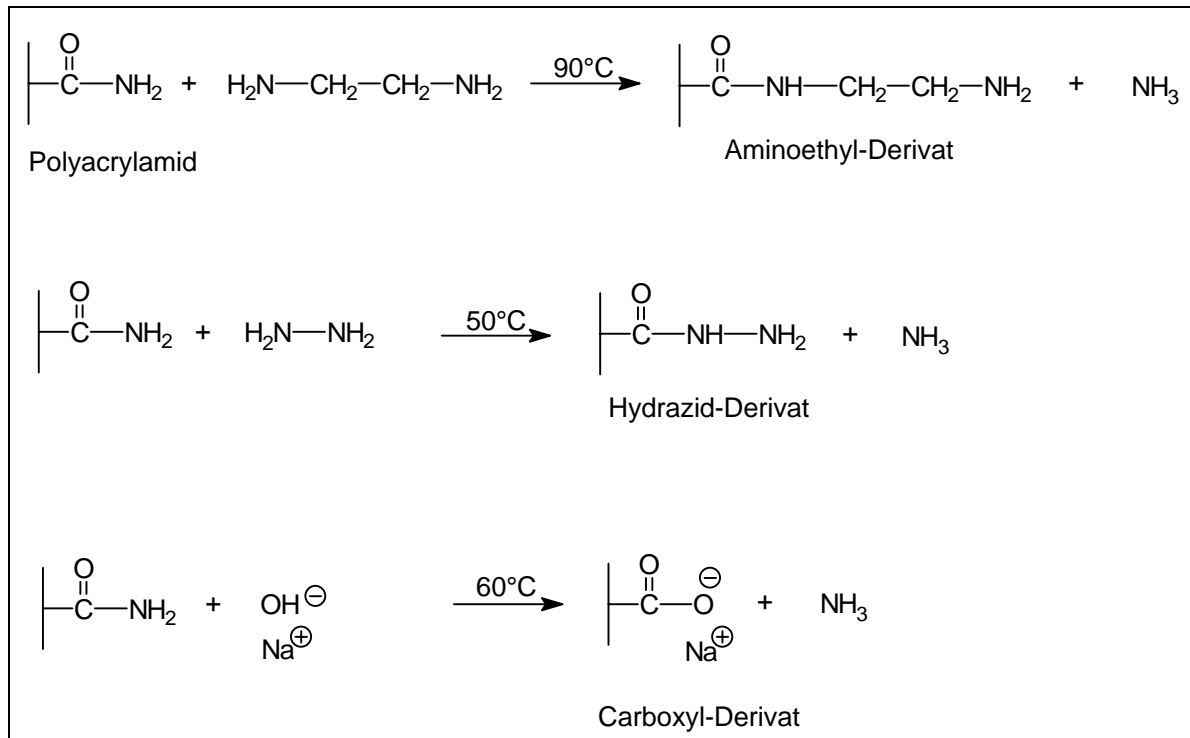


Abb. 15 Beispiele primärer Derivatisierungen von Polyacrylamid

An das Carboxylderivat können über eine carbodiimidvermittelte Kopplung Amine gebunden werden.

Als reaktives Ausgangsderivat zur weiteren Oberflächenmodifizierung diene das im Zuge eines primären Derivatisierungsschrittes gebildete Hydrazidderivat. Ausgehend vom Trägerhydrazid konnten das Succinyl- und das Phosphatylierte Derivat synthetisiert werden. Über den Weg der Acylazidierung gelang es, das Naphtolsulfonsäure-Derivat zu bilden, sowie das Protein Albumin am Träger kovalent zu binden. (Abb. 16).

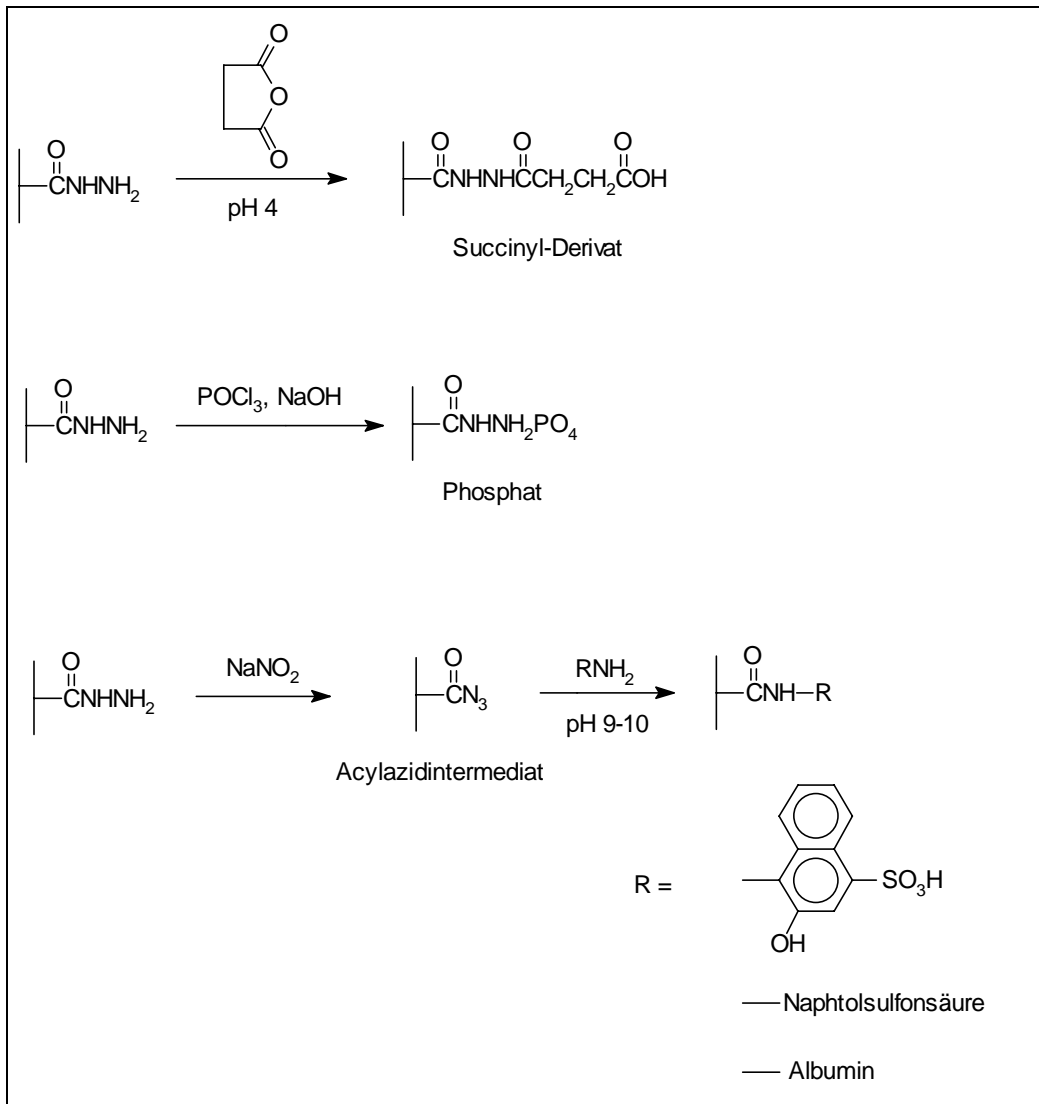


Abb. 16 Reaktionsschema zur Bildung des Succinyl- und Naphtholsulfonsäure-Derivates und zur kovalenten Kuppung von Albumin

Der Grad der Hydrazinolyse ist abhängig von der eingesetzten Hydrazinkonzentration und der Temperatur (Abb. 17).

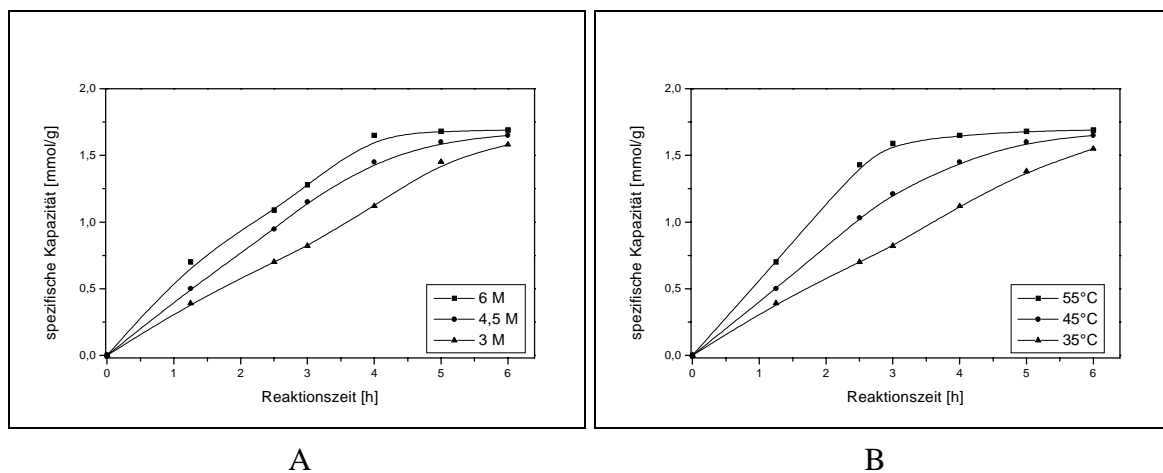


Abb. 17 Abhängigkeit des Hydrolysegrades von der Hydrazinkonzentration (A), der Temperatur (B) und der Reaktionszeit

Zur Ermittlung der wäßrigen Hydrazinkonzentration wurde die Lösung mit 1N HCl titriert.

Die Anzahl der funktionellen Gruppen (Kapazität c in mM) am Träger konnte über eine Wasserstoffionen-Bindungskurve ermittelt werden. Titriert wird beginnend bei 2 pH-Einheiten oberhalb und endend bei 2 pH-Einheiten unterhalb des pK-Wertes der zu bestimmenden funktionellen Gruppe. Die Berechnung erfolgte nach der allgemeinen Formel:

$$c = (N \cdot v - [H^+, OH^-] \cdot V) - w \cdot B$$

Dabei ist N die Normalität vom Titrationsmittel HCl, w das Trockenvolumen der eingesetzten Polymerträger in Gramm und v das zur Titration benötigte Volumen an HCl. $[H^+, OH^-]$ symbolisiert die ermittelte finale freie Wasserstoffionenkonzentration, wenn die Titration unterhalb pH 4,0 endet, oder die freie Hydroxylionenkonzentration, wenn die Titration oberhalb pH 10,0 beginnt. V (Ausgangsvolumen der Trägersuspension in ml) geht in die Berechnung wie folgt ein:

$$V = 0,9935 \cdot (\text{Nettogewicht des Suspensionsvolumens} - w)$$

Der Faktor 0,9935 ist das spezifische Volumen der 0,2 M KCl-Lösung, in der die Titration durchgeführt wird. w ist das Trockengewicht des eingesetzten Trägermaterials. Der Term B repräsentiert das Milliäquivalent gebundener Wasserstoffionen je Gramm trockenen Trägerderivats innerhalb der pH-Grenzen der Titration, die am underivatisierten Träger oder an unbestimmten funktionellen Gruppen, die im Verlauf der Herstellung eingeführt werden, binden. Vom Hersteller ist diese unspezifische H^+ -Bindung mit 0,003-0,005 mM/g innerhalb von 4 pH-Einheiten angegeben.

Die spezifische Kapazität C ist der Quotient aus gemessener Kapazität c und dem eingesetzten Trockenvolumen des Trägermaterials.

$$C = c/w$$

Die Anzahl der Hydrazidgruppen am Träger könnte direkt durch Titration des Hydrazids ermittelt werden. Der niedrige pKa-Wert (2,6) jedoch ließe in der Berechnung den Term der freien Wasserstoffionen ($[H^+] \cdot V$) sehr hoch werden. Es wurde gefunden, daß die Überführung des Hydrazids in das Succinyl-Derivat des Hydrazids quantitativ verläuft. Die endständige Carboxylgruppe, die einem pKa=4,55 aufweist, kann exakt titriert werden. Weiterhin ist es notwendig, die „Hintergrund“-Kapazität (zum größten Teil endständige Carboxylgruppen, die über Nebenreaktionen eingeführt wurden) zu ermitteln, da diese bei der Titration des Succinyl-Derivats mit erfaßt wird. Man bestimmt sie, indem man die Hydrazidgruppen einer anderen Trägerprobe durch Acetylierung blockiert und das so gebildete Essigsäurehydrazid-Derivat im selben pH-Bereich titriert. Schließlich ergibt sich zur Berechnung der endständigen Hydrazidgruppen folgendes Gleichungssystem.

- (1) $C_{\text{SuHz}} = (N_{V_1} - [H^+]_1 V_1) / w_1$ (von der Bernsteinsäurehydrazid-Titration)
- (2) $C_{\text{AcHz}} = (N_{V_2} - [H^+] V_2) / w_2 (1 + 0,058 C_{\text{SuHz}})$ (von der Essigsäurehydrazid-Titration)
- (3) $C_{\text{Hz}} = C_{\text{SuHz}} - C_{\text{AcHz}}$ (mM/g Hydrazid-Derivat)

Der Term $(1 + 0,058 C_{\text{SuHz}})$ dient zur Korrektur der unterschiedlichen Gewichte von Succinyl- und Acetylhydrazid-Derivat.

Die maximale Hydrazid-Derivatisierung ergab danach eine Kapazität von 1,53 mM/g Trägermaterial. Polymerträger mit dieser Hydrazidkapazität gingen in weitere Experimente ein.

Analog wurde die Kapazität anderer Derivate ermittelt.

Infolge unterschiedlicher Derivatisierungen erhielt man verschiedene Oberflächenladungen am Polymerträger. Die pK-Werte und die Kapazitäten der jeweiligen Derivate sind in der nachfolgenden Übersicht zusammengefaßt (Tab. 3).

Tab. 3 Polymerderivate, deren pK-Werte und Kapazitäten

Derivat	pK-Wert	Kapazität [mM/g] (ermittelt über Wasserstoffionenbindungs- kurve)
Carboxyl	<2,0	2,03
Naphtolsulfonat	<2,0	0,85
Hydrazid	2,6	1,53
Succinylhydrazid	4,6	1,53
Amid	7,0	?
Phosphat	(1)	6,8
	(2)	<2,0
Aminoethyl	9,2	1,18

In anschließenden Versuchen sollte der Einfluß der Ladungsart und Stärke auf das Adhärenieren von Zellen untersucht werden. Es sollte sich ein Profil ergeben, nach dem ein bestimmter Ladungsbereich für ein erfolgreiches Anwachsen der Zellen an der Trägeroberfläche notwendig ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in Kapitel 3.4.3. aufgezeigt.

3.3.2. Bindung von Phospholipid am modifizierten Polymerträger

Die Lipidierung der Polymerträger zielte auf eine starke Hydrophobisierung der Partikeloberfläche. Im Zuge der Kopplungsreaktion werden die Phospholipide über ihre Kopfgruppen am Träger fixiert. Die langkettigen Fettsäurereste sind dabei nach außen gerichtet und verleihen der Trägeroberfläche einen hydrophoben Charakter.

Zum einen war die Frage zu klären, in welchem Maße Zellen an lipidierten, hydrophobe Oberflächen adhärenieren. Durch wiederholtes Beschichten mit Lipid im Zuge einer Dialyse sollten die Träger im zweiten Schritt erneut hydrophiliert werden. Dabei entsteht eine bilayerartige, membranähnliche Struktur. Es war die Frage zu klären, ob Zellen in der Lage sind, an proteinfreie Membranstrukturen zu binden, abzuflachen und festzuwachsen (s. 3.4.3.).

Zum anderen sollte infolge einer anschließenden Dialyse eine membranähnliche Oberflächenstruktur erzeugt werden, in die membranverankerte Proteine inkorporiert und somit immobilisiert werden können (s. 3.7.3.).

Bei der chemischen Reaktion zur Bindung von Dimyristoyl-Phosphatidylethanolamin (DMPE) an die Matrixoberfläche können die zu bindenden Lipidmoleküle je nach Reaktionsmedium entweder in organisch gelöster oder aber in wäßrig mizellarer (nicht gelöster) Form vorliegen. Mizellen sind sphärische Gebilde amphiphiler Substanzen, deren Moleküle sich in einem Zustand minimaler freier Energie befinden. Um die mizellar angeordneten Lipidmoleküle einer chemischen Reaktion verfügbar zu machen, muß die relativ stabile Mizellkonstruktion unter energetischem Aufwand „aufgebrochen“ werden.

Daher ist anzunehmen, daß chemische Reaktionen, an denen micellare Strukturen beteiligt sind, mit deutlich geringerer Ausbeute ablaufen, als Reaktionen, bei denen Lipide molekular gelöst vorliegen. Dies ist der Fall, wenn man die chemische Reaktion zur kovalenten Kupplung des Lipids an die Polymermatrix im organischen Medium durchführt.

Es galt also die bestmöglichen Bedingungen zu finden, bei der die Kupplungsreaktion mit hoher Ausbeute verläuft, um die Trägeroberfläche dicht mit Lipidmolekülen zu besetzen. Um die Menge des bei den Kopplungsreaktionen einzusetzenden Phosphatidylethanolamins abschätzen zu können, mußten Untersuchungen zur Oberflächenstruktur der Träger durchgeführt werden. Über porosimetrische Berechnungen konnte für trockene, nichtmagnetischer Polymerträger eine spezifische Oberfläche von etwa $1,4 \text{ cm}^2/\text{mg}$ Trägermaterial ermittelt werden. Für magnetisierte Träger betrug die Oberfläche etwa $0,7 \text{ cm}^2/\text{mg}$. Nach Untersuchungen von HAUSER et al. (1981) ist eine Lipidmonolayer dann stabil, wenn der Flächenbedarf für ein PE-Molekül im Bereich von $0,6$ und $1,6 \text{ nm}^2$ liegt. Um eine stabile DMPE-Monoschicht am Polymerträger zu erzeugen, müßten $5,34 \text{ }\mu\text{g}$ bis $14,24 \text{ }\mu\text{g}$ Lipid an 1 mg nichtmagnetische Polymerträger und $2,67 \text{ }\mu\text{g}$ bis $7,12 \text{ }\mu\text{g}$ an 1 mg magnetisierte Polymerträger gebunden werden.

LINBE (1986) und ROTHE (1989) zeigten, daß Phospholipide im wässrigen Puffersystem über eine Carbodiimidreaktion an die teilweise carboxylierte Polyacrylamidmatrix nur mit geringer Ausbeute gekoppelt werden können. Als Kondensationsmittel diente Dicyclohexylcarbodiimid (Abb. 18).

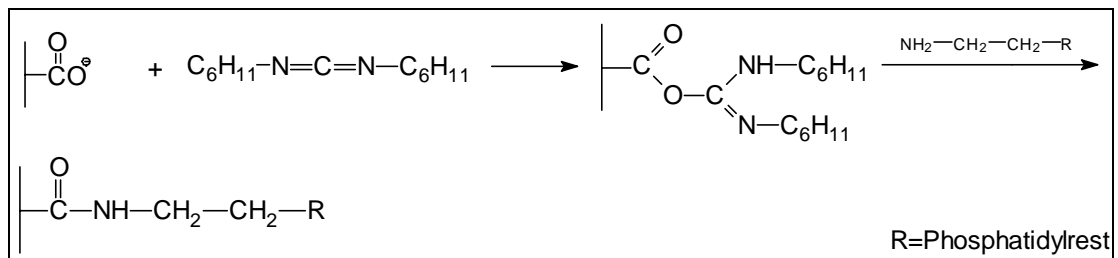


Abb. 18 Kupplung von Phosphatidylethanolamin an den carboxylierten Polymerträger

Unter den bei LINBE gegebenen Reaktionsbedingungen reichte die Menge der an der Partikeloberfläche kovalent gebundenen Lipidmoleküle nicht aus, um an der Trägeroberfläche eine geschlossene membranähnliche Struktur aufzubauen.

Mit der Überführung in das Aminoethylderivat ist es möglich, über das Diazoniumsalzintermediat im wässrigen Milieu sowohl Proteine als auch Aminophospholipide zu binden (Abb. 19). Aber auch hier verlief die Lipidbindungsreaktion mit ungenügender Ausbeute ($0,689 \text{ }\mu\text{g}/\text{mg}$ nichtmagnetische Träger).

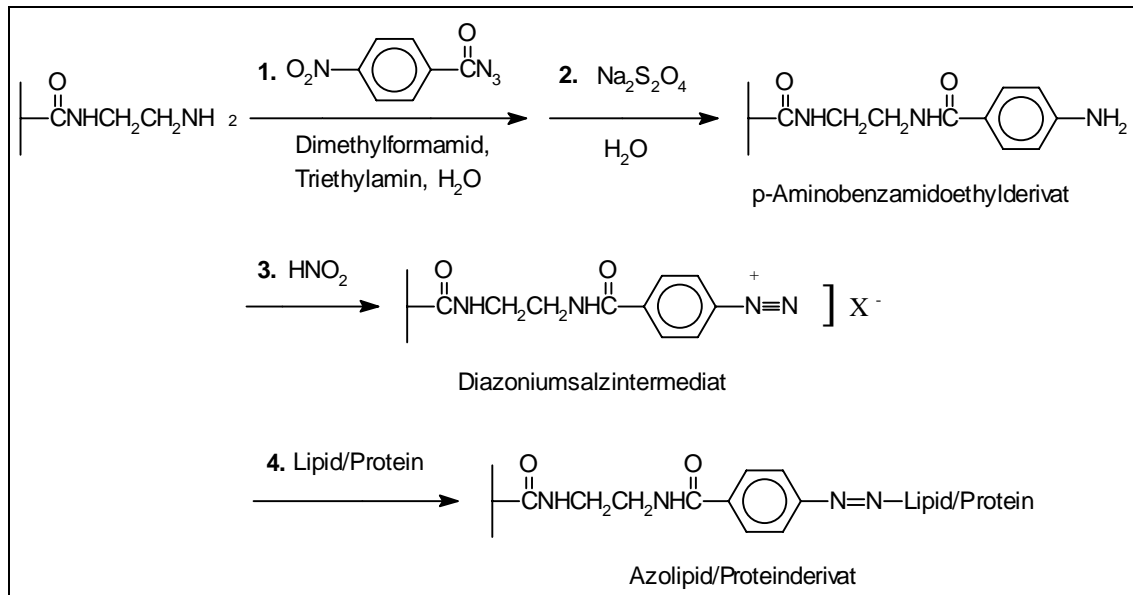


Abb. 19 Lipid/Protein-Bindung am Aminoethylträgerderivat über ein Diazoniumsalzintermediat

Die Durchführung der Lipidkopplung im organischen Medium erfolgte zunächst nach dem Chemismus der Azidkupplung (s. Abb. 16) (AURICH 1991). Als Reaktionsmedium diente Tetrahydrofuran (THF). Zur Bildung des Azidintermediats wurde n-Butylnitrit als organisch lösliches Agens verwendet. Da das zu koppelnde Lipid in diesem Ansatz molekular gelöst vorlag, sollte eine höhere Bindungsrate zu verzeichnen sein. Tatsächlich konnten $6,87 \mu\text{g}$ kovalent gebundenes Phospholipid je mg nichtmagnetisiertes Trägermaterial nachgewiesen werden. Am magnetisierten Träger wurden $4,56 \mu\text{g}/\text{mg}$ gefunden.

Die Methode der Wahl fiel jedoch aufgrund der deutlich höheren Ausbeuten auf die Cyanurchlorid-vermittelte Aktivierung des Trägerhydrazids. Die Reaktion folgt dem in Abb. 20 dargestellten Mechanismus.

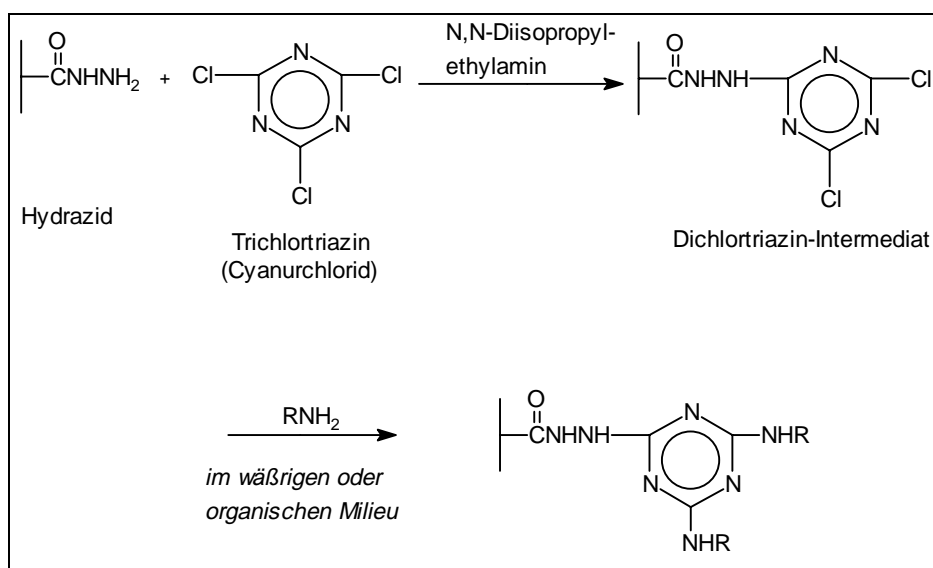


Abb. 20 Kupplung primärer Amine über Dichlortriazin-Aktivierung

Als primäres Amin diente das zu bindende Phospholipid Phosphatidylethanolamin. Der Ablauf der Reaktion gelingt sowohl im wäßrigen als auch im organischen Milieu. Eine Phosphatbestimmung ergab eine Bindungsrate von 7,53 µg Lipid je mg magnetischer Polymerträger und 8,86 µg je mg nichtmagnetisierter Polymerträger bei Reaktionsverlauf in wasserfreiem Dioxan. Im wäßrigen Milieu dagegen banden nur 3,51 µg bzw. 4,83 µg Lipid je mg Träger.

Als Alternative zum Trägerhydrazid ist es auch möglich, ein Derivat mit endständigen Hydroxylgruppen reagieren zu lassen. Dabei sollte die Effektivität der Lipidkopplung sogar noch erhöht werden. Amine binden bei der Cyanurchlorid-Aktivierung an beide freien Chloratome des Cyanurchlorids, d.h. eine „Brückenbildung“ zu benachbarten Aminogruppen (resp. Hydrazidgruppen) und somit eine geringere Zugänglichkeit des zu bindenden Phosphatidylethanolamins kann die Folge sein. Hydroxyl- oder Carboxylgruppen jedoch können mit nur einem Chloratom des Trichlortriazins reagieren. Damit bleibt die PE-Zugänglichkeit für die anderen beiden Chloratome erhalten. Bei einer entsprechenden Versuchsreihe mit beiden Trägerderivaten (Hydrazidderivat und Bernsteinsäurehydrazidderivat) konnten allerdings keine wesentlichen Unterschiede in der Kupplungsrate festgestellt werden. Es ist anzunehmen, daß ein Cyanurchloridüberschuß bei der Aminaktivierung keine „Brückenbildung“ zuläßt und das Lipid theoretisch an jeder Dichlortriazingruppe binden kann.

Es konnte gezeigt werden, daß nach erfolgter Lipidierung die gebundene PE-Menge in einem Bereich lag, innerhalb dem man eine geschlossene Monolayer zu erwarten hatte. Nach einer Relipidierung (Dialyse) fand man einen 4- bis 5-fachen Wert (31,4 µg Lipid je mg Träger). Dabei hatte sich statt einer Bilayer eine Multilayer am Träger gebildet, die einer 4- bis 5-fachen Lipidschicht entsprach. Eine anschließende Delipidierung (intensives Waschen in organischem Lösungsmittel) entfernte die Multischicht und hinterließ nur kovalent gebundene PE-Moleküle am Träger.

Desweiteren wurde versucht, die Menge an PE zu ermitteln, die sich rein adsorptiv an die Matrixoberfläche anlagert. Dazu wurde ein Kontrollversuch durchgeführt, bei dem die Träger ohne das Kupplungsreagenz zum Ansatz kamen. Auch hier konnte Lipid nachgewiesen werden, dessen Menge jedoch nicht für die Ausbildung einer dichten Monolayer ausgereicht hätte (Abb. 21).

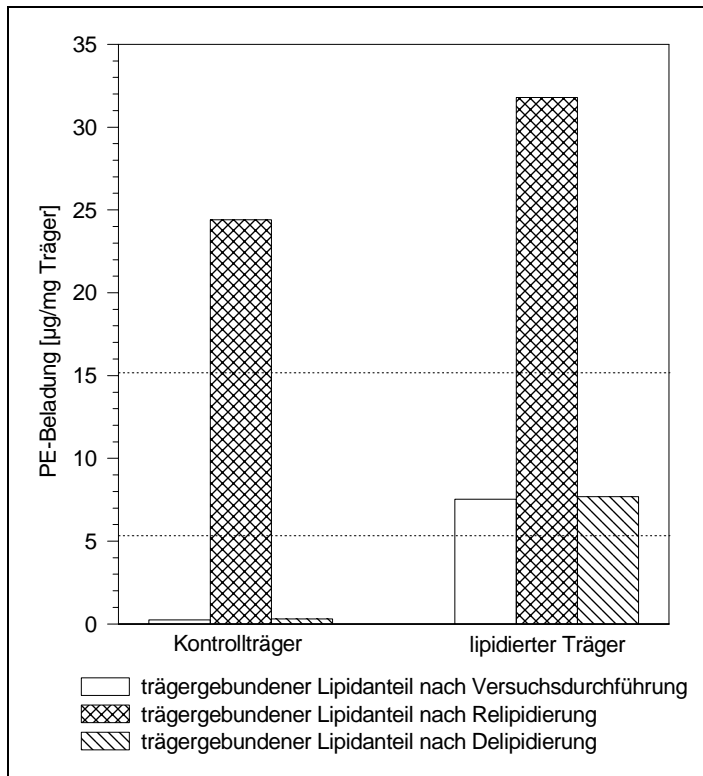


Abb. 21 PE-Beladung von Kontrollträger und Träger mit kovalent fixiertem PE
Die gestrichelten Linien markieren den Grenzbereich, in dem eine Mono- bzw. Bilayerschicht als stabil gilt.

Vergleicht man die statistische Größenverteilung lipidierter und nichtlipidierter Träger, so erkennt man eine deutliche Abnahme der Durchmesser der Partikel nach der Lipidierung (Abb. 22).

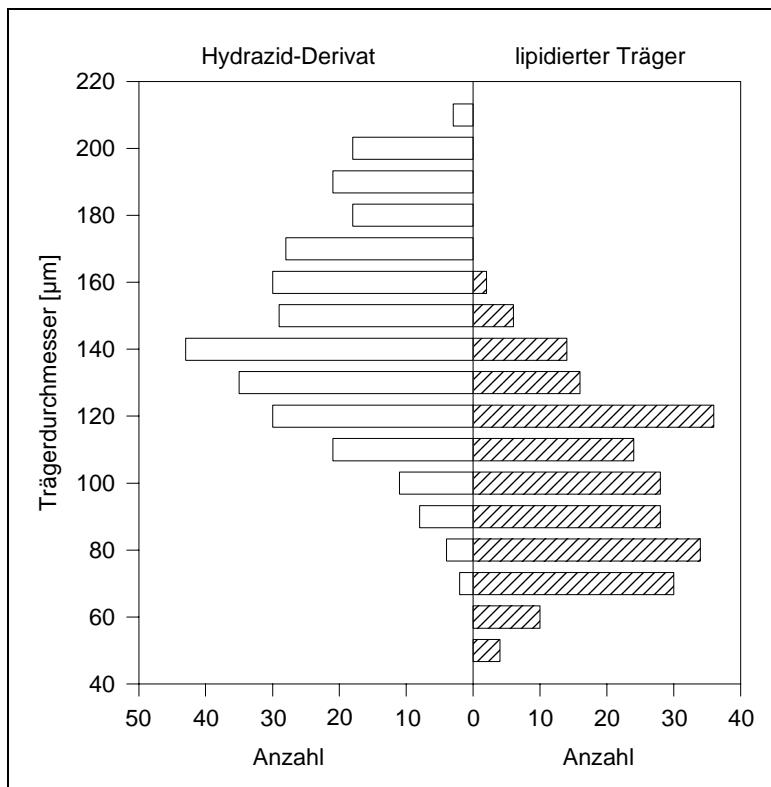


Abb. 22 Vergleich der Größenverteilung lipidierter und nichtlipidierter Träger

Eine möglicher Erklärung dafür wäre die Abnahme der Oberflächenladung und die Zunahme der Hydrophobizität lipidierter gegenüber nichtlipidierter Trägern. Beide Änderungen wirken dem Quellvermögen entgegen.

3.3.3. Bindung von Collagen am modifizierten Polymerträger

Mit der Beschichtung der Polymerpartikel mit Collagen sollte am Träger eine ideale Oberfläche zur Zelladhäsion geschaffen werden, wie sie in der konventionellen Monolayerkultur adhärenter Zellen zur Anwendung kommt (s. Einleitung). Die Bindung und das anschließende Abflachen der Zellen am Collagen erfolgt über eine spezifische Wechselwirkung zwischen Protein und Adhäsionsproteinrezeptoren der Zellmembran. Eine Collagenschicht an der Trägeroberfläche sollte daher die Zelladhäsion und das Abflachen der Zellen am Polymerpartikel fördern (s. 3.4.3. und 3.6.).

Zur Bestimmung des am Träger gebundenen Collagens wurde eine neu entwickelte turbidimetrische Methode eingesetzt. Aufgrund der Unlöslichkeit in alkalischem und neutralem Medium und des geringen Gehalts an Tyrosin und Tryptophan (LOWRY et al. 1951; CHOU und GOLDSTEIN 1960) ist die herkömmliche Proteinbestimmung nach LOWRY für Collagen nicht anwendbar. Die Quantifizierung durch Hydroxyprolin (WOESSNER 1961) ist ebenfalls nicht möglich, da das teilweise hydrolysierte Polyacrylamidträgermaterial eine zu große Eigenfärbung aufweist. Auch die Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) ist ungeeignet, da das Collagen bei der Prozedur ausflockt.

Für eine relativ einfache und schnelle Collagenbestimmung wurde die Präzipitation des Proteins aus einer starken, 36% Harnstoff enthaltenden Säurelösung (Trichloressigsäure, TCA) genutzt. Die Zugabe von Harnstoff verhindert dabei das Ausflocken des Proteins in der TCA-Lösung (mit oder ohne 10% SDS). Eine Ausflockung beobachtet man auch dann, wenn die zu messenden Proteinproben 40% Harnstoff enthalten und diese in harnstofffreie TCA-Lösung gegeben werden. Um die optimale Proteinlösung (maximale Trübung ohne Ausflockung) zu ermitteln, wurde eine Mischung aus 20 µl Probe und 100 µl einer Lösung bestehend aus 36% Harnstoff, 3% SDS und 30% TCA 2- bis 6-fach in harnstofffreiem SDS/TCA verdünnt. Bei einer dreifachen Verdünnung wurde eine maximale Trübung gefunden. Dies zeigt die optimalen Verdünnungsverhältnisse der Lösungsbestandteile bei der turbidimetrischen Bestimmung auf. Diese Abhängigkeit ist in Abb. 23 dargestellt, bei der zusätzlich zu Collagen eine Proteinbestimmung von Albumin durchgeführt wurde.

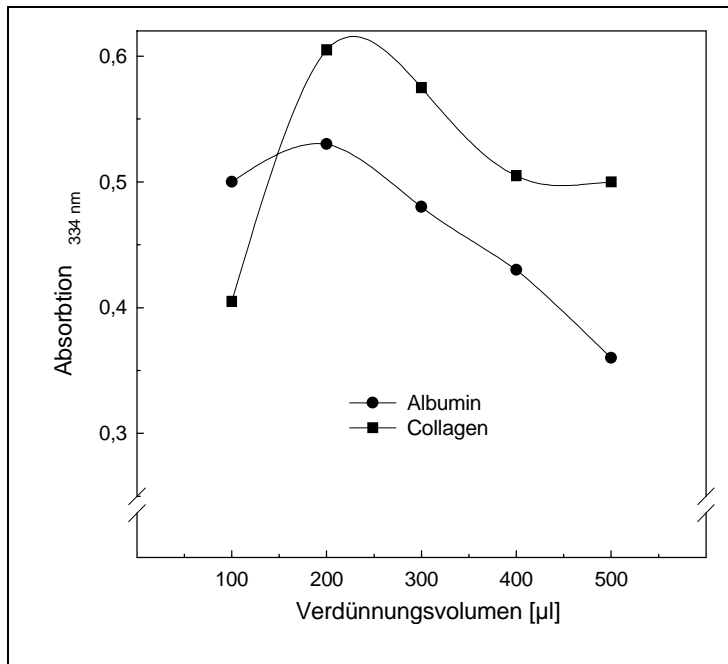


Abb. 23 Abhängigkeit der Trübung vom Grad der Verdünnung
20 µl Proteinlösung (50 µg/ml) werden in 100 µl 36% Harnstoff in SDS/TCA gelöst und entsprechend mit SDS/TCA verdünnt. Die resultierende Harnstoffkonzentration ergibt sich aus der Verdünnung.

Weiterhin war die Abhängigkeit des Probenvolumens vom Gesamtansatzvolumens zu berücksichtigen. Erhöht man das Probenvolumen, steigt damit der Proteinanteil und sinkt der Anteil an Harnstoff im Ansatz. Anhand Abb. 24 ist erkennbar, daß bei Proteinproben größer als 50 µl auf 100 µl 36% Harnstoff in SDS/TCA der Trübungsgrad abnimmt. Um sicher zu gehen, sollte daher das Probenvolumen 40 µl auf 100 µl nicht überschreiten.

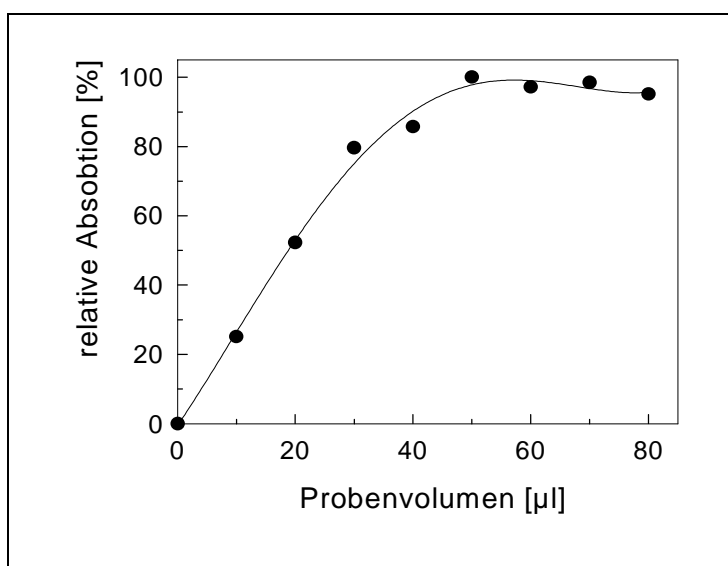


Abb. 24 Abhängigkeit der relativen Absorption von der Größe des Probenvolumens

Die Empfindlichkeit der turbidimetrischen Methode gegenüber der herkömmlichen Hydroxy-

prolinbestimmung für Collagen (WOESSNER 1961) erwies sich als doppelt so hoch (Abb. 25).

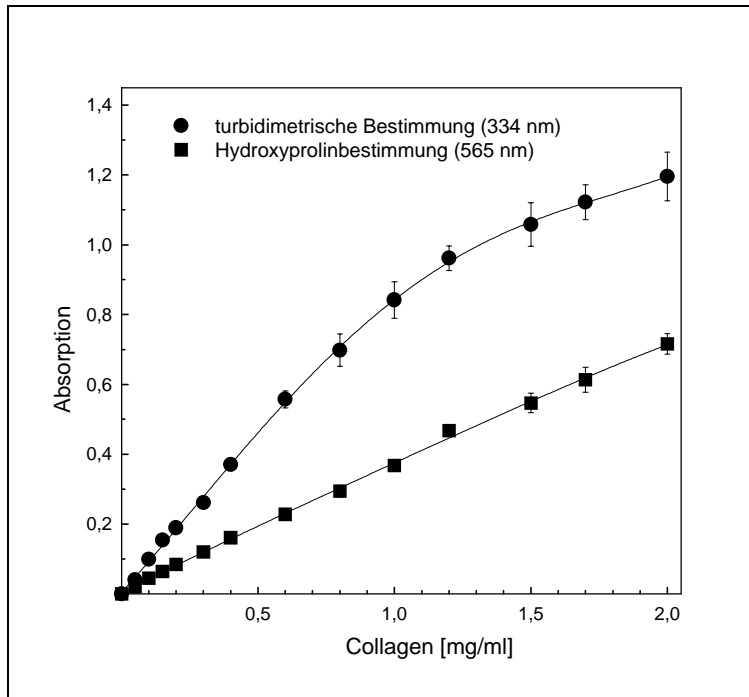


Abb. 25 Bestimmung des Collagengehalts durch Turbidimetrie und Hydroxyprolinmethode

Die Hydroxyprolinbestimmung zeigt geringere Standardabweichung und eine längere Linearität, ist jedoch bedeutend zeitaufwendiger und wird durch viele Substanzen gestört.

Die Methode ist ausreichend linear bis zu einer Absorption von 0,85 (Korrelationskoeffizient $R=0,9972$), was einer Probenkonzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Es wurde gefunden, daß ein Proteingemisch im Ansatz additive Werte der einzelnen Proteinbestandteile ergibt.

Ein besseres Fitting wird durch eine Polynomialregression dritten Grades ($R=0,9996$) erreicht. Ermittlungen der Collagenkonzentration einer Probe, die sowohl turbidimetrisch als auch über die Bestimmung des Hydroxyprolinegehalts errechnet wurde, zeigte nach Korrelation mit $R=0,9996$ in einem Bereich bis 1,20 mg/ml, daß beide Methoden äquivalent sind.

Damit konnte die Eignung der Methode zur Bestimmung von an Trägerunterlagen nichtkovalent gebundenem Collagen etabliert werden.

Bei der Collagenierung der Polyacrylamidträger banden 54% des ursprünglich zum Ansatz gegebenen Collagens. Die restlichen 46% flockten im Überstand aus und wurden in den darauffolgenden Waschprozeduren entfernt (Tab. 4).

Tab. 4 Relative Verteilung des Collagens zwischen collagierten Trägern und Überstand

Probe	Collagengehalt [%]
Polymerträger	54,1
Überstand	29,3
1. Waschung	8,7
2. Waschung	6,9
3. Waschung	1,0
4. Waschung	0,0
Σ ungebunden	45,9

Das zur Trägerbeschichtung eingesetzte Collagen betrug 6000 µg im Ansatz, was durch Hydroxyprolinbestimmung nach Säurehydrolyse der verwendeten Collagenlösung ermittelt wurde. Schließlich konnten 6186 µg Collagen nach der Beschichtung (gebunden und ungebunden, Tab. 4) unter Verwendung der turbidimetrischen Bestimmungsmethode wiedergefunden werden. Am Trägermaterial banden 1,62 µg/mg Trägermaterial. Diese gute Wiederfindungsrate stellt die Turbidimetrie als eine geeignete Proteinbestimmungsmethode zur quantitativen Erfassung von Collagenkonzentrationen dar.

3.3.4. Bindung von Albumin am modifizierten Polymerträger

Die Beschichtung der Trägeroberfläche mit Albumin sollte eine Aussage darüber erbringen, ob adhärenz Zellen unspezifisch an Proteine binden, die keine typischen Erkennungssequenzen für Adhäsionsproteinrezeptoren der Zellenmembran aufweisen. Nach einer eventuellen unspezifischen Anlagerung der Zellen an die Polymeroberfläche (unpezifische Ladungseffekte) war zu untersuchen, ob in der Folge eine Abflachung der Zellen als Voraussetzung für eine erfolgreichen Kultivierung zu beobachten ist (s. 3.4.3. und 3.6.).

Die Menge des an der Polymermatrix kovalent gebundenen Albumins konnte nicht direkt am Träger ermittelt werden. Eine Hydrolyse des Trägermaterials einschließlich des gebundenen Albumins und anschließender Proteinbestimmung nach LOWRY (1951) oder BRADFORD (1976) konnte aufgrund der Eigenfärbung des Trägermaterials nicht durchgeführt werden. Die turbidimetrische Bestimmung war ebenfalls ungeeignet, da das Albumin kovalent an der Polymermatrix verankert vorlag und somit nicht einer harnstoffvermittelten Ablösung zugeführt werden konnte.

Zur Bestimmung des am Träger gebundenen Albumins wurde die Proteinkonzentration vor und nach der Kupplungsreaktion nach LOWRY (1951) ermittelt.

Im Laufe der chemischen Kopplung banden 64,1% des ursprünglich eingesetzten Albumins.

Der Rest im Überstand wurde zunächst abpipettiert und durch wiederholtes intensives Waschen entfernt (Tab. 5).

Tab. 5 Relative Verteilung des Albumins zwischen albuminierten Trägern und Überstand

Probe	Albumingehalt [%]
Polymerträger	64,1
Überstand	23,8
1. Waschung	7,3
2. Waschung	4,0
3. Waschung	0,8
4. Waschung	0,0
Σ ungebunden	35,9

Von dem eingesetzten 1 g Albumin konnten somit 641 mg an 1 g Trägermaterial gebunden werden. Im Gegensatz zu den mit Collagen beschichteten Trägern lag das Albumin an der Matrix kovalent gekoppelt vor. Es war daher nicht möglich, das Protein nachträglich unter Einwirkung von Detergenzien vom Träger zu entfernen. Nach der Kopplungsreaktion verklebten die Träger nicht, sie blieben vereinzelt in Suspension.

3.4. Immobilisierung und Kultivierung von Rattenhepatozyten an magnetischen Polymerträgern

3.4.1. Medienzusammensetzung, Trägermodifizierung und Zellanhaftung

Die Fähigkeit und die Effektivität der Haftung und des Wachstums isolierter Leberzellen an festen Matrizes ist abhängig vom Kulturmedium, vom Zusatz entsprechender Wachstumsfaktoren, von der Oberflächencharakteristik der angebotenen Unterlage und von Kultivierungsbedingungen wie Begasung, Temperatur und mechanischer Beanspruchung. Nur die optimale Abstimmung aller für Wachstum und dem gleichzeitigen Erhalt der hepatozytenspezifischen Funktionen verantwortlichen Faktoren gewährleistet eine erfolgreiche Langzeitkultivierung.

3.4.2. Kulturmedium und Zusätze, Begasung

Die Komplexität der zur Verfügung stehenden Zellkulturmedien macht es notwendig, Medien zu selektieren, die speziell der Kultivierung von Hepatozyten angepaßt sind. Für den Erhalt dif-

ferenzierter Funktionen von Leberzellen in Kultur hat sich neben Medium 199 (WÖRFLE et al. 1983), Chees' essential Medium (CEM) (JAURGUI et al. 1994), Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (LECLUYSE et al. 1994) und Waymouth's 721/1 Medium (DRISCOL et al. 1982; MORGAN und DARLING 1994) besonders Williams Medium E bewährt (HOCKIN und PAINE 1983; MIYOSHI et al. 1994; VAN 'T KLOOSTER et al. 1994). Dieses Medium wurde speziell für die Langzeitkultivierung adulter Leberzellen von WILLIAMS und GUNN (1974) entwickelt.

Durch Zusätzen von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Spurenelementen zum Vollmedium können die Wachstumsbedingungen der Zellen optimiert werden (BERRY et al., 1991) (Tab. 6).

Tab. 6 Zusätze zum Kulturmedium Williams' Medium E zur Optimierung der Wachstumsbedingungen von Hepatozyten

Zusatz	Funktion
Puffersubstanzen (NaCO ₃ , HEPES)	pH-Stabilisierung
Gentamycin, Streptomycin, Penicillin	Antibiotika
Dexamethason	verbesserte Ausbildung von Cytoskelettmorphologien für eine Zellanhaftung an extrazellulären Unterlagen
DMSO	Unterstützung des Erhalts der Albuminsynthese, Förderung der Zellassoziation in Kultur, Erhalt der Zelldifferenzierung, Einwirkung auf Cytoskelettausbildung
Insulin	Förderung der Zellanhaftung, Erhalt der Zellfunktionen
Glucagon	Erhalt der Zellfunktionen, unterstützender Einfluss auf Erhalt der Albuminsynthese
epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Wachstumsunterstützung, Erhalt der Hepatozytenmorphologie und gewebsspezifische Funktionen
Apo-Transferrin	gewährleistet verstärkte Aufnahme von Fe ²⁺ und Fe ³⁺ bei Hepatozyten, Erhaltung der Eisenbalance

Die Zugabe der unphysiologischen Substanz Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Kulturmedium bewirkt neben der direkten unterstützenden Wirkung zum Funktionserhalt der Hepatozyten (Albuminsynthese) auch einen Einfluß auf die Morphologie der in Kultur befindlichen Hepatozyten.

LANDRY et al. (1985) berichteten, daß frisch isolierte und auf Plastikunterlagen eingesäte Hepatozyten innerhalb 2-5 Tagen spontan aggregieren und vereinzelt Zellinseln bilden. Histologische Schnitte zeigten zentral im Zellaggregat entstandene Lumen, die als gallenröhrenähnliche Struktur gedeutet wurden. Diese Selbstorganisation führte während der weiteren Kultivierung

zu dreidimensional strukturierten Zellkomplexen bei Erhalt hoher Zellfunktionalität.

Beim Einsatz adhärenter Matrizes, wie sie bei vorliegenden Untersuchungen zum Einsatz gebracht wurden, konnte zunächst keine spontane Aggregation der Hepatozyten zu Zellinseln gefunden werden, da die Zellen innerhalb kurzer Zeit an der Unterlage festwuchsen und einen konfluenten Zellteppich bildeten, der auch nach längerer Kultivierung erhalten blieb (Abb. 26A). Erst nach Zugabe von 1% DMSO ins Kulturmedium frisch isolierter Hepatozyten konnte nach 2-3 Tagen eine Zellaggregation beobachtet werden (Abb. 26B).

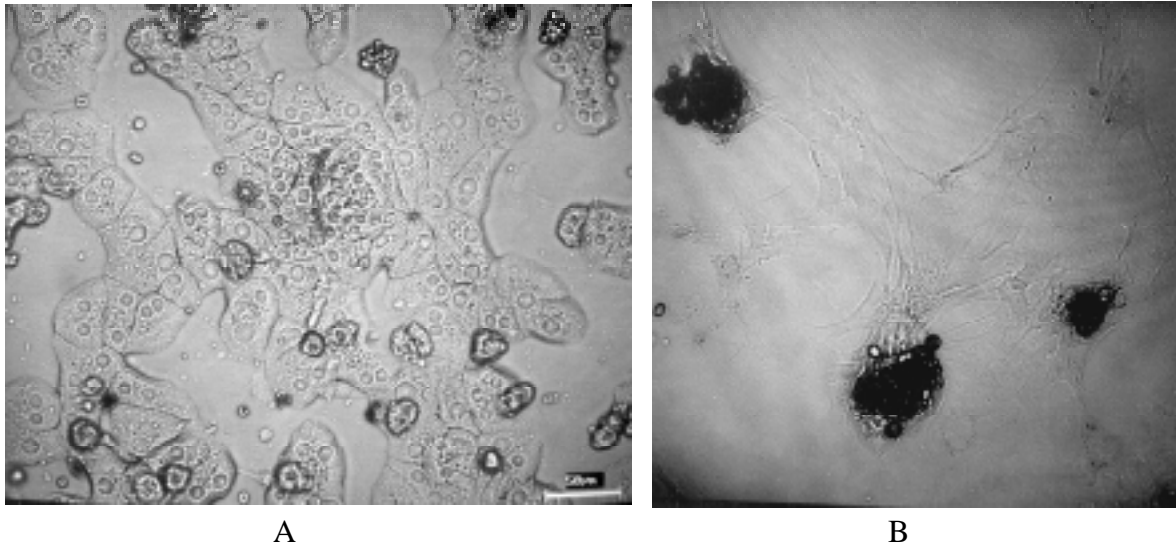


Abb. 26 3-tägige Monolayerkultur von Hepatozyten ohne DMSO-Zusatz (A) und mit 1% DMSO-Zusatz (B)

Jedoch konnte eine Erhöhung der untersuchten hepatozytenspezifischen Funktionen (Phenolrotabbau, Harnstoffsynthese) bei Dauerkultivierung gegenüber DMSO-freier Monolayerkultur nicht beobachtet werden. Das entspricht den Befunden von PARSONSWINGERTER und SALTZMAN (1993), nach denen Proliferation und differenzierte Zellfunktion im reziproken Verhältnis stehen. Da eine Aggregation zu Zellinseln auf einer adhärenter Unterlage nach Ausbildung eines konfluenten Zellteppichs ein dreidimensionales Wachstum bei intensiver Proliferation voraussetzt, nimmt im gleichen Maße die differenzierte Funktionalität der Leberzellen ab. Obwohl die Gesamtzellzahl steigt, bleibt die „Nettoleistung“ gleich.

Man kann daher schlußfolgern, daß der Zusatz von DMSO ins Kulturmedium für Langzeitkultivierungen von Hepatozyten unter den gegebenen Bedingungen in geringen Mengen (0,1%) förderlich, in höheren Konzentrationen (1-2%) jedoch nicht zweckmäßig ist.

Serum enthält eine wichtige, wenn auch kaum definierte Mischung der verschiedensten wachstumsfördernden Substanzen (Polypeptide, Hormone, Lipide und Spurenelemente). Die Zugabe von fetalem Kälberserum zum Kulturmedium erhöht die Effizienz der Zellanhaftung an die Unterlage (KILBERG und HANDLOGTEN 1988). Die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren erhöhen die Überlebensrate, für spezifische Hepatozytenfunktionen leisten sie keinen Beitrag (REID et al. 1986, zitiert in BERRY et al. 1991). In Gegenwart von Serum überwuchern eventuell

noch in der Kultur befindliche Fibroblasten die Hepatozyten innerhalb kürzester Zeit, während Kulturen mit epithelialer Morphologie in serumfreiem Medium geschützt sind (SELLS, 1985, zitiert in BERRY 1991). Es ist daher angebracht, den Serumzusatz im Verlauf der weiteren Kultivierung stark einzuschränken oder ganz darauf zu verzichten.

Der hohe Sauerstoffverbrauch von intakten Hepatozyten (7 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht je Minute) erfordert eine zu jeder Zeit ausreichende Begasung des Kulturmediums. Sinkt der Sauerstoffpartialdruck im Medium auf weniger als 10 mm Hg, ist der Stoffwechsel der Zellen stark eingeschränkt. Zunächst zeigen sich Ausstülpungen an der Zellmembran (Blebs), die in den ersten Minuten einen reversiblen Mangelzustand reflektieren. Bei anhaltendem Sauerstoffdefizit sterben die Zellen innerhalb 1-2 Stunden. In der Leber herrscht ein Sauerstoffpartialdruck im Bereich zwischen 1 und 60 mm Hg, im Mittel 20 mm Hg (BERRY 1991). Daher dürfte die Zuführung von Luftsauerstoff, bei der sich ein $p\text{O}_2$ von bis zu 150 mm Hg im Medium einstellt ausreichend sein. Bei einer Begasung mit Carbogengas wird ein Partialdruck von 680 mm Hg erreicht. Es gibt jedoch in der Literatur keinen Hinweis darauf, daß der Metabolismus isolierter Hepatozyten differiert, wenn die Zellen einem $p\text{O}_2$ von 680 oder 150 mm Hg ausgesetzt sind.

3.4.3. Hepatozytenwachstum auf magnetischen Polymerpartikeln

Primärkulturen sind im allgemeinen in Bezug auf die Kulturbedingungen anspruchsvoller als etablierte Zelllinien. Unter anderem liegt das daran, daß sich viele Zelllinien von Tumorgewebe ableiten und daher einen reduzierten Bedarf an Wachstumsfaktoren besitzen. Rattenhepatozyten vermehren sich in Kultur kaum. Die Liste der Zusatzstoffe, die Primärzellen für ein zufriedenstellendes Wachstum benötigen, ist lang und beinhaltet Faktoren, die dem Kulturmedium beigefügt werden müssen, um eine Anheftung der Zellen zu unterstützen. Die chemische Charakteristik der Unterlagen, auf denen Primärzellen wie Hepatozyten kultiviert werden können, ist von besonderer Wichtigkeit. Literaturuntersuchungen belegen, daß die Kultivierung von Hepatozyten an Cytodex 1 Mikrocarriern (positiv geladene N,N-diethylaminethyl-substituierte Dextranpartikel) und an Cytodex 3 Mikrocarriern (Dextranpartikel mit kovalent gekoppelter Collagen (Typ I)-Schicht, Pharmacia, Schweden) gelingt (AGIUS et al. 1985, ATHARI et al. 1988, VOSS und SEIBERT 1991).

Neben löslichen Mediatoren liefern auch die unlöslichen Cytoskelettelemente über spezifische Membranrezeptoren wichtige Informationen ins Zellinnere, die darüber entscheiden, ob die Zelle an der Matrix haftet oder nicht. An dem komplexen Vorgang der Zell-Substrat-Haftung sind eine Reihe verschiedener Proteine beteiligt (Adhäsionsproteine, Rezeptoren der Adhäsionsproteine, Proteine des Membranskeletts und Cytoskelettproteine) (IWIG und GLÄSER 1990). Die Oberfläche von Mikrocarriern, die für Zellkultivierungen genutzt werden sollen, ist somit diesen Bedürfnissen der Zelle anzupassen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung magnetisierter Polyacrylamidpartikel für die Kultivierung von Leberzellen als Alternative zu bereits etablierten Zellkulturen an Mikrocarriern untersucht werden. Dazu wurden die Träger unterschiedlichen Oberflächenmodifizie-

rungen unterzogen. Ziel dabei war es, sowohl die Ladung der Trägeroberfläche und den Grad der Hydrophobizität zu variieren als auch die Träger mit Proteinen zu beschichten, die der Zellanhaftung förderlich sind. Zugleich war der Einfluß der Magnetitablagerung im Inneren der Trägermatrix auf das Zellwachstum zu prüfen.

Die Bedingungen, unter denen sich die Zellen an Unterlagen heften, sind kritisch. Die Anheftungsrate ist gering, wenn Zellen und Microcarrier sich in einem großen Inkubationsvolumen befinden. Unter diesen Bedingungen reicht der im Inkubationspuffer gelöste Sauerstoff nicht aus, um die Zellen ausreichend zu versorgen. Leitet man dagegen Carbogengas während der Inkubation in das Medium ein, werden die Zellen aufgewirbelt und ihnen fehlt die nötige Ruhephase von 2-3 Stunden, um fest an die Trägerunterlage binden zu können. Eine höhere Anheftungsrate wird erreicht, wenn die Inkubation in einem vergleichsweise kleinen Volumen in flachen Petrischälchen unter Carbogenatmosphäre durchgeführt wird. Durch die geringen Diffusionswege des Sauerstoffs im flachen Medienvolumen ist eine ausreichende Begasung der Zellen bei gleichzeitiger pH-Stabilisierung gewährleistet.

Ein weiterer Faktor, welcher sich zwar nicht auf das unmittelbare Anheften der Zellen auf die Unterlage auswirkt, jedoch einen direkten Einfluß auf weiteres Wachstum und Proliferation der Zellen am Träger nimmt, stellt das Verhältnis von Partikelmenge und zugegebener Zellzahl dar (BUTTLER und THILLY 1982). So konnte BILLIG (1987) bei der Mikrocarrierkultur von MRC-5-Zellen zeigen, daß eine Beimpfungsrate von 2 Zellen/Trägerpartikel die gleiche finale Zelldichte erreichte wie eine Beimpfung von 4,4 Zellen/Trägerpartikel.

In Abhängigkeit von der Oberflächenladung der Polymerträgerderivate ergeben sich unterschiedliche Zellanhaftungsraten (Abb. 27). Im Trend wird deutlich, daß mit zunehmendem pK-Wert die Zellhaftungsrate zunimmt. Während am stark negativ geladenen Naphtolsulfonsäurederivat ($pK_a < 2,0$) kaum Zellen binden, kann am leicht negativierten (Hydrazid, $pK_a = 4,6$) und am neutralen Träger (Amid) ein gutes Zellwachstum beobachtet werden. Die besten Wachstumsbedingungen sind am stark positiven Aminoethylträgerderivat zu beobachten. Die Zellverteilung an den Trägern entspricht einer Gaußschen Normalverteilung, wobei die Menge der unbewachsenen Träger unter 5 % liegt. Das trifft jedoch nicht für das Naphtolsulfonsäurederivat zu. Hier lag der Anteil der nichtbewachsenen Träger bei 40 %.

Diese Beobachtungen entsprechen herkömmlichen Befunden, nach denen positivierete Oberflächen (WEZEL und VAN DER VELDEN-DE GROOT 1978) und endständige Aminogruppen (LEE et al. 1994) einen unterstützenden Einfluß auf die Zellanhaftung haben.

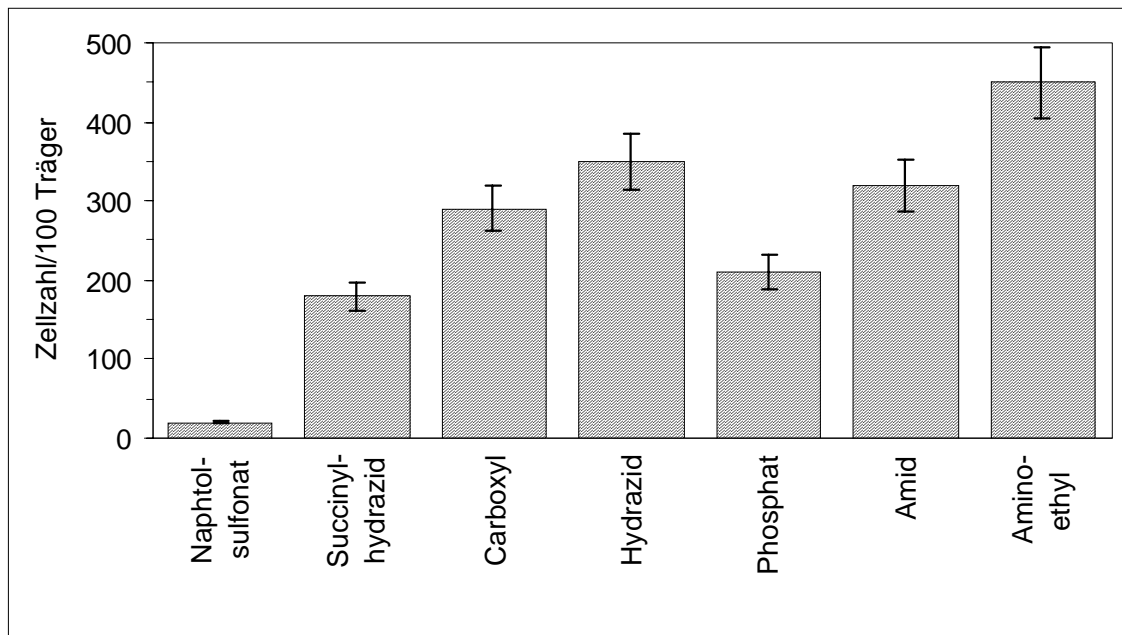


Abb. 27 Zellhaftungsrate an verschiedenen magnetisierten Polyacrylamidträgerderivaten nach zweitägiger Kultivierung
Die Derivate sind geordnet nach zunehmenden pKa-Wert, der ein Ausdruck der Ladung im neutrale Kulturmedium darstellt.

Allerdings ist bei allen von uns untersuchten Trägerchargen der Effekt zu beobachten, daß die Zellen sich nach 3-4 Tagen von der Oberfläche ablösen und zum Teil spheroidale Formen intakter Zellen bilden. Bei Derivaten mit positiv geladenen Oberflächen ist die Ablösung verzögert, sie tritt in der Regel erst nach 5-6 Tagen auf.

Mit der kovalenten Bindung von Phospholipid und Albumin erfolgt eine Hydrophobierung bzw. eine Hydrophilierung der Polymerträgeroberfläche. Aufgrund des stark hydrophoben Charakters der lipidierten Träger ist eine Zellanhaftung nicht zu erwarten. Tatsächlich ist die Anhaftungsrate vernachlässigbar klein (Abb. 28).

Auf der mit Albumin beschichteten Polymeroberfläche erfolgt eine Zellanhaftung ebenfalls nur in geringem Maße.

Die von allen Chargen beste Bewuchsrate ist an Trägern mit Collagenbeschichtung zu finden. Aufgrund des spezifischen Aufbaus des Collagens und der damit verbundenen Affinität zu zelleigenen collagenspezifischen Rezeptoren sollte eine collagenbeschichtete Matrix die ideale Wachstumsunterlage für Hepatozyten darstellen (KILBERG 1988; LEE et al. 1992; VILLAFUERTE et al. 1994; KOEBE et al. 1994). Eine Ablösung der Zellen ist auch nach mehreren Wochen unter normalen Kultivierungsbedingungen nicht zu beobachten. Die Zellhaftungsrate von durchschnittlich 7 Zellen/Träger ist im Vergleich zu anderen Polyacrylamidpartikeln sehr hoch (Abb. 28).

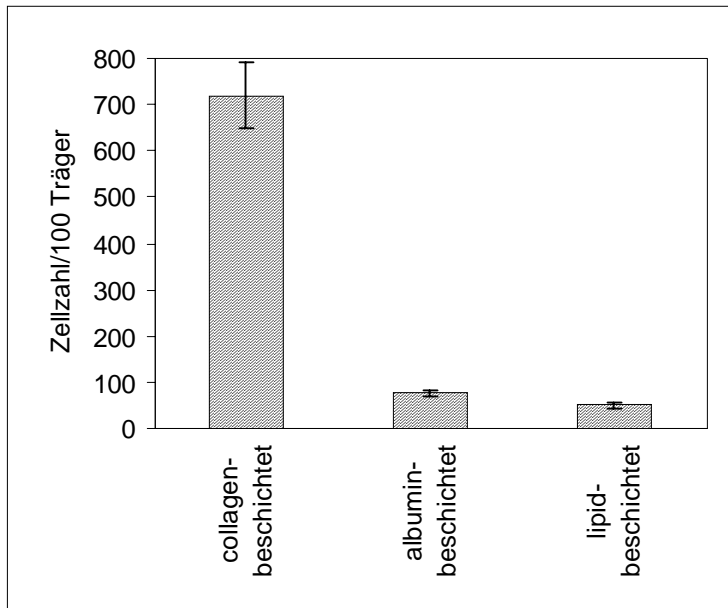


Abb. 28 Zellhaftungsrate an magnetischen Polymerpartikeln mit kovalent gekoppelten Lipid- und Proteinschichten

Neben der Oberflächenbeschaffenheit der Polyacrylamidträger kann eine deutliche Abhängigkeit der Zellhaftung von der Beladung der Träger mit Fe_3O_4 -Präzipitaten nachgewiesen werden. Diese Abhängigkeit ist in Abb. 29 anhand des Hydrazid-, des Succinylhydrazid-, und des Aminoethylderivates dargestellt.

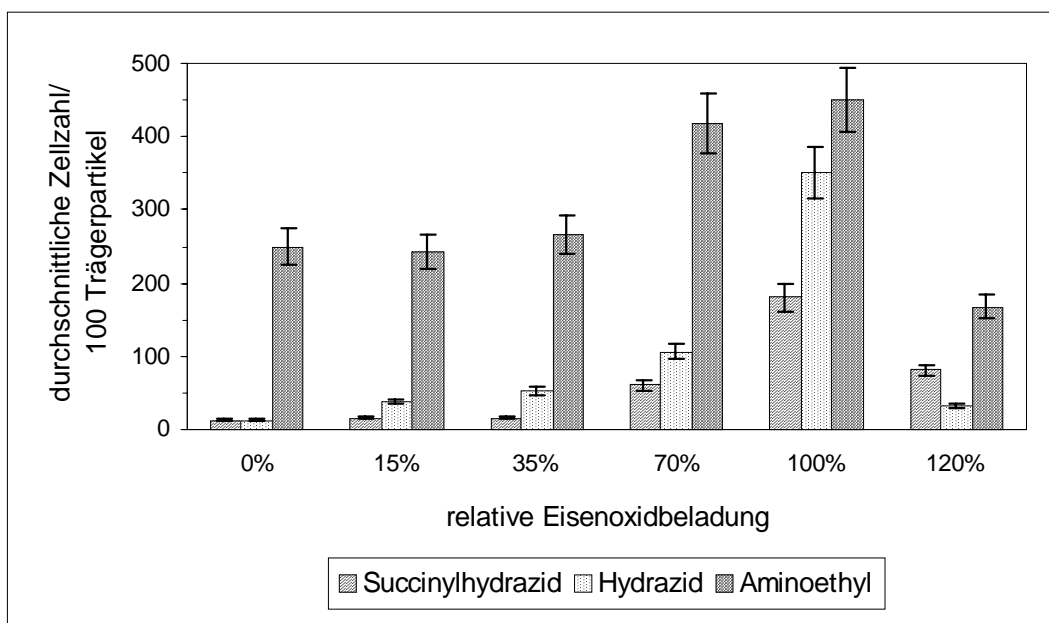


Abb. 29 Durchschnittlicher Zellbewuchs je 100 Trägerpartikel für drei verschiedene Derivate in Abhängigkeit von der Beladung mit Fe_3O_4 nach 10 Stunden Inkubation
Die maximal mögliche Ausfüllung des Porenvolumens eines Polymerträgers entspricht einer 100%igen Beladung. Bei einer Überladung (120%) haften zusätzlich Präzipitatschollen am Träger und verdecken Teile der zugänglichen Polymeroberfläche.

Mit zunehmendem Fe_3O_4 -Gehalt der Polymerträger binden mehr Zellen an der Polymeroberfläche.

che, so daß die höchste Zellbeladungsrate bei maximaler Eisenoxidbeladung der Polymerpartikel erfolgt. Bei einer Überladung der Träger (120 %) decken an der Oberfläche angelagerte Eisenoxidpräzipitate einen Teil der sonst zugänglichen Polymermatrix ab. Damit geht der Einfluß der Oberflächenladung auf die Zellhaftung verloren, die Zellhaftungsrate nimmt ab.

Der Einfluß der Fe_3O_4 -Präzipitate auf das Zellwachstum kann mit einer langsamen Eisenionenabgabe aus dem Trägerinneren erklärt werden. Versuche, bei denen maximal mit Eisenoxid beladene Polymerträger im Zellkulturmedium über mehrere Stunden geschüttelt werden, lassen eine sehr geringe aber stete Auslaugung der Träger erkennen (Abb. 30). Während konventionelle Kulturmedien mit einem Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum etwa $0,085 \mu\text{g/ml Fe}^{3+}$ enthalten, erhöht sich der Eisengehalt nach 60 stündiger Auswaschung der Polymerträger um $0,057 \mu\text{g/ml}$. Die resultierende Eisenkonzentration von $0,142 \mu\text{g/ml}$ im Kulturmedium liegt komplett transferringebunden vor und entspricht nur 7 % des Eisengehaltes, wie es unter In vivo-Bedingungen im Blutplasma zu finden ist ($1,7 \mu\text{g/ml}$ Plasma). Wenn man davon ausgeht, daß die aus dem Polymerpartikel diffundierenden Eisenionen eine lokale Konzentrationserhöhung am Träger hervorrufen, ist die unmittelbare Zellumgebung eisenreicher und könnte dem Eisenionengehalt des Blutplasmas entsprechen. Da jedoch auch diese Eisenionen sofort von Apotransferrin gebunden werden können und somit nicht frei im Medium vorliegen, ist diese lokale Eisenkonzentrationserhöhung physiologisch und für die Zellen unkritisch.

Die freigesetzten Eisenionen sind für den Stoffwechsel der Leberzellen verfügbar. Für die meisten Zellen ist das Serumtransferrin die einzige verfügbare Eisenquelle im Organismus. Die Leber besitzt die wichtige Rolle der Eisenspeicherung zur Biosynthese von Hämoglobin oder anderer Eisenproteine. Der Eisentransport über Transferrin und der Ionenaustausch mit den Leberzellen repräsentieren beim Menschen ca. 10 % (0,4 g) des Eisenturnovers im Stoffwechselkreislauf (YOUNG und AISEN 1988). Hepatozyten besitzen eine große Anzahl Transferrin-Rezeptoren. Ein Rattenhepatozyt weist etwa 37.000 Rezeptormoleküle für Transferrin auf, welche das mit Eisenionen gesättigte Protein mit einer Dissoziationskonstante von $K_D=62 \text{ nM}$ binden (YOUNG und AISEN 1980). Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über eine Endozytose des beladenen Transferrins, das im sauren Milieu der Endosomen seine Bindung zum Eisen verliert und im weiteren als Apotransferrin wieder von der Zelle abgegeben wird. Das Eisen wird in der Zelle von Ferritin aufgenommen und in dieser Form gespeichert. Der durchschnittliche Eisengehalt im Rattenleber-Ferritin liegt bei ca. 2.500 bis 3.000 Atomen, wobei bis zu 4.500 Atome aufgenommen werden können (LINDER und MUNRO 1972). In diesem voll beladenen Zustand repräsentiert das Eisen etwa 26% der Molekularmasse des Proteins (RICHTER 1978). Bei Bedarf kann das Eisen für Biosynthesewege freigegeben werden.

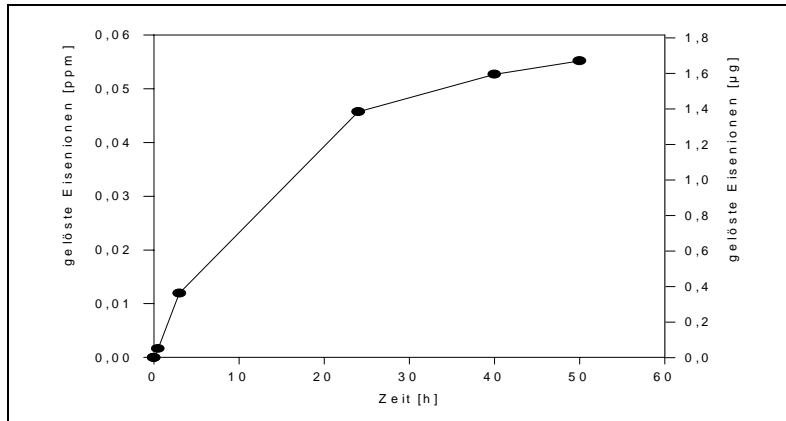


Abb. 30 Auswaschung von Eisen aus maximal beladenen magnetischen Polyacrylamidträgern. 100 mg Trägermaterial (Trockengewicht) wird in 10 ml Kulturmedium suspendiert und über 60 Stunden gerührt. Der Eisengehalt wird flammenphotometrisch ermittelt.

Da freie Eisenionen verschiedene cytotoxische Radikalbildungsprozesse katalysieren (Bildung von Superoxidradikalen, Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren, Fenton-Reaktionen), erhöht sich die Syntheserate des Ferritins in der Zelle als natürlicher Schutzmechanismus, wenn der Eisenionengehalt im die Zelle umgebenden Medium steigt. Die Aufnahme, Speicherung und der Metabolismus von Fe^{2+} - und Fe^{3+} -Ionen gehört daher zu den grundlegenden Eigenschaften und Funktionen von Hepatozyten. Eine retardierte, aber stetige und vor allem konstante Eisenionenabgabe der Polymerpartikel und die damit verbundene lokale, zellnahe Konzentrationserhöhung konnte eine Zellanhaftung unterstützen. Im Gegensatz dazu wurde von LIU et al. (1993) eine kurzfristige Erhöhung der Zellproliferationsrate durch Zusatz von FeCl_3 in unphysiologisch hoher Konzentration bei immobilisierten Zellen beschreiben. Er beobachtete in Gegenwart von Insulin nach Zugabe von $10 \mu\text{M}$ FeCl_3 ($0,56 \mu\text{g/ml}$ freies Fe^{3+}) in das proteinfreie Kulturmedium eine Steigerung der Wachstumsrate um 100 %. Nach seinen Untersuchungen ist in Gegenwart hoher Konzentrationen an Fe^{3+} -Ionen die Zugabe von Transferrin für das Zellwachstum nicht notwendig. Ein hoher Eisenzusatz wirke sich nicht toxisch auf die Zellproliferation aus. Eine Erklärung, wie die Zellen freie Eisenionen transferrinunabhängig aufnehmen und warum eine überhöhte Fe^{3+} -Konzentration der Zelle nicht schadet, konnte LIU nicht aufweisen. Ob bei der Fe^{3+} -Aufnahme Transferrin im entscheidenden Maße mit beteiligt sein muß, der Eisenionentransport über das Konzentrationsgefälle in die Zelle erfolgt oder ob beide Möglichkeiten zutreffen, konnte bisher nicht eindeutig bestätigt werden. Beide Umstände würden jedoch den stimulierenden Einfluß der von uns eingesetzten magnetischen Polymerträgern auf das Zellwachstums erklären.

3.5. Langzeitkultivierung im magnetischen Gitterreaktor

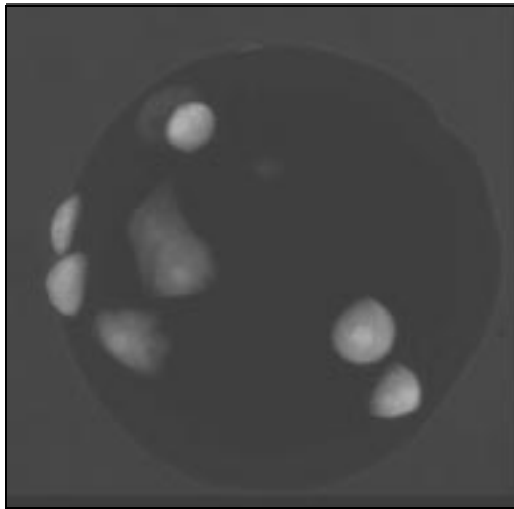
Für eine Langzeitkultivierung von Hepatozyten ist es zweckmäßig, die Polymerträgercharge mit den besten Zellhaftungsbedingungen einzusetzen. Bei den Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß magnetisierte, collagenbeschichtete Polyacrylamidträger die günstigste Voraussetzung zur Zellkultivierung besitzen. Für die Untersuchungen der Hepatozytenkultivierung im magnetischen Gitterreaktor (s. 2.7.) sollten daher ausschließlich collagenbeschichtete Träger eingesetzt werden.

Der Hepatozytenbewuchs am Träger erfolgt vor der Reaktorbeladung in Plastik Kulturschälchen. Dabei kann die nötige Ruhephase von mehreren Stunden zur Zellanhaftung eingehalten werden.

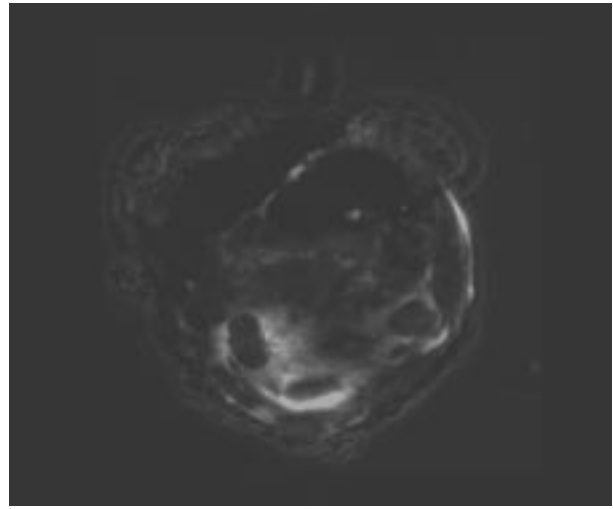
Unter sterilen Bedingungen wird die Befüllung des Reaktorraumes durchgeführt.

Mit einer Durchflußrate von 5 ml/min wird über eine Peristaltikpumpe carbogenbegastes Kulturmedium im zyklischen Verfahren durch den Reaktorraum gepumpt. In regelmäßigen Abständen werden dem Reaktorraum Träger- und Medien-Proben entnommen, um Morphologie und Wachstumszustand der Zellen und deren Funktionalität über einen Zeitraum von 21 Tagen zu überprüfen und zu vermessen.

Die morphologischen Untersuchungen ergeben ein unterschiedliches Zellwachstumsverhalten in den ersten 24 Stunden nach der Reaktorbestückung im Vergleich zur verbleibenden Kultivierungszeit. Während die Zellen in den ersten Stunden noch abgerundet am Träger haften, flachen sie sich im weiteren Verlauf zusehends ab (Abb. 31 A, B). Häufig ist eine Aggregation der Polymerträger zu beobachten, bei der die Zellen gleichzeitig am benachbarten Partikel anwachsen und als „Kittsubstanz“ beide Träger „verkleben“. Mit dieser Zellanordnung ist eine bipolare Adhäsion gewährleistet, wie sie auch in vivo durch die extrazelluläre Matrix des perisinoidalen Raumes vorgegeben ist (Abb. 32). Am Ende des Kultivierungszeitraumes (3 Wochen) bedecken die Zellen flach und netzartig einen Großteil der Partikeloberfläche (Abb. 32A). Die Zellzahl blieb innerhalb der Versuchsperiode konstant. In diesem Zeitraum konnte eine Vermehrung der Zellen nicht festgestellt werden.

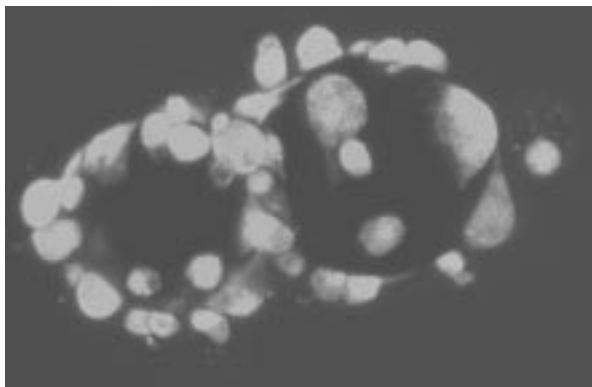


B

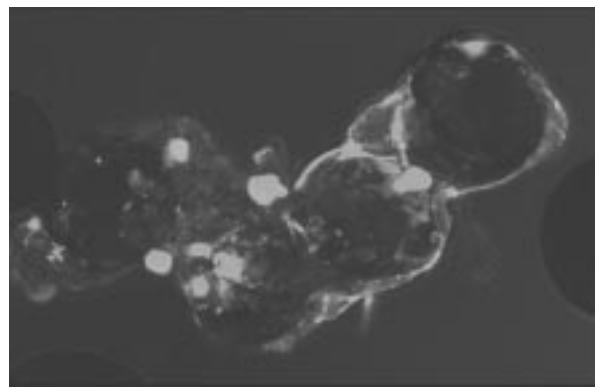


A

Abb. 31 Fluoreszenzaufnahmen von Hepatozyten kultiviert an collagenierten magnetischen Polyacrylamidträgern nach 20 Stunden (A) und nach 72 Stunden (B)



A



B

Abb. 32 Hepatozytenkultur an collagenierten magnetisierten Polacrylamidträgern zu Beginn (20 Stunden, A) und am Ende des Kultivierungszeitraumes (20 Tage, B)

An zwei ausgesuchten Beispielen wird die metabolische Aktivität der kultivierten Leberzellen im Gitterreaktor aufgezeigt (Harnstoffsynthese und Glucuronidierung).

Die Leber ist das einzige Organ, in dem eine quantitativ bedeutende Harnstoffsynthese stattfindet. Obwohl ein Teil des Ornithinzyklus als Bestandteil der Harnstoffbiosynthese auch in anderen extrahepatischen Zellen abläuft, findet man die Enzyme des ersten, entscheidenden Schrittes (die Metabolisierung von Ammoniak über Carbamylphosphat zum Citrullin) ausschließlich in der Leber (Carbamylphosphatsynthetase und Ornithintranscarbamylase).

Um die Harnstoffsyntheseaktivität der Zellen im Reaktor bestimmen zu können, wurde die zeitabhängige Harnstoffkonzentration durch Zugabe von 1 mM Ammoniumchlorid stimuliert. Der im Laufe der Kultivierung kumulierte Harnstoff ist ein Maß für die Syntheseleistung der kultivierten Hepatozyten (Abb. 33). Zum Vergleich wurden die Harnstoffsynthesewerte einer

Monolayerkultur bestimmt, deren Kulturbedingungen (Kulturperiode, Verhältnis Zellzahl zu Medienvolumen) der Reaktorkultur adäquat gewählt wurden.

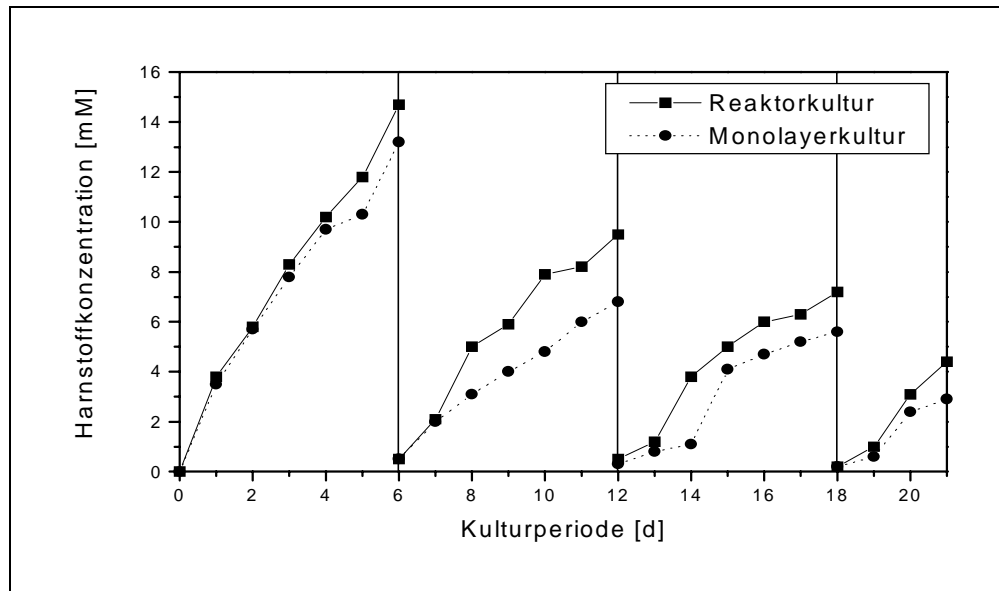


Abb. 33 Zeitabhängige kumulative Harnstoffkonzentration in der Reaktorkultur und in der Monolayerkultur. Medienwechsel erfolgte am 6., 12. und 18. Tag.

Die Befähigung zur Harnstoffsynthese kann in der Reaktorkultur für längere Zeit auf höherem Level gehalten werden. Während in den ersten 4 Tagen die Syntheserate im Reaktor der Harnstoffproduktion in der Monolayerkultur entspricht, kann bereits nach 5-6 Tagen ein Unterschied bei der Harnstoffsyntheseeffizienz zwischen beiden Kulturen festgestellt werden. Am 10. Tag beträgt bei der Monolayerkultur die Harnstoffsyntheserate nur noch etwa zwei Drittel im Vergleich zur Reaktorkultur. Der Rückgang der Syntheseleistung ist auf eine Entdifferenzierung der Leberzellen im Reaktor und in der Monolayer zurückzuführen, da die Anzahl der gebundenen Zellen während der gesamten Kultivierungsperiode konstant blieb.

Die zweite untersuchte metabolische Aktivität der kultivierten Hepatozyten ist die Fähigkeit der Zellen zur Glucuronidierung des Indikatorfarbstoffes Phenolphthaleinsulfonsäure (Phenolrot). Glucuronidierung ist für die Leber das meist genutzte Verfahren, Xenobiotika für die Exkretion zu metabolisieren (MILLER und MILLER 1985). Das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist die UDP-Glucuronosyltransferase. Als Donatorsubstrat fungiert stets die UDP-Glucuronsäure, wobei die Verbindungen, welche als Akzeptormoleküle zur Verfügung stehen, vielgestaltig sein können.

Unter vergleichbaren Bedingungen wurde der Phenolrotmetabolismus in der Reaktorkultur und in der konventionellen Monolayerkultur ermittelt. In Abb. 34 ist der Glucuronidierungsgrad in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

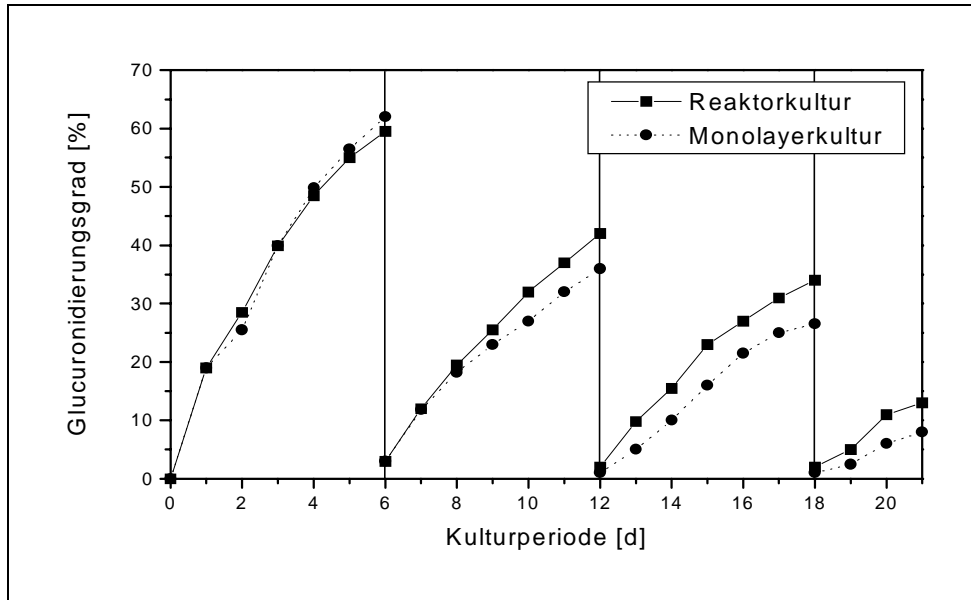


Abb. 34 Zeitabhängiger Glucuronidierungsgrad in Reaktorkultur und Monolayer im Vergleich
Medienwechsel erfolgte am 6., 12. und 18. Tag.

Im Vergleich ist auch hier längerfristig eine deutlich bessere Umsatzleistung in der Reaktorkultur im Vergleich zur stationären Monolayerkultur zu verzeichnen. Am 10. Tag entspricht die Syntheseleistung der Monolayerkultur nur noch 70 % der Kultur im Reaktor.

Es ist wahrscheinlich, daß durch eine Akkumulation spezieller Stoffwechselprodukte im Medium bei dem von uns gewähltem zyklischem Mediendurchsatz im Reaktor die Syntheseleistung der Zellen gehemmt wird. Es muß bei weiteren Untersuchungen überprüft werden, ob beim nichtzyklischen Verfahren verbunden mit einem kontinuierlichen, langsameren Medienfluß eine Entdifferenzierung weiter verzögert werden kann.

3.6. Immobilisierung von Rinderaugenlinsenepithelzellen und humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVEC)

Magnetisierte Polyacrylamidträger sollten sich auch zur Immobilisierung und Kultivierung weiterer Zellarten eignen. Um dies zu zeigen, wurden den Trägern Epithelzellen aus Rinderaugenlinsen und Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC) zugeführt. Dabei sollte eine generelle Eignung der neuentwickelten Partikel zur Zellimmobilisierung nachgewiesen werden. Auf eine quantitative Analyse und Optimierung ist hier bewußt verzichtet worden. Vielmehr ging es darum, eine allgemeine Abhängigkeit zwischen Zellanhaftung/-bewuchs und Oberflächenbeschaffenheit der Polymerträger aufzuzeigen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob der Magnetisierungsgrad der Polyacrylamidträger einen Einfluß auf das Zellwachstum an der Partikeloberfläche erkennen läßt.

Die zu immobilisierenden Zellen liegen zunächst nach Trypsinierung in Suspension vor. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium kann die Wirkung des Trypsins aufgehoben werden. Die Zellen sind nun bestrebt, an einer geeigneten Unterlage zu adhären. Das zugefügte Serum enthält Zellbindungsproteine, wie Fibronectin, Vitronectin u.a., die für die Zelladhäsion essentielle Faktoren darstellen. Diese Proteine müssen an der Oberfläche der Träger adsorbieren, bevor die Zellen an der Trägeroberfläche haften bleiben, in der weiteren Folge abflachen und proliferieren können. Daher ist auch hier die Modifizierung der oberflächlichen Polymerstruktur hinsichtlich Ladungsart und der Anzahl der ladungstragenden Gruppen von entscheidender Wichtigkeit. Wird während der Anhaftungsphase extern kein Serum resp. kein Adhäsionsprotein zugegeben, so adhären die Zellen lediglich schwach, ohne daß es zu einer spezifischen Wechselwirkung zwischen zelleigenen Adhäsionsproteinrezeptoren und der extrazellulären Matrix kommt (FORESTELL et al. 1992). Die Zellen flachen nicht ab und wachsen nicht an der Unterlage fest. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß es Zelllinien (z.B. diploide Fibroblasten) gibt, die in der Lage sind, Fibronectin zu sekretieren, sodaß es in diesem Fall nicht notwendig ist, dieses Glycoprotein extern hinzuzufügen.

Für die erfolgreiche Anhaftung der Zellen an die Trägeroberfläche ist eine Ruhephase von einer halben (Epithelzellen) bis zu 2 Stunden (Endothelzellen) nach Zelleinsaat notwendig. In dieser Zeit führt der Zell-Substrat-Kontakt zur Haftung der Zellen an der Trägeroberfläche. Es tritt eine deutliche Zellabflachung ein. Je nach Beschaffenheit der Trägeroberfläche wachsen und proliferieren die Zellen in den folgenden Tagen mehr oder weniger gut.

Bereits bei der Kultivierung von Hepatozyten war eine deutliche Abhängigkeit des Zellbewuchses von der Oberflächenladung zu verzeichnen. Auch bei der Immobilisierung von Endothel- und Epithelzellen wird deutlich, daß mit zunehmender Positivierung (steigender pK-Wert) der Trägeroberfläche die Zellhaftungsrate zunimmt (Abb. 35).

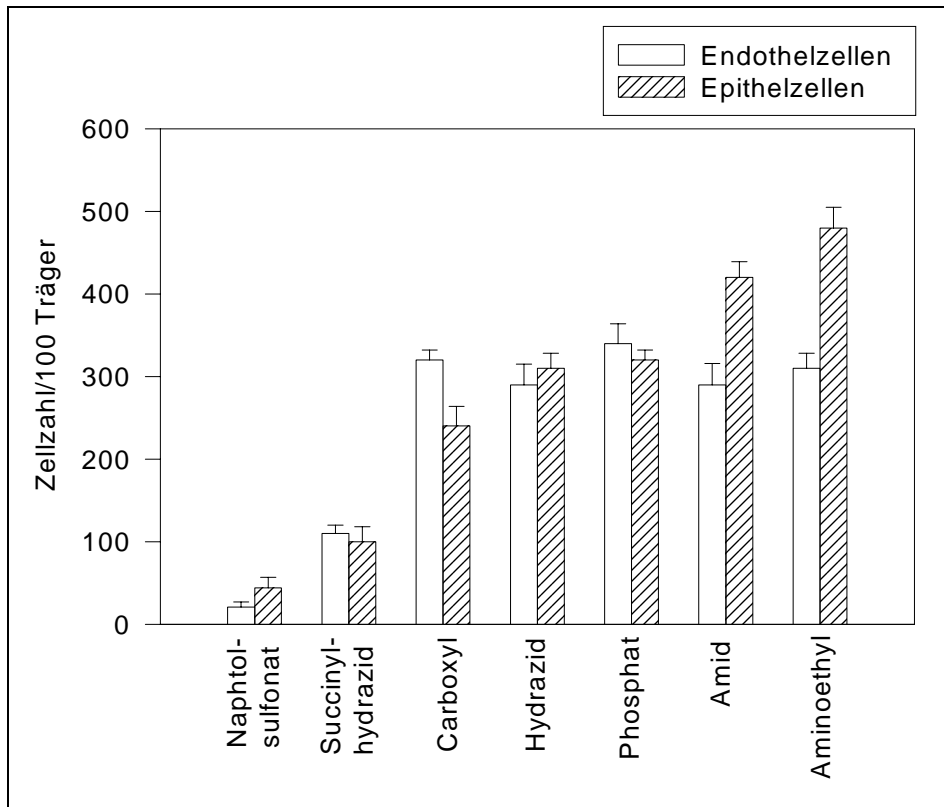


Abb. 35 Zellhaftung von Epithel- und Endothelzellen an verschiedenen magnetisierten Trägerderivaten nach 24 Stunden Kultivierung

Im Gegensatz zu den Versuchen zur Immobilisierung von Hepatozyten (s. 3.4.3., Abb. 22) lösen sich beide Zellarten nach 5-6 Tagen nicht von der Oberfläche, sondern vermehren sich an der Trägeroberfläche durch Zellteilung.

Gründe dafür sind die unterschiedlichen Ansprüche der verwendeten nichttransfizierten Zelllinien. Endothel- und Epithelzellen gelten als relativ gut kultivierbar bei konstantem DNA-, RNA- und Protein-Syntheseraten innerhalb der gesamten Kultivierungsphase. Hepatozyten dagegen widerfahren im Laufe der Monolayerkultivierung beträchtliche Veränderungen in Genexpression und Differenzierung (s. S. 11). Diese münden schließlich in Veränderungen des Adhäsionsverhaltens der Zellen. Die Adhäsionsraten an den jeweiligen Trägerchargen sind jedoch zu Beginn der Kultivierung bei Hepatozyten, Endothel- und Epithelzellen etwa gleich (Abb. 27, Abb. 35). Dies zeigt, daß die Umgebungsbedingungen, unter denen adhärenente Zellen wachsen nicht gleich derjenigen sein müssen, unter denen die Kultur initialisiert wird.

Bei der Kultivierung der Endothel- und Epithelzellen an den Partikeln der Naphtholsulfonat- und Bernsteinsäurehydrazidderivate erfolgt eine Verdopplung der Zellzahl nach 5-6 Tagen, während sich auf Trägern der Amid- oder Aminoethyl derivate die Zellzahl bereits nach 3-4 Tagen verdoppelt hat.

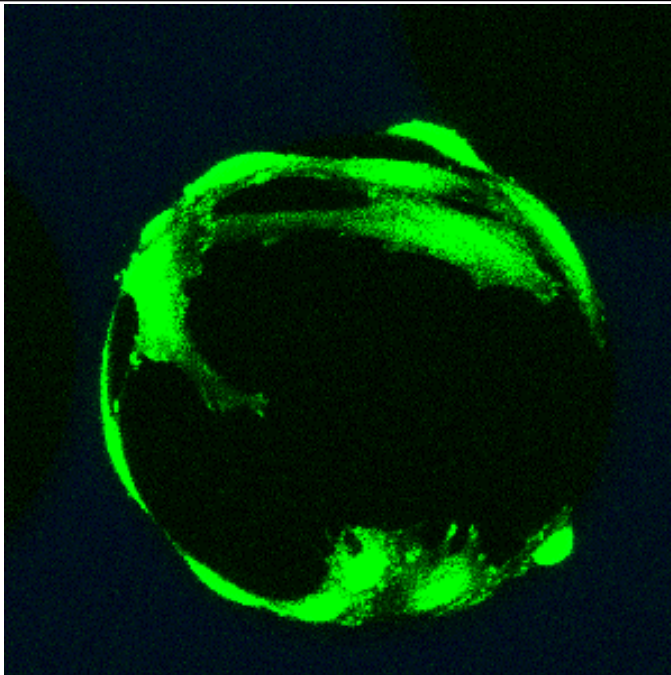


Abb. 36 Endothelzellen auf Aminoethyl-derivatisierten magnetischen Polyacrylamidträgern (24 Stunden Kultivierung)
Die Zellen wurden mit Calcein angefärbt.

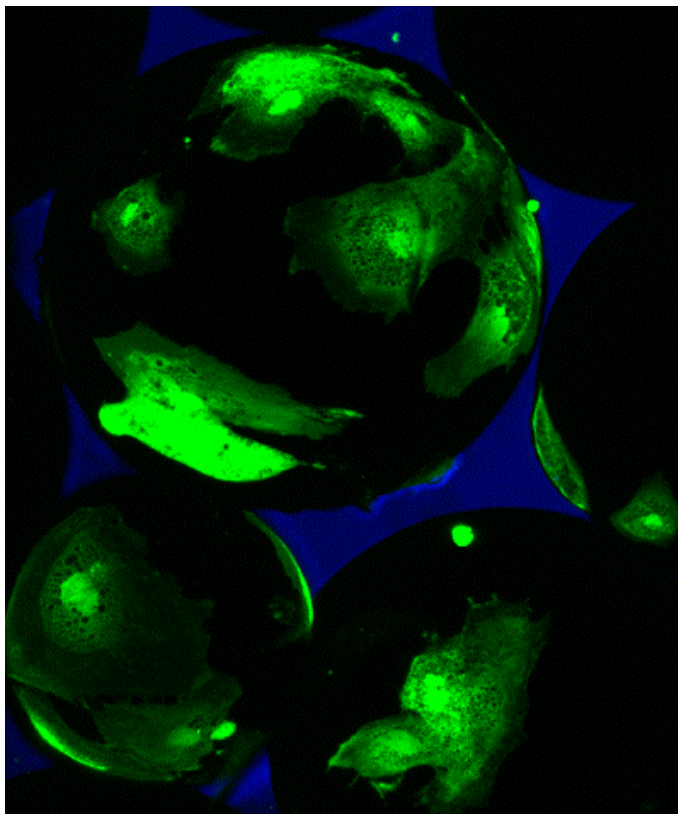


Abb. 37 Epithelzellen auf Aminoethyl-derivatisierten magnetischen Polyacrylamidträgern (24 Stunden Kultivierung)
Die Zellen wurden mit Calcein angefärbt

Limitierend ist schließlich die Gesamtheit der Partikeloberfläche. Bei Oberflächenmangel können die Zellen in mehreren Schichten übereinander wachsen oder sie lösen sich nach Zellteilung

vom konfluenten Zellverband und gehen in Suspension. Die Zellproliferation wird eingeschränkt und kann bei folgenden Subkultivierungen zu Wachstumsstörungen führen. Wird eine Zelldichte von 15-18 Zellen/Träger erreicht, werden die Zellen durch Trypsinieren abgelöst und an einer weiteren Trägercharge subkultiviert.

Die effektivste und schnellste Zellhaftung konnte jedoch an Trägern gefunden werden, die mit Collagen beschichtet wurden. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen der Hepatozytenkultivierung. Eine Hydrophilierung durch Albuminbeschichtung oder eine Lipidierung ergeben eine Trägeroberfläche, an die Endothel- und Epithelzellen nicht oder nur sehr wenig adhäreren. Die Zelladhäsionsproteine der beiden Zelltypen finden an Lipid oder Albumin keine funktionelle Domäne, die als Bindungsort für eine Zellhaftung fungieren kann. Nur sehr wenige Zellen (etwa eine Zelle pro Trägerpartikel) binden unspezifisch (Abb. 38).

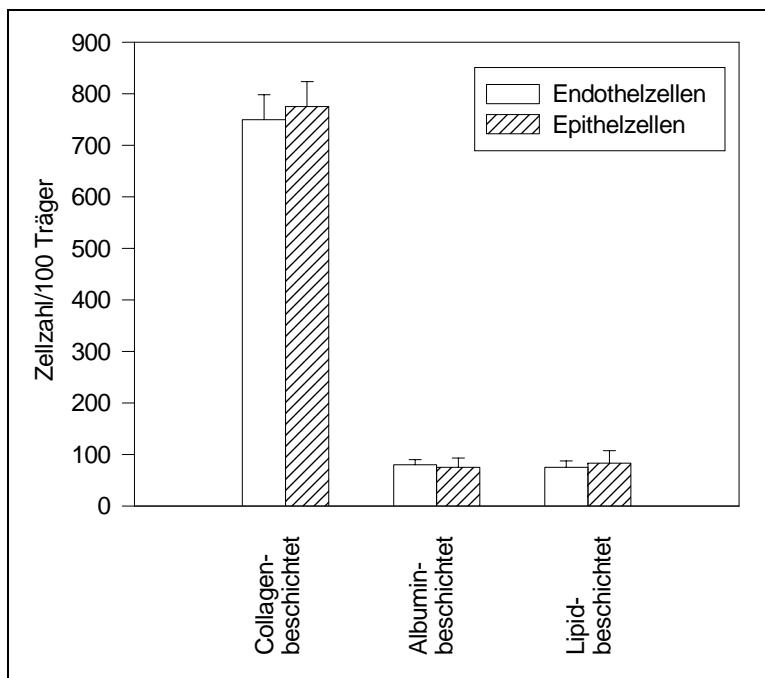


Abb. 38 Zellhaftung von Endothel- und Epithelzellen an magnetischen Polymerträgern mit kovalent gekoppelten Lipid- und Proteinschichten nach 24 Stunden Kultivierung

Weiterhin konnte festgestellt werden, daß der Grad der Eisenbeladung im magnetisierten Partikel, wie bereits bei der Hepatozytenkultivierung gefunden wurde, einen Einfluß auf die Zellhaftung ausübt (Abb. 39). Allerdings ist der bei Endothel- und Epithelzellen gefundene Effekt nicht derart deutlich. Eine Überladung, bei der das Eisenoxid einen Großteil der Trägeroberfläche bedeckt (Beladung 120 %) hat zur Folge, das nur ein Fünftel der Zellen adhäreren.

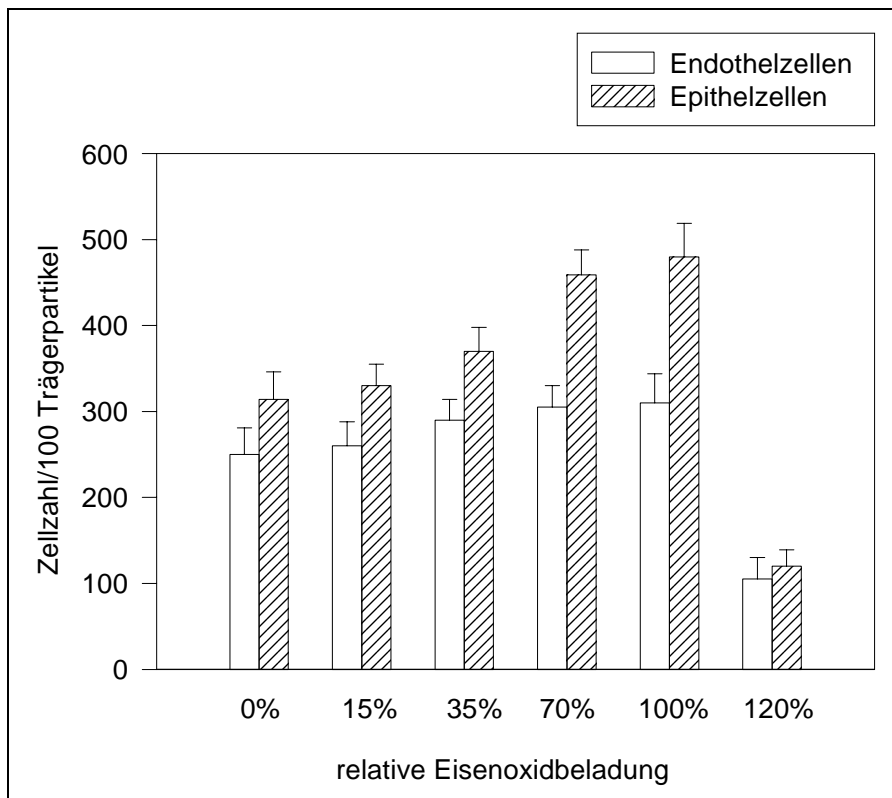


Abb. 39 Zellhaftung von Endothel- und Epithelzellen an aminoethylierten Polymerträgern in Abhängigkeit der relativen Eisenoxidbeladung

Eine toxische Wirkung des Eisenoxids auf die Zellen konnte nicht nachgewiesen werden, da die Zellen ohne sichtbare Beeinträchtigung proliferieren. Der postulierte fördernde Effekt einer steigenden Eisenkonzentration im Träger geht konform mit Untersuchungen zum Einfluß von Fe^{3+} -Ionen auf die Proliferation von Zellen (LINDER und MUNRO 1972, YOUNG und AISEN 1988, SELIGMAN et al. 1992, LIU et al. 1993, RICHARDSON 1997). Dabei konnte gezeigt werden, daß Eisen einen essentiellen Faktor für die Zellproliferation darstellt. Transferrin gilt als das Transportprotein zur Eisenaufnahme in die Zelle. Lymphozyten, wie auch andere Zellarten, reagieren auf erhöhten Eisenbedarf mit einer erhöhten Expression von membranständigen Transferrin-Rezeptoren. Im Gegensatz dazu kann der gezielte Einsatz von Eisenchelatoren Zellen schädigen (Anwendung in der Krebstherapie einschließlich Neuroblastoma und Leukämie, RICHARDSON 1997). Neben der transferrinvermittelten Eisenaufnahme ist auch eine transferrin-unabhängige Resorption nachgewiesen worden (SELIGMAN et al. 1992). Es ist anzunehmen, daß der magnetisierte Polymerträger eine extrazelluläres, retardierendes Eisendepot darstellt, das einen zellulären Eisenmangel im Medium kompensieren kann und somit die Zellproliferation positiv beeinflusst. Die Zellen sind in der Lage, das aus der Unterlage diffundierende Eisen direkt zu nutzen.

3.7. Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase

Transmembran-Proteine besitzen in die Membran eingebettete Bereiche aus hydrophoben Aminosäureresten, die die gesamte Membran durchspannen. Die Aktivität der Membranenzyme hängt dabei in der Regel von der chemischen Zusammensetzung und dem physikalischen Zustand der umgebenen Lipidphase ab. Oftmals besteht eine obligatorische Lipidabhängigkeit.

Bei der Immobilisierung von Membranenzymen ist daher die Struktur und die Zusammensetzung der Lipidphase, die sie durchspannen, von großer Bedeutung. Eine einfache Adsorption der Membranenzyme an hydrophoben Unterlagen haben eine deutlichen Aktivitätsverlust zur Folge.

Liposomen bilden ein geeignetes System zur Immobilisierung von Membranproteinen (Proteoliposomen). Sie stellen kleine, kugelförmige Gebilde dar, in denen konzentrisch angeordnete Lipidbilayer und Wasserschichten alternieren in denen die Proteine bei Erhalt ihrer nativen Konformation. Diese Vesikel sind jedoch sehr klein (25 nm bis 1 µm) und sind bei der Verwendung in technischen Verfahren nur schwer handhabbar. Nach Adsorption an festen Matrices breiten sich Liposomen auf der Oberfläche aus, lösen sich aber bereits bei geringen mechanischen Beanspruchungen von der Unterlage ab.

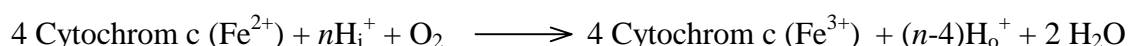
Die kovalente Fixierung von Lipidmolekülen an der Polyacrylamidmatrixoberfläche (s. 2.9.3.2.) schafft eine stabile, membranähnliche, bilayerartige Lipidstruktur, in die Membranproteine fest verankert werden können. Bei mechanischen Einwirkungen ist die Lipidschicht fest genug mit der Unterlage verbunden, um nicht abgespült zu werden. Die Enzymaktivität am Träger bleibt über längere Zeit erhalten (Operationsstabilität).

Verbunden mit den magnetischen Eigenschaften der lipidierten Polymerträger lassen sich diese Protein-Träger-Komplexe nach der Reaktion von der Reaktionslösung schnell über magnetische Kräfte abtrennen und wiederverwenden. Der Einsatz dieses Systems im magnetischen Gitterreaktor (s. 2.7.) wäre denkbar.

Am Beispiel der Immobilisierung von Cytochrom c-Oxidase an lipidierte, magnetisierte Polyacrylamidträger soll die Effektivität und die Stabilität des Immobilisierungsystems aufgezeigt werden.

3.7.1. Eigenschaften und Reinigung der Cytochrom c-Oxidase

Cytochrom c-Oxidase (EC 1.9.3.1) stellt das letzte Enzym der Atmungskette aller höheren Organismen dar. Es katalysiert den Elektronentransfer vom Cytochrom c zum molekularen Sauerstoff. Gleichzeitig ist die Reaktion mit einem Protonentransport gekoppelt.



Das Enzym ist ein Y-förmiges Transmembranprotein, was in der inneren Mitochondrienmem-

bran lokalisiert ist. Die beiden Arme des Proteins (M1- und M2-Domäne) durchdringen die Membran, während der Stiel (C-terminal) etwa 5,5 nm weit in den Membranzwischenraum hineinragt (DENIS 1986). Die drei Hauptuntereinheiten (I bis III) mit einem Molekulargewicht zwischen 26000 und 56000 Da sind in der mitochondrialen DNS codiert, alle anderen (Untereinheiten IV bis VII, $M_r < 20000$ Da) sind cytoplasmatischen Ursprungs. Während der Enzymkomplex in Hefen aus den genannten 7 Untereinheiten besteht, konnten im Enzym aus Rinderherzen 12 Untereinheiten nachgewiesen werden (BUSE und STEFFENS 1978). Das Molekulargewicht des Gesamtzytenzymkomplexes beträgt $MG = 200.000$ Da.

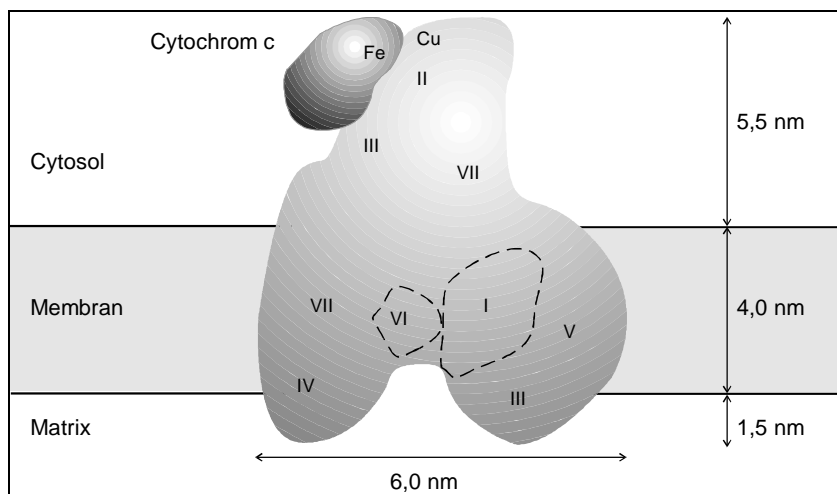


Abb. 40 Topologie der Untereinheiten der Cytochrom c-Oxidase (nach AZZI 1980)

Die Cytochrom c-Oxidase enthält als redoxaktive Bestandteile zwei Kupfer-Zentren (Cu_A und Cu_B) und die Häme a und a_3 , über die die Elektronen zum Sauerstoff gelangen. Das bei der O_2 -Reduktion entstehende, stark basische O^{2-} -Anion bindet zwei Protonen und geht dabei in Wasser über.

Für die Aufrechterhaltung ihrer funktionellen Aktivität benötigt die Cytochrom c-Oxidase angelagerte Phospholipide. Das aktive, gereinigte Enzym ist umgeben von etwa 20 % Phospholipid (YU et al. 1985). Das entspricht 0,2-0,3 mg Phospholipid/mg Protein (RIGELL et al. 1985, AZZI 1985). Es konnte gezeigt werden, daß Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Diphosphatidylglycerol (DPG) (ABRAMOVITCH et al. 1990) als essentielle Phospholipide in der Lipidummantelung enthalten sind. Eine restlose Delipidierung des Enzymkomplexes ist bei der Reinigung zur anschließenden Membranrekonstitution zum einen nicht möglich und zum anderen zur Aufrechterhaltung der Funktionalität nicht notwendig.

Nach Angaben mehrerer Autoren (CAPALDI und BRIGGS 1976, MALMSTRÖM 1979, HARTZELL et al. 1978, HARTZELL und BEINERT 1974) lassen sich folgende Parameter aus einer gereinigten Cytochrom c-Oxidase-Fraktion ableiten (Tab. 7).

Tab. 7 Charakteristische Parameter der isolierten Rinderherz-Cytochrom c-Oxidase

Aktivität	($\mu\text{mol Cyt. c/sec je } \mu\text{mol Häm a)$		100-400
Häm a	(nmol/mg Protein)		10-14
Kupfer	(ng Atome/mg Protein)		11-13
Phospholipid	mg/mg Protein		0,01-0,5
Absorptionsmaxima (nm)			
α , reduziert	604	α , oxidiert	598
γ , reduziert	445	γ , oxidiert	417

Für die Isolierung mit anschließender Aufreinigung gelten folgende Reinheitskriterien, nach denen die Sauberkeit einer Enzymfraktion charakterisiert werden kann:

- keine Cyt b_1 -Banden bei $\lambda=560$ nm im reduzierten Zustand
- keine Cyt. c_1 -Bande bei $\lambda=552$ nm im reduzierten Zustand
- keine modifizierte Cyt. c-Oxidase (Banden-Schulter bei $\lambda=422$ nm im reduzierten Zustand)
- das Verhältnis der Bandenintensität von $\lambda=445$ nm (red.) und $\lambda=422$ nm (ox.) sollte 1,25 oder höher sein
- das Verhältnis der Bandenintensität von $\lambda=280$ nm (ox.) und $\lambda=445$ nm (red.) sollte 2,5 oder weniger sein

Nach der Reinigungsprozedur konnten 11 nM Häm a je mg Protein nachgewiesen werden. Daraus wurde eine spezifische Aktivität von 1,32 $\mu\text{M Cytochrom c/sec je mg Protein}$ ermittelt. Diese Ergebnisse stimmen mit den in der Literatur beschriebenen gereinigten Cytochrom c-Oxidase-Fractionen überein. Das Spektrum der gereinigten Fractionen ist in Abb. 41 aufgezeigt.

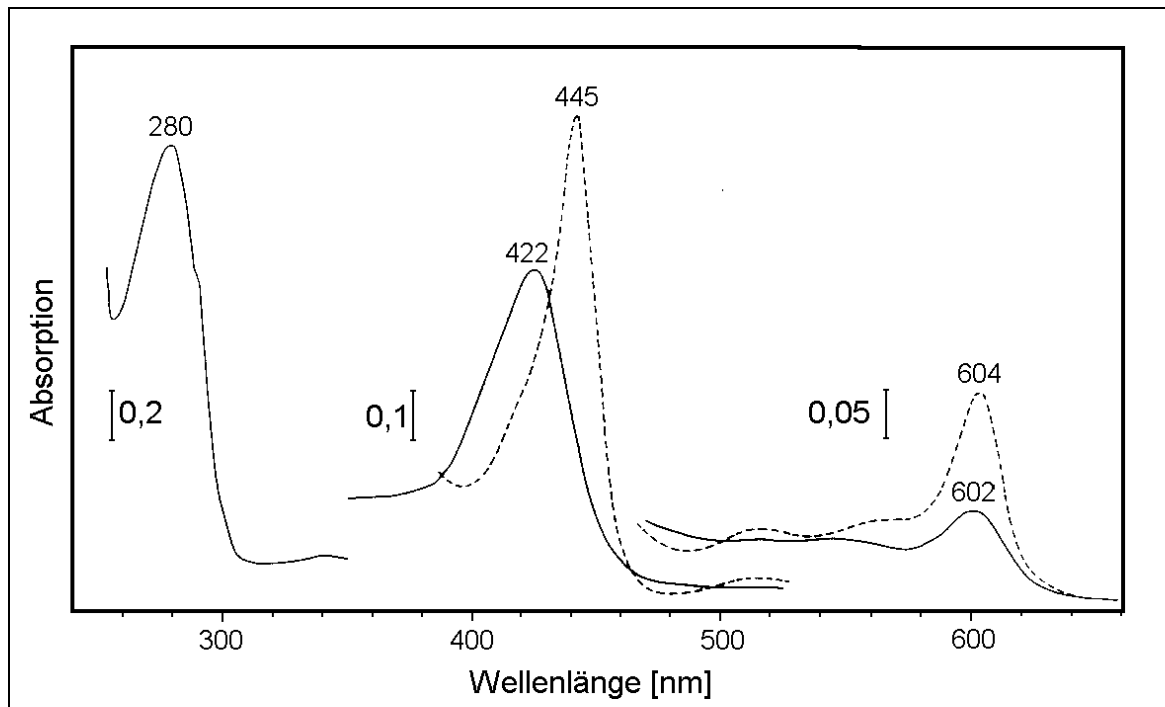


Abb. 41 Spektrum der gereinigten Cytochrom c-Oxidase
 Durchgezogene Linie: oxidierte Präparation
 Gestrichelte Linie: reduzierte Präparation

3.7.2. Eigenschaften und Reinigung von Cytochrom c

Als Redox-Cofaktor des Cytochrom c-Oxidase-Enzymkomplexes dient die Hämgruppe des Cytochrom c für die Elektronenübertragung. Dabei ändert das Eisen-Ion des Häm seine Wertigkeit ($\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$). Damit verbunden ist eine Änderung des Absorptionsspektrums der Hämgruppe, die sich photometrisch verfolgen lässt. Abb. 42 zeigt einen Ausschnitt des sichtbaren Spektrenanteils des Cytochrom c.

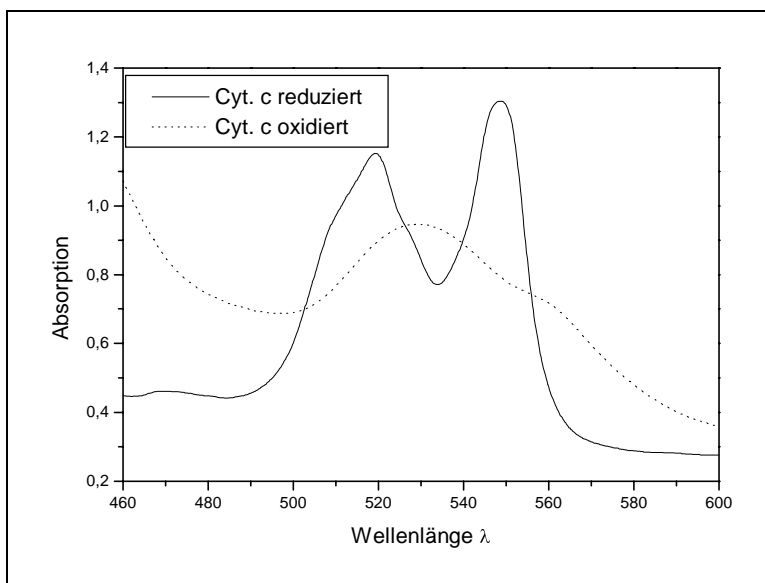


Abb. 42 Spektrum von Cytochrom c

Mit zunehmender Oxidation schwindet der Reduktionspeak bei $\lambda=551$ nm, während bei $\lambda=522$ nm ein Oxidationspeak entsteht. Das Verhältnis der Absorptionwerte beider Wellenlängen stellt den Anteil reduzierten Cytochroms zur Gesamtmenge im Volumen dar.

Eine hundertprozentige Reduzierung des Cytochrom c erfolgt durch Zugabe nur weniger Körnchen Natriumdithionit. Dieses Reduktionsmittel muß vor der Reaktion mit Cytochrom c Oxidase entfernt werden. Dazu wird das Cytochrom c an einer Sephadex G50-Säule gereinigt (Abb. 43).

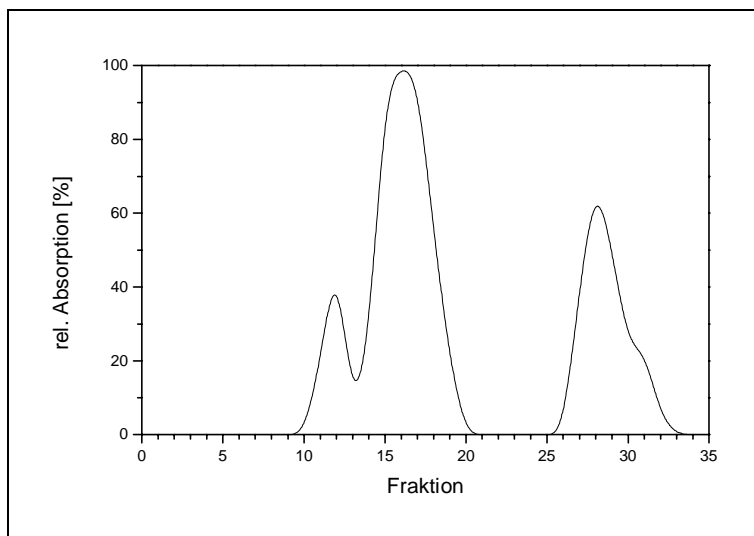


Abb. 43 Reinigung des reduzierten Cytochrom c an einer Sephadex G50-Säule

Die Fraktionierung wurde über UV-Detektion verfolgt. Dabei konnten nach der Reinigung drei Peaks identifizieren werden, wobei der Hauptpeak, der die Fraktionen 14-21 umfaßte, dem als Monomer vorliegendem Cytochrom c entsprach. In den Fraktionen 9-13 lag das Cytochrom c vermutlich gebunden als Dimer vor. Die Fraktionen 25-34 enthielten nicht zu identifizierende Bestandteile, denen neben freiem Häm andere Reste, die bei der Gewinnung des Cytochrom c aus Rinderherzen als Verunreinigungen anfallen, zuzuordnen sind. Die beiden letztgenannten Fraktionsgruppen wurden nicht näher untersucht und konnten verworfen werden.

Untersuchungen der monomeren Cytochrom c-Fraktionen ergaben, daß mit aufsteigender Fraktionsnummer der Reduktionsgrad des Cytochrom c zunahm. Während in Fraktion 14 der Reduktionsgrad nur 75 % betrug, war in Fraktion 17 88 % und in Fraktion 20 95 % des Cytochrom c reduziert.

Die Fraktionen 18-21 wurden zusammengefaßt. Diese ergaben einen Gehalt von 48,8 mg 92 % reduziertes Cytochrom c in einem Gesamtvolumen von etwa 13 ml. Das entsprach einer Konzentration von 300 μ M. Demnach betrug bei ursprünglich eingesetzten 90 mg Cytochrom c die Ausbeute der Aufreinigung 54 %.

Die Aktivität der Cytochrom c-Oxidase kann mit der Abnahme des Reduktionspeaks von Cytochrom c bei $\lambda=551$ nm gegen $\lambda=600$ nm im Zweiwellenlängenmodus verfolgt werden.

3.7.3. Immobilisierung von Cytochrom c-Oxidase am lipidierten Polyacrylamidträger

Die Immobilisierung von Enzymen stellt eine Variante der Enzymmodifizierung dar, bei der das Enzym an polymeren Trägermaterialien über einen Polymer-Enzym-Komplex an einer festen Matrixstruktur verbunden ist. Bei der Fixierung wird das Enzym in seiner Beweglichkeit eingeschränkt. Dabei verändern sich dessen Eigenschaften zum Teil erheblich. Aufgrund der Bindung an einem wasserunlöslichen Stoff kann das Enzym als Feststoff betrachtet und eingesetzt werden. Daraus ergeben sich entscheidende Vorteile gegenüber der löslichen Enzymform. Es wird möglich, das Enzym nach der Reaktion von der Reaktionslösung abzutrennen und erneut einzusetzen. Ein kontinuierlicher Reaktionsprozeß wird gewährleistet. Meist erhöht sich die thermische und chemische Belastbarkeit und Stabilität des Enzympräparates.

Mit der Immobilisierung eines Membranenzym an lipidierte magnetische Polymerpartikel soll ein weiterentwickeltes Modell der Trägerfixierung vorgestellt werden, bei dem das Enzym nicht kovalent am Polymer gekoppelt wird. Vielmehr wird mit der Lipidierung der Polymerpartikel dem zu immobilisierenden Transmembranenzym eine membranähnliche Phase angeboten, die in-vivo-Bedingungen simulieren soll. Damit kann eine hohe spezifische Enzymaktivität bei nur geringen Mengen an Trägermaterial erreicht werden.

Die Magnetisierung der Träger erlaubt eine noch einfachere und effektivere Abtrennung des Enzyms aus dem Reaktionssystem. Eine exakte Steuerung des enzymatischen Prozesses wird möglich.

Die Rekonstitution des mit Detergenz (Natriumcholat) mizellar gelösten Enzymes in die membranähnliche Struktur der lipidierten Trägeroberfläche gelang über Dialysebehandlung des Träger/Lipid/Enzymlösung-Gemisch. Dabei wird das Detergenz über eine Dialysemembran entfernt, während das Lipid und die Enzymmoleküle wie auch das Trägermaterial zurückgehalten werden (Abb. 44). Die hydrophoben Domänen des Eiweißes bauen sich koordiniert in die geschlossenen Lipidschichten ein. Diese wiederum lagern sich über hydrophobe Wechselwirkungen an die freiliegenden, kovalent gekoppelten Lipidmoleküle der Trägeroberfläche.

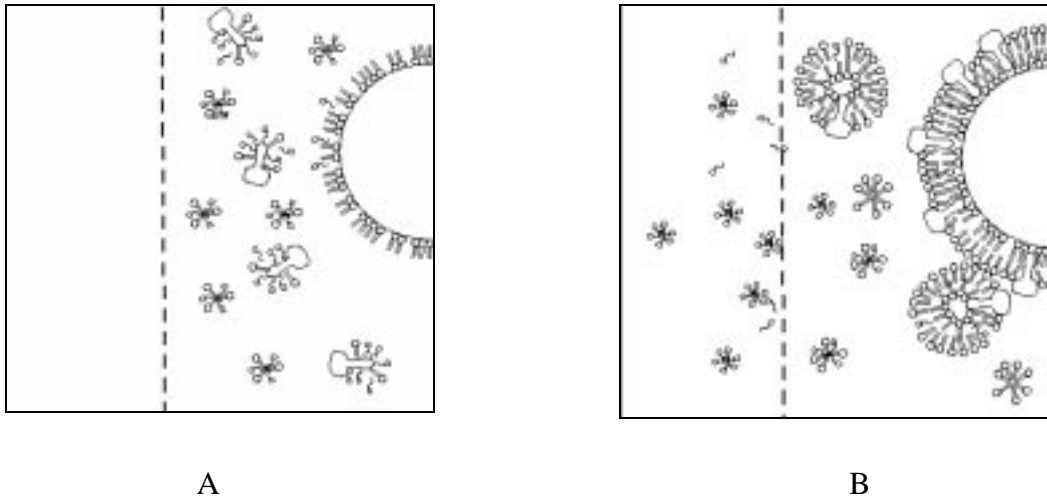


Abb. 44 Schematische Darstellung des Dialysevorgangs (A-zu Beginn; B- zum fortgeschrittenen Zeitpunkt)
Im Ansatz befindet ein Lösungsgemisch von Detergenz, Enzym und Lipid; der lipidierte Träger ist rechts im Bild als angeschnittener Halbkreis angedeutet.

Wenn der Flächenbedarf eines Enzymmoleküls etwa 36 nm^2 ($MG=200.000 \text{ Da}$) beträgt (s. 3.7.1.) und 1 g Trägermaterial (magnetisiert, trocken) eine Oberfläche von $705,85 \text{ cm}^2$ aufweist (s. Tab. 2), so könnten theoretisch maximal $6,55 \text{ mg}$ Eiweiß die Oberfläche von 1 g Trägermaterial abdecken. Praktisch konnten im Zuge der Detergenzdialyse $4,31 \text{ mg}$ Eiweiß an 1 g Trägermaterial (magnetisiert, trocken) rekonstituiert werden (Lowry-Bestimmung). Das entspricht $65,8 \%$ der maximal möglichen Beladung. Es ist zudem anzunehmen, daß ein Teil des immobilisierten Enzyms zwar rekonstituiert vorlag, aber aufgrund einer Maskierung des Reaktionszentrums durch Lipid oder Polymerketten dem Substrat unzugänglich blieb. Die Festigkeit des Enzymeinbaus kann anhand des Aktivitätserhaltes bei mechanischer Beanspruchung (Operativstabilität) bestätigt werden (s. Abb. 48).

Die Nettoaktivität am Träger wurde im Zweiwellenlängen-Verfahren (Ext. bei $\lambda=550 \text{ nm}$ minus Ext. bei $\lambda=600 \text{ nm}$) ermittelt. Dazu wurde in einer Küvette eine eingewogene Trägermenge in eine Cytochrom c-haltige entgaste Pufferlösung überführt und im Spektrometer (SHIMATSU UV 300) vermessen. Mit der Entgasung des Puffers wurde eine Autoxidation des reduzierten Cytochrom c ausgeschlossen. Mit einem Magnetrührer erfolgte eine kurze Aufwirbelung der Trägersuspension. Nach wenigen Sekunden setzten sich die Träger am Boden ab und die Extinktion konnte im Überstand ermittelt werden. Das Absetzen der Träger ließ sich beschleunigen, indem man seitlich an die Küvette einen starken Magneten plazierte, der das Trägermaterial schnell an den Rand zog.

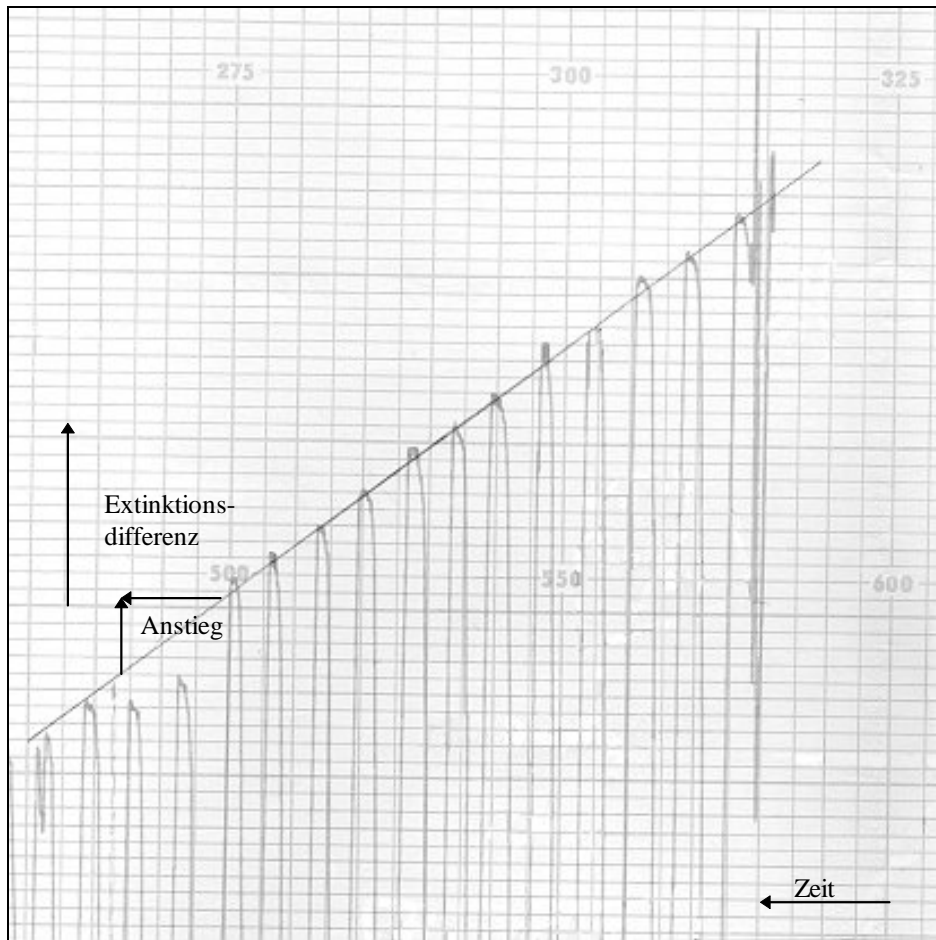


Abb. 45 Ausschnitt aus einem Spektrometerprotokolls, das die zeitlichen Veränderung der Extinktionsdifferenz von $\lambda=550$ nm und $\lambda=600$ nm zur Ermittlung der trägergebunden Enzymaktivität aufzeigt.

Während des Rührens der Trägersuspension nimmt die Extinktionsdifferenz aufgrund der „Trübung“ im Überstand stark ab. Läßt man die Träger absetzen oder zieht sie mit einem Magneten an die Küvettenwand, mißt man die Extinktionsdifferenz im Überstand. Die Extinktions-„Spitzen“ werden im Zuge der Auswertung verbunden und stellen den Grad des zeitlichen Cytochrom c-Umsatzes dar (Anstieg).

Gleiche Extinktionsänderungen konnten in einer Durchflußküvette gemessen werden, der eine mit Trägermaterial gefüllte Säule vorgeschaltet wurde. Der stete zirkuläre Durchfluß gewährleistete eine kontinuierliche Cytochrom c-Umsetzung im System.

Auf diese Weise konnte eine Trägeraktivität von $21,9 \text{ mM Cyt.c g}^{-1} \text{ magn. Träger min}^{-1}$ gemessen werden.

Im weiteren sollte untersucht werden, inwieweit die Eigenschaften des immobilisierten Enzyms von den des löslichen Enzyms variierten. Es ist bekannt, daß das pH-Optimum immobilisierter Enzyme gegenüber dem der gelösten Form aufgrund von Protonenkonzentrationsgradienten am Trägermaterial verschoben sein kann (ULBRICH 1989). An anionischen Trägern findet eine Anreicherung von Protonen statt, während an kationischen Trägern die Protonenkonzentration erniedrigt ist. Die Folge ist eine Verschiebung des pH-Profiles der Enzymaktivität in die alkalische Region bzw. in den sauren Bereich.

Untersuchungen zeigten, daß das pH-Optimum des immobilisierten Enzyms um 0,8 pH-Einheiten von 7,4 auf 6,6 gegenüber der gelösten Enzymform verschoben ist (Abb. 46).

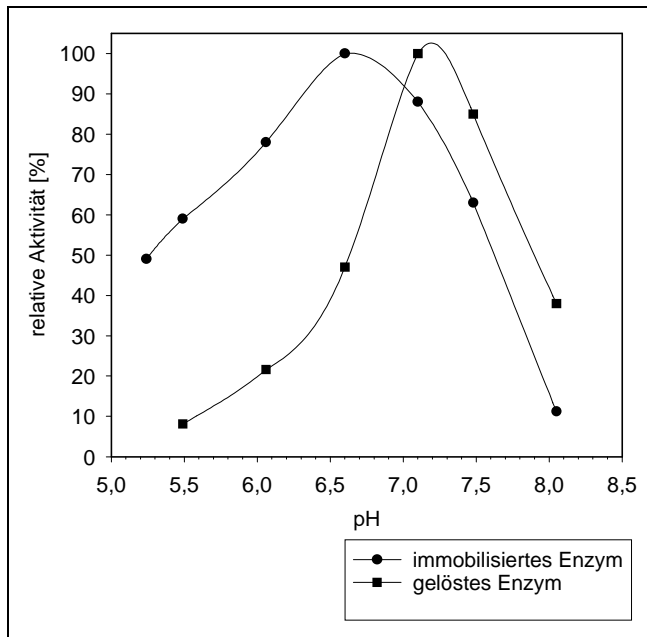


Abb. 46 Verschiebung des pH-Optimums nach Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase

In gelöster Form wird das Enzym von negativen Desoxycholatmolekülen umgeben, was die lokale Protonenkonzentration am Molekül erhöht. Dadurch wird das pH-Optimum in den basischen Bereich verschoben. Mit der Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase am lipidierten Träger wird das Enzym in ein Milieu integriert, das aufgrund der leicht positiv geladenen Lipidmoleküle das pH-Optimum in den niedrigeren pH-Bereich verschiebt.

Bewahrt man den enzymbeladenen Träger bei 4°C in 50mM Tris/Acetat-Puffer pH 7,3 auf, so sollte im Idealfall die Aktivität des Trägerenzym über längere Zeit stabil bleiben. Tatsächlich aber ist zu erwarten, daß aufgrund der unphysiologischen Lagerbedingungen die Aktivität stetig abnimmt. Der Grad der Aktivitätsabnahme hängt im entscheidenden Maße von der Art der Enzymimmobilisierung ab. Dieser Parameter der Lagerstabilität wurde im Vergleich zu Kontrollträgern untersucht, bei dem unter gleichen Immobilisierungsbedingungen, wie pH und Substratkonzentrationen, kein Lipid zum Ansatz gebracht wurde. Die Kopplung des Enzyms erfolgte demnach rein adsorptiv. Wie in Abb. 47 gezeigt wird, beträgt die meßbare maximale Beladungsaktivität nur etwa 72 % gegenüber der Aktivität des rekonstituierten Enzyms am lipidierten Trägers. Verfolgt wurde die Lagerstabilität über 12 Tage. Danach sank die Trägeraktivität des Kontrollträgers auf 5 % der Ursprungsaktivität, während die Aktivität am lipidierten Träger nur um etwa ein Viertel abnahm.

Die Abnahme der Aktivität am Kontrollträger resultiert auf einer Inaktivierung des Enzymeiweißes am Träger und/oder aus einer Ablösung des Enzyms vom Träger mit anschließender Inaktivierung der Enzymaktivität. In den jeweiligen Überständen konnte innerhalb der 12 Tage keine nennenswerte Aktivität nachgewiesen werden.

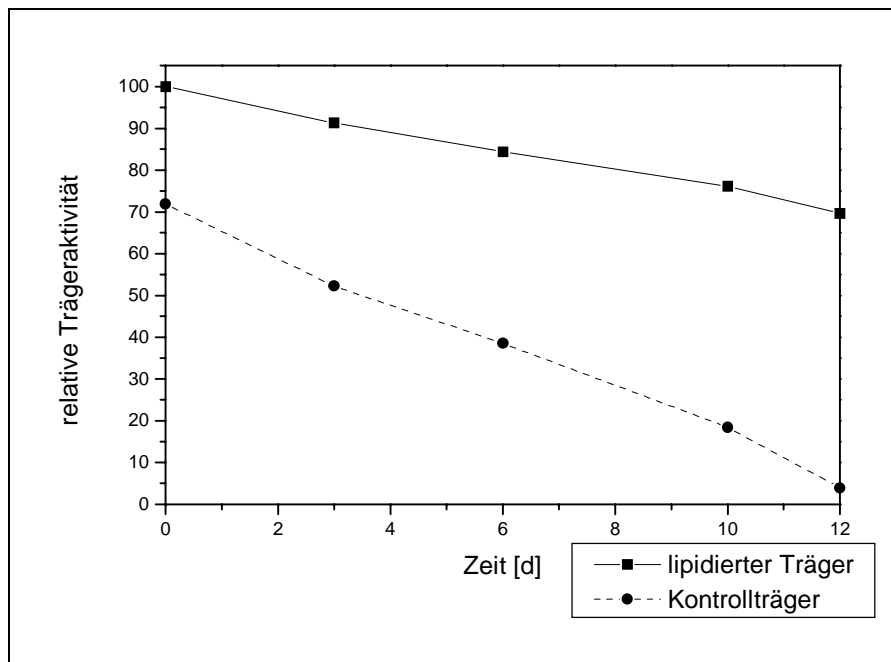


Abb. 47 Lagerstabilität des am lipidierten Träger rekonstituierte Enzyms und des adsorptiv gebundenen Enzyms am Kontrollträger

Ein weiterer Parameter für die Stabilität des Enzyms am Träger sollte der Erhalt der Aktivität während einer mechanischen Beanspruchung des Trägermaterials darstellen (Operationsstabilität). Dazu wurden die enzymbeladenen Träger über 2 Stunden in 50 mM Tris/Acetat-Puffer (pH 7,3) bei Raumtemperatur gerührt (Abb. 48). Dabei konnte erneut der stabile Einbau des Enzyms am lipidierten Träger gegenüber dem adsorptiv gebundenem Enzym aufgezeigt werden. Überraschenderweise konnte kurzzeitig sogar eine leichte Erhöhung der Aktivität am lipidierten Träger gefunden werden. Eine Erklärung dafür könnte ein Abwaschungseffekt sein, der die äußeren Lipidschichten der möglicherweise gebildeten Multilayer am Träger abspült und damit reaktive Zentren von Enzymmolekülen tiefer eingebauter Moleküle freigibt. Im Laufe des Rührprozesses wurde im Überstand eine leicht zunehmende Enzymaktivität festgestellt, die etwa 10 % der Gesamtaktivität im System entsprach.

Nach 2 Stunden waren 90 % des Enzyms vom Kontrollträger abgewaschen, während der lipidierte Träger über 90 % der ursprüngliche Aktivität behielt.

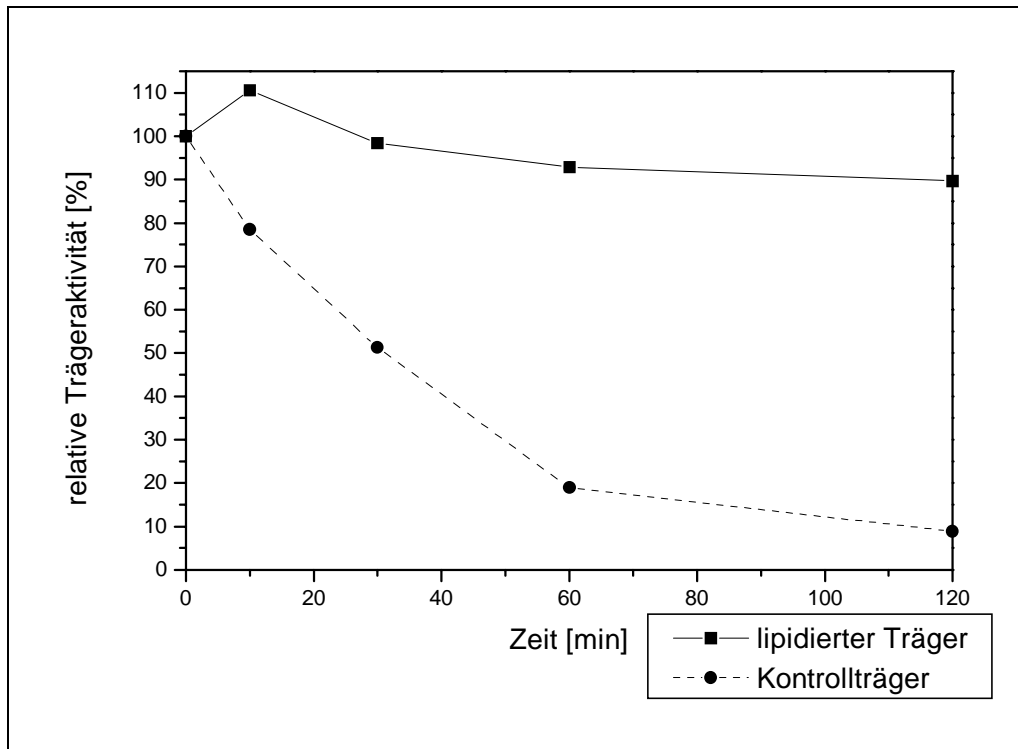


Abb. 48 Operationsstabilität nach zweistündigem Rühren in 50 mM Tris/Acetat (pH 7,3)

Die Stabilität der lipidierten enzymbeladenen Träger in einem detergenzhaltigen Puffer sollte im weiteren untersucht werden. Der Detergenzeinfluß hat zur Folge, daß ein Großteil der in der Lipidschicht inkorporierten Enzymmoleküle aus dem Lipidverband herausgelöst werden. Dabei sinkt die Aktivität am Träger rapide. Getestet wurde der Einfluß der Detergenzien Octylglucosid und Tween 20 (Abb. 49).

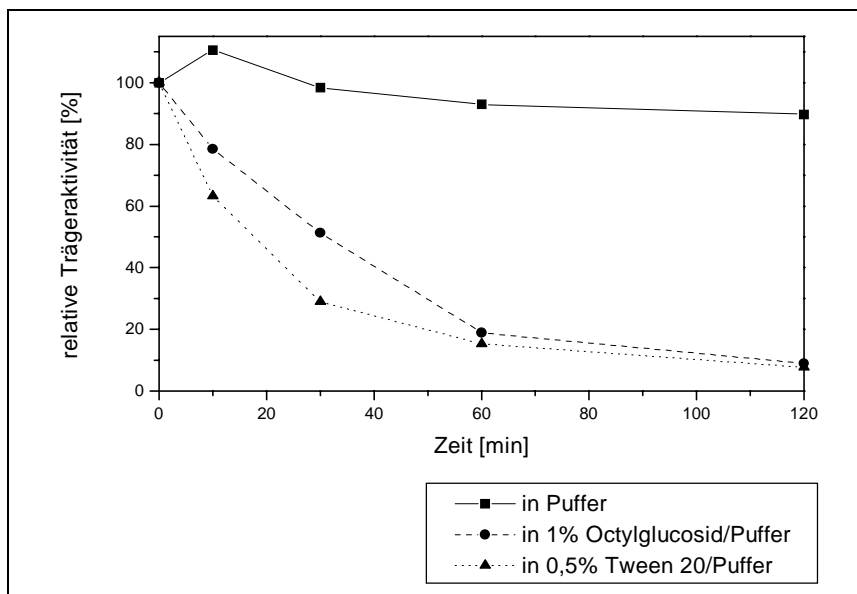


Abb. 49 Stabilität bei Detergenzeinwirkung

Nach 30 min Rühren waren bereits 50 % der Enzymmoleküle vom Träger abgewaschen; nach 2

Stunden verblieb am Träger eine Restaktivität von 10 %. Im Überstand wuchs die Aktivität auf 80 % der ursprünglich am Träger gemessenen Enzymaktivität.

Das erfolgreiche Inkorporieren des Membranenzym Cytochrom c-Oxidase in die kovalent am Polymerträger gebundene, membranähnliche Lipidstruktur konnte anhand der ermittelten Stabilitätsparameter bestätigt werden. Trotz intensivem Rühren blieb die Enzymaktivität am kovalent lipidierten Träger nahezu vollständig erhalten, da die Lipidschicht durch Rühren nicht von der Trägeroberfläche abgelöst werden konnte. Das Fehlen von Phospholipidmolekülen im Überstand konnte mit dem Phosphatnachweis nach AMES (1966) bestätigt werden (s. 2.4.7.).

Auf gleichem Wege wäre die Immobilisierung anderer membranständiger Proteine bei nur geringem Aktivitätsverlust realisierbar. Die Träger können schnell und zuverlässig über magnetische Wechselwirkungen aus dem System entfernt werden.

4. Zusammenfassende Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuartiges System zur Immobilisierung von Enzymen und Zellen an magnetisierten Polymerpartikeln und dessen Nutzung in einem magnetischen Festbettreaktor vorgestellt.

Die **Magnetisierung** von 100-200 μm großen Polyacrylamidpartikeln gelang mit der Durchführung einer Fällungsreaktion, in deren Folge im Inneren der Partikel nanometergroße Fe_3O_4 -Präzipitate entstanden, die die poröse Struktur der Polyacrylamidträger stabilisierten. Auf der Partikeloberfläche konnten nach intensiven Waschungen kaum Fe_3O_4 -Präzipitate nachgewiesen werden. Je nach Beladungsgrad mit Eisenoxid konnte durch das Anlegen eines äußeren Magnetfeldes eine mehr oder weniger große Kraftwirkung nachgewiesen werden. Qualitative Untersuchungen zum Verhalten der Polymerpartikel im magnetischen Feld beschrieb die magnetisch induzierte Krafteinwirkung auf die magnetisierten Träger. Danach erfolgten vielfältige **Derivatisierungen** der Trägermatrixoberfläche. Dabei wurde die Ladung, die Hydrophobizität und die Beschichtung der Oberfläche variiert. Ziel dieser Modifizierungen war es, eine geeignete Matrixoberfläche für die Immobilisierung von Zellen und Enzymen zu erhalten.

Die **Immobilisierung** von Zellen beruhte auf dem Prinzip der Adhärenz von Hepatozyten, Epithel- und Endothelzellen auf der Oberfläche ferrimagnetischer Polyacrylamidkugeln. Die Partikeloberfläche mußte dafür zusätzlich mit Überzügen ausgestattet werden, die die Adhärenz und den Zellbewuchs fördern. Collagen erwies sich als das am besten geeignete Material. Es ergab sich zudem eine Korrelation zwischen Oberflächenladung und Zelladhäsion. Mit zunehmendem pK_a -Wert nahm die Zellanhaftung zu. Dieser Trend war bei allen Zelltypen zu beobachten.

Desweiteren wurde ein **Reaktorsystem** vorgestellt, mit dem die Kultivierung von Hepatozyten über einen längeren Zeitraum bei Erhalt leberspezifischer Funktionen möglich war. Diese neuartige Zellzuchttechnik verbindet die Vorteile eines Festbettreaktors (hohe Zelldichte, kontinuierlicher Mediendurchfluß, leichte Entnahme von Zellen und Wiederverwendung der Polymerträger) mit einer Rekonstruktion der Mikroumgebung in vivo (bipolarer Zellwuchs auf Collagenunterlagen). Dabei konnten die metabolischen Funktionen der Zellen über längere Zeit auf hohem Niveau erhalten werden.

Die mit Zellen bewachsenen magnetischen Microcarrier werden im Reaktorraum durch ein äußeres Magnetfeld derart fixiert, daß eine lockere Beladung der Anlage gewährleistet wird und so eine optimale Nährstoffversorgung der Zellen gesichert ist. Nachdem die mit Hepatozyten vor-kultivierten Magnetpartikel in den Reaktor eingebracht wurden, adsorbierten sie spontan an Metallstäben, die im Reaktorinnern parallel und senkrecht zum Feld eines äußeren Magnetfeldes angeordnet waren.

Dieser Zellzuchtreaktor konnte im Labormaßstab 3 Wochen kontinuierlich betrieben werden. Dabei gelang es, die optimalen Parameter für die Hepatozytenkultivierung über diesen Zeitraum

stabil zu halten. Besonders vorteilhaft war, daß die zellbewachsenen Carrier im System gleichmäßig vom Nährmedium umspült wurden und aufgrund der magnetischen Fixierung im Reaktor vor wachstumshemmenden Scherkräften geschützt waren. Beim Ausschalten des Magnetfeldes sanken die zellbehafteten Trägerpartikel nach unten und konnten so aus der Anlage entfernt werden.

Ein weiterer Vorteil des neuartigen Reaktors ist die unkomplizierte Konstruktion des Systems. Es ist lediglich eine Carbogenflasche und ein auf 37 °C temperierter Raum erforderlich. Pumpen können entfallen, weil die Sicherstellung der Sauerstoff-Versorgung des Mediums konstruktiv so gelöst wurde, daß durch die Einleitung von Carbogengasblasen in den Verbindungsschlauch zwischen Reaktor und Medienreservoir ein gerichteter, stetiger und leicht zu kontrollierender Flüssigkeitsstrom im gesamten System erzeugt wurde.

Es konnte gezeigt werden, daß die Beladung der Polymerträger mit kolloidalem Fe_3O_4 einen förderlichen Einfluß auf die Zellanhaftung von Hepatozyten ausübt. Während auf nichtmagnetisierten Trägern nur eine geringe Haftung und ein eingeschränktes Abflachen der Zellen registriert wurde, konnte auf optimal mit Eisenoxid beladenen Polymerpartikeln ein maximaler Zellbewuchs beobachtet werden.

Ein Vergleich mit anderen Zellzuchtmethoden konnte die Effizienz des neuartigen Zellzuchtreaktors am Beispiel der Hepatozytenkultivierung aufzeigen. Im Vergleich zur konventionellen Monolayerkultur war im Verlaufe der Reaktorkultivierung eine verzögerte Entdifferenzierung zu verzeichnen. Um Vergleichbarkeit zur parallel untersuchten Monolayerkultur zu gewährleisten, wurde der Reaktor bisher suboptimal in einem semikontinuierlichen System betrieben (d.h. die Kulturflüssigkeit wurde im gleichen Rhythmus wie die Monolayerkultur alle 6 Tage gewechselt, in diesem Zeitraum aber viele Male zyklisch durch den Reaktor gepumpt). Es kann davon ausgegangen werden, daß noch wesentlich bessere Ergebnisse zu erreichen sind, wenn die aus der zyklischen Betriebsweise resultierende Anreicherung toxischer Metabolite vermieden wird, z.B. indem stets frisches Medium langsam durch den Reaktor fließt.

Eine Patentrecherche ergab, daß bisher kein vergleichbares System beschrieben wurde, bei dem tierische Zellen an magnetischen Mikrocarriern kultiviert werden.

Auch die hier beschriebene Konstruktion eines Magnet-Zellkulturreaktors ist bislang weder beschrieben noch patentiert worden.

Mit diesem neuartigen Kultursystem bieten sich neue Wege zu Untersuchungen leberspezifischer Metabolisierungswege von Arzneimitteln an. Damit könnten Tierversuche durch ein relevanteres Testsystem ersetzt werden.

Das vorliegende Verfahren zur kontinuierlichen Zucht von Hepatozyten im magnetischen Gitterreaktor läßt sich problemlos für die Kultivierung anderer medizinisch und biologisch interessanter Zellen adaptieren. So konnte eine Kultivierung von Rinderaugenlinsenepithelzellen und humanen Nabelschnurvenenendothelzellen am magnetisierten Polyacrylamidträger durchgeführt werden. Die schnelle Vermehrung dieser Zellen am Träger zeigt auch hier die Effizienz des Kultursystems.

Die Eignung magnetisierter Polyacrylamidpartikel zur Immobilisierung von Membranenzymen sollte am Beispiel der Cytochrom c-Oxidase aus Rinderherzen gezeigt werden.

Dazu wurde ein Verfahren beschrieben, das es ermöglicht, an der Oberfläche von aktivierten magnetisierten Polyacrylamidträgern durch kovalente und hydrophobe Wechselwirkungen eine künstliche membranähnliche Lipidstruktur zu erzeugen, in die das Membranenzym stabil und dauerhaft inkorporiert werden kann.

Voraussetzung zur Ausbildung einer dichten Lipidschicht war zunächst ein genügend hoher Anteil aktivierter reaktionsfähiger Gruppen an der Trägeroberfläche. Die daran bindenden Phosphatidylethanolaminmoleküle ergaben im Verband eine monolayerartige Lipidstruktur, die weder durch Detergenzien noch durch organische Lösungsmittel zu entfernen war. Dabei zeigte sich, daß eine Lipidkopplung im organischen Reaktionsmilieu aufgrund der Lipidlöslichkeit in deutlich höheren Ausbeuten erfolgt, als es in wäßriger Phase der Fall ist. Im Zuge einer Dialyse wurde in der Folge detergentgelöstes Lipid und das zu inkorporierende Membranenzym am lipidierten Träger fixiert. In die so entstandene bilayer-/multilayerartige Struktur konnte dabei das Membranenzym gerichtet inkorporiert werden. Die Effektivität des Enzymeinbaus (Verhältnis fixierte Enzymmenge zu spezifischer Aktivität am Träger) konnte nur bedingt ermittelt werden, da ein unbekannter Teil der immobilisierten Enzymmoleküle zwar rekonstitutioniert vorlag, aber aufgrund einer Maskierung des Reaktionszentrums durch Lipid oder Polymerketten dem Substrat unzugänglich blieb. Der erfolgreiche Einbau bestätigte sich jedoch bei der Auswertung spezifischer Parameter wie der Verschiebung des pH-Optimums, sowie der Lager-, Operations- und Detergenzstabilität. Das Enzym konnte in die kovalent gebundene membranähnliche Lipidstruktur des Polymerträgers fest verankert werden, so daß auch nach intensiver mechanischer Beanspruchung oder langer Lagerzeit nur ein geringer Aktivitätsverlust zu verzeichnen war. Die Immobilisierung anderer membranständiger Proteine bei nur geringem Aktivitätsverlust wäre in der gleichen Weise realisierbar.

Das vorliegende Verfahren zur Immobilisierung von Membranenzymen und zur kontinuierlichen Zucht von Hepatozyten, Endothel- und Epithelzellen im magnetischen Gitterreaktor läßt sich zwanglos für die Kultivierung anderer medizinisch und biologisch interessanter Zellen und Zellorganellen adaptieren.

So ist es in Ansätzen beispielsweise bereits gelungen, Kupffersche Sternzellen aus Rattenleber an magnetisierte Polymerträger zu binden und über einen längeren Zeitraum zu vermehren.

Inwieweit Mikroorganismen in diesem System gezüchtet und vermehrt werden können, ist zu untersuchen. Da die Verkapselung von Bakterien oder Hefen bereits erfolgreich in der Fermentationstechnik eingesetzt wird, sollte die Kultivierung von Mikroorganismen an magnetisierten Polymerpartikeln oder in magnetischen Mikrokapseln und deren Fixierung in unserem Magnetreaktor möglich sein.

5. Literatur

AASHEIM, H.C.; DEGGERDAL, A.; SMELAND, E.B.; HORNES, E. (1994)

A simple subtraction method for the isolation of cell-specific genes using magnetic monodisperse polymer particles.

Biotechniques 16 (4), S. 716

ABRAMOVITCH, D.A.; MARSH, D.; POWELL, G.L. (1990)

Activation of beef-heart cytochrom c oxidase by cardiolipin and analogues of cardiolipin.

Biochim. Biophys. Acta 1020, S. 34-42

AGIUS, L.; BATTERSBY, C.; ALBERTI, K.G.M.M. (1985)

Monolayer culture parenchymal rat hepatocytes on collagen-coated microcarriers. A hepatoc system for short- and long-term metabolic studies.

In Vitro Cell. Dev. Biol. 21, S. 254-259

AMES, B.N. (1966)

Assay for inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases.

In: *Methodes of Enzymology* 8, S. 115

ATHARI, A; UNTHAN-FECHNER, K.; SCHWARTZ, P.; PROBST, I. (1988)

Adult rat hepatocyte microcarrier culture. Comparison to the conventional dish culture system.

In Vitro Cell. Dev. Biol. 24, S. 1085-1091

AURICH, H. (1991)

Herstellung und Charakterisierung magnetischer Trägerpartikel mit kovalent fixierter Lipidaufgabe sowie erste Versuche zum Einbau membrangebundener Enzyme.

Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle, Sektion Biowissenschaften

AZZI, G. (1980)

Cytochrom c oxidase

Towards a clarification of its structure, interactions and mechanism.

Biochim. Biophys. Acta, 594, S. 231-252

BERRY, M.N.; EDWARDS, A.M.; BARRIT, G.J. (1991)

Isolated hepatocytes - preparation, properties and applications.

(Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol. 21)

Elsevier Amsterdam-New York-Oxford, S. 303-316

BILLIG, D. (1987)

Scaling-up microcarrier cultures of mammalian cells for production purposes.

In: Plant and animal cells, process possibilities.

Eds.: WEBB, C. und MAVITUNA, F.

Ellis Horwood, Chichester, UK

BLOUIN, A.; BOLENDER, R.P.; WEIBEL, E.R. (1977)

Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma.

J. Cell Biol. 72, S. 441-455

BOSMAN, D.K.; de HAAN, J.G.; SMIT, J.; JORNING, G.G.A.; MAAS, A.W.; CHAMULEAU, R.A.F.M. (1989)

Metabolic activity of microcarrier attached liver cells after intraperitoneal transplantation during severe liver insufficiency in rat.

J. Hep. 9, S. 49-58

BOWERS, L.D. und CARR, P.W. (1980)

Immobilized enzymes in analytical chemistry.

Adv. Biochem. Eng. 15, S. 89-129

BRADFORD, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72, S. 248-254

BUCK, C.A. UND HORWITZ, A.F. (1987a)

Cell surface receptors for extracellular matrix molecules.

Ann. Rev. Cell Biol. 3, S. 179-205

BUCK, C.A. UND HORWITZ, A.F. (1987b)

Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cellsubstratum adhesion.

J. Cell Sci. Suppl. 8, S. 231-250

BUSE, G. und STEFFENS, G.J. (1978)

Studies on cytochrome c oxidase, II.

The chemical constitution of a short polypeptide from the beef heart enzyme.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, S. 1005-1009

BUTTLER, M. und THILLY, W.G. (1982)

MDCK microcarrier cultures: Seeding density effects and amino acid utilization.

In Vitro 18, S. 213

- CHA, M.S.; RAH, D.K.; LEE, K.H. (1996)
Isolation and pure culture of microvascular endothelial cells from the fetal skin.
Yonsai Medical J. 37 (3), S. 186-193
- CHAN, K.; KOST, D.P.; MICHALOPOULOS, G. (1989)
Multiple sequential periods of DNA synthesis and quiescence in primary hepatocyte cultures maintained on the DMSO-EGF on/off protocol.
J. Cell. Physiol. 141, 584-590
- CHANG, T.M.S. (1984)
Artificial cells in medicine and biotechnology.
Appl. Biochem. Biotechnol. 10, S. 5-24
- CHEN, H. und LANGER, R. (1997)
Magnetically-responsive polymerized liposomes as potential oral delivery vehicles.
Pharmaceut. Res. 14, S. 537-540
- CHOU, S.C. und GOLDSTEIN, A. (1960)
Chromogenic groupings in the Lowry protein determination.
Biochem. J. 75, S. 109-115
- CLARK, J.M. und HIRTENSTEIN, M.D. (1981)
Optimizing culture conditions for the production of animal cells in microcarrier culture.
Ann. NY Acad. Sci. 396, S. 33-46
- COLTON, C.K.; NEMET, M.I.; YANG, R.Y.K (1978)
A coupled enzyme system for ATP regeneration immobilized in magnetic polyacrylamide beads.
AIChE Symposium Series 74 (172), S. 8-13
- DE CUYPER, M. und JONIAU, M. (1990a)
Immobilization of membrane enzymes into magnetizable, phospholipid bilayer-coated, inorganic colloids.
Progr. Colloid Polym. Sci. 82, S. 353-359
- DE CUYPER, M. und JONIAU, M. (1990b)
Potentialities of magnetoliposomes in studying symmetric phospholipid transfer processes.
BBA 1027, S.172-178
- DE CUYPER, M. und JONIAU, M. (1988)
Magnetoliposomes - Formation and structural characterisation.
Eur. Biophys. J. 15, S. 311-319

- DE TAXIS DU POET, P.T.; DHULSTER, P., BARBOTIN, J.; THOMAS, D. (1986)
Plasmid inheritability and biomass production: comparison between free and immobilized cell cultures of *Escherichia coli* BZ18 (pTG201) without selection pressure.
J. Bacteriol. 165 (3), S. 871-877
- DELOS-SANTOS, B.; SHIRAGAMI, N.; KARIYA, M.; UNNO, H (1995)
An index for microcarrier dispersion inside a horizontally rotating bioreactor for animal cell culture.
Bioproc. Eng. 12 (3), S. 147-150
- DEMETRIOU, A.A.; LEVENSON, S.M.; NOVIKOFF, P.M.; NOVIKOFF, A.B.; CHOWDHURY, J.R. (1986)
Survival, organization, and function of microcarrier-attached hepatocytes transplanted in rat.
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, S. 7475-7479
- DENIS, M. (1986)
Structure and function of cytochrome-c oxidase.
Biochimie 68, S. 459-470
- DHUMEAUX, M.M.D.; BERTHELOT, P.; FAUVER, R. (1968)
Glucoronide formation of phtalein dyes by the liver: a study in Wistar and homozygous Gunn rats.
Biol. gastro-Enterol. Tome 1, S. 37-47
- DORETTI, L.; FERRARA, D.; GATTOLIN, P.; LORA, S. (1996)
Covalently immobilized enzymes on biocompatible polymers for amperometric sensor applications.
Biosens. Bioelectron. 11 (4), S. 365-373
- DRISCOLL, J.L.; HAYNER, N.T.; WILLIAMSON-HOLLAND, R.; SPIES-KAROTKIN, G.; GALLETI, P.M.; JAUREGUI, H.O. (1982)
Phenolsulfonphtalein (phenol red) metabolism in primary monolayer cultures of adult rat hepatocytes.
In Vitro 18 (10), S. 835-842
- DUNN, J.C.Y.; TOMPKINS, R.G.; YARMUSH, M.L. (1991)
Long-term in vitro funktion of adult hepatocytes in a collagen sandwich configuration.
Biotechnol. Prog. 7, S. 237-245
- EDELMAN, E.; BOBECK, H.; LANGER, R. (1983)
Magnetically controlled delivery systems.
Polym. Preprints 24 (1), S. 49-50

FAHLVIK, A.K.; ARTURSSON, P.; EDMAN, P. (1990)

Magnetic starch microspheres: interactions of a microsphere MR contrast medium with macrophages in vitro.

IJP 65, S. 249-259

FLENDRIG, L.M.; LA SOE, J.W.; JORNING, G.G.; STEENBEEK, A.; KARLSEN, O.T.; BOVEE, W.M.; LADIGES, N.C.; TE VELDE, A.A.; CHAMULEAU, R.A. (1997)

In vitro evaluation of novel bioreactor based on an integral oxygenator and a spirally wound nonwoven polyester matrix for hepatocyte culture as small aggregates.

J. Hepatol. 26 (6), S. 1379-1392

FORESTELL, S.P.; KALOGERAKIS, N.; BEHIE, L.A. (1992)

Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures.

Biotechnol. Bioeng. 39, S. 305-313

FREED, L.E.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.V.; DRINKER, P.A.; LANGER, R. (1993)

Bioreactor based on suspended particles of immobilized enzyme.

Ann. Biomed. Eng. 21 (1), S. 57-65

GERLACH, J.C. (1996)

Development of a hybrid liver support system: a review.

Int. J. Artif. Organs 19 (11), S. 645-654

GERLACH, J.C.; SCHNOY, N.; VIENKEN, J.; SMITH, M.; NEUHAUS, P. (1996)

Comparison of hollow fibre membranes for hepatocyte immobilisation in bioreactors.

Int. J. Artif. Organs 19 (10), S. 610-616

GALLO, J.M. und HÄFELI, U. (1997)

Peclinical and clinical experiences with magnetic drug targeting.

Cancer Re. 57, S. 3063-3064

GERSON, D.F. (1981)

Methods in surface physics for immunology.

In: *Immunological Methods*, Vol. II

Eds.: Lefkovits, I. und Pernis, B., Academic Press, New York, S. 105-138

GEY, G.O.; COFFMAN, W.D.; KUBIEK, M.T. (1952)

Cancer Res. 12, S. 264

GIDDINGS, J.C. und MYERS, M.N. (1978)

Steric Field-Flow-Fractionation: A new method for separating 1 to 100 μm particles.

Sep. Sci. Technol. 13 (8), S. 637-645

- GIMBRONE, M.A.JR.; COTRAN, R.S.; FOLKMAN, J. (1974)
Human vascular endothelial cells in culture
J. Cell Biol. 60, S. 673-684
- GLÄSSER, D.; FRIEDRICH, E.; IWIG, M.; WEBER, E. (1972)
Über ein Aggregationsphänomen von Augenlinsenepithelien und seine Beeinflussung durch physiologische Purinderivate.
Exptl. Cell. Res. 72, S. 409-420
- GLÄSSER, D.; IWIG, M.; WEBER, E. (1975)
Zur Regulierung altersabhängiger Phänomene—
Einfluß C₆-substituierter Purine auf Zellaggregation und Zellemigration in der Primärkultur von Linsenepithelzellen.
Z. Alternsforsch. 30 (4), S. 359-370
- GLOGAUER, M.; FERRIER, J.; MCCULLOCH, C.A.G. (1995)
Magnetic fields applied to collagen-coated ferric oxide beads induce stretch-activated Ca²⁺ flux in fibroblasts.
Am. J. Physiol. 269 (5, Part 1), S. C1093-C1104
- GREENGARD, O.; FEDERMAN, M.; KNOX, W.E. (1972)
Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation.
J. Cell Biol. 52, S. 261-272
- GRIESSER, H.J.; CHATELIER, R.C.; GENGENBACH, T.R.; JOHNSON, G.; STEELE, J.G. (1994)
Growth of human cells on plasma polymers: Putative role of amine and amide groups.
J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 5 (6), S. 531-554
- GRIFFITHS, M.S. und BOSLEY, J.A. (1993)
Assessment of macroporous polystyrene-based polymers for the immobilization of *Citrobacter freundii*.
Enzyme Microb. Technol. 15 (2), S. 109-113
- GUGUEN-GUILLOUZO, C. (1986)
In: Research in isolated and cultured hepatocytes.
Eds. Guillouzo, A. und Guguen-Guillouzo, C., John Libbey Eurotext Ltd., Inserm, London
S. 259
- GUZELIAN, P.S.; LI, D.; SCHUETZ, E.G., et al. (1988)
Sex change in cytochrom P-450 phenotype by growth hormone treatment of adult rat hepatocytes maintained in a culture system on Matrigel.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, S. 9783-9787

HÄFELI, U.O.; PAUER, G.J.; MACKLIS, R.M. (1995)

Treatment of mouse tumors with radioactive magnetic microspheres: Model for intracavitary radiotherapy.

Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater 22, S. 89-90

HARADLSDOTTIR, V.; HAANEN, C.; KALSBECK-BATENBURG, E.; OLTHIUS, F. (1995)

S-phase cells of the lymphoplasmocytic compartment in hyperdiploid multiple myeloma are diploid cells.

Cytometry 21 (2), S. 203-210

HARTMEIER, W. (1986)

Immobilisierte Biokatalysatoren.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York

HAUSER, H.; PASCHER, I.; PEARSON, R.H.; SUNDELL, S. (1981)

Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine.

BBA 650, S. 21-51

HERZOG, B.; CHICKERING, D.; MATHIOWITZ, E. (1995)

A novel remote-sensing, electromagnetic force transducer for the quantification of bioadhesive interactions between polymer microspheres and living tissue.

Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater 22, S. 316-317

HOCKIN, L.J. und PAINE, A.J. (1983)

The role of 5-aminolaevulinat synthase, haem oxygenase and ligand formation in the mechanism of maintenance of cytochrome P-450 concentration in hepatocyte culture.

Biochem. J. 210, S. 855-857

HOTTENSTEIN, C.S.; JOURDAN, S.W.; HAYES, M.C.; RUBIO, F.M.; HERZOG, D.P.; LAWYER, T.S. (1995)

Determination of pentachlorophenol in water and soil by a magnetic particle-based enzyme immunoassay.

Environ. Sc. Technol. 29 (11), S. 2754-2758

HU, T.T und WU, J.Y. (1987)

Study on the characteristics of a biological fluidized bed in a magnetic field.

Chem. Eng. Res. Des. 65 (3), S. 238-242

HUGHES, R.C.; TAYLOR, A.; SAGE, H.; HOGNAN, B.L.M. (1987)

Distinct patterns of glycosylation of colligin, a collagen-binding glycoprotein, and SPARC (osteonectin), a secreted Ca^{2+} -binding glycoprotein.

Eur. J. Biochem. 163, S. 57-65

HUGHES, R.D. und WILLIAMS, R. (1996)

Use of bioartificial and artificial liver support devices.
Semin Liver Dis. 16 (4), S. 435-444

INMAN, J.K und DINTZIS, H.M. (1969)

The Derivatization of cross-linked polyacrylamide beads. Controlled introduction of functional groups for the preparation of special-purpose, biochemical adsorbents.
Biochemistry 8 (10), S. 4074-4082

ISOM, H.C.; SECOTT, T.; GEORGOFF, I. et al. (1985)

Maintenance of differentiated rat hepatocytes in primary culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, S.3252-3256

ITAK, J.A.; SELISKER, M.Y.; HERZOG, D.P.; FLEEKER, J.R.; BOGUS, R.; MUMMA, R.O. (1994)

Determination of captan in water, peaches, and juice by a magnetic particle-based immunoassay.
J. AOAC International 77 (1), S. 86-91

IWIG, M. und GLÄSER, D. (1990)

Beteiligung der Mikrofilamente an der Ausbildung der Adhäsionsplaque und ihre Bedeutung für die Zellform und proliferatives Wachstum.
Acta histochemica, Suppl. 39, S. 403-418

JAFFE, E.A.; NACHMAN, R.L.; BECKER, C.G.; MINICK, C.R. (1973)

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.
J. Clin. Invest 52, S. 2745-2756

KALLURY, K.M.R.; LEE, W.E.; THOMPSON, M. (1993)

Enhanced stability of urease immobilized onto phospholipid covalent bound to silica, tungsten, and fluoropolymer surface.
Analyt. Chem. 65 (18), S. 2459-2467

KIJAS, J.M.H.; FOWLER, J.C.S.; GARBETT, C.A.; THOMAS, M.R. (1994)

Enrichment of microsatellites from the Citrus genom using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles.
Biotechniques 16 (4), S. 656-662

KILBERG, M.S. und HANDLOGTEN, M.E. (1988)

Transport of branched-chain amino acids and their corresponding 2-keto acids by mammalian cells.
In: *Methods in Enzymology* (Vol. 166), Academic Press, Inc. (1988), S. 256

KIM, J.H. und HONG, S.K. (1962)

Urinary and biliary excretion of various phenol red derivates in the anesthetized dog.
Am. J. Physiol. *202*, S. 174-178

KINO, Y.; SAWA, M.; KASAI, S.; NAKAZAWA, E.; KATO, K.; YAMAMOTO, T.; MITO, M. (1996)

Immobilization of rat hepatocytes on multiporous microcarriers with large pores and their metabolic activity.
Cell Transplant *5* (5 Suppl. 1), S. S35-37

KOEBE, H.G.; DAHNHARDT, C.; MÜLLER-HOCKER, J.; WAGNER, H.; SCHILDBERG, F.W. (1996)

Cryopreservation of porcine hepatocyte culture.
Cryobiology *33* (1), S. 127-141

KOIDE, N.; SHINJI, T.; TANABE, T.; ASANO, K.; KAWAGUCHI, M.; SAKAGUCHI, K.; KOIDE, Y.; MORI, M.; TSUJI, T. (1989)

Continued high albumin production by multicellular spheroids of adult rat hepatocytes formed in the presence of liver-derived proteoglycans.
Biochem. Biophys. Res. Comm. *161*, S. 385-391

KOOPAL, C.G. und NOLTE, R.J. (1994)

Highly stable first-generation biosensor for glucose utilizing latex particles as the enzyme-immobilizing matrix.
Enzyme Microb. Technol. *16* (5), S. 402-408

KURIYAMA, T.; KIMURA, J.; KAWANA, Y. (1985)

Development of biosensors with immobilized enzymes.
Chem. Econ. Eng. Rev. *17*, S. 22-27

LANDRY, J.; BERNIER, D.; OUELLET, C.; GOYETTE, R.; MARCEAU, N. (1985)

Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional activities.
J. Cell Biol. *101*, S. 914-923

LAWRUK, T.S.; GUECO, A.M.; MIHALIAK, C.A.; DOLDER, S.C.; DIAL, G.E.; RUBIO, F.M. (1996)

Development of a magnetic particle-based enzyme immunoassay for the quantitation of chlorpyrifos in water.
J. Agricult.Food Chem. *44* (9), S. 2913-2918

LECLUYSE, E.L.; AUDUS, K.L.; HOCHMAN, J.H. (1994)

Formation of extensive canalicular networks by rat hepatocytes cultured in collagen-sandwich configuration.
Am. J. Physiol. *266* (Cell Physiol. *35*), S. C1764-C1774

LEE, D.W.; MORGAN, J.R.; TOMPKINS, R.G.; YARMUSH, M.L. (1992)

The importance of proline on long-term hepatocyte function in a collagen sandwich configuration: regulation of protein secretion.

Biotechnol. Bioeng. 40, S.298-305

LEE, J.H.; JUNG, H.W.; KANG, I.K.; LEE, H.B. (1994)

Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups.

Biomaterials 15 (9), S. 705-711

LI, Y.; NAQUI, A.; FREY, T.G.; CANCE, B. (1987)

A new procedur for the purification of monodisperse highly active cytochrom c oxidase from bovin heart.

Biochem. J. 242, S.417-423

LINDER, M.C. und MUNRO, H.N. (1972)

Assay of tissue ferritin.

Anal. Biochem. 48, S. 266-278

LINBE, B. (1989)

Ein Verfahren zur Oberflächenlipidierung von perlenförmigem Polyacrylamidträgermaterial.

Diplomarbeit, MLU Halle, Naturwissenschaftlich mathematische Fakultät,

LIU, S.Q.; ITO, Y.; IMANISHI, Y. (1993)

Cell growth on immobilized cell growth factor. 7. Protein-free culture by using growth-factor-immobilized polymer membran.

Enzym Microb. Technol. 15, S. 167-172

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, S. 265-275

MAGANTO, P.; TRABER, P.G.; RUSNELL, C.; DOBBINS, W.O.; KEREN, D.; GUMUCIO, J.J. (1990)

Long-term maintenance of the adult pattern of liver-specific expression for P-450b, P-450e, albumin and alpha-fetoprotein genes in intrasplenically transplanted hepatocytes.

Hepatology 11 (4), S. 585-592

MAKRYALEAS, K.; SCHEPER, T.; SCHÜGERL, K.; KULA, M.R. (1985)

Enzymkatalysierte Darstellung von L-Aminosäure mit kontinuierlicher Coenzymregenerierung mittels Flüssigmembran-Emulsion.

Chem. Ing. Tech. 57, S. 362-363

- MARKIEWICZ, M.; KAMINSKA, H.; WOJNAR, J.; JAGODA, K.; KRAWCZYK, M.; HOLOWIECKI, J. (1996)
Immunomagnetic method of CD34+ cell separation.
Transpl. Proc. 28, S. 3526-3527
- MASLANSKY, C.J. und WILLIAMS, G.M. (1982)
Primary cultures and the levels of cytochrom P-450 in hepatocytes from mouse, rat, hamster, and rabbit liver.
In Vitro Cell. Dev. Biol. 18, S. 683-693
- MATSUNAGA, T. und KAMIYA, S. (1987)
Appl. Microb. Biotech. 26, S. 328-332
- MATTIASSON, B. (1983)
In: Immobilized Cells and Organells. Vol. 2
Ed.: MATTIASSON, B., S. 23-41, CRC Press, Boca Raton, Fla.
- MICHEL, B. und BOSSHARD, H.R. (1984)
Spectroscopic analysis of the interaction between cytochrome c and cytochrom c oxidase.
J. Biol. Chem. 259 (16), S. 10085-10091
- MILLER, E.C. und MILLER, J.A. (1985)
Some historical perspectives on the metabolism of xenobiotic chemicals to reactive electrophiles
In: Bioactivation of foreign compounds.
Ed. ANDERS, M.W., Academic Press, Orlando, Fl., S.3-28
- MITSUMORI, M.; HIRAOKA, M.; SHIBATA, T.; OKUNO, Y.; NAGATA, Y.; NISHIMURA, Y.; ABE, M.; Hasegawa, M.; Nagae, H.; Ebisawa, Y. (1996)
Targeted hyperthermia using dextran magnetite complex: A new treatment madality for liver tumors.
Hepato-Gastroenterology 43, S. 1431-1437
- MIYOSHI, H.; YANAGI, K.; FUKUDA, H.; OHSHIMA, N. (1994)
Long-term continuouse culture of hepatocytes in a packed-bed reactor utilizing porous resin.
Biotechnol. Bioeng. 43, S.635-644
- MIYOSHI, H.; YANAGI, K.; FUKUDA, H.; OHSHIMA, N. (1996)
Long-term performance of albumni secretion of hepatocytes cultured in a packed-bed reactor utilizing porous resin.
Artif. Organs 20 (7), S. 803-807
- MOOR, G.E.; SANDBERG, A.A.; ULRICH, K. (1966)
J. Natl. Cancer Inst. 36, S. 405

- MORGAN, S.J. und DARLING, D.C. (1994)
Kultur tierischer Zellen.
Spektrum, Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 88
- MOSBACH, K. (Ed.) (1976a)
Application of immobilized enzymes. C. Enzyme engineering (Enzym technology).
Methods Enzymol. 44, S. 717-830
- MOSBACH, K. (Ed.) (1976b)
Application of immobilized enzymes. D. Application of immobilized enzymes in organic chemistry.
Methods Enzymol. 44, S. 831-856
- NAIK, S.; SANTANGINI, H.A.; TRENKLER, D.M.; MULLON, C.J.; SOLOMON, B.A.; PAN, J.; JAUREGUI, H.O. (1997)
Functional recovery of porcine hepatocytes after hypothermic or cryogenic preservation for liver support systems.
Cell Transplant 6 (5), S. 447-454
- O'BRIEN, S.M.; THOMAS, O.R.T.; DUNNILL, P. (1996)
Non-porous magnetic chelator supports for protein recovery by immobilised metal affinity adsorption.
J. Biotechnol. 50, S. 13-25
- ORIEL, P. (1988)
Amylase production by *Escherichia coli* immobilized in silicone foam.
Biotechnol. Letters 10 (2), S. 113-116
- OSHEROFF, N.; SPECK, S.H.; MARGOLIASH, E.; VEERMAN, E.C.I.; WILMS, J.; KÖNIG, B.W.; MUIJSERS, A.O. (1983)
The reaction of primate cytochromes c with cytochrome c oxidase. Analysis of the polarographic assay.
J. Biol. Chem. 258, S. 5731-5738
- OWEN, C.S. (1989)
Magnetic-polymer particles.
US Patent, #4795698
- PARSONSWINGERTER, P.A. und SALTZMAN, W.M. (1993)
Growth versus function in the 3-dimensional culture of single and aggregated hepatocytes within collagen gels.
Biotechnol. Progr. 9 (6), S. 600-607

- PAULSSON, M.; KOBER, M.; FREIJLARSSON, C.; STOLLENWERK, M.; WESSLEN, B.; LJUNGH, A. (1993)
Adhesion of *Staphylococci* to chemically modified and native vitronectin and fibrinogen.
Biomaterials 14 (11), S. 845-855
- PÄUSER, S.; RESZKA, R.; WAGNER, S.; WOLF, K.J.; BUHR, H.J.; BERGER, G. (1997)
Liposome-encapsulated superparamagnetic iron oxide particles as markers in an MRI-guided search for tumor-specific drug carrier.
Anti-Cancer Drug Design 12, S. 125-135
- PIETERS, B.R. und BARDELETTI, G. (1992)
Enzyme immobilization on a low-cost magnetic support: kinetic studies on immobilized and coimmobilized glucose oxidase and glucoamylase.
Enzyme Microb. Technol. 14 (5), S. 361-370
- PIETERS, B.R.; BARDELETTI, G.; COULET, P.R. (1992a)
Glucoamylase immobilization on a magnetic microparticle for the continuous hydrolysis of maltodextrin in a fluidized bed reactor.
Appl. Biochem. Biotech. 32, S. 37-53
- PIETERS, B.R.; WILLIAMS, R.A.; WEBB, C. (1992b)
Colloid and surface engineering: Application in the process industry.
Ed.: WILLIAMS, R.A.; Butterworth-Heinemann
- POULSON, P.G. (1984)
Current applications of immobilized enzymes for manufacturing purposes.
Biotechnol. Gen. Eng. Rev. 1, S. 121-140
- POVEY, A.C.; GODENECHÉ, D.; O'NEILL (1988)
Time-dependent distribution and excretion of radiolabelled, semipermeable, stable magnetic microcapsules.
J. Pharm. Pharmacol. 40, S. 431-433
- RICHARDSON, D.R. (1997)
Potential of iron chelators as effective antiproliferative agents.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 75 (10-11), S. 1164-1180
- RICHTER, G.W. (1978)
The iron-loaded cell - the cytopathology of iron storage.
Am. J. Pathol. 91, S. 362-404

- RIGELL, C.W.; DE SAUSSURE, C.; FREIRE, E. (1985)
Protein and lipid structural transitions in cytochrom c oxidase-dimyristoylphosphatidylcholine reconstitutions.
Biochem. 24, S. 5638-5646
- ROJKIND, M.; GATMAITAN, Z.; MACKENSEN, S.; GIAMBRONE, M.-A.; PONCE, P.; REID, L.M. (1980)
Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes.
J. Cell Biol. 87, S.255-263
- ROTHER, U. (1989)
Herstellung und Charakterisierung von lipidumhüllten Polymerpartikeln.
Vergleichende Untersuchungen zum Inkorporations- und Ablöseverhalten von Membranproteinen an dieser neuartigen Trägermatrix.
Dissertation B, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
- SAMBAMURTHY, K und VIJAYA, M. (1987)
Covalent attachment of amyloglucosidase on magnetic iron oxide - optimization of the immobilization parameters.
J. Microb. Biotechnol. 2 (1), S. 15-21
- SCHMITZ, B.; RADBRUCH, A.; KUMMEL, T.; WICKENHAUSER, C.; KORB, H.; HANSMANN, M.L.; THIELE, J.; FISCHER, R. (1994)
Magnetic activated cell sorting (MACS) - A new immunomagnetic method for megakaryocytic cell isolation: Comparison of different separation techniques.
Eur. J. Haematol. 52 (5), S.267-275
- SCOTT, C.D. (1987)
Immobilized Cells: a review of recent literature.
Enzyme Microb. Technol. 9, S. 66-73
- SELIGMAN, P.A.; KOVAR, J.; GELFAND, E.W. (1992)
Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways.
Pathobiology 60 (1), S. 19-26
- SINGELTON, W.S.; GRAY, M.S.; BROWN, M.L.; WHITE, J.L. (1965)
Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids.
JAACS 42, S. 53-56
- SMALHEISER, N.R. und SCHWARTZ, N.B. (1987)
Cranin: A laminin-binding protein of cell membranes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, S. 6457-6461

- SMELAND, E.B.; FUNDERUD, S.; KVALHEIM, G.; GAUDERNACK, G.; RASMUSSEN, A.M.; RUSTEN, L.; WANG, M.Y.; TINDLE, R.W.; BLOMHOFF, H.K.; EGELAND, T. (1992)
Isolation and characterization of human haematopoietic progenitor cells: An effective method for positive selection of CD34+ cells.
Leukemia 6, S.845-852
- SPERBER, I. (1957)
The biliary excretion and choloretic effect of phenolsulfonphtalein.
Acta Physiol. Scand. Suppl. 145 (42), S. 129-130
- STEELE, J.G.; MCFARLAND, C.; DALTON, B.A.; JOHNSON, G.; EVANS, M.D.M.; HOWLETT, C.R.; UNDERWOOD, P.A. (1993)
Attachment of human bone cells to issue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment.
J. Biomater. Sci. Polymer Edn, 5 (3), S. 245-257
- SUN, J.; WANG, L.; WARING, M.A.; WANG, C.; WOODMAN, K.K.; SHELL, A.G. (1997)
Simple and reliable methods to asses hepatocyte viability in bioartificial liver support system matrices.
Artif. Organs 21 (5), S. 408-413
- SUZUKI, M.; TAKESHITA, K.; YAMAMOTO, T.; ISHIBASHI, H.; KODAMA, M. (1997)
Hepatocytes entrapped in collagen gel following 14 days of storage at 4 degrees C: preservation of hybrid artificial liver.
Artif. Organs 21 (2), S. 99-106
- SUZUKI, K.; OKAMOTO, N.; KANO, T. (1993)
Colorimetric detection for PCR amplified HIV-1 DANN using magnetic beads.
J. Virol. Meth. 41, S. 341-350
- TRAMPER, J. (1995)
Oxygen gradients in animal-cell bioreactors.
Cytotechnology 18 (1-2), S. 27-34
- ULBRICH, R. (1989)
Immobilisierte Enzyme
In: *Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme*
Ed.: SCHELLENBERGER, A.; Gustav Fischer Verlag, Jena, S. 316-317
- VAN 'T KLOOSTER, G.A.E.; WOUTERSEN-VAN NIJNANTEN, F.M.A.; BLAAUBOER, B.J.; NOORDHOEK, J.; VAN MIERT, A.S.J.P.A.M. (1994)
Applicability of cultured hepatocytes derived from goat, sheep and cattle in comparative drug metabolism studies.
Xenobiotica 24 (5), S. 417-428

- VAN DER VELDEN DE GROOT, C.A.M. (1995)
Microcarrier technology, present status and perspective.
Cytotechnology 18 (1-2), S. 51-56
- VAN HINSBERGH, V.W.M.; SCHEFFER, M.A.; LANGELER, E.G. (1991)
Macro- and microvascular endothelial cells from human tissues
In: *Cell culture techniques in heart and vessel research*.
Ed. Piper, H.M., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong
S. 180
- VAN WEZEL, A.L. und VAN DER VELDEN-DE GROOT, C.A.M. (1978)
Large scale Cultivation of animal cells in microcarrier culture.
Proc. Biochem. 5 (12), S. 6-9
- VARLAN, A.R.; SANSEN, W.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. (1996)
Covalent enzyme immobilization on paramagnetic polyacrolein beads.
Biosens. Bioelectron. 11 (4), S. 443-448
- VEERMAN, E.C.I.; WILMS, J.; DEKKER, H.L.; MUIJSERS, A.O.; VAN BUUREN, K.J.H.; VAN GELDER, B.F.; OSHEROFF, N.; SPECK, S.H.; MARGOLIASH, E. (1983)
The presteady state reaction of chemically modified cytochromes c with cytochrome oxidase.
J. Biol. Chem. 258, S. 5739-5745
- VILLAFUERTE, B.C.; KOOP, B.L.; PAO, C.; GU, L.; BIRDSONG, G.G.; PHILLIPS, L.S. (1994)
Coculture of primary rat hepatocytes and nonparenchymal cells permits expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in vitro.
Endocrinology 134 (5), S.2044-2050
- VOSS, J.U. und SEIBERT, H. (1991)
Microcarrier-attached rat hepatocytes as a xenobiotic-metabolizing system in cocultures.
Cell Biol. Toxicol. 7 (4), S. 387-399
- WANG, N. und INGBER, D.E. (1994)
Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension.
Biophys. J. 66 (6), S. 3181-2189
- WEIBEL, E.R.; STÄUBLI, W.; GNÄGI, H.R.; HESS, F.A. (1969)
Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cells.
J. Cell Biol. 42, S. 68-93
- WILLIAMS, G.M. und GUNN, J.M. (1974)
Long-term cell culture of adult rat liver epithel cells.
Exp. Cell Research 89, S.139-142

WOESSNER, J.F. JR. (1961)

The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid.

Arch. Biochem. Biophys. 93, S. 440-447

WONG, L.S.; BATEMAN, W.J.; MORRIS, A.G.; FRASER, I.A. (1995)

Detection of circulating tumor cells with the magnetic activated cell sorter.

Br. J. Surg. 82, S. 1333-1337

WOODWARD, J. (1988)

Methods of immobilization of microbial cells.

J. Microbiol. Meth. 8, S. 91-102

WÖRFLE, D.; SCHMIDT, H.; JUNGERMANN, K. (1983)

Short-term modulation of glycogen metabolism, glycolysis and gluconeogenesis by physiological oxygen concentrations in hepatocyte cultures.

Eur. J. Biochem. 135, S. 405-412

XIAO, C.; HUANG, Z.; ZHANG, Z.; YE, J.; GAO, L.; GUO, Z.; CHENG, D.; ZHOU, H.; KONG, W. (1994)

High density cultivation of a recombinant CD-1 cell line producing prourokinase using a biosilon microcarrier culture system.

Chin. Med. Sc. J. 9 (4), S. 203-208

YAHY, N.; BAGHDIGUIAN, S.; FANTINI, J. (1995)

Production of a highly cytopathic HIV-1 isolated from a human mucosal epithelial cell line cultured on microcarrier beads in serum-free medium.

In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal 31 (1), S. 62-66

YAMAGUCHI, M.; SAWADA, K.; SATO, N.; KOIZUMI, K.; SEKIGUCHI, S.; KOIKE, T. (1997)

A rapid nylon-fiber syringe system to deplete CD14+ cells for positive selection of human blood CD34+ cells. Use of immunomagnetic microspheres.

Bone Marrow Transplantation 19, S. 373-379

YAMAJI, H. und FUKUDA, H. (1992)

Growth and death behavior of anchorage-independent animal cells immobilized within porous support matrices.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 37 (2), S. 244-251

YANAGI, K.; OOKAWA, K.; MIZUNO, S.; OHSHIMA, N. (1989)

Performance of a new hybrid artificial liver support system using hepatocytes entrapped within a hydrogel.

Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Org. 35, S. 570-572

YONETANI, T. (1960)

Studies on cytochrome oxidase — II. Steady state properties.

J. Biol. Chem. 235 (11), S. 3138-3143

YOSHIDA, M.; WESTLIN, W.F.; WANG, N.; INGBER, D.E.; ROSENZWEIG, A.; RESNICK, N.;

GIMBRONE, M.A.JR. (1996)

Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton.

J.Cell Biol. 133 (2), S. 445-455

YOUNG, S.P. und AISEN, P. (1980)

The interaction of transferrin with isolated hepatocytes.

Biochim. Biophys. Acta 762, S. 145-153

YOUNG, S.P. und AISEN, P. (1988)

The liver and iron.

In: The liver: biology and pathobiology, Second edition

Eds. Arias, M.I.; Jakoby, W.B.; Popper, H.; Schachter, D.; Shafritz, D.A.

Raven Press, Ltd., New York, S. 535-550

Danksagung

Für die hilfreiche Unterstützung und die wertvollen Hinweise und Ratschläge bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Doz. Dr. U. Rothe bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. H. Aurich. Er ermöglichte mir die Durchführung meiner Arbeit im Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät, ohne dessen gerätetechnischen Voraussetzungen eine Bearbeitung dieses Themas nicht möglich gewesen wäre.

Zudem möchte ich mich bei der Deutschen Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen (DECHEMA) für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Abschließend sei den Mitarbeitern der Abteilung Membranbiochemie des Instituts für Physiologische Chemie für ihre Unterstützung und gute kollegiale Zusammenarbeit gedankt.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Weiterhin erkläre ich, daß von mir an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt wurde.

Halle (Saale), den 23.04.1998

Lebenslauf

Name: Hendryk Aurich

Geburtstag/Ort: 15.12.1964 in Zwickau

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1971-1979 Grundschulausbildung
1979-1983 Erweiterte Oberschule (Altsprachen) - Abitur

Wehrdienst: 1983-1986

Berufsausbildung: 1986-1991 4½ -jähriges Hochschulstudium an der Sektion Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Hochschulabschluß mit Gesamtprädikat "Gut", Prädikat des Diploms "Gut"
1991-1995 Promotionsstudium an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit Mai 1995 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle, den 29.04.1998