

Universität Potsdam
Institut für Biochemie und Biologie

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
“doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Biotechnologie

Wechselwirkungen von Immunzellen mit synthetischen und biomimetischen Oberflächen

Dipl. Biol. Katja Heilmann
geb. 1978 in Lutherstadt Wittenberg

Potsdam, den 30.01.2006

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Potsdam

Derjenige, der etwas zerbricht, um herauszufinden,
was es ist, hat den Pfad der Weisheit verlassen.

J.R.R. Tolkien

Gewidmet meinem Großvater, der diesen Pfad nie verlassen hat.

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2002 bis November 2005 an dem Institut für Biochemie und Biologie der Universität Potsdam in Kooperation mit dem Institut für Chemie des GKSS Forschungszentrums in Teltow unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Micheel und Herrn Prof. Dr. Th. Groth angefertigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wechselwirkungen von Immunzellen mit verschiedenen Kultursubstraten untersucht. Dafür wurden drei verschiedene Hybridomzelllinien eingesetzt. Eine Hybridomzelllinie (K2) ist im Laufe dieser Arbeit hergestellt und etabliert worden.

Der Einsatz von synthetischen und proteinbeschichteten Kulturoberflächen führte bei Hybridomzellen zu einer deutlich gesteigerten Antikörpersynthese im Vergleich zu herkömmlichen Zellkulturmaterialien. Obwohl diese Zellen in der Regel als Suspensionszellen kultiviert werden, führten die eingesetzten Polymermembranen (PAN, NVP) zu einer verbesserten Antikörpersynthese (um 30%) gegenüber Polystyrol als Referenz. Es konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Produktivität und dem Adhäsionsverhalten der Hybridomzellen gibt.

Um den Einfluss von Proteinen der extrazellulären Matrix auf Zellwachstum und Antikörpersynthese von Hybridomzellen zu untersuchen, wurden proteinbeschichtete Polystyrol-Oberflächen eingesetzt. Für die Modifikationen wurden Fibronectin, Kollagen I, Laminin und BSA ausgewählt. Die Modifikation der Polystyrol-Oberfläche mit geringen Mengen Fibronectin (0,2-0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führte zu einer beträchtlichen Steigerung der Antikörpersynthese um 70-120%. Für

Kollagen I- und BSA-Beschichtungen konnten Steigerungen von 40% beobachtet werden. Modifikationen der Polystyrol-Oberfläche mit Laminin zeigten nur marginale Effekte. Durch weitere Versuche wurde bestätigt, dass die Adhäsion der Zellen an Kollagen I- und Laminin-beschichteten Oberflächen verringert ist. Die α_2 -Kette des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins konnte auf der Zelloberfläche nicht nachgewiesen werden. Durch ihr Fehlen wird wahrscheinlich die Bindungsfähigkeit der Zellen an Kollagen I und Laminin beeinflusst. Durch die Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Hybridomzellen nicht nur Suspensionszellen sind und das Kultursubstrate das Zellwachstum und die Produktivität dieser Zellen stark beeinflussen können. Der Einsatz von synthetischen und proteinbeschichteten Kultursubstraten zur Steigerung der Antikörpersynthese kann damit für die industrielle Anwendung von großer Relevanz sein.

Für die Modellierung einer Lymphknotenmatrix wurden Fibronectin, Kollagen I, Heparansulfat und N-Acetylglucosamin-mannose in verschiedenen Kombinationen an Glasoberflächen adsorbiert und für Versuche zur In-vitro-Immunsierung eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Modifikation der Oberflächen die Aktivierung und Interaktion von dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten begünstigt, was durch den Nachweis spezifischer Interleukine (IL12, IL6) und durch die Synthese spezifischer Antikörper bestätigt wurde. Eine spezifische Immunreaktion gegen das Antigen Ovalbumin konnte mit den eingesetzten Zellpopulationen aus Ovalbumin-T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen nachgewiesen werden. Die In-vitro-Immunantwort wurde dabei am stärksten durch eine Kombination von Kollagen I, Heparansulfat und N-Acetylglucosamin-mannose auf einer Glasoberfläche gefördert.

Die Etablierung einer künstlichen Immunreaktion kann eine gesteuerte Aktivierung bzw. Inaktivierung von körpereigenen dendritischen Zellen gegen bestehende Krankheitsmerkmale *in vitro* ermöglichen. Durch die Versuche wurden Grundlagen für spezifische Immunantworten erarbeitet, die u.a. für die Herstellung von humanen Antikörpern eingesetzt werden können.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	16
1.1	Das Immunsystem der Vertebraten	16
1.1.1	Die angeborene Immunität	17
1.1.2	Die erworbene Immunität	19
1.1.3	Struktur und Funktion von Immunglobulinen	20
1.2	Techniken für In-vitro-Manipulationen	22
1.2.1	Herstellung monoklonaler Antikörper	22
1.2.2	In-vitro-Immunisierung	23
1.2.3	Wechselwirkungen von Immunzellen mit anderen Zellen und "Matrices"	25
1.2.3.1	Die Familie der Integrine	26
1.2.3.2	Struktur und Signalwirkung von Integrinen	26
1.2.3.3	Integrine und ihre Liganden	29
1.2.3.4	Extrazelluläre Matrix	30
1.2.4	Materialien für biologische Systeme	32
1.2.4.1	Synthetische Polymere für biologische Systeme	33
1.2.4.2	Adsorption von Proteinen an feste Oberflächen für den Einsatz in biologischen Systemen	34
2	Zielstellung	36
3	Material und Methoden	38
3.1	Materialien	38
3.1.1	Geräte	38

Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Chemikalien und Biochemikalien	38
3.1.3	Kulturmedien/Seren	40
3.1.4	Antikörper	40
3.1.5	Mäuse	41
3.1.6	Zelllinien	41
3.2	Herstellung und Charakterisierung der Membranen	41
3.2.1	Zusammensetzung der Acrylnitril-Comonomere	41
3.2.2	Membranformation	42
3.2.3	Randwinkelmessungen	43
3.2.4	Permeabilitätsmessungen	44
3.3	Protein-Charakterisierung	44
3.3.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Coomassie Blau- Färbung	44
3.3.2	Proteinbestimmung	45
3.4	Immunglobulin-Reinigung und -Kopplung	46
3.4.1	Reinigung von Immunglobulinen	46
3.4.2	Kopplung von Antikörpern an Ovalbumin	47
3.4.3	Biotinylierung von Antikörpern	47
3.5	Immunologische Tests	48
3.5.1	Western Blot und Immunologische Detektion der immobi- lisierten Proteine	48
3.5.2	Festphasen-Immunoassay zur Bestimmung der Antikörper- konzentration und der Spezifität	49
3.5.3	Bestimmung von Interleukinen im Kulturüberstand	51
3.5.4	Bestimmung der Konzentration von Maus-Antikörpern in primären Zellkulturen nach den Versuchen zur In-vitro- Immunisierung	52
3.5.5	Nachweis von Aktin und DEC205 in fixierten dendritischen Zellen und T-Lymphozyten	52
3.5.6	Nachweis von Oberflächenantigenen auf Hybridomzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	54
3.6	Hybridomtechnik	54
3.6.1	Kultivierung von Hybridomzellen	54

Inhaltsverzeichnis

3.6.2	Immunisierung von Mäusen	54
3.6.3	Gewinnung von Feeder-Zellen	55
3.6.4	Elektrofusion zur Herstellung von Hybridomzellen	55
3.6.5	Reklonierung und Erweiterung von Hybridomkulturen	56
3.6.6	Gefrierkonservierung	57
3.7	Charakterisierung von kultivierten Zellen	57
3.7.1	Bestimmung der Zelldichte mit dem Lactat-Dehydrogenase-Assay	57
3.7.2	Fluoreszeindiazetat-Färbung	58
3.7.3	Rasterelektronenmikroskopie	58
3.8	Kultivierung von Hybridomzellen auf Polymermembranen und proteinbeschichteten Oberflächen	59
3.8.1	Kultivierung von Hybridomzellen auf Polymermembranen	59
3.8.2	Kultivierung von Hybridomzellen in Polymermembranextrakten	60
3.8.3	Kultivierung von Hybridomzellen auf proteinbeschichteten Oberflächen	60
3.8.4	Inhibierung der Kollagen- und Fibronectinbindungsstellen mit RGD-Peptiden	61
3.8.5	Nachweis Tyrosin-phosphorylierter Proteine bei Hybridomzellen	62
3.9	Versuche zur In-vitro-Immunisierung	63
3.9.1	Erzeugung von primären unreifen dendritischen Zellen aus murinen Knochenmarkszellen	63
3.9.2	Isolierung naiver B- und T-Lymphozytenpopulationen	64
3.9.3	Beschichtung der Glasoberflächen	64
3.9.4	In-vitro-Assays zur Bestimmung von Interleukinen und Antikörpern	65
3.10	Statistische Auswertungen	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Einfluss von Polymermembranen auf das Wachstum und die Produktivität von Hybridomzellen	66

Inhaltsverzeichnis

4.1.1	Charakterisierung der Membranen	66
4.1.1.1	Randwinkelmessungen	66
4.1.1.2	Bestimmung der Durchflussrate von Wasser	66
4.1.2	Zellwachstum und Morphologie von Hybridomzellen	67
4.1.3	Produktion monoklonaler Antikörper durch Hybridomzellen	72
4.2	Wachstum und Produktivität von Hybridomzellen auf proteinbeschichteten Oberflächen	72
4.2.1	Wachstum und Produktivität des Hybridoms H10	73
4.2.2	Wachstum und Produktivität weiterer Hybridome	77
4.2.3	Inhibierung von Zell-Matrix-Interaktionen durch RGD-Peptide	83
4.2.4	Durchflusszytometrische Analysen	84
4.2.5	Bestimmung phosphorylierter Proteine	86
4.3	Versuche zur In-vitro-Immunisierung auf proteinmodifizierten Oberflächen	88
5	Diskussion	96
5.1	Wachstum und Produktivität von Hybridomzellen auf Polymermembranen	96
5.2	Wachstum und Produktivität von Hybridomzellen auf proteinbeschichteten Oberflächen	100
5.3	Versuche zur In-vitro-Immunisierung	104
6	Danksagung	110
	Literaturverzeichnis	112

Abbildungsverzeichnis

1.1	Angeborene und erworbene Immunität	17
1.2	Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls nach Micheel [2003]	20
1.3	Darstellung eines IgM Antikörpermoleküls	21
1.4	Schematische Darstellung der Hybridomtechnik, verändert nach Micheel [2003]	22
1.5	Struktur der Zelladhäsionsmoleküle	25
1.6	Die Familie der Integrine, nach Hynes [2002]	27
1.7	Schematischer Aufbau von Integrinen	28
1.8	Wirkungsweise und Signalgebung von Integrinen	29
3.1	Struktur von Polyacrylnitril (PAN) und der eingesetzten Monomere NVP, NaMAS und APMA	42
3.2	Schematische Darstellung der Randwinkelmessungen, verändert nach Kamusewitz et al. [1991]	43
3.3	Schematische Darstellung der verwendeten Immunoassays	50
3.4	Schematische Darstellung der Interleukin 12-Bestimmung	51
4.1	Wasserrandwinkel der Polymermembranen	67
4.2	Einfluss unterschiedlicher Polymermembranen auf das Wachstum von H10-Zellen	68
4.3	Einfluss von Membranextrakten auf das Wachstum von H10-Zellen	69
4.4	Adhäsion von H10-Zellen bei der Kultivierung auf unterschiedlichen Polymermembranen und Polystyrol	70

Abbildungsverzeichnis

4.5	Morphologie von H10-Zellen nach der Kultivierung auf unterschiedlichen Polymermembranen und Polystyrol	71
4.6	Antikörperproduktion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf unterschiedlichen Polymermembranen und Polystyrol	73
4.7	Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von H10-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Costar	75
4.8	Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von H10-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Nunc	76
4.9	Adhäsion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf proteinbeschichteten Costar-Platten	78
4.10	Adhäsion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf proteinbeschichteten Nunc-Platten	79
4.11	Morphologie von H10-Zellen nach der Kultivierung auf proteinbeschichteten Oberflächen und Polystyrol	80
4.12	Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von E11AE11-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Costar	81
4.13	Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von E11AE11-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Nunc	82
4.14	Inhibierung der Zelladhäsion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf Fibronectin-modifizierten Costar-Platten	83
4.15	Einfluss der RGD-Peptide auf die Adhäsion von H10-Zellen in Kollagen I-modifizierten Costar-Platten	84
4.16	Ergebnisse der FACS-Analyse für H10-Zellen	85
4.17	Ergebnisse der FACS-Analyse für E11AE11-Zellen	86
4.18	Bestimmung des Proteingehaltes für Zelllysate von H10-Zellen und humanen Fibroblasten auf unbehandelten und Fibronectin-modifizierten Polystyrol-Oberflächen	87
4.19	Detektion Tyrosin-phosphorylierter Proteine in den Zelllysaten von H10-Zellen und humanen Fibroblasten (HF) auf unbehandelten und Fibronectin-modifizierten Polystyrol-Oberflächen	88
4.20	Schematische Darstellung der In-vitro-Immunisierung	89
4.21	Phasenkontrastaufnahmen von dendritischen Zellen und T-Lymphozyten	90

Abbildungsverzeichnis

4.22	Immunfluoreszenzfärbung von A) aktivierten dendritischen Zellen und T-Lymphozyten mit Bodipy Phalloidin und B) aktivierten dendritischen Zellen mit Bodipy Phalloidin und α CD205-FITC . . .	91
4.23	Interleukin 6-Freisetzung von Balb/c- und TgNDO11.10-Zellen nach Stimulierung mit Ovalbumin und Concanavalin A	92
4.24	Interleukin 12-Freisetzung von Balb/c- und TgNDO11.10-Zellen nach Stimulierung mit Ovalbumin und Concanavalin A	93
4.25	Gesamtimmunglobulingehalt in Ansätzen von Balb/c- und TgNDO11.10-Zellen	94
4.26	Nachweis Ovalbumin- und ConA-spezifischer Antikörper von Zellen aus Balb/c- und TgNDO 11.10-Mäusen	95

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht der auf Leukozyten exprimierten Integrine, nach Schaffner und Dard [2003]	30
3.4	Syntheseparameter und Charakteristika der Polymere	42
3.5	Verwendete Puffer	45
4.1	“Fouling“ von Polymermembranen vor und nach der Proteinadsorption	68

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Ak	Antikörper
AN	Acrylnitril
AP	Alkalische Posphatase
APMA	3-Amino-Propylmethacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
BSS	engl.: balanced salt solution
CD	engl.: Cluster of Differentiation
CFA	Komplettes Freund´sches Adjuvanz (engl.: complete freund´s adjuvanz)
Con A	Concanavalin A
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	engl.: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FDA	Fluoreszeindiazetat
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GOD	Glukoseoxidase
h	Stunde

Abkürzungsverzeichnis

HAT	Selektionsmedium für Hybridomzellen (HAT = Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KLH	Hämocyanin aus <i>Megathura cremulata</i> (engl.: keyhole limpet hemocyanin)
KÜ	Kulturüberstand
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NaMAS	Natrium-2-Methyl-2-Propen-1-Sulfonsäure
ng	Nanogramm
NKS	neonatales Kälberserum
NVP	N-vinylpyrrolidon
OPD	Orthophenylendiamin
OVA	Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAN	Polyacrylnitril
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PBS/5% NKS	PBS mit 5% (v/v) NKS
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
pg	Picogramm
POD	Meerrettichperoxidase
RGD	Arginin-Glycin-Asparagin
rm-GMCSF	Rekombinanter muriner Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor
RPMI 1640	Zellkulturmedium für Säugerzellen (RPMI = Roswell Park Memorial Institute)

Abkürzungsverzeichnis

RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
TEMED	N,N,N',N',-tetra-Methylethyldiamin
Tris	tris(Hydroxymethyl-)aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaureat
ZAMAK	Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörper

1 Einleitung

Erkrankungen durch Infektionserreger zählen mit zu den bedeutendsten Problemen der Medizin und stellen auch heute noch große Anforderungen an die Grundlagenforschung. Die Entwicklung effektiver Impfstoffe und neuer Antibiotika ist zwingend notwendig, um diese Gefahr einzudämmen. Zwar verfügt jeder menschliche Organismus über ein hochspezifisches Immunsystem, jedoch haben Krankheitserreger viele Mechanismen entwickelt, dieses zu umgehen. Vor allem die Entartung körpereigener Zellen und die daraus resultierenden Krebserkrankungen gelten als besonders schwierig in ihrer Bekämpfung. Daher existiert schon seit langem das Bestreben, die Immunantwort *in vitro* zu manipulieren. Ein wichtiger Meilenstein dieser Manipulationen ist die Generierung spezifischer Antikörper aus Mäusen und Menschen, die gegen Krankheiten eingesetzt werden können. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den unterstützenden Funktionen von Kultivierungsoberflächen, um bessere Bedingungen für *in vitro* Kultivierungen von Antikörper-bildenden Zellen zu finden.

1.1 Das Immunsystem der Vertebraten

Nach der Entdeckung der Immunabwehr und der Entwicklung erster Impfmethoden durch Edward Jenner (1749-1823) begannen grundlegende Untersuchungen am Immunsystem. Das Immunsystem umfasst Organe, Zellen und Proteine, deren Funktion in der Bekämpfung körperfremder Substanzen und Erreger wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilzen besteht [van den Tweel, 1999]. Es werden im Allgemeinen zwei Subsysteme der Pathogenerkennung und -eliminierung unterschieden: die angeborene und die erworbene Immunität (s. Abb. 1.1).

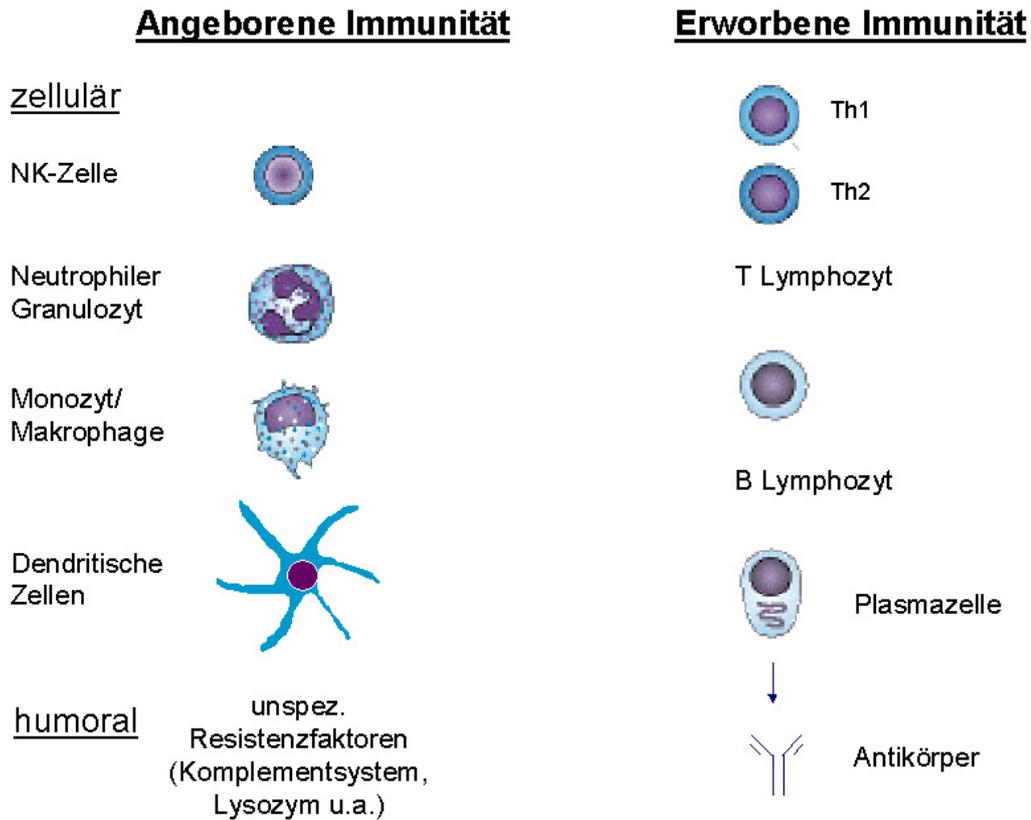


Abbildung 1.1: Angeborene und erworbene Immunität.

Darstellung der beteiligten Zelltypen während einer Immunreaktion

1.1.1 Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität ermöglicht die Eliminierung von Krankheitserregern und Fremdkörpern bereits beim ersten Kontakt, da die beteiligten Faktoren (un-spezifische Resistenz) über die Keimbahn vererbt werden. Dazu zählen auch physikalische Barrieren wie die Haut und das saure Milieu im Magen. Weitere Faktoren sind Lysozym in Tränen- und Speichelflüssigkeit und das Komplementsystem.

Das Komplementsystem ist in der Lage, körperfremde und infizierte Zellen aufzulösen. Es besteht aus mehr als 20 Eiweißkomponenten, die in der Leber synthetisiert werden. Durch die Bildung terminaler zytolytischer Komplexe (MAC = Membrane Attack Complex) können infizierte Zellen zerstört werden. Weiterhin

1 Einleitung

markieren sie Krankheitserreger für Phagozyten, indem sie u.a. den konstanten Teil von Antikörpern binden.

Zu den Phagozyten ("Fresszellen") zählt man neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, die Krankheitserreger aufnehmen und "verdauen". Die Endozytose von Krankheitserregern wird erleichtert, wenn diese schon durch Antikörper und Komplement markiert sind.

Makrophagen und dendritische Zellen gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen, da bei ihnen die Endozytose von Krankheitserregern in das Phagosom zu einer intrazellulären Verarbeitung (Antigenprozessierung) der Antigene führt. Nach dem Verschmelzen von Phagosom und Lysosom spalten proteolytische Enzyme das Antigen in Peptide. Diese immunogenen Peptide werden wieder an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. Die Präsentation erfolgt über Peptidstrukturen auf MHC-Komplexen (major histocompatibility complex), wobei man zwischen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Komplexen unterscheidet. MHC-Klasse-I-Komplexe werden von allen Zelltypen exprimiert und präsentieren Peptide von Pathogenen, die ins Cytosol gelangt sind. Auf MHC-Klasse-II-Komplexen werden Peptidfragmente von Pathogenen präsentiert, die in intrazellulären Vesikeln abgebaut wurden. Diese Komplexe werden hauptsächlich von Immunzellen exprimiert. Eine Präsentation ist notwendig, um T-Lymphozyten zu aktivieren. Phagozyten werden als zellulärer Faktor der angeborenen Immunabwehr bezeichnet und treten als Vermittler zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität auf.

Dendritische Zellen entstehen im Knochenmark aus hämatopoietischen Stammzellen. Im naiven Zustand wandern sie durch das Blut und die Lymphe, um antigene Substanzen aufzunehmen. Nach der Aufnahme beginnt ein Reifeprozess, der u.a. die Ausbildung von MHC-Molekülen zur Folge hat und eine gezielte Wanderung der Zellen in den Paracortex-Bereich der Lymphknoten auslöst. Der Paracortex des Lymphknotens besteht aus einem Kollagen-Fasernetz, in das sich die Zellen einnisten. In diesem Stadium werden die Zellen als interdigitierende Zellen bezeichnet. Es erfolgt eine Änderung der Morphologie, die hauptsächlich durch die Ausbildung langer Fortsätze, sogenannter Dendriten, gekennzeichnet ist. Die Prozessierung des zuvor aufgenommenen Antigens führt zur Präsentation antigener Peptide über MHC-Moleküle, welche auf den Dendriten lokalisiert sind.

Das ist die Voraussetzung für die Kontaktaufnahme zu naiven T-Lymphozyten, die im Laufe ihrer Entwicklung durch den Paracortex des Lymphknotens wandern und somit gegen das Antigen aktiviert werden [Banchereau und Steinman, 1998]. Die Migration naiver Lymphozyten in sekundäre lymphoide Organe ist notwendig für die Aktivierung gegen Antigene [Leuker et al., 2001].

1.1.2 Die erworbene Immunität

Die erworbene Immunität beruht auf antigen-spezifischen Reaktionen und wird auch als adaptive Immunität bezeichnet. Die spezifische Immunantwort wird durch Lymphozyten vermittelt. Lymphozyten sind eine Untergruppe der Leukozyten und werden in T- und B-Lymphozyten unterschieden. Die Entwicklung beider Zellpopulationen aus hämatopoietischen Stammzellen beginnt im Knochenmark. Während die T-Lymphozyten zur Ausreifung in den Thymus wandern, verbleiben die B-Lymphozyten bis zur Reifung im Knochenmark. Thymus und Knochenmark werden als primäre Lymphorgane bezeichnet.

Nach der abgeschlossenen Differenzierung zirkulieren beide Zellpopulationen als naive Zellen durch Blutgefäße und sekundäre lymphatische Organe wie Milz, Lymphknoten oder Peyer'sche Plaques.

B-Lymphozyten vermitteln die humorale Immunantwort. Sie sind in der Lage, Antigene selbst zu erkennen und sich, nach einer Aktivierung durch T-Helfer-Zellen, in antikörperproduzierende Plasmazellen zu differenzieren. Die Sekretion spezifischer Antikörper tritt in der Regel nach drei bis sechs Tagen ein. Nach dieser Immunantwort verfügt der Organismus über Gedächtnis-Zellen, die in Zukunft eine schnellere Antwort auf das gleiche Antigen gewährleisten.

T-Lymphozyten müssen, um auf antigene Strukturen zu reagieren, durch antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen oder Makrophagen, aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt hauptsächlich über MHC-Peptid-Komplexe. T-Lymphozyten differenzieren dann entweder in zytotoxische T-Zellen ($CD8^+$), die in der Lage sind, infizierte Zellen zu lysieren oder in T-Helfer-Zellen ($CD4^+$). Bei der Differenzierung in T-Helfer-Zellen entstehen inflammatorische Zellpopulationen, die Makrophagen (TH1-Zellen) oder B-Lymphozyten (TH2-Zellen) aktivieren können. Ein Teil der T- und B-Lymphozyten entwickelt sich nach

1 Einleitung

erfolgreicher Aktivierung zu T- bzw. B-Gedächtniszellen, so dass eine spätere Infektion mit gleichen Erregern schnellere und verstärkte Immunreaktionen auslösen. Die spezifische Differenzierung wird u.a. durch Zytokine gesteuert. Angeborene und erworbene Immunität wechselwirken über verschiedene Wege miteinander, um eine effektive Immunreaktion zu gewährleisten.

1.1.3 Struktur und Funktion von Immunglobulinen

Als Hauptbestandteil der humoralen Immunantwort wird die Sekretion von antigenspezifischen Immunglobulinen angesehen. Diese Proteine werden von B-Lymphozyten synthetisiert, die zunächst über membrangebundenes Immunglobulin auf der Oberfläche (B-Zell-Rezeptor) verfügen. B-Zell-Rezeptoren werden während der Reifung im Knochenmark durch somatische Rekombination gebildet. Dabei entstehen die vielfältigen Spezifitäten für die Erkennung von Antigenen. Antikörper sind die von Plasmazellen sezernierte Form dieses B-Zell-Rezeptors mit der gleichen Spezifität. Antikörpermoleküle sind Y-förmige globuläre Proteine, die aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Ketten bestehen (s. Abb. 1.2).

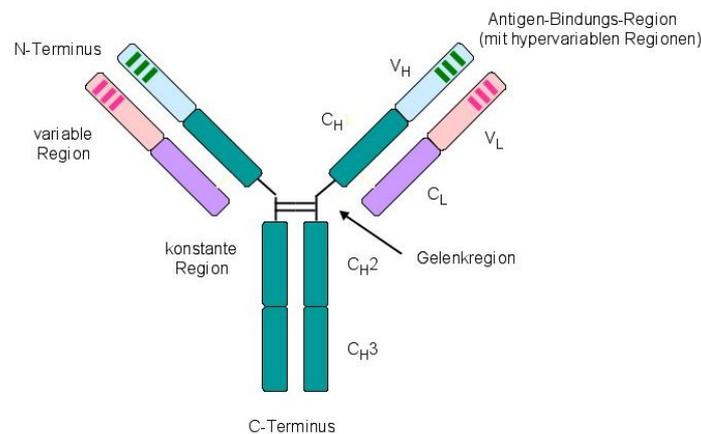


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls nach Micheel [2003]

Die Verknüpfung der schweren und leichten Ketten des Antikörpers wird durch Disulfidbrücken realisiert. Sowohl die schweren als auch die leichten Ketten besit-

1 Einleitung

zen variable und konstante Regionen, wobei die variable Region am Aminoterminus und die konstante Region am Carboxyterminus lokalisiert ist. Durch diese Struktur entstehen zwei identische Antigen-Bindungsstellen, die eine Bindung an zwei gleiche Antigen determinanten möglich machen. Die konstanten Bereiche eines Antikörpers dienen der Aktivierung des Komplementsystems und der Bindung von Effektorzellen.

Die Klasse eines Antikörpers und viele seiner Effektorfunktionen werden durch die Struktur der schweren Ketten bestimmt. Im humanen und murinen Immunsystem gibt es fünf verschiedene Immunglobulinklassen: Immunglobulin M (IgM), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin G (IgG), Immunglobulin A (IgA) und Immunglobulin E (IgE). IgM ist das erste Immunglobulin, das eine antikörperproduzierende Zelle bildet. Aufgrund der als Pentamer vorliegenden Struktur kann eine multispezifische und schnelle Immunantwort gewährleistet werden, bis durch somatische Hypermutation Antikörper mit besserer Spezifität und Affinität gebildet werden, z.B. IgG (s. Abb. 1.3).

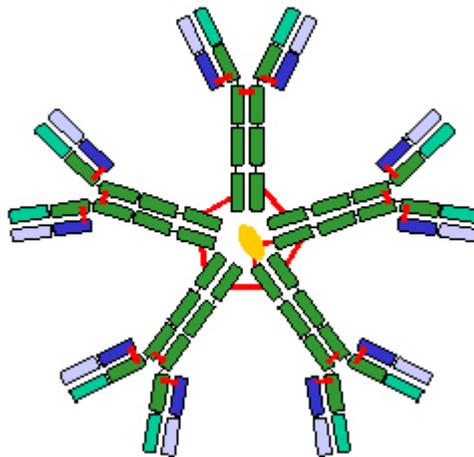


Abbildung 1.3: Darstellung eines IgM Antikörpermoleküls

Es können mehrere IgG-Subklassen (beim Menschen IgG1, 2, 3 und 4) unterschieden werden. Diese Immunglobuline verfügen über eine hohe Affinität zum Antigen und dienen der spezifischen Eliminierung des Erregers.

Antikörper sind ein grundlegender Teil der Immunantwort und werden aufgrund ihrer Spezifität in der Industrie und der Forschung häufig für Untersuchungen

1 Einleitung

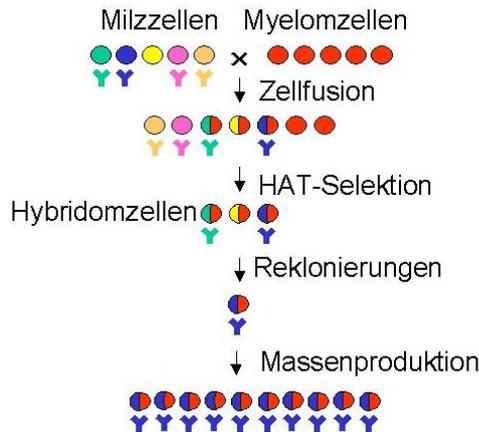


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Hybridomtechnik, verändert nach Micheel [2003].

Verwendete Abkürzungen: HAT - Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin

eingesetzt. Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gilt als eine der wichtigsten Entwicklungen in der Biomedizin, weil diese Proteine sehr variabel gegen jedes Zielmolekül einsetzbar sind und über eine hohe Stabilität verfügen. Damit sind sie für die Immuntherapie und -diagnostik unerlässlich geworden.

1.2 Techniken für In-vitro-Manipulationen

1.2.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

Die Herstellung monoklonaler Antikörper beruht auf der von Köhler und Milstein [1975] entwickelten Hybridomtechnik (s. Abb. 1.4).

Das Prinzip dieser Technik besteht darin, antikörperproduzierende Zellen durch die Fusion mit Myelomzellen “unsterblich“ zu machen, da B-Lymphozyten *in vitro* nur begrenzt lebensfähig sind. Die verwendeten Myelomzelllinien sind unbegrenzt wachsende Zellen, die keine Antikörper mehr produzieren. Nach der Fusion erhält man Hybridzellen, die die Eigenschaften beider Elternzellen (tumorähnliches unbegrenzt Wachstum und Antikörper-Produktion) in sich vereinen und Hybridomzellen genannt werden.

Die Selektion von Hybridomen erfolgt unter Ausnutzung der Hypoxanthin-Guanin-

1 Einleitung

Phosphoribosyl-Transferase-Defizienz (HGPRT-Defizienz) der betreffenden Myelomzellen. Damit sind sie nicht in der Lage, den Alternativweg zur Purinsynthese zu nutzen. B-Lymphozyten besitzen dieses Enzym noch, überleben aber in Kultur nur wenige Tage. Durch die Zugabe von Aminopterin bzw. Azaserin in das Selektionsmedium wird der Hauptweg der Purinsynthese geblockt, so dass nur Zellen überleben können, die das Enzym HGPRT besitzen. Eine Kultivierung im entsprechenden HAT-Medium sorgt somit für das Absterben der nicht fusionierten und für das Überleben der fusionierten Zellen. Die Hybridome, die den gewünschten Antikörper produzieren, werden anschließend erweitert, kloniert und cryokonserviert.

Monoklonale Antikörper werden in der Industrie in Fermentern, Bioreaktoren oder in Zellimmobilisierungs- und Perfusionssystemen hergestellt [Lowrey et al., 1994]. Hybridomzellen werden dabei häufig in Suspension kultiviert [Tharakan und Chau, 1985]. Da Hybridomzellen während der Kultivierung aber auch Kontakte zum Substrat aufbauen und sich diese adhäsiven Wechselwirkungen auf das Wachstum und die Antikörpersynthese dieser Zellen auswirken können, wird nach neuen Materialien gesucht, die das adhäsive Verhalten von Immunzellen berücksichtigen, um so höhere Produktivitäten zu erzielen. In der Bioreaktortechnologie werden dazu Hohlfasermembranen mit definierten Porengrößen eingesetzt, um Antikörper im äußeren Kompartiment anzureichern und so die Produktkonzentration zu erhöhen.

1.2.2 In-vitro-Immunisierung

Die Immunreaktion *in vivo* ist ein sehr komplexer Vorgang, an dem viele Zellpopulationen und Botenstoffe beteiligt sind. Antigene, die in den Körper gelangen, werden von Makrophagen oder dendritischen Zellen phagozytiert, prozessiert und präsentiert. Da die Wechselwirkungen dendritischer Zellen mit T- und B-Lymphozyten eine elementare Voraussetzung für die Einleitung einer Immunantwort darstellen, werden mittlerweile unterschiedliche Ansätze getestet, um die Immunantwort *in vitro* steuern zu können. Die Bezeichnung "In-vitro-Immunisierung" wurde in der Literatur mit verschiedenen Bedeutungen gebraucht. Die frühen Arbeiten von Borrebaeck et al. [1988] z.B. beschreiben

1 Einleitung

die Aktivierung von B-Lymphozyten *in vitro* für die Herstellung humaner Antikörper als In-vitro-Immunisierung. An einer Immunantwort sind allerdings weitaus mehr Komponenten beteiligt.

Es werden zunehmend auch Strukturen der extrazellulären Matrix als unterstützende und stimulierende Faktoren in die Kulturbedingungen miteinbezogen. Für die Gestaltung geeigneter *in vitro*-Konditionen werden derzeit zwei-oder auch dreidimensionale Kollagenmatrices erprobt, in denen dendritische Zellen hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens und der Interaktion mit T-Lymphozyten untersucht werden [Tasaki et al., 2004; Gunzer et al., 2000; Rao et al., 2000]. Dabei handelte es sich meist um Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von Lymphozyten in einer dreidimensionalen Kollagenmatrix erhöhte zytotoxische Antworten zur Folge hat [Kubota und Tamauchi, 1988]. Allerdings ist für den Ablauf einer Immunantwort *in vivo* nicht nur eine Matrixkomponente ausschlaggebend. Die vielfältigen Funktionen extrazellulärer Matrixproteine und das Zusammenspiel dieser mit den betreffenden Zelltypen ist grundlegend für fast alle Vorgänge in einem Organismus. Die hier vorgestellten Untersuchungen sollen dazu beitragen, Teilschritte für eine vollständige immunologische Aktivierung *in vitro* zu erarbeiten.

Für die Antigenaufnahme von dendritischen Zellen gelten besonders mannosylierte Strukturen, unmethylierte CpG-Motive bakterieller DNA und doppelsträngige RNA von Viren unter *in vivo*-Bedingungen als verstärkender Auslöser. Diese Strukturen werden durch spezifische Rezeptoren erkannt, die man als "Pattern Recognition Receptors" (PRRs) bezeichnet und die zur Familie der C-Typ Lektine gehören [Engering et al., 2002]. N-Acetylglucosamin-mannose z.B. verstärkt die Bindungsfähigkeit der Rezeptoren um das 5-25fache [Figdor et al., 2002].

Die Aktivierung der dendritischen Zellen zeigt sich, neben der Expression von MHC-Molekülen und der Überexpression von Rezeptoren (z.B. CD205), vor allen Dingen auch in der Sekretion von Zytokinen (IL12 bzw. IL6). Zytokine haben vielfältige proinflammatorische, immunregulatorische und entzündungssteuernde Funktionen. Man unterteilt sie u.a. in Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren und Tumornekrosefaktoren. Nach der Aktivierung werden von dendritischen Zellen hauptsächlich die Interleukine 12 und 6 sezerniert, um naive T-Lymphozyten zusätzlich anzulocken und zu stimulieren [Cumberbatch et al.,

1996]. Interleukin 12 fungiert als regulatorisches Zytokin, welches die Differenzierung von T-Lymphozyten steuert und die zell-vermittelte Immunität unterstützt [Winzler et al., 1997]. Interleukin 6 ist wichtig für die Kommunikation zwischen T- und B-Lymphozyten im Laufe einer Immunantwort [Cumberbatch et al., 1996].

1.2.3 Wechselwirkungen von Immunzellen mit anderen Zellen und “Matrices“

Die Zellen des Immunsystems wandern während ihrer Entwicklung von naiven Leukozyten zu aktivierten Immunzellen von den Blutgefäßen zum Lymphsystem bzw. in periphere infizierte Gewebe. Dazu müssen sie das Endothel und die darunter liegende Matrix durchqueren. Dieser Vorgang wird durch Adhäsionsmoleküle (CAMs für “Cell Adhesion Molecules“) vermittelt (s. Abb. 1.5).

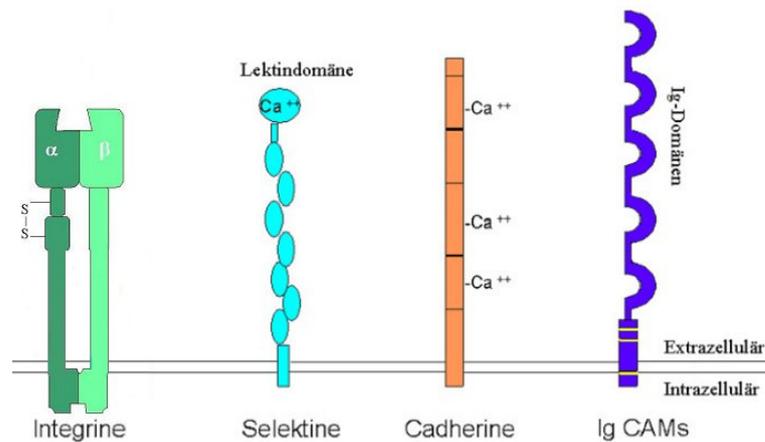


Abbildung 1.5: Struktur der Zelladhäsionsmoleküle

Durch die Vermittlung von Zell-Zell-Interaktionen und Wechselwirkungen von Immunzellen mit der extrazellulären Matrix werden grundlegende Prozesse wie Migration, Extravasation, “Homing“, “Rolling“ und die Antikörperantwort von B-Lymphozyten realisiert [Springer, 1990]. Adhäsionsmoleküle lassen sich allgemein in vier Hauptklassen einteilen: Cadherine, Selektine, Adhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie und Integrine [Isacke und Horton, 2000].

Cadherine sind Calcium-abhängige Adhäsionsmoleküle, die hauptsächlich für die stabile interzelluläre Adhäsion in vielen Geweben verantwortlich sind [Hirano et al., 1987]. Selektine bilden die Familie lektinartiger Adhäsionsmoleküle, die den Kontakt und das “Rolling“ von Leukozyten auf der Endotheloberfläche vermitteln [Hammel et al., 2001]. Zur Immunglobulinsuperfamilie gehören neben den T- und B-Zell-Rezeptoren auch die interzellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1, -2 und -3, die als Liganden für β_2 -Integrine fungieren [McLeod et al., 2004].

Integrine sind bedeutend für die Vermittlung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten und haben damit einen großen Einfluss auf das adhäsive Verhalten von Zellen. In dieser Arbeit wurden u.a. Integrine von Hybridomzellen untersucht, weshalb nachfolgend detaillierter auf die Familie der Integrine eingegangen wird.

1.2.3.1 Die Familie der Integrine

Integrine gehören zu einer weitverbreiteten Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren, die in tierischen Organismen die Verankerung von Zellen in der extrazellulären Matrix vermitteln und mechanische und chemische Signale weitergeben. Sie sind Bestandteil von Signalkaskaden, welche die Aktivität von zytoplasmatischen Kinasen, von Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, von Ionenkanälen und die Organisation des intrazellulären Aktin-Zytoskeletts regulieren [Giancotti und Ruoslahti, 1999]. Integrine “integrieren“ das Cytoskelett der Zelle in das Gerüst der extrazellulären Matrix [Hynes, 1987]. Sie ermöglichen die Anlagerung von Lymphozyten an antigenpräsentierende Zellen und von Blutplättchen an Fibrinogen [Hynes, 1992]. Außerdem spielen sie eine entscheidene Rolle beim Gewebeaufbau und der Zellwanderung in der Embryonalentwicklung [Albelda und Buck, 1990; Darribere et al., 2000]. Bei Säugetieren sind bis heute 24 spezifische Integrine gefunden worden (s. Abb. 1.6).

1.2.3.2 Struktur und Signalwirkung von Integrinen

Integrine sind heterodimere transmembrane Glykoproteine. Die α - und β -Untereinheiten sind nicht kovalent miteinander verknüpft (s. Abb. 1.7). Zur Zeit sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt [Humphries et al., 2003].

1 Einleitung

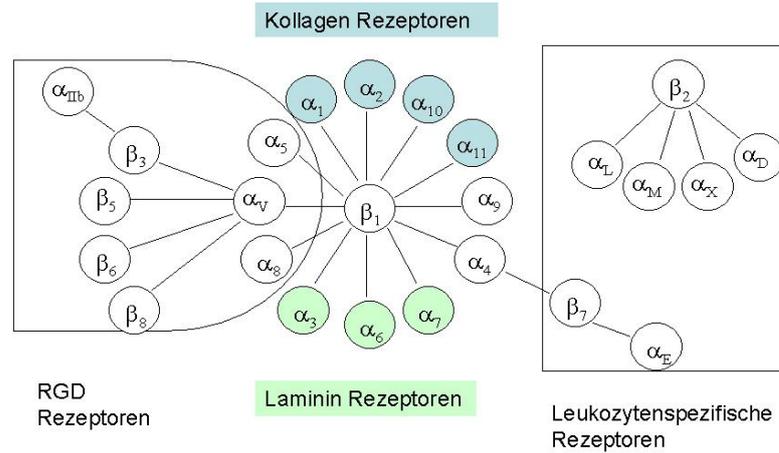


Abbildung 1.6: Die Familie der Integrine, nach Hynes [2002].

Verwendete Abkürzungen: RGD - R Arginin, G Glycin, D Aspartat

Die Untereinheiten bestehen jeweils aus einer großen extrazellulären Domäne (bis zu 1114 Aminosäuren für die α - und bis zu 678 Aminosäuren für die β -Untereinheiten), einer transmembranen und einer kleinen zytoplasmatischen Domäne (15 bis 77 Aminosäuren für die α - und 46 bis 60 Aminosäuren für die β -Untereinheit; als Ausnahme gilt die β_4 -Untereinheit mit 1750 Aminosäuren). Jede bisher bekannte Kombination der Untereinheiten hat eine eigene Bindungsspezifität und Signalfunktion.

Eine weitere Funktion ist das bidirektionale Vermitteln von Signalen von außen in die Zelle (outside-in-signaling) oder umgekehrt vom Inneren der Zelle nach außen (inside-out-signaling) [Kim et al., 2003]. Die Wirkungsweise und Signalgebung von Integrinen ist in der Abbildung 1.8 dargestellt.

Das "outside-in-signaling" ist dadurch gekennzeichnet, dass durch die Ligandenbindung intrazelluläre Signalwege (z.B. JAK/STAT- oder Ras/MAPK-Signalwege) aktiviert werden. Durch die Bindung der Integrine an Bestandteile der extrazellulären Matrix erfolgt ein "Clustering" mit anderen gebundenen Integrinen zu hoch kondensierten intrazellulären Komplexen, sog. "Focal Adhesions". In diesen Komplexen befinden sich hohe Konzentrationen zytoskelettaler Proteine und Signalmoleküle, wie z.B. α -Actinin, Filamin, Talin und Tensin, aber auch Vinculin, Paxillin und Proteine, die während der Adhäsion an Tyrosinresten

1 Einleitung

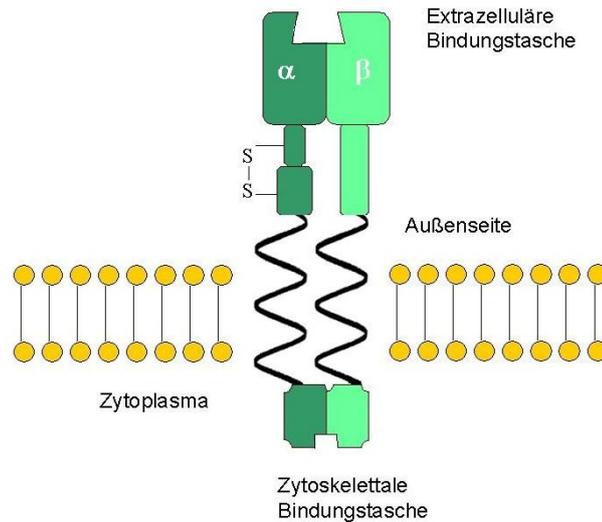


Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau von Integrinen

phosphoryliert werden [Geiger et al., 2001].

Durch die Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe kommt es zur Aggregation der Integrine und der Signalmoleküle, was eine Aktivierung verschiedener Tyrosin-Kinasen zur Folge hat. Die wichtigsten Signalmoleküle sind dabei die fokale Adhäsionskinase (FAK) und Proteine, die mit dem Zellskelett verbunden sind, wie Paxillin oder Tensin [Ruoslahti, 1997].

Beim “inside-out-signaling“ wird die extrazelluläre Domäne der Integrine durch intrazelluläre Signale aktiviert. Dabei bedingt ein Konformationswechsel der zytoskelettalen Domäne die Aktivierung der extrazellulären Domäne und damit eine gesteigerte Affinität, Liganden der extrazellulären Matrix zu binden.

Die Ligandenbindung der Integrine kann so von der Zelle selbst reguliert werden. Dies schützt vor zu starker Integrin-vermittelter Zelladhäsion, welche z.B. bei aggregierenden Thrombozyten pathologische Konsequenzen haben könnte. Durch diese zwei Wege der Signalübertragung wird eine spezifische Kommunikation zwischen den Zellen untereinander und ihrer Umgebung gewährleistet. Die Verbindung von intrazellulären und extrazellulären Prozessen hat einen großen Einfluss auf den gesamten Zellmetabolismus. Störungen in der Funktion von Integrinen sind assoziiert mit Krankheiten wie Thrombose, Arteriosklerose, Krebs und chronisch inflammatorischen Erkrankungen [Qin et al., 2004].

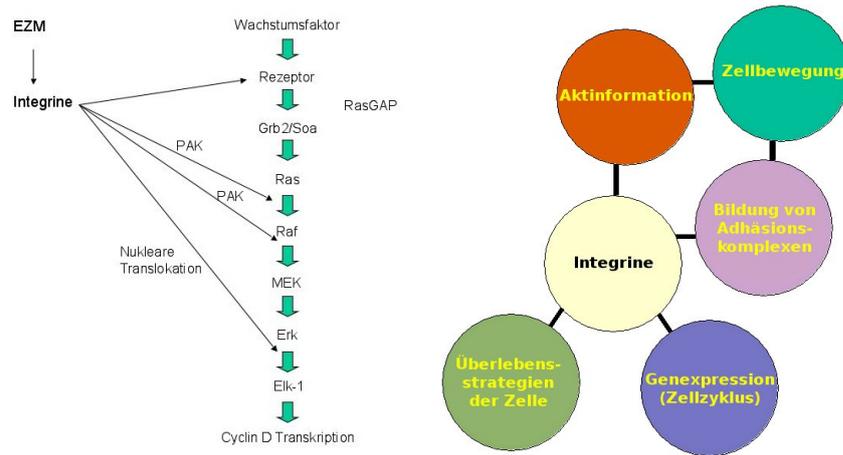


Abbildung 1.8: Wirkungsweise und Signalgebung von Integrinen.

Die Darstellung links zeigt als Beispiel den Ras/Erk-Signalweg für durch Integrine aktivierte Signalkaskaden.

1.2.3.3 Integrine und ihre Liganden

Die Bindung an die Liganden wird durch das globuläre Kopfstück der Integrine gewährleistet, das durch zwei lange Stelzen-Regionen mit der transmembranen und der zytoplasmatischen Domäne verbunden ist (s. Abb. 1.7). In ihrer Ligandenbindung zeigen Integrine eine große Varianz. Es gibt Integrine, die spezifisch und hoch selektiv nur einen Liganden binden, wie $\alpha_6\beta_1$ an Laminin, aber auch Integrine, die ein großes Spektrum an Bindungspartnern aufweisen (s. Tab. 1.1). Außerdem gibt es lösliche Integrinliganden wie Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aber auch einige Bakterien und Viren, die eine Bindung mit Integrinen eingehen [van der Flier und Sonneberg, 2001].

Integrin	alternative Bezeichnungen	charakterisierte Liganden
$\alpha_1\beta_1$	VLA-1, CD49a./CD29	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_2\beta_1$	VLA-2, CD49b/CD29	Kollagen I und IV, Laminin
$\alpha_3\beta_1$	VLA-3, CD49c/CD29	Kollagen I, Laminin, Fibronectin, Epiligrin
$\alpha_4\beta_1$	VLA-4, CD49d/CD29	VCAM-1, Fibronectin
$\alpha_5\beta_1$	VLA-5, CD49e/CD29	Fibronectin

1 Einleitung

Integrin	alternative Bezeichnungen	charakterisierte Liganden
$\alpha_6\beta_1$	VLA-6, CD49f/CD29	Laminin
$\alpha_L\beta_2$	LFA-1, CD11a/CD18	ICAM-1, -2, -3, -4, -5
$\alpha_M\beta_2$	Mac-1, CD11b/CD18	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen, Faktor X
$\alpha_X\beta_2$	p150, p95, CD11c/CD18	Fibrinogen, iC3b, CD23
$\alpha_D\beta_2$	CD11d/CD18	ICAM-3, VCAM-1
$\alpha_V\beta_3$	CD51/CD61	Vitronektin, Fibrinogen, Fibronektin, Kollagen
$\alpha_4\beta_7$	CD49d/-	MAdCAM-1, Fibronektin, VCAM-1
$\alpha_E\beta_7$		E-Cadherin

Tabelle 1.1: Übersicht der auf Leukozyten exprimierten Integrine, nach Schaffner und Dard [2003].

Verwendete Abkürzungen: VLA very late antigen; LFA-1 lymphocyte function-associated antigen 1; VCAM vascular cell adhesion molecule; ICAM intercellular adhesion molecule; iC3b inaktivierte Form von C3b; MAdCAM mucosal cell adhesion molecule.

Wichtig für die Bindung vieler Integrine ist die minimale essenzielle Zelladhäsionssequenz RGD (Arginin; Glycin; Aspartat) in den Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM). Die Sequenz wurde 1984 von Pierschbacher und Ruoslahti beim EZM-Protein Fibronektin entdeckt und als Bindungsepitop für Integrine identifiziert [Pierschbacher und Ruoslahti, 1984]. Die RGD-Sequenz wurde seitdem in vielen weiteren EZM-Proteinen nachgewiesen.

1.2.3.4 Extrazelluläre Matrix

Für das Wachstum und die Funktion aller Zelltypen spielen Interaktionen mit den Komponenten der extrazellulären Matrix eine große Rolle. Als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet man Makromoleküle, die von den Zellen des interstiellen Bindegewebes produziert und sezerniert werden. Diese Makromoleküle formen ein komplexes fibrilläres Netzwerk, welches den Raum zwischen den Zel-

1 Einleitung

len ausfüllt [Shimizu und Shaw, 1991]. In dieses Netzwerk sind eine Vielzahl von Komponenten involviert. Die wichtigsten werden nachfolgend kurz beschrieben. Die grundlegende fibrilläre Struktur wird durch Kollagene gewährleistet. Kollagene sind ubiquitäre Proteine, die aufgrund der Fibrillenbildung die strukturelle Integrität von Organismen bewahren. Dabei können mehr als 20 verschiedene Kollagene beteiligt sein, die hauptsächlich von Fibroblasten, Myofibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten synthetisiert werden [Bosman und Stamenkovic, 2003].

Ein weiterer gut charakterisierter Bestandteil der extrazellulären Matrix ist das dimere Glykoprotein Fibronectin, welches in Gewebe, Plasma und auf Zelloberflächen vorkommt. Fibronectin verfügt über eine Vielzahl adhäsiver Domänen, die die Bindung an Zellen, Kollagene, Heparin und Heparansulfat vermitteln [Yamada, 1989]. Wie Fibronectin zählt auch Laminin zu den Adhäsionsproteinen. Laminin ist ein Glykoprotein (900 kDa) aus drei Polypeptid-Ketten (A, B1, B2), welches als Adapter Kontakte zu Zellen und auch zu anderen Proteinen aufbauen kann [Beck et al., 1990].

Proteoglykane stellen einen weiteren grundlegenden Baustein der extrazellulären Matrix dar, weil sie u.a. Botenstoffe wie Zytokine binden können und damit ein Reservoir bilden [Bosman und Stamenkovic, 2003]. Zur Gruppe der Proteoglykane zählen verschiedene Glukosaminoglykane wie Hyaluronsäure, Heparansulfat oder Dermatansulfat, die zusätzlich an Proteine gebunden sein können. Proteoglykane sind durch die Vermittlung von Wechselwirkungen innerhalb der extrazellulären Matrix wichtig für die Organisation des umliegenden Gewebes und die Kommunikation zwischen den Zellen [Sugahara und Kitagawa, 2000].

Der Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix erfolgt hauptsächlich durch Matrix-Metalloproteinasen. Dabei handelt es sich um proteolytische, Zink-haltige Enzyme, die sich in der Membran von Zellen des interstitiellen Bindegewebes befinden oder von den entsprechenden Zellen sezerniert werden. Matrix-Metalloproteinasen weisen unterschiedliche Substrat-Spezifitäten auf, können aber in Kombination offenbar jedes EZM-Protein abbauen [Nagase und Woesner, 1999]. Adhäsionsvorgänge sind für die Funktionalität und den Metabolismus der Zellen von großer Bedeutung. Jede Zelle des Organismus ist auf Zell-Matrix-Kontakte angewiesen, um Kommunikation und Entwicklung zu gewährleisten [Maeda et al.,

1986]. Bei der Modellierung von *in vitro*-Bedingungen wurde bisher der Bedeutung einer extrazellulären Matrix nur wenig Aufmerksamkeit geschenkt.

Hybridomzellen sind fusionierte Zellen aus ausgereiften B-Lymphozyten (Plasmazellen) und malignen Plasmazellen (Myelomzellen) aus dem Knochenmark [Hallek et al., 1998]. Ausgereifte B-Lymphozyten können mit dem Blut frei zirkulieren, d.h. sie sind kaum an adhäsiven Vorgängen beteiligt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Lymphozyten in allen Entwicklungsstadien Rezeptoren für EZM-Proteine exprimieren, um ihre Funktionalität aufrecht zu erhalten [Shimizu und Shaw, 1991]. Myelomzellen hingegen sind hauptsächlich im Knochenmark lokalisiert und können nur durch adhäsive Wechselwirkungen mit Stromazellen überleben [Hallek et al., 1998].

Im Allgemeinen ist aber nicht bekannt, inwiefern adhäsive Wechselwirkungen die Produktivität von Hybridomzellen beeinflussen. Deshalb wird neuerdings bei der Kultivierung von Zellen *in vitro* auch verstärkt auf die adhäsiven Wechselwirkungen mit artifiziellen Substraten geachtet. Für die Antikörpertechnologie sucht man vorrangig nach Materialien, welche durch adhäsive Wechselwirkungen mit den Hybridomzellen eine größere Produktivität monoklonaler Antikörper ermöglichen. Auch bei der Kultivierung, Selektion und Differenzierung naiver Zellpopulationen ist eine extrazelluläre Matrix erforderlich. Für die Realisierung einer Immunreaktion *in vitro* sollte eine an den Paracortex des Lymphknotens angelehnte Oberfläche eher unterstützende und stimulierende Wirkung entfalten als unbehandeltes Polystyrol, das bisher in erster Linie als Material für die Kultivierung von Zellen genutzt wird [Mahnke et al., 1996].

1.2.4 Materialien für biologische Systeme

Als Biomaterialien werden Werkstoffe synthetischen aber auch natürlichen Ursprungs definiert, die in Kontakt mit Gewebe, Blut und Körperflüssigkeiten kommen, deren Funktion fördern, für deren Lagerung dienen oder für prothetische, therapeutische und diagnostische Anwendungen benutzt werden, ohne den Organismus oder dessen Komponenten zu schädigen [Bruck, 1980].

Die Einführung aseptischer Operationstechniken durch J. Lister und I. Semmelweis in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts ermöglichte erstmals die An-

wendung von Implantaten und Fremdmaterialien in der Medizin [van den Tweel, 1999]. Zuvor waren alle Versuche einer Implantation an schweren nachfolgenden Infektionen gescheitert. Zu den seit Beginn des 20. Jahrhunderts eingesetzten Biomaterialien zählen z.B. metallische Implantate zur Fixierung von Knochenfrakturen und Membranen, die bei der Hämodialyse verwendet wurden [Kolff und Berk, 1944]. Heute finden Biomaterialien in fast allen Bereichen der modernen Biomedizin eine breite Anwendung. Stützapparate für Gelenke und Knochen, künstliche Blutgefäße und Herzklappen, künstlich generierter Hautersatz und Zellkulturmaterialien stellen nur einen kleinen Teil der Anwendungen dar. Zur Zeit werden auch Polymere entwickelt, die nach einem Temperaturwechsel bzw. nach einer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ihre Form ändern und so z.B. als abbaubare Nahtmaterialien in der minimal-invasiven Chirurgie Anwendung finden können [Alteheld et al., 2005; Lendlein et al., 2005]. Biomaterialien müssen über spezifische Eigenschaften wie z.B. Festigkeit, Korrosionsstabilität oder Biokompatibilität verfügen. Der Einsatz von Polystyrol als Kultivierungsoberfläche in der Zellkultur wurde schon 1975 beschrieben [Amstein und Hartman, 1975]. Auch einige Polymere sind wegen ihrer guten Verarbeitbarkeit und chemisch-hydrolytischen Beständigkeit dafür geeignet und werden deshalb nachfolgend näher erläutert.

1.2.4.1 Synthetische Polymere für biologische Systeme

Polymere sind langkettige Moleküle, welche durch kovalente Bindungen zwischen den Grundbausteinen (Monomere) gebildet werden. Sind Polymere dabei aus identischen Monomeren aufgebaut, werden sie als Homopolymere bezeichnet. Dazu zählen z.B. Polyacrylnitril oder Polyethylen. Verschiedenartige Monomere können zu Heteropolymeren synthetisiert werden wie z.B. Polyurethane, Polyharnstoffe oder Polyimide [Braun et al., 1999].

Bei der industriellen Herstellung monoklonaler Antikörper werden Polymere gegenwärtig in Bioreaktoren eingesetzt. Dabei handelt es sich hauptsächlich um hydrophile Membranen aus Zellulose-Azetat oder Polymethylmethacrylat, die für die Herstellung von Hohlfasern verwendet werden [Lowrey et al., 1994]. Die Hybridomzellen befinden sich im inneren Kompartiment einer Hohlfaser mit definierten Porengrößen. Dadurch können produzierte Antikörper im äußeren Kom-

partment angereichert werden. Dort können Antikörperkonzentrationen zwischen 1 und 4 mg/ml erreicht werden [Nagel et al., 2003]. Für die Polymere, die in Zellkultursystemen eingesetzt werden, ist die Wechselwirkung mit Wasser von fundamentaler Bedeutung, da Wasser Hauptbestandteil aller komplexen Entitäten wie z.B. Zellen und Blut ist. Um die Oberflächenbenetzbarkeit und die Biokompatibilität der Polymere zu beurteilen, werden Randwinkel von Wassertropfen auf der Polymeroberfläche bestimmt. Diese Messungen gelten als wichtiges makroskopisches Charakteristikum [Dimitrov et al., 1991].

1.2.4.2 Adsorption von Proteinen an feste Oberflächen für den Einsatz in biologischen Systemen

Aufgrund von Adhäsionskräften (Anziehungskräfte zwischen zwei verschiedenen Molekülarten) haben Gase, Dämpfe oder in Flüssigkeiten gelöste Stoffe das Bestreben, sich an Grenzflächen anzulagern. Wenn diese Stoffe bei der Berührung mit einem festen Stoff "festgehalten" werden, bezeichnet man dies als Adsorption. Je nach Art und Intensität der Wechselwirkung unterscheidet man zwischen physikalischer und chemischer Adsorption. Die Physisorption ist durch schwache, unspezifische Bindungskräfte gekennzeichnet. Es handelt sich um einen schnellen, reversiblen Prozess, wobei die Anzahl der Adsorbatschichten nicht beschränkt ist. Im Gegensatz dazu ist die Chemisorption durch Bildung einer monomolekularen Adsorbatschicht charakterisiert, die irreversibel an die Oberfläche gebunden sein kann [Dörfler, 1994].

Der Vorgang der Adsorption wird durch Temperatur, Konzentration des zu adsorbierenden Stoffes (Adsorbat), Druck und Aufnahmefähigkeit der Grenzfläche beeinflusst. Die Adsorption aus Flüssigkeiten wird hauptsächlich durch die Grenzflächenspannung bestimmt, da das Energiepotenzial an der Grenzfläche durch das Adsorbat verringert wird. Die Beziehung zwischen der adsorbierten Menge, dem Druck und der Konzentration wird durch die Adsorptionsisotherme beschrieben. Daraus lassen sich Konzentrationsangaben zur Sättigung ableiten, bei der keine weitere Adsorption mehr stattfindet. Das Adsorbat hat sich dann als monomolekulare Schicht auf der Grenzfläche ausgebreitet.

Für die Adsorption von Proteinen an Grenzflächen ist die Oberflächenstruktur der Proteine entscheidend. Nur wenn das Protein über freie Adsorptionsenergie

1 Einleitung

verfügt, findet eine Adsorption an der Grenzfläche statt. Es konnte gezeigt werden, dass aus einem Proteingemisch zunächst kleine Proteine an Grenzflächen adsorbieren, die nach und nach durch größere ersetzt werden [Vroman und Adams, 1969]. Dieser Vorgang wird als Vroman-Effekt bezeichnet [Horbett, 1984; Andrade und Hlady, 1991]. Nach der Adsorption stabilisieren sich die Proteine durch Konformationsänderungen. Proteine mit geringer Konformationsstabilität können dabei auch denaturieren. Dieser Prozess der Denaturierung ist zeitabhängig. Die Proteine erfahren größere Konformationsänderungen, je länger sie an der Grenzfläche verbleiben [Andrade et al., 1987; Young et al., 1988].

2 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten synthetische und biomimetische Oberflächen hinsichtlich ihrer Einsetzbarkeit in Hybridom-Zellkultur-Systemen und für In-vitro-Immunsierungsansätze untersucht und bewertet werden.

Die wirtschaftliche Produktion monoklonaler Antikörper basiert häufig auf der Kultivierung von Hybridomzellen in Fermentern oder Bioreaktoren. Da Hybridomzellen aber mittlerweile nicht mehr nur als Suspensionszellen gelten, werden in letzter Zeit auch viele Strategien für Zellimmobilisierungs- und Perfusionsysteme verfolgt, die das Adhäsionsverhalten der Zellen berücksichtigen und so eine erhöhte Synthese an monoklonalen Antikörpern erzielen. Auch Komponenten der extrazellulären Matrix zur Modifikation von Kultursubstraten gewinnen dabei zunehmend an Bedeutung.

Für den Einsatz in der Zellkultur sollten hier dichte Ultrafiltrations-Flachmembranen verwendet werden, um die direkten Wechselwirkungen von Hybridomzellen mit den verschiedenen Membrantypen näher zu charakterisieren und einen Einfluss auf die Antikörpersynthese zu untersuchen. Die in dieser Arbeit verwendeten Polymere Membranen wurden vom Institut für Chemie des GKSS Forschungszentrums in Teltow auf der Basis von Acrylnitril-Copolymeren synthetisiert.

Weiterhin sollten die zur Kultivierung eingesetzten Polystyrol-Oberflächen mit Proteinen der extrazellulären Matrix modifiziert werden, um den Einfluss auf Wachstum und Antikörpersynthese von Hybridomzellen zu untersuchen.

Für die Bewertung der eingesetzten Oberflächen sollten physikochemische, biochemische und zellbiologische Methoden verwendet werden. Angestrebt wurde eine möglichst niedrige Adhärenz der Zellen und Proteine an die Membranen, um

2 Zielstellung

einen Langzeiteinsatz ohne Verlust der Membranpermeabilität zu gewährleisten. Vitalität, Wachstum und Antikörpersynthese der Zellen auf allen verwendeten Oberflächen sollten beurteilt und verglichen werden. Für die Versuche sollten drei Hybridomzelllinien eingesetzt werden. Eine Hybridomzelllinie, die einen anti-idiotypischen Antikörper sezerniert, sollte im Laufe dieser Arbeit hergestellt und etabliert werden.

Es wurde zudem nach Möglichkeiten gesucht, eine Lymphknotenmatrix zu modellieren, die den Vorgang einer In-vitro-Immunisierung unterstützt. Dafür sollten Glasoberflächen mit biogenen Molekülen und mit Lymphknotenmatrix-entsprechenden Proteinen modifiziert werden, auf denen die Interaktion von aktivierten dendritischen Zellen mit naiven T- und B-Lymphozyten begünstigt wird. Die Aktivierung der unreifen dendritischen Zellen sollte am Ovalbuminmodell erfolgen. Durch die Zugabe naiver T- und B-Lymphozyten sollte eine Immunreaktion *in vitro* simuliert werden. Der Aktivierungszustand der beteiligten Zellpopulationen sollte durch Immunfluoreszenzmikroskopie, durch die Analyse sezernierter Interleukine und Immunglobuline abgeschätzt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Konfokales Laser Scanning Mikroskop 510	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Cytomics Durchfluss-Zytometer FC500 CXP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
MACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Tecan easy-Win, Spectrafluor-Plus	Tecan Europe GmbH, Crailsheim, Schweiz
Elektroporator EPI 2500	Firma Fischer, Heidelberg, Deutschland
Goniometer	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop Leo Gemini Typ 1550	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Dynex MRX II	Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA

3.1.2 Chemikalien und Biochemikalien

Acrylamid/Bisacryl-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Concanavalin A	//
Fluoreszeindiacetat (FDA)	//
Glutaraldehyd	//
Heparansulfat (Spezies Rind)	//
Kollagen I (Spezies Ratte)	//

3 Material und Methoden

Laminin (Spezies Mensch)	//
Natrium-Orthovanadat	//
Ovalbumin	//
Paraformaldehyd	//
Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000)	//
Poly-L-Lysin	//
Gentamycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Glutamin	//
Hypoxanthin-Thymidin-Lösung	//
Trypsin/EDTA-Lösung	//
Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Orthophenylendiamin (OPD)	//
Polyoxyethylensorbitan-	//
Monolaureat (Tween 20)	
Triton-X-100	//
Fibronektin (Spezies Mensch)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Protease Inhibitor	//
Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)	Calbiochem (Merck KgaA), Darmstadt, Deutschland
RGD-Peptid	//
Azaserin	Serva, Heidelberg, Deutschland
NHS-LC-Biotin	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Bodipy-Phalloidin	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Komplettes Freund'sches Adjuvanz	Difco Laboratories, Detroit, MI, USA
Mowiol 4.88	Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland
Osmiumtetroxid	Plano W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland
Protein-A-Sepharose	Amersham Biosciences Europe GmbH, Frei- burg, Deutschland
Rekombinanter muriner Granulo- zyten-Makrophagen-stimulierender Faktor (rm-GMCSF)	Strathmann Biotec, Hamburg, Deutschland
Sephadex-G25-coarse	Pharmacia, Uppsala, Schweden

Streptavidin-AP

Hofmann La Roche, Penzberg, Deutschland

3.1.3 Kulturmedien/Seren

fötales Kälberserum (FKS)

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

neonatales Kälberserum (NKS)

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

RPMI 1640-Medium

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

3.1.4 Antikörper

Monoklonale Antikörper

Maus-anti-Ratte-FcεRI (H10)

I. Pecht, Rehovot, Israel [Ortega et al., 1988]

Maus-anti-Ratte-FcεRI (J17)

I. Pecht, Rehovot, Israel

Maus-anti-Id-J17 (K2)

AG Biotechnologie, im Laufe dieser Arbeit hergestellt

J17-Biotin-Konjugat

AG Biotechnologie, im Laufe dieser Arbeit hergestellt

Maus-anti-Biotin, IgG3 (E11AE11)

AG Biotechnologie, eigene Herstellung

Ratte-anti-Maus-CD11a

BD Biosciences, Pharmingen, Deutschland

Ratte-anti-Maus-CD18

BD Biosciences, Pharmingen, Deutschland

Ratte-anti-Maus-CD29

BD Biosciences, Pharmingen, Deutschland

Ratte-anti-Maus-CD72a,b

Serotec, Düsseldorf, Deutschland

Maus-anti-Phosphotyrosin-Ig
(PY20)

Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

Ratte-anti-Maus-CD69-FITC-
Konjugat

eBioscience Inc. San Diego, CA, USA

Hamster-anti-Ratte-CD49b-FITC-
Konjugat

BD Biosciences, Pharmingen, Deutschland

Ratte-anti-Maus-CD205-FITC-
Konjugat

Serotec, Düsseldorf, Deutschland

Ratte-anti-Maus-CD90.2-FITC-
Konjugat

eBioscience Inc. San Diego, CA, USA

Polyklonale Antikörper

Ziege-anti-Maus-Ig	AG Biotechnologie, eigene Herstellung
Ziege-anti-Maus-Ig-Peroxidase-Konjugat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ziege-anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat	Zymed, San Francisco, CA, USA

3.1.5 Mäuse

Für die Untersuchungen wurden Mäuse der Linien Balb/c, AB, NMRI und Balb/c-TgNDO11.10 eingesetzt. Die Arbeit mit TgNDO11.10-Mäusen erfolgte am Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Ria Baumgraß.

3.1.6 Zelllinien

Die verwendeten Hybridomzelllinien H10 und J17 entstammen dem Labor von I. Pecht, Rehovot, Israel [Ortega et al., 1988]. Die Hybridomzelllinie K2 wurde während dieser Arbeit etabliert. Für die Fusion wurde die murine Myelomzelllinie X63-Ag 8.653 eingesetzt [Kearney et al., 1979]. Die Hybridomzelllinie E11AE11 ist in der AG Biotechnologie etabliert worden.

3.2 Herstellung und Charakterisierung der Membranen

3.2.1 Zusammensetzung der Acrylnitril-Comonomere

Die verwendeten Comonomere waren das nicht-ionische, aber hydrophilisierende Comonomer N-Vinylpyrrolidon (NVP), das mit Acrylnitril in zwei verschiedenen molaren Verhältnissen von 20% und 30% gemischt wurde (s. Abb. 3.4).

Das zweite Comonomer 3-Amino-Propylmethacrylamid (APMA) enthält eine primäre Aminogruppe. Das dritte Comonomer Natrium-2-Methyl-2-Propen-1-Sulfonsäure (NaMAS) besitzt eine Sulfongruppe und verfügt über anionische Eigenschaften (s. Abb. 3.1).

3 Material und Methoden

	Polymerisationsmuster	Comonomer	Polymereigenschaften	
			$X_{com. \text{ in polym.}}$	$M_{n, Osm.}$
PAN	P(AN)	Acrylnitril	0	48,5
NVP20	P(AN-NVP20)	N-Vinylpyrrolidon	20,9	37,5
NVP30	P(AN-NVP30)	N-Vinylpyrrolidon	31,1	105,0
APMA	P(AN-APMA)	3-Amino-Propylmethacrylamid	7,1	55,7
NaMAS	P(AN-NaMAS)	Natrium-2-Methyl-2-Propen-1-Sulfonsäure	1,9	19,6

Tabelle 3.4: Syntheseparameter und Charakteristika der Polymere.

$X_{com. \text{ in polym.}}$: Gehalt des Comonomers im Polymer; $M_{n, Osm.}$: durchschnittliches Molekulargewicht der Polymere. Die Bestimmung erfolgte osmetrisch.

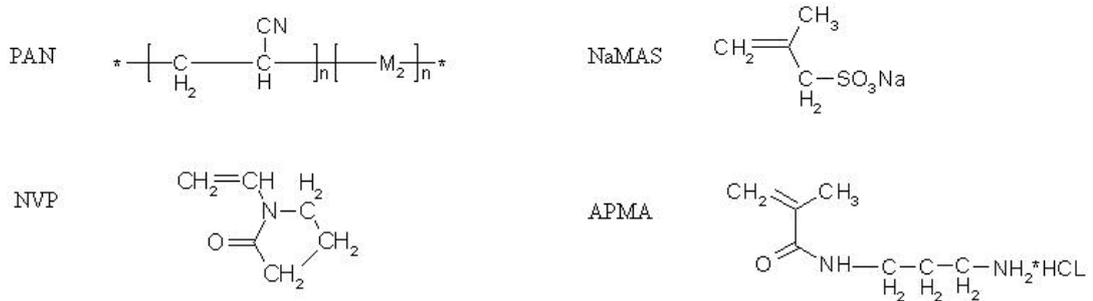


Abbildung 3.1: Struktur von Polyacrylnitril (PAN) und der eingesetzten Monomere NVP, NaMAS und APMA. M_2 - Monomer

Die Monomere wurden über eine freie radikalische Polymerisation mit Acrylnitril copolymerisiert. Damit erhält man Copolymere der gewünschten Zusammensetzung mit guten membranformenden Eigenschaften. Homopolymerisiertes Polyacrylnitril (PAN) diente als Referenzmaterial. Die Polymere wurden im Institut für Chemie des GKSS Forschungszentrums in Teltow hergestellt.

3.2.2 Membranformation

Ultrafiltrationsflachmembranen mit einer asymmetrischen Porenstruktur wurden durch einen konventionellen Phasen-Inversionsprozess hergestellt. Die Herstellung erfolgte im Institut für Chemie des GKSS Forschungszentrums in Teltow. Die Polymere wurden in 15-25%iger Konzentration in N-Dimethylformamid gelöst und als Polymerfilm auf die Oberfläche eines stählernen Transportbandes

gegossen, welches sich, bei einer Temperatur von 1-2°C, mit einer konstanten Geschwindigkeit von 4 m/min bewegte.

Danach wurden die Membranen durch Erhitzen des Wasserbades auf 65 bis 90°C, abhängig von der Glasübergangstemperatur des Polymers, von restlichem Lösungsmittel getrennt. Dabei kommt es außerdem zu einer Änderung der Porenstruktur. Bis zum Gebrauch wurden die Membranen in einer wässrigen Natriumazid-Lösung (0,02%) bei 4°C aufbewahrt. Vor Zellkulturversuchen wurden die Membranen in sterilem destilliertem Wasser gewaschen, um das Natriumazid zu entfernen.

3.2.3 Randwinkelmessungen

Zur Untersuchung der Benetzbarkeit von Membranoberflächen wurden in Kooperation mit dem Institut für Chemie des GKSS Forschungszentrums in Teltow Randwinkelmessungen durchgeführt. Die Randwinkel wurden mit der “sessile drop“ Methode gemessen (s. Abb. 3.2). Wasser diente als Testflüssigkeit. Der Durchmesser des Tropfens auf der Randfläche war immer größer als 3 mm. Die Randwinkelmessungen wurden mit einem Goniometer (Carl Zeiss) durchgeführt.

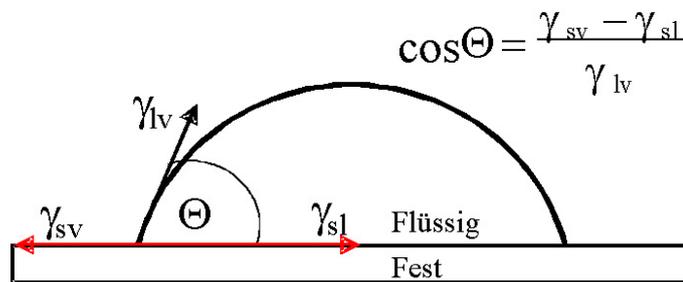


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Randwinkelmessungen, verändert nach Kamusewitz et al. [1991].

Verwendete Abkürzungen: cos Randwinkel, γ Grenzflächenenergie, s solid, v vapour, l liquid

Mindestens zehn Messungen verschiedener Tropfen an drei verschiedenen Punkten wurden durchgeführt, um den Durchschnittswert des Randwinkels zu ermitteln.

3.2.4 Permeabilitätsmessungen

Die Permeabilitätsmessungen an den Membranen wurden durchgeführt, um die Durchflussrate von Wasser und das "Fouling"-Verhalten nach einer Proteinbeschichtung beurteilen zu können. Als "Fouling" bezeichnet man das Verstopfen der Membranporen durch Proteine und Mediumbestandteile. Membranenscheibchen mit einem Durchmesser von 25 mm wurden ausgestanzt und 2 h in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Membranscheiben in eine Amicon-8010-Zelle (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) platziert. Die Wassermenge, die bei einem Druck von 0,5 kp/cm² und einem Zeitintervall von 2 min die Membran passierte, wurde gemessen. Für jeden Membrantyp wurden zwei Messungen durchgeführt. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde in l/hm² quantifiziert.

Die Membranen wurden für 24 h in eine BSA-Lösung (1 g/l) getaucht und dabei leicht geschüttelt. Danach wurden die Membranen nacheinander je 1 h in PBS und dann in 0,5 M NaCl-Lösung gewaschen. Die Messung der Durchflussgeschwindigkeit erfolgte danach wie oben beschrieben.

3.3 Protein-Charakterisierung

3.3.1 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Coomassie Blau-Färbung

Um Proteine der Größe nach aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach [Laemmli, 1970] durchgeführt. Es wurden Gele mit einem Polyacrylamidgehalt von 12,5% verwendet. Die Polyacrylamid-Gellösung wurde zwischen zwei Glasplatten einer Mini-Gelapparatur (Biometra, Göttingen, Deutschland) gegossen und mit n-Butanol überschichtet.

Nach der Polymerisation wurde das n-Butanol entfernt und die Geloberfläche kurz mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurde auf das fertige Trenngel das Sammelgel (4%) gegossen. Die Proben wurden durch Zugabe von Probenpuffer (enthält Merkaptoethanol) reduziert und durch kurzzeitiges Aufkochen vorbereitet. Das Gel wurde mit den Proben beladen und der Gellauf in SDS-Puffer (25

3 Material und Methoden

mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,3) zunächst für 30 min bei 50 V, dann für 1 h bei 20 mA durchgeführt.

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im SDS-Gel anzufärben, wurde Coomassie Brilliant Blue R-250 verwendet. Die Gele wurden 60 min bei Raumtemperatur (RT) in der Färbelösung (55% Methanol, 10% Essigsäure, 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250) geschwenkt und anschließend über Nacht in einer Entfärbelösung (30% Methanol, 7% Essigsäure) gelagert.

Nach ausreichender Entfärbung wurde das Gel in einer Geltrockner-Lösung (25% Methanol, 4% Glycerin) 1 h inkubiert und luftblasenfrei zwischen zwei Cellophanfolien gelegt. Die Folien wurden in einen Rahmen gespannt und das Gel wurde über Nacht bei RT getrocknet.

Trenngelpuffer 4x	1,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, 0,4% TEMED, pH 8,8
Sammelgelpuffer 4x	0,5 M Tris-HCl, 0,4% SDS, 0,4% TEMED, pH 6,8
Laufpuffer 10x	0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS
Probenpuffer	Roti-Load 1, 4x, Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 3.5: Verwendete Puffer

3.3.2 Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit Hilfe des "DC Protein Assays" (BioRad, München, Deutschland; DC=detergent compatible) bestimmt. Hierbei handelt es sich um eine kolorimetrische Methode, die stark an die Lowry-Methode [Lowry et al., 1951] angelehnt ist. Die benötigten Lösungen entstammten dem Kit und wurden nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurden 100 μ l Probe mit 500 μ l der Kupfer-Tartrat-Lösung versetzt und gut gemischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4 ml der verdünnten Folin-Lösung zu jeder Probe. Der Ansatz wurde ebenfalls stark durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750$ nm gemessen. Konzentrationsberechnungen basierten auf BSA-Eichreihen in einem Konzentrationsbereich von 10 - 500 μ g/ml.

3.4 Immunglobulin-Reinigung und -Kopplung

3.4.1 Reinigung von Immunglobulinen

Die Antikörper wurden vor allem für den Einsatz in Festphasen-Immunoassays gereinigt. Da für die Wahl der richtigen Reinigungsmethode der Isotyp des Antikörpers wichtig ist, wird vorher die Subklasse bestimmt. Das Hybridom K2HE7 produzierte einen IgG1-Antikörper, so dass die Reinigung mit Hilfe von immobilisiertem Protein A durchgeführt werden konnte. Die Kulturüberstände wurden vor der Reinigung zentrifugiert (15 min bei 3000 x g) und filtriert (Zellulose-Azetat-Filter, Porengröße 0,2 μm).

Die Überstände wurden 1:2 mit Beladungspuffer (4 M NaCl, 2 M Glycin-NaOH, pH 8,9) versetzt. Anschließend erfolgte die Beladung der Protein A-Säule (2 ml Protein A-Sepharose) mit einer Geschwindigkeit von 1-2 ml/min über Nacht bei 4°C. Nicht gebundenes Material wurde mit verdünntem Beladungspuffer (1,33 M NaCl, 0,67 M Glycin) von der Säule gewaschen. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte mit dem Elutionspuffer I (100 mM Citronensäure-NaOH-Puffer, pH 3,5), der mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gepumpt wurde. Die Elution wurde mit Hilfe eines Photometers (UV-1, Pharmacia LKB, Lund, Schweden) und eines Schreibers verfolgt, der eluierte Antikörper wurde aufgefangen und sofort mit Neutralisationspuffer (3,5 M Tris-HCl, pH 9,0) versetzt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 280 nm mit Hilfe eines Photometers (Shimadzu UV-1202, Shimadzu Europe, Duisburg, Deutschland), um die Konzentration des Antikörpers zu bestimmen. Dafür wurden Extinktionen bei 280 nm von 1,43 für 1 mg/ml IgG zu Grunde gelegt [Coligan et al., 1992–2002]. Zur Regenerierung der Säule wurde ein zweiter Elutionspuffer (100 mM Citronensäure, pH 2,0) eingesetzt. Die Säule wurde anschließend mit Beladungspuffer gespült und gelagert.

Zur Erhöhung der Konzentration wurden die Antikörper mit Hilfe von Millipore Ultrafiltrationseinheiten ("Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units", MWCO 10,000 Da; Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) eingeeengt. Dafür wurden die Antikörperlösungen bei 3000 x g auf ca. 500 μl eingeeengt und mehrfach mit PBS gewaschen. Die Konzentration der Antikörper wurde auf 3 mg/ml eingestellt.

3.4.2 Kopplung von Antikörpern an Ovalbumin

Die Kopplung von Ovalbumin an J17-Antikörper wurde mit Glutaraldehyd als Linker durchgeführt. Für den Kopplungsansatz wurden 400 μg Antikörper (130 μl in PBS) mit 400 μg Ovalbumin (gelöst in 50 mM NaHCO_3 , 40 μl) und 10 μl 1,25% Glutaraldehyd gemischt und 4 h inkubiert. Danach erfolgte eine "Schnelldialyse" des Kopplungsansatzes zur Umpufferung in PBS.

Für die "Schnelldialyse" wurden kleine Sephadex-Säulchen hergestellt. Eppendorf-Gefäße wurden am unteren Ende mit einer Kanüle durchstoßen, mit Glaswolle abgedichtet und mit ca. 300 mg Sephadex-G25-coarse befüllt. Durch Zugabe von 1 ml PBS erfolgte ein Aufquellen des Sephadex auf ca. 1,3 ml. Die Säule wurde in ein Auffangröhrchen platziert und zweimal mit PBS gewaschen (500 x g, 2 min), dann wurde der Kopplungsansatz (180 μl) aufgetragen. Nach erneuter Zentrifugation bei 500 x g für 2 min befand sich das umgepufferte und Glutaraldehyd-freie Konjugat als Eluat in dem Auffangröhrchen. Das Eluat wurde anschließend für eine Immunisierung zur Herstellung monoklonaler anti-idiotypischer Antikörper eingesetzt (s. Abschnitt 3.5.2).

3.4.3 Biotinylierung von Antikörpern

Für den Kopplungsansatz wurden 500 μg der zuvor eingeengten Antikörperproben (ca. 170 μl) über selbst hergestellte Sephadex-Säulchen in Bicarbonatpuffer (50 mM) umgepuffert. Das Eluat wurde mit 20 μg NHS-LC-Biotin (in Aqua dest.) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Für die Entfernung von überschüssigem Biotin erfolgte eine weitere Schnelldialyse über eine Sephadex-Säule (s. Abschnitt 3.4.2).

Der Erfolg der Kopplung wurde mit Hilfe von spezifischen Festphasen-Immunoassays überprüft (s. Abschnitt 3.5.2). Die gekoppelten Antikörper wurden zum Nachweis von monoklonalen Antikörpern der Fusion K2 eingesetzt.

3.5 Immunologische Tests

3.5.1 Western Blot und Immunologische Detektion der immobilisierten Proteine

Für die Untersuchung der Proteinphosphorylierung wurden die Proteine nach der SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembranen (Protran BA 83; Whatman Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) übertragen. Der Transfer erfolgte durch sog. Elektroblothing in einer Protein-Transfer-Apparatur (Fast Blot B33, Biometra, Göttingen, Deutschland).

Die benutzten Filterpapiere (Dicke 1 mm) und die Nitrozellulosemembran wurden auf die Trenngelgröße (65 mm Länge x 85 mm Breite x 1 mm Dicke) zugeschnitten und in Blotpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,8, 20% Methanol) äquilibriert. Auf die drei Filterpapiere wurden zunächst die Nitrozellulosemembran, dann das SDS-Gel und wieder drei Filterpapiere luftblasenfrei übereinander geschichtet. Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 1 h.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden Tyrosin-Phosphorylierungen durch spezifische Antikörper mittels des "WesternBreeze Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit" (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) detektiert. Dafür wurde die Blotmembran zunächst 2 x 5 min in 20 ml Aqua dest. gewaschen, um Gel- und Pufferbestandteile und schwach gebundene Proteine zu entfernen. Danach erfolgte das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen in 10 ml Blocklösung unter leichtem Schütteln für 30 min bei RT. Die benötigten Lösungen waren im o.g. Kit enthalten und sind nach Vorschrift verwendet worden.

Nach dem Abblocken erfolgte ein Waschschrift (20 ml Waschlösung, 5 min, RT). Anschließend wurde dann mit dem Primärantikörper PY20 (Maus-anti-Phosphotyrosin-Antikörper, 10 ml, 1 µg/ml) 1 h bei RT und leichtem Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgten drei Waschschriffe mit je 20 ml der Waschlösung für jeweils 5 min.

Die Blotmembran wurde dann 30 min mit dem Sekundärantikörper (10 ml, Ziege-anti-Maus-Ig, gekoppelt an alkalische Phosphatase) inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten wieder drei Waschschriffe (20 ml Waschlösung, 5 min). Danach

wurde die Membran 2 x 2 min in 20 ml Aqua dest. gewaschen und auf transparente Folie platziert (im Kit enthalten). Das Chemilumineszenzsubstrat (2,5 ml) wurde auf die Membran pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach 5 min wurde die Membran mit einer weiteren transparenten Folie abgedeckt, überschüssiges Substrat wurde mit Filterpapier entfernt. Die Lumineszenz wurde mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT-AR, Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland) nachgewiesen, die Belichtungszeit betrug 1 sec bis 5 min. Der Film wurde dann mit Fixierer- und Entwicklerlösung der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH entwickelt.

3.5.2 Festphasen-Immunoassay zur Bestimmung der Antikörperkonzentration und der Spezifität

Mehrere Festphasen-Immunoassays wurden zur Konzentrationsbestimmung von monoklonalen Antikörpern aus der Zellkultur eingesetzt (s. Abb. 3.3). Im Allgemeinen wurden die Platten zwischen den einzelnen Inkubationen dreimal mit kaltem Leitungswasser gewaschen, nach der Inkubation mit den Enzymkonjugaten zehnmal. Die Mikrotiterplatten befanden sich während der Inkubationen in einer Feuchtkammer. Wenn nicht anders erwähnt, betrug das Inkubationsvolumen immer 50 μ l pro Napf.

Für die H10-Antikörper wurden 96-Napf Platten (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 8 μ g/ml ZAMAK beschichtet. Die Inkubation für die Antikörper K2HE7 und E11AE11 erfolgten mit 10 μ g/ml J17 bzw. 5 μ g/ml GOD-Biotin (s. Abb. 3.3). Die für die Adsorption an Mikrotiterplatten vorgesehenen Proteine wurden in PBS verdünnt. Die Beschichtungen wurden entweder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C durchgeführt. Nach der Beschichtung wurden die Näpfe mit Blockpuffer (PBS, 5% neonatales Kälberserum, 0,01% Phenolrot) 30 min bei RT abgesättigt. Danach wurde zellfreier Kulturüberstand, ggf. verdünnt in Blockpuffer, zu den Näpfen pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Der Sekundär-Antikörper (Peroxidase-markierter Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörper) wurde nach den Angaben des Herstellers 1:5000 verdünnt und für den Nachweis der Antikörper H10 und E11AE11 eingesetzt. Für K2HE7-Antikörper erfolgte eine Inkubation mit Biotin-markiertem J17 bzw. mit Streptavidin-AP-

3 Material und Methoden

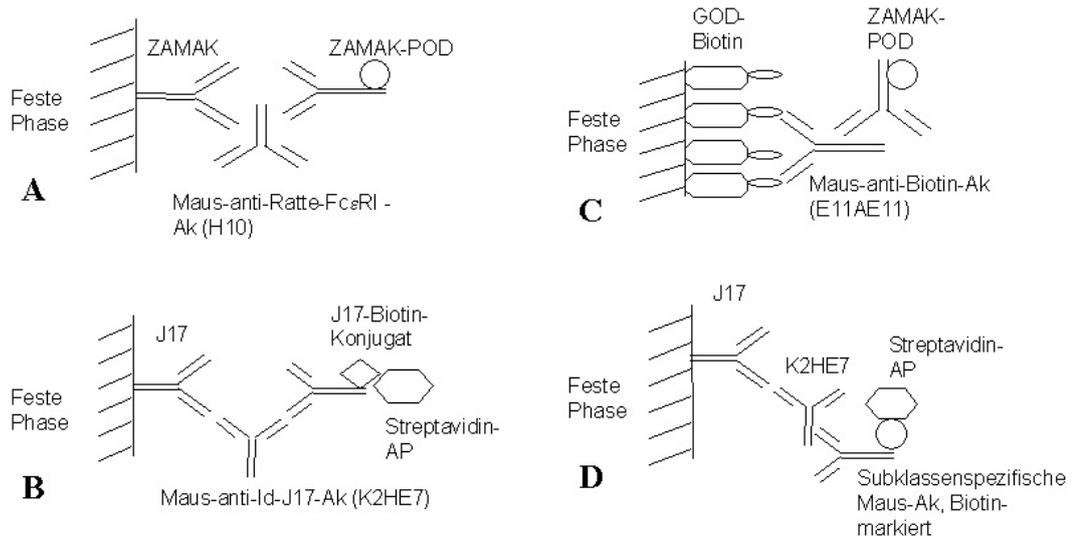


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der verwendeten Immunoassays.

A) Nachweis von H10-Antikörpern, B) Nachweis von anti-idiotypischen Antikörpern gegen monoklonale J17-Antikörper, C) Nachweis von E11AE11-Antikörpern, D) Nachweis der Subklasse des anti-idiotypischen Antikörpers. Verwendete Abkürzungen: ZAMAK Ziege-anti-Maus-Ig-Antikörper; POD Meerrettichperoxidase; AP Alkalische Phosphatase; GOD Glukoseoxidase

markierten subklassenspezifischen Antikörpern ($1,5 \mu\text{g/ml}$ je Antikörper). Die Antikörperlösungen wurden 1 h bei RT inkubiert. Zum Nachweis der K2HE7-Antikörper mit Biotin-markiertem J17 erfolgte vor der Substratzugabe ein weiterer Inkubationsschritt mit Streptavidin-AP (20 ng/ml).

Als Substratlösung für die Peroxidase wurde 1 mg/ml o-Phenylendiamin und $0,01\%$ Wasserstoffperoxid in 50 mM Natriumcitrat und $0,1 \text{ M}$ Dinatriumhydrogenphosphat (pH 5,0) verwendet. Nach einer Inkubation von 10 bis 30 min wurde die Reaktion mit $100 \mu\text{l}$ /Napf Stopplösung ($1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$, $50 \text{ mM Na}_2\text{SO}_3$) beendet. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 492 nm und einer Referenz von 630 nm in einem ELISA-Reader (Dynex MRX II).

Die Substratlösung für die alkalische Phosphatase enthielt 10 mM p-Nitrophenylphosphat in 100 mM Diethanolamin-HCl-Puffer (pH 10,0). Nach der Inkubation mit Streptavidin-AP wurde die Substratlösung pipettiert. Die Entwicklungszeit variierte zwischen 10 und 30 min. Die Absorption wurde bei 405 nm mit einer

Referenz von 630 nm gemessen.

3.5.3 Bestimmung von Interleukinen im Kulturüberstand

Für die Detektion von Interleukin 12 und 6 (s. Abb. 3.4) wurden Kits der Fa. eBioscience (“Mouse-IL12p70 ELISA Ready-SET-GO!“, “Mouse-IL6 ELISA Ready-SET-GO!“, eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) verwendet und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt. Nunc Maxisorb Platten (96 Nöpfe) wurden mit 100 μ l/Napf gereinigtem Ratte-anti-Maus-IL12p70-Ig bzw. Ratte-anti-Maus-IL6-Ig in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Nöpfe wurden dreimal mit 100 μ l/Napf Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) gewaschen und mit 200 μ l/Napf Blocklösung 1 h bei RT abgesättigt.

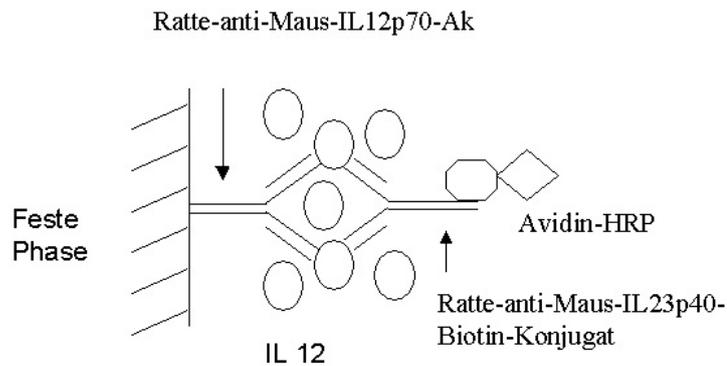


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Interleukin 12-Bestimmung.

Die Bestimmung von Interleukin 6 erfolgte analog mit zwei verschiedenen Ratte-anti-Maus-IL6-Ig-Antikörpern.

Danach erfolgte ein dreimaliger Waschschrift (100 μ l/Napf) und die Applikation der Proben und des Standards (100 μ l/Napf) mit anschließender Inkubation für 2 h bei RT. Die Nöpfe wurden fünfmal mit Waschpuffer (100 μ l/Napf) gewaschen und mit 100 μ l/Napf der Biotin-konjugierten Antikörper (Ratte-anti-Maus-IL23p40-Ig bzw. Ratte-anti-Maus-IL6-Ig) befüllt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 1 h. Nach dem fünfmaligen Waschen der Platten wurde Peroxidase-markiertes Avidin (100 μ l/Napf) pipettiert und 30 min bei RT inkubiert.

Die Nöpfe wurden siebenmal mit Waschpuffer gewaschen, wobei der Waschpuffer beim ersten Mal 1 bis 2 min inkubierte. Dann erfolgte die Zugabe von Tetramethylbenzidin-Substratlösung (100 μl /Napf) und eine Inkubation von 15 min bei RT. Die Reaktion wurde mit 50 μl /Napf Stopplösung (2 N H_2SO_4) beendet. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm mit einer Referenz von 550 nm.

3.5.4 Bestimmung der Konzentration von Maus-Antikörpern in primären Zellkulturen nach den Versuchen zur In-vitro-Immunisierung

Es wurde getestet, ob Kulturüberstände Antikörper enthielten, die spezifisch für Ovalbumin, Concanavalin A oder KLH sind. Zusätzlich wurde der Gesamtimmunglobulinspiegel bestimmt.

Dafür wurden Ovalbumin, Concanavalin A bzw. KLH jeweils in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS an 96-Napf Platten adsorbiert. Für die Bestimmung des Gesamtimmunglobulinspiegels wurden 96-Napf Platten mit 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ZAMAK beschichtet. Alle Verdünnungen erfolgten in PBS. Die Platten wurden bei 4°C über Nacht in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Platten wurden dann mit Kulturüberständen und Peroxidase-konjugierten ZAMAK inkubiert, wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben.

3.5.5 Nachweis von Aktin und DEC205 in fixierten dendritischen Zellen und T-Lymphozyten

Zunächst wurden Glasoberflächen mit Poly-L-Lysin beschichtet, um nicht adhären- te Zellen besser untersuchen zu können. Die Deckgläschen (22 x 22 mm, Marienfeld GmbH & Co. KG) wurden in 100% Ethanol sterilisiert, in 6-Napf Platten appliziert und mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Poly-L-Lysin (in PBS, 2 ml/Napf) 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Waschschrift mit 1 ml/Napf PBS. Die beschichteten Deckgläschen wurden in der Platte über Nacht bei RT getrocknet. Für die Aktinfärbung wurden danach dendritische Zellen (3×10^5 Zellen/Napf) und T-Lymphozyten ($1,2 \times 10^6$ Zellen/Napf) auf die Deckgläschen pipettiert (2 ml

3 Material und Methoden

Vollmedium/Napf) und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Für die Färbung des Rezeptors DEC205 wurden nur dendritische Zellen der gleichen Dichte ausgesät und inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellkulturplatten bei 200 x g 5 min zentrifugiert, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (in PBS, 1 ml/Napf, pH 7,4) fixiert (15 min, RT). Danach wurde zweimal mit je 1 ml/Napf PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Deckgläschen 20 min in PBS/1% BSA (2 ml/Napf) bei RT inkubiert.

Die Deckgläschen wurden dann vorsichtig aus der 6-Napf Platte entfernt und mit der Zellseite nach oben auf Parafilm gelegt. Für die Aktinfärbungen wurde Bodipy-Phalloidin 1:300 in PBS/1% BSA verdünnt, 100 μ l wurden pro Deckglas pipettiert und 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen wieder in die 6-Napf Platte zurückgelegt und zweimal mit PBS und Aqua dest. gewaschen (1 ml/Napf). Für die Färbung des Rezeptors DEC205 wurden die Deckgläschen nach der Aktinfärbung zweimal mit PBS (1 ml/Napf) gewaschen (in der 6-Napf Platte), wieder mit der Zellseite nach oben auf Parafilm gelegt, je 100 μ l des Ratte-anti-Maus-CD205-FITC-Konjugates in einer Verdünnung von 1:2 auf die Deckgläschen pipettiert und 30 min inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen in der 6-Napf Platte zweimal mit PBS und Aqua dest. gewaschen (1 ml/Napf). Für die Einbettung der Proben wurde ein Tropfen Mowiol 4.88 auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit der Zellseite nach unten in das Einbettmedium gelegt. Anschließend wurden die Proben lichtgeschützt verpackt und über Nacht bei 4°C getrocknet. Die Zellen wurden mit der Kamera eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (LSM 510) fotografiert. Dabei wurden 63x und 100x Objektive eingesetzt. Die Anregung für Phalloidin erfolgte bei 558 nm mit Hilfe eines Helium-Neon-Lasers, die Emission bei 568 nm. Die Anregung für FITC erfolgte bei 494 nm mit Hilfe eines Argonlasers, die Emission bei 518 nm.

3.5.6 Nachweis von Oberflächenantigenen auf Hybridomzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden Hybridomzellen (H10 und E11AE11) auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in PBS eingestellt. Die verwendeten Antikörper gegen CD11a, CD18, CD29, CD49b, CD69 und CD72 wurden nach den Angaben des Herstellers verdünnt und mit den Zellen jeweils 20 min bei 4°C inkubiert. Der sekundäre Antikörper (FITC-konjugierter Ziege-anti-Ratte-Ig-Antikörper) wurde in einer Konzentration von 2,6 µg/ml zugesetzt und weitere 20 min mit den Zellen bei 4°C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt entfiel bei den FITC-konjugierten Antikörpern gegen CD49b und CD69. Für die Analysen wurde das Gerät Cytomics FC500 CXP der Firma Beckman Coulter GmbH verwendet. Die FITC-Anregung erfolgte bei 494 nm mit Hilfe eines Argonlasers, die Emission bei 518 nm.

3.6 Hybridomtechnik

3.6.1 Kultivierung von Hybridomzellen

Die Kultivierung von Hybridomzellen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in einem Vollmedium, das aus RPMI 1640, 2 mM L-Glutamin, 50 µM 2-Merkaptoethanol und 10% hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) bestand. Bei der Kultivierung mit Membranen, nach Fusionen und bei der Gewinnung von Feederzellen wurde Gentamycin (0,1 mg/ml) als Antibiotikum zugesetzt. Das Vollmedium für Fusionen enthielt 20% FKS. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 96% Luftfeuchtigkeit inkubiert (Steri-Cult 200 Inkubator, Forma Scientific Inc., Ohio, USA).

3.6.2 Immunisierung von Mäusen

Für den spezifischen Nachweis des monoklonalen Antikörpers J17 (Maus-anti-Ratte-FcεRI) wurden monoklonale anti-idiotypische Antikörper hergestellt. Eine Balb/c-Maus wurde intraperitoneal mit einer Emulsion aus 100 µl J17-Ovalbumin-Konjugat (130 µg Protein in 100 µl PBS) und 100 µl Kompletten Freund'schen

Adjuvanz (CFA) immunisiert. Die Nachimmunisierung mit der gleichen Menge des Immunogens aber ohne CFA erfolgte 3 Monate später ebenfalls intraperitoneal.

3.6.3 Gewinnung von Feeder-Zellen

Feeder-Zellen unterstützen das Anwachsen der frisch fusionierten Zellen durch Wachstumsfaktoren und phagozytische Aktivität. Für die Gewinnung von Feeder-Zellen wurden nicht immunisierte Mäuse (Auszucht, Stamm AB, Balb/c oder NMRI) verwendet. Die Mäuse wurden durch Inhalation von Kohlendioxid getötet. Das Fell wurde auf der Bauchseite entfernt und 10 ml steriles, eiskaltes RPMI 1640 in die Bauchhöhle injiziert. Danach wurde leicht massiert, die Zellsuspension abgesaugt und bei 200 x g 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Vollmedium aufgenommen. Je nach Größe der Maus wurden 60 bis 120 ml Feeder-Zellsuspension hergestellt.

3.6.4 Elektrofusion zur Herstellung von Hybridomzellen

Für die Herstellung von Hybridomen wurden die B-Lymphozyten der mit J17-Ovalbumin-Konjugat immunisierten Maus (Balb/c) mit murinen Myelomzellen der Linie X63-Ag 8.653 [Kearney et al., 1979] fusioniert. Dafür wurde die Milz der immunisierten Maus steril präpariert, in eine Petrischale mit 10 ml RPMI 1640 gelegt und mit einem Spatel ausgestrichen. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen mit einer 5 ml-Pipette wurde eine Zellsuspension hergestellt.

3 ml der Milzzellsuspension wurden mit 7 ml Vollmedium gemischt, mit Gentamycin (0,1 mg/ml) versetzt und in einer Kulturflasche 7 Tage inkubiert. Der Kulturüberstand dieser Milzzellkultur wurde als Positivkontrolle bei anschließenden Festphasen-Immunoassays eingesetzt.

Die Fusion wurde nach dem Protokoll von Stoicheva und Hui [1994] durchgeführt. Dazu wurden die verbliebenen Milzzellen (7 ml) dreimal in sterilem BSS-Puffer (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM CaCl₂, 2,5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen (200 x g, 10 min). Die Myelomzellen wurden geerntet und ebenfalls dreimal in BSS-Puffer gewaschen.

Die Zellpellets wurden in 1 ml BSS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und in

einer Neubauer-Zählkammer gezählt. 3×10^7 Myelomzellen und 12×10^7 Milzzellen wurden für die Fusion verwendet.

Anschließend erfolgte eine Pelletierung der Zellen bei $200 \times g$ für 10 min. Die Zelldichte wurde auf 15×10^7 /ml eingestellt. $200 \mu\text{l}$ der Zellsuspension wurden mit $200 \mu\text{l}$ 20%iger PEG 8000-Lösung (in BSS-Puffer) in einem Eppendorf-Gefäß gemischt, damit die Zellen aggregieren.

Die Suspension ($400 \mu\text{l}$) wurde danach sofort in eine Elektroporationsküvette (GenePulser Cuvette, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die Fusion erfolgte durch einen Gleichspannungsimpuls ($700\text{-}1200 \text{ V}$, $5 \mu\text{s}$), erzeugt durch einen Elektroporator EPI 2500, (Fischer, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen wurden 3 min bei Raumtemperatur (RT) in der Küvette inkubiert. Die Zellsuspension wurde danach vorsichtig in einen mit 100 ml HAT-Medium (1 mM Hypoxanthin, 12 mM 2-Deoxythymidin, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ Azaserin in Vollmedium) gefüllten sterilen Erlenmeyerkolben gegeben und 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Verteilung der Suspension auf 10 Zellkulturplatten ($100 \mu\text{l}/\text{Napf}$ in 96-Napf Platten, TPP, Trasadingen, Schweiz). Die Zellkulturplatten waren am Vortag mit Feederzellsuspension befüllt worden ($100 \mu\text{l}/\text{Napf}$, s. Abschnitt 3.6.3). Die Zellen wurden 7-10 Tage inkubiert. Danach wurde der KÜ auf Antikörper getestet (s. Abschnitt 3.5.2) und positive Hybridome wurden rekloniert. Zur Serumgewinnung wurde der Maus nach der Milzzellpräparation Blut aus dem Herz und der Lunge entnommen. Zur Gerinnung wurde das Blut 4 h in einem Eppendorf-Gefäß inkubiert und dann 5 min bei $3000 \times g$ pelletiert. Die zellfreien Überstände wurden vereinigt und in einem Festphasen-Immunoassay eingesetzt (s. Abschnitt 3.5.2).

3.6.5 Reklonierung und Erweiterung von Hybridomkulturen

Alle Klone aus der Hybridomfusion, die die gewünschten anti-idiotypischen Antikörper produzierten, wurden rekloniert. Dabei wurde die Methode der limitierenden Verdünnung angewendet, um die Monoklonalität der Kulturen zu sichern und Hybridome stabil zu etablieren. Dafür wurden die Zellen der betreffenden Kultur resuspendiert und gezählt. 10 ml einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 10 Zellen/ml wurden hergestellt und auf eine Mikrotiterplatte

mit Feeder-Zellen verteilt. Nach einer Woche wurde das klonale Wachstum mit Hilfe des Mikroskops analysiert. Einzeln wachsende Klone wurden ausgewählt und ihre Kulturüberstände in einem Festphasen-Immunoassay getestet (s. Abschnitt 3.5.2). Die Klone mit der besten Produktivität wurden etabliert. Nach erfolgreicher Reklonierung wurden die Kulturen schrittweise erweitert. Zunächst erfolgte die Erweiterung in 24-Napf Platten mit Feeder-Zellen und anschließend in Zellkulturflaschen (25 cm²; TPP AG, Trasadingen, Schweiz). Die Kontrolle der Antikörperproduktion erfolgte regelmässig unter Verwendung eines Festphasen-Immunoassays (s. Abschnitt 3.5.2).

3.6.6 Gefrierkonservierung

Die Gefrierkonservierung dient der Sicherung stabiler Hybridome. Die Zellen wurden aus 24-Napf Platten oder Zellkulturflaschen geerntet, pelletiert und in 500 μ l Vollmedium (pro Einfrierröhrchen) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in auf Eis stehende Einfrierröhrchen überführt und mit 500 μ l Einfriermedium (RPMI 1640, 20% fötales Kälberserum, 15% DMSO) gemischt. Die Einfrierröhrchen wurden sofort in eine Styroporbox (Wanddicke ca. 5 cm) gestellt und in einer Tiefkühltruhe platziert. Die Thermoisolation sorgt für ein langsames Absinken der Temperatur auf -80°C. Für eine Langzeitlagerung wurden die Ampullen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen von Zellsuspensionen wurde in einem Wasserbad bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden sofort in 5 ml Vollmedium überführt, pelletiert, in frisches Vollmedium aufgenommen und ausgesät.

3.7 Charakterisierung von kultivierten Zellen

3.7.1 Bestimmung der Zelldichte mit dem Lactat-Dehydrogenase-Assay

Der zur Bestimmung verwendete Test von Zelldichten basiert auf der Messung der zytoplasmatischen Lactat-Dehydrogenase-Aktivität (Lactat \rightarrow Pyruvat). Nach der Zelllyse wird das Enzym in das Medium abgegeben (LDH-Assay, Hofmann La

Roche, Penzberg, Deutschland). Die Enzymaktivität korreliert mit der Anzahl der lysierten Zellen [Tamada et al., 1995]. Für die Bestimmung der Zelldichte wurden die Platten (96-Napf bzw. 24-Napf Platten) zentrifugiert (200 x g, 5 min), das Medium wurde abgesaugt und durch 1% Triton in PBS (100 μ l/well) ersetzt. Zur Lyse der Zellen erfolgte eine Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur. Die Platten wurden dabei leicht geschüttelt.

Danach wurden die Platten erneut zentrifugiert (500 x g, 10 min). Die Überstände wurden in neue Platten überführt und mit 100 μ l der LDH-Mischung versetzt. Nach Zugabe der LDH-Mischung wurden die Platten im Dunkeln (20 min, RT) inkubiert. Die Reaktion wurde dann mit 50 μ l 1 M HCl abgestoppt und bei 492 nm (Referenz 630 nm) mit einem ELISA-Reader vermessen. Die Berechnung der Zelldichten beruht auf erstellten Eichreihen.

3.7.2 Fluoreszeindiazetat-Färbung

Mit Fluoreszeindiazetat (FDA) lassen sich lebende Zellen anfärben. Die Moleküle dringen leicht in Zellen ein, das Azetat wird dort abgespalten und das Fluoreszein verbleibt aufgrund seiner Polarität in der Zelle.

Für Vitalfärbungen wurde FDA in Aceton gelöst (5 mg/ml), in einer Endkonzentration von 150 μ g/ml zu den Zellen (4×10^4 Zellen/ml in 100 μ l Vollmedium/Napf) gegeben und 3 min inkubiert. Danach wurde die Lösung abgesaugt, durch 100 μ l PBS pro Napf ersetzt und die 96-Napf Platten mikroskopisch betrachtet. Die Bilder wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510) unter Verwendung eines 10x-Objektivs aufgenommen. Die Anregung erfolgte bei 494 nm mit Hilfe eines Argonlasers, die Emission bei 518 nm.

3.7.3 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wurde eingesetzt, um morphologische Veränderungen von Hybridomzellen zu untersuchen. Verwendete Membranen und Polystyrolscheiben (Thermanox, Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland, Durchmesser 13 mm) sind mit 70% Ethanol sterilisiert, dreimal in Aqua dest. gewaschen, in 24-Napf Platten appliziert und mit Duranglasringen beschwert worden. Die Hybridomzellen wurden mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/ml auf

den Oberflächen ausgesät. Die Zellen wurden 72 h kultiviert. Nach der Inkubation wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, 1 ml/Napf 4% Glutaraldehyd (in Aqua dest.) zugesetzt und 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Glutaraldehyd abgesaugt und 3 x 10 min mit Aqua dest. gewaschen.

Die Hybridomzellen wurden mit Osmiumtetroxid (1% in PBS, 500 μ l/Napf) 30 min bei RT fixiert und danach mehrmals mit Aqua dest. gewaschen, um das Fixativ zu entfernen. Für den Prozess der Dehydrierung wurden die Proben in Membransegmente geschnitten, je 15 min mit 30, 50, 70, 80, 90, 95 und schließlich 100% Ethanol inkubiert (500 μ l/Napf) und in 100% Ethanol bei 4°C aufbewahrt. Dann erfolgte die kritische Punkttrocknung mit einer Gold-Palladium Behandlung der Proben, wie von Cohen [1979] beschrieben. Die Bilder wurden in Kooperation mit dem Institut für Chemie des GKSS Forschungszentrums (Dr. M. Schossig) mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops LEO Gemini (Typ 1550 VP) innerhalb weniger Tage aufgenommen.

3.8 Kultivierung von Hybridomzellen auf Polymermembranen und proteinbeschichteten Oberflächen

3.8.1 Kultivierung von Hybridomzellen auf Polymermembranen

Für die Zellkulturversuche wurden Polymermembranscheiben mit einem Durchmesser von 13 mm ausgestanzt und 15 min in 70% Ethanol sterilisiert. Danach wurden die Polymermembranen dreimal in sterilem Aqua dest. gewaschen und in 24-Napf Platten appliziert. Damit die Polymermembranen nicht im Medium schwimmen, wurden sie mit sterilisierten Duranglasringen (innerer Durchmesser 11 mm, äußerer Durchmesser 15 mm, Höhe 17 mm) beschwert.

Auf jeder Polymermembran wurden 4×10^4 Zellen in 1 ml Vollmedium mit 0,1 mg/ml Gentamycin ausgesät. Es erfolgte eine Inkubation der Zellkulturplatten für 3 Tage. Nach der Inkubation wurden die Glasringe entfernt und die Platten bei 200 x g 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Zelldichte mit Hil-

fe des Lactat-Dehydrogenase-Assays und die Antikörperproduktion mit einem Festphasen-Immunoassay bestimmt (s. Abschnitt 3.7.1 und 3.5.2). Diese Zellkulturversuche wurden mit dem Hybridom H10 durchgeführt.

3.8.2 Kultivierung von Hybridomzellen in Polymermembranextrakten

Für die Herstellung von Membranextrakten wurden Polymermembranen und Teflonringe (innerer Durchmesser 11 mm, äußerer Durchmesser 15 mm, Höhe 17 mm) in 24-Napf Platten appliziert. 1 ml Vollmedium/Napf wurde zugesetzt und 7 Tage inkubiert. Danach wurden die Polymermembranen und die Teflonringe entfernt und 5×10^4 H10-Zellen in die Näpfe gegeben.

Es erfolgte eine Inkubation von 3 Tagen. Anschließend wurden die Platten zentrifugiert (200 x g, 10 min) und die Zelldichte mit Hilfe des Lactat-Dehydrogenase-Assays bestimmt (s. Abschnitt 3.7.1). Diese Experimente wurden mit dem Hybridom H10 durchgeführt.

3.8.3 Kultivierung von Hybridomzellen auf proteinbeschichteten Oberflächen

Mit diesen Experimenten wurde das Zellwachstum und die Antikörpersynthese von Hybridomzellen (H10, E11AE11, K2) auf proteinbeschichteten Oberflächen untersucht. Es wurden 96-Napf Zellkulturplatten der Hersteller Corning Inc., NY, USA (Corning[®] Costar 96 Well Clear Flat Bottom Polystyrene TC-treated Microplates) und Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland (96 MicroWell Nunclon TMA Platten) verwendet, die in dieser Arbeit als Costar- bzw. Nunc-Platten bezeichnet werden.

Für die Hybridome H10 und E11AE11 wurden die Näpfe mit unterschiedlichen Konzentrationen von Fibronectin (0,2-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Kollagen I (1-80 $\mu\text{g}/\text{ml}$), BSA (10-800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Laminin (0,4-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), gelöst in PBS (50 $\mu\text{l}/\text{Napf}$) für 2 h beschichtet. Für das Hybridom K2 wurden 24-Napf Platten mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen I, 1 mg/ml BSA, 100% FKS, 10% FKS und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin beschichtet. Näpfe ohne Vorbehandlung wurden als Kontrolle

genutzt. Die BSA-Lösung wurde sterilfiltriert, alle anderen Lösungen wurden bereits steril geliefert.

Nach der Beschichtung wurden die Proteinlösungen abgesaugt und die Näpfe einmal mit PBS gewaschen. Die Hybridomzellen wurden mit einer Startdichte von 4×10^4 Zellen/ml in 100 μ l Vollmedium/Napf ausgesät und 3 Tage kultiviert. Danach wurden die Platten bei 200 x g 10 min zentrifugiert und die Zelldichte mit Hilfe des Lactat-Dehydrogenase-Assays quantifiziert (s. Abschnitt 3.7.1). Die Konzentration der monoklonalen Antikörper im Kulturüberstand wurde mit Festphasen-Immunoassays bestimmt (s. Abschnitt 3.5.2).

3.8.4 Inhibierung der Kollagen- und Fibronectinbindungsstellen mit RGD-Peptiden

Um EZM-Rezeptoren von Hybridomzellen zu untersuchen, wurden RGD-Peptide (Calbiochem, (Merck KgaA), Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Das Peptid besitzt die Sequenz H-Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro-OH und es wurden vier verschiedene Konzentrationen hergestellt. Für den Hemmtest wurden 96-Napf Platten (Costar, Nunc) steril mit Fibronectin und Kollagen I beschichtet. Der Test erfolgte nach dem Protokoll von Zubler [2002].

Verschiedene Fibronectin- (3 μ g/ml, 5 μ g/ml 10 μ g/ml) und Kollagen I-Lösungen (5 μ g/ml, 30 μ g/ml, 60 μ g/ml, 80 μ g/ml), in PBS, wurden auf die Platten verteilt (50 μ l/Napf) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proteinlösungen abgesaugt und durch 50 μ l/Napf PBS/3% BSA ersetzt. Die Platten wurden 2 h inkubiert. Danach wurde die BSA-Lösung abgesaugt und die Platten einmal mit gekühltem PBS (50 μ l/Napf) gewaschen. Die Hybridomzellen (H10 und E11AE11) wurden aus den Zellkulturflaschen geerntet. Das Medium wurde abgesaugt und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Der Flaschenboden wurde mit 5 ml RPMI 1640 gespült und danach mit 2 ml Trypsin/EDTA 5 min im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden suspendiert, in das Falcon-Röhrchen gegeben und bei 200 x g 5 min pelletiert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit Vollmedium auf 1×10^6 /ml eingestellt.

Die unterschiedlichen RGD-Lösungen (70 μ g/ml, 30 μ g/ml, 1 μ g/ml, 1 ng/ml)

wurden mit der Zellsuspension in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gemischt und diese wurden dann 2 h bei 4°C gedreht (für 200 µl Zellsuspension wurden 300 µl RGD-Lösung eingesetzt). Die vorinkubierte Zellsuspension wurde in die proteinbeschichtete 96-Napf Platte pipettiert (50 µl/Napf) und 2 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Platte mit 50 µl/Napf eiskaltem PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 50 µl/Napf Methanol (15 min, RT) wurden die Zellen fixiert. Das Methanol wurde vorsichtig abgesaugt und die Platte 30 min bei RT getrocknet. Die fixierten Zellen wurden mit frisch hergestellter Kristallviolett-Lösung (0,07% in PBS, 100 µl/Napf) 5 min inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS (100 µl/Napf) und die Zugabe von 1% SDS (50 µl/Napf). Die Platten wurden 10 min geschüttelt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 560 nm.

3.8.5 Nachweis Tyrosin-phosphorylierter Proteine bei Hybridomzellen

Für die Untersuchung des Einflusses der Zell-Substrat-Wechselwirkungen auf den Phosphorylierungszustand der Proteine bei Hybridomzellen wurden Zellkulturplatten (6-Napf Platten) mit Fibronectin-Lösungen (1, 3, 5, 10 µg/ml in PBS, 2 ml/Napf) unter sterilen Bedingungen beschichtet.

Nach der Inkubation wurden die Fibronectin-Lösungen abgesaugt, die Hybridomzellen des Klons H10 wurden mit einer Dichte von 7×10^5 Zellen/ml in 2 ml Vollmedium/Napf ausgesät und 2 oder 24 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellkulturplatten bei 200 x g und 4°C 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (500 µl/Napf) gewaschen, und 20 min in 500 µl/Napf eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris-HCL pH 7,4, 20% Glycerol, 0,1 mM Dithiothreitol, 1 mM Natrium-Orthovanadat, Complete Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (1 Tablette/50 ml Extraktionslösung)) bei 4°C inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers (TPP AG, Trasadingen, Schweiz) wurden die Zellen abgeschabt.

Das Zellysate wurde anschließend bei 200 x g und 4°C 5 min zentrifugiert, um Zelltrümmer und DNA zu entfernen. Von dem Überstand wurden 100 µl für die Proteinbestimmung (DC Protein Assay, s. Abschnitt 3.3.2) eingesetzt. 30

μg Protein wurden anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE (s. Abschnitt 3.3.1) analysiert. Die Gele wurden geblottet und phosphorylierte Proteine mit einem murinen monoklonalen Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (PY20, Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) nachgewiesen (s. Abschnitt 3.5.1).

3.9 Versuche zur In-vitro-Immunisierung

3.9.1 Erzeugung von primären unreifen dendritischen Zellen aus murinen Knochenmarkszellen

Für die Gewinnung von murinen Knochenmarkszellen (nach dem Protokoll von Inaba et al. [1992]) wurden zunächst die Beinknochen der Maus (Balb/c, Balb/c-TgNDO 11.10) freipräpariert. Sowohl Femora als auch Tibiae wurden für die Isolierung verwendet. Nach dem Abtrennen der Knochenköpfe wurden die Schäfte der Röhrenknochen in eine mit 10 ml Waschmedium (RPMI 1640) gefüllte Petrischale (Durchmesser 6 cm) gelegt.

Anschließend wurden die Knochenmarkszellen mit Hilfe einer 5 ml-Spritze und passender Kanüle (Durchmesser 0,6 mm) herausgespült. Zum Spülen wurde Waschmedium verwendet. Jeder Knochen wurde zweimal über der Petrischale ausgespült. Danach wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen der Suspension mit einer 5 ml-Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit Waschmedium auf 50 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 18°C und 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml Vollmedium mit 20 ng/ml rm-GMCSF resuspendiert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Anschließend wurden 23 ml Vollmedium mit 20 ng/ml rm-GMCSF zu der Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wurde in zwei 6-Napf Platten aufgeteilt (ca. 1×10^6 Zellen in 2 ml/Napf) und 7 Tage kultiviert. Während der Ausdifferenzierung der hämatopoietischen Stammzellen zu primären unreifen dendritischen Zellen erfolgten mehrere Mediumwechsel. Am Tag 1 und 3 nach der Isolierung wurde ein kompletter Mediumwechsel (2 ml/Napf Vollmedium mit 20 ng/ml rm-GMCSF) durchgeführt. Am Tag 5 erfolgte kein Mediumwechsel, da

die gewünschten Zellen nicht mehr adhären wuchsen. Deshalb wurde Vollmedium mit 20 ng/ml rm-GMCSF (2 ml/Napf) hinzugefügt. Am 7. Tag war die Ausdifferenzierung abgeschlossen.

3.9.2 Isolierung naiver B- und T-Lymphozytenpopulationen

Für die Gewinnung naiver B- und T-Lymphozyten aus Mäusen (Balb/c, Balb/c-TgNDO 11.10) wurde eine Milzzellsuspension hergestellt. Die Milz wurde herauspräpariert, in eine mit 10 ml RPMI 1640 gefüllte Petrischale (Durchmesser 90 mm) überführt, mit der Schere an einem Ende aufgeschnitten und die darin enthaltenen Zellen mit Hilfe eines Spatels herausgestrichen. Durch mehrmaliges Aufziehen der Zellsuspension mit einer 5 ml Pipette wurden die Zellen vereinzelt. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 200 x g 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Vollmedium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Für die anschließende Isolierung von naiven B- und T-Lymphozyten wurde die Zellsuspension geteilt. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte über eine magnetische Zellsortierung mit MACS-Kits entsprechend den Angaben der Firma Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland. Naive T-Lymphozyten wurden über den "CD4⁺-CD62L⁺-Tcell Isolation Kit" und naive B-Lymphozyten mit Hilfe des "B cell Isolation Kit" nach der Vorschrift des Herstellers aus der Milzzellsuspension selektiert. Anschließend erfolgte die Verwendung der Zellpopulationen in In-vitro-Assays (s. Abschnitt 3.9.4).

3.9.3 Beschichtung der Glasoberflächen

Für den Einsatz in der In-vitro-Immunisierung wurden Deckgläschen (22 x 22 mm, Marienfeld GmbH & Co.KG) verwendet. Sie wurden 1 h in Ethanol sterilisiert, mit sterilem Aqua dest. gespült und in 6-Napf Platten appliziert. Danach wurden 2 ml PBS in jeden Napf pipettiert. In die Nöpfe wurden dann verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin (5 µg/ml), Kollagen I (50 µg/ml) und Heparansulfat (50 µg/ml), sowie N-Acetylglucosamin-mannose (50 µg/ml) in verschiedenen Kombinationen gegeben (Gesamtvolumen/Napf ca. 2,16 ml). Die Deckgläschen wurden 2 h im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die

Proteinlösungen wurden danach abgesaugt und die Deckgläschen in der Platte zweimal mit je 1 ml PBS/Napf gewaschen. Danach wurden sie aus der Platte entfernt und unter sterilen Bedingungen zu den naiven dendritischen Zellen gegeben.

3.9.4 In-vitro-Assays zur Bestimmung von Interleukinen und Antikörpern

Für Versuche zur In-vitro-Immunisierung mit Ovalbumin wurden naive dendritische Zellen, naive T- und B-Lymphozyten verwendet. Deckgläschen, die mit Matrixproteinen modifiziert waren (s. Abschnitt 3.9.3), wurden zu den resuspendierten naiven dendritischen Zellen gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 45 μg /Napf Ovalbumin (in 90 μl PBS) und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ /Napf Concanavalin A (in 90 μl PBS) für 3 bzw. 23 h. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden naive T- und B-Lymphozyten zu den dendritischen Zellen gegeben. Pro Napf wurden ca. 3×10^5 naive T-Lymphozyten und ca. 3×10^6 naive B-Lymphozyten zugesetzt (ca. 100 μl Zellsuspension, in Vollmedium). Die Ansätze wurden bis zu 7 Tage im CO_2 -Brutschrank inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden täglich Kulturüberstände abgenommen und die Konzentrationen von Interleukin 12, Interleukin 6 und Ovalbumin-spezifischen Antikörpern gemessen (s. Abschnitt 3.5.3 und 3.5.2).

3.10 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit dem t-Test-Kalkulator der GraphPad Software (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Polymermembranen auf das Wachstum und die Produktivität von Hybridomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Polymermembranen mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften in der Zellkultur eingesetzt (s. Abb. 3.1), um deren Einfluss auf die Produktivität von Hybridomzellen zu untersuchen.

4.1.1 Charakterisierung der Membranen

4.1.1.1 Randwinkelmessungen

Die Aussagen über die Benetzbarkeit der Membranen beruhen auf Randwinkelmessungen an den verwendeten Polymeren (s. Abb. 4.1).

Membranen aus dem Polymer APMA wiesen die höchsten Randwinkel auf, was ein Charakteristikum für hydrophobe Oberflächen ist [Dann, 1970]. NaMAS, NVP20 und NVP30 sind hydrophile Membranen, da sie niedrige Randwinkel besitzen. PAN zeigte im Vergleich dazu eine moderat benetzbare Oberfläche.

4.1.1.2 Bestimmung der Durchflussrate von Wasser

Der Einsatz von Membranen in einem Bioreaktor erfordert ein geringes "Fouling". Deshalb wurde von den Membranen PAN, NVP20, NVP30 und APMA vor und nach einer 24stündigen BSA-Adsorption die Durchflussrate durch die Membranporen bestimmt (Tab. 4.1). NVP20, NVP30 und APMA zeigten keine signifi-

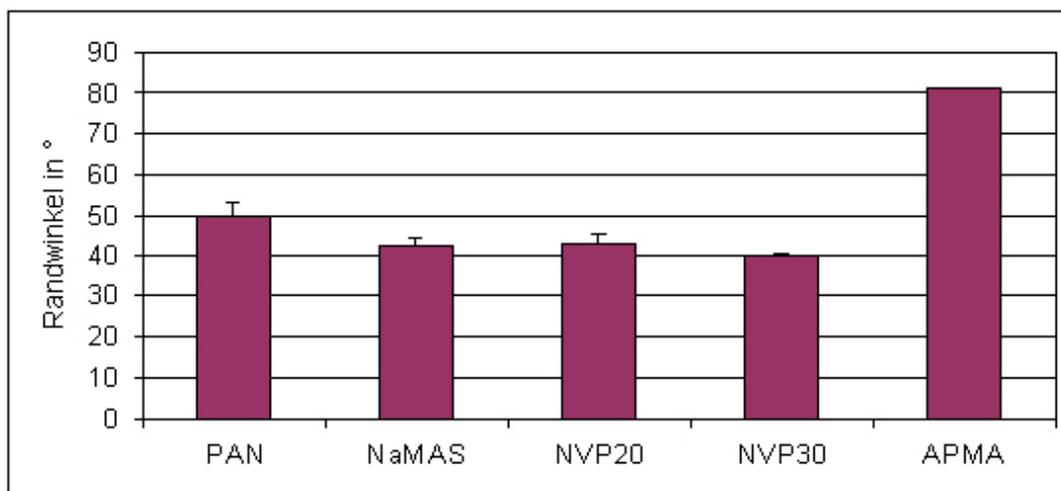


Abbildung 4.1: Wasserrandwinkel der Polymermembranen.

Die Randwinkel wurden mit Hilfe der "sessile drop" Methode unter Verwendung eines Goniometers (Carl Zeiss) bestimmt. (n=10)

kanten Veränderungen in der Durchflussrate vor und nach der Adsorption, was für ein sehr geringes "Fouling" spricht.

NVP20 wies eine sehr geringe Durchflussrate auf, die durch die niedrige Porosität (Porendurchmesser ca. 5,5 nm) dieser Membran bedingt ist. Die Durchlässigkeit von PAN-Membranen sank nach der Behandlung mit BSA auf 50%.

4.1.2 Zellwachstum und Morphologie von Hybridomzellen

Das beste Zellwachstum für den Klon H10 zeigte sich auf APMA-Membranen, ein geringeres Wachstum auf Polystyrol und PAN-Membranen (s. Abb. 4.2).

Die niedrigsten Teilungsraten wurden bei der Kultivierung auf NVP20-, NVP30- und NaMAS-Membranen beobachtet. Die Wachstumsraten auf NVP20- und NVP30-Membranen unterschieden sich nur unwesentlich, so dass das molare Verhältnis scheinbar keinen großen Einfluss hat.

NVP20-Membranen zeichneten sich durch ein reduziertes Zellwachstum im Vergleich zu Polystyrol aus (87%). Diese Unterschiede sind nicht groß, aber signifikant ($p < 0,05$). Insgesamt konnten keine toxischen oder hemmenden Einflüsse der Membranen auf das Zellwachstum beobachtet werden. Auch ist zu sehen,

4 Ergebnisse

Polymermembran	Durchflussrate in l/hm ²	
	vor der BSA-Adsorption	nach der BSA-Adsorption
PAN	253,4	127,6
NVP20	2,3	2,0
NVP30	15,6	19,8
APMA	15,3	14,3

Tabelle 4.1: "Fouling" von Polymermembranen vor und nach der Proteinadsorption (BSA, 1 g/l).

Der Durchfluss von Wasser wurde bei einem Druck von 0,5 kp/cm² und einem Zeitintervall von 2 min gemessen und als l/hm² quantifiziert. (n=2)

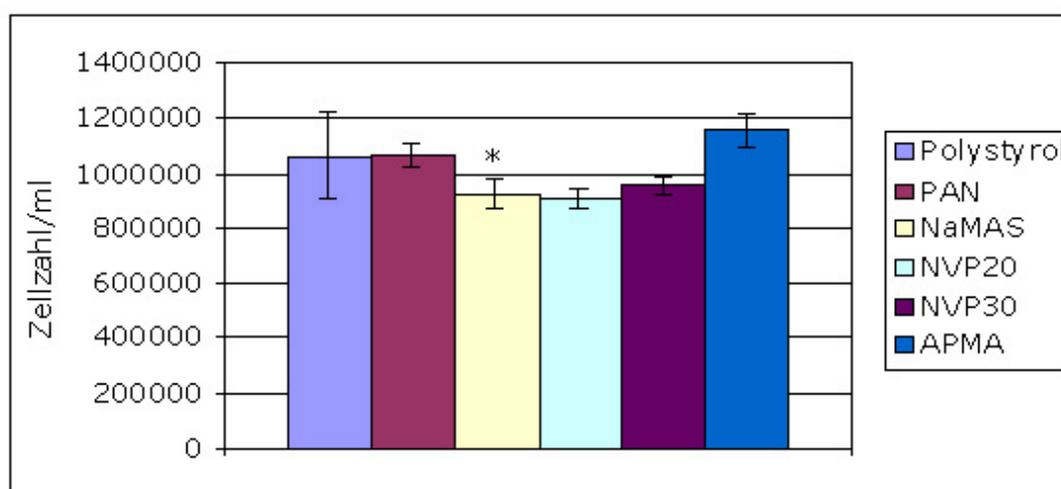


Abbildung 4.2: Einfluss unterschiedlicher Polymermembranen auf das Wachstum von H10-Zellen.

H10-Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/Napf 72 h kultiviert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe des LDH-Assays bestimmt. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 6 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. (n=6, $p \leq 0,05$)

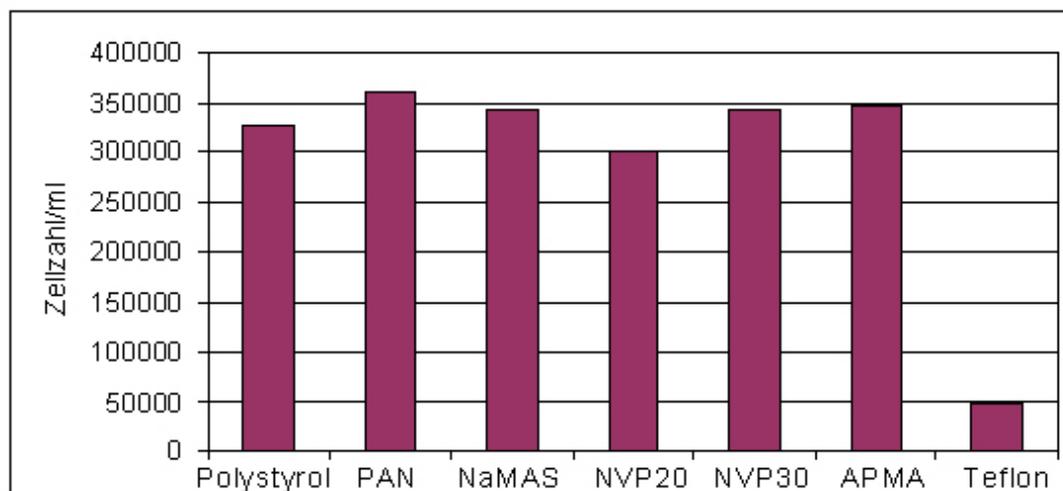


Abbildung 4.3: Einfluss von Membranextrakten auf das Wachstum von H10-Zellen.

H10-Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^4 Zellen/Napf 72 h kultiviert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe des LDH-Assays bestimmt.

dass die Kultivierung auf Polystyrol größere Variabilitäten verursacht als bei den eingesetzten Polymermembranen.

Um zu untersuchen, ob das Wachstum durch die Interaktion der Zellen mit der Membranoberfläche beeinflusst wird oder aber auf der Wirkung löslicher Komponenten beruht, die während der Kultivierung von den Membranen abgegeben werden, wurden die Membranen zunächst für 7 Tage in Kulturmedium inkubiert. Nach der Entfernung der Membranen wurden Zellen in diesem Medium kultiviert. Die Kultivierung der Hybridomzellen in diesen "Membranextrakten" ergab keine Unterschiede in der Zelldichte, so dass die oben angeführten Ergebnisse auf adhäsive Wechselwirkungen der H10-Zellen mit den Membranoberflächen zurückzuführen sind.

In ersten Versuchen wurden die Polymermembranen während der Kultivierung mit Teflonringen beschwert, um das Schwimmen der Membranen zu verhindern. Dabei wurde ein inhibitorischer Effekt des Teflons auf das Wachstum der Hybridomzellen beobachtet (s. Abb. 4.3).

Das Experiment wurde mit einer Zelldichte von 50000 Zellen/ml begonnen.

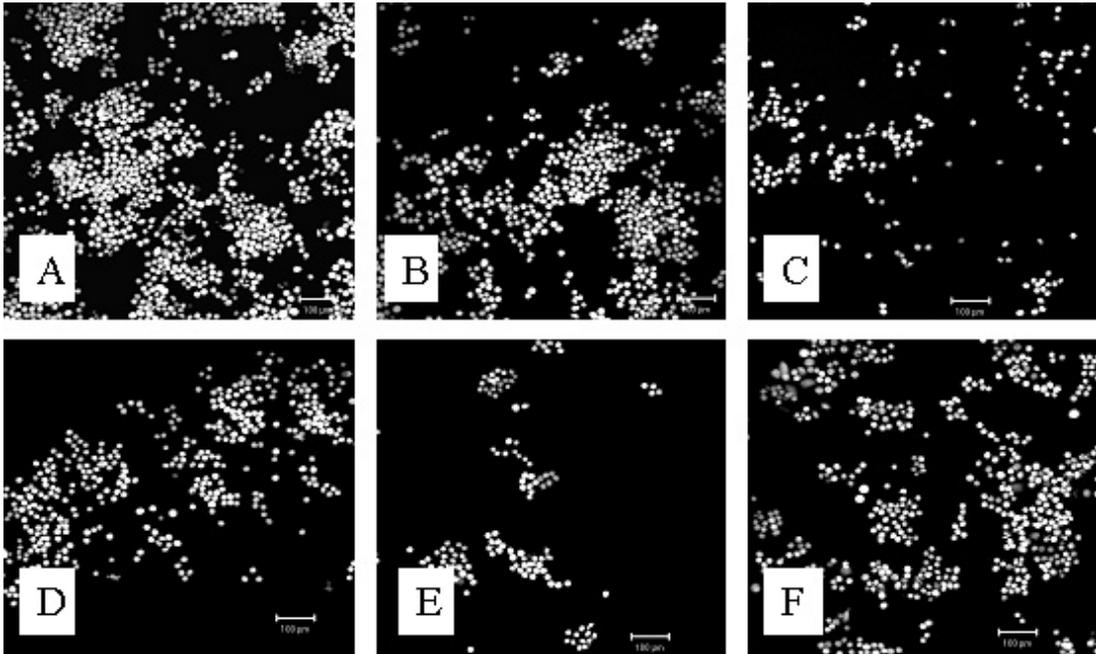


Abbildung 4.4: Adhäsion von H10-Zellen bei der Kultivierung auf unterschiedlichen Polymermembranen und Polystyrol.

A) Polystyrol; B) PAN; C) NaMAS; D) NVP20; E) NVP30; F) APMA

Die Zellen wurden mit FDA ($150 \mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt. Bilder wurden mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Carl Zeiss) aufgenommen. (Messbalken $100 \mu\text{m}$)

Nach 3tägiger Inkubation der Zellen in dem Teflonextrakt lag die Zelldichte fast unverändert bei $47400 \text{ Zellen}/\text{ml}$. Damit ist ein inhibitorischer Effekt offensichtlich, die Ursache dafür ist jedoch unklar. Deshalb wurden bei den zuvor beschriebenen Kultivierungsversuchen Duranglasringe zur Fixierung der Polymermembranen eingesetzt.

Die Vitalität und Verteilung der adsorbierten Zellen auf den Membranen wurden zudem durch Färbungen mit Fluoreszeindiazetat sichtbar gemacht (s. Abb. 4.4). Auf den Membranen APMA und PAN und auf Polystyrol (Kontrolle) konnte dabei eine größere Zahl von Zellen gefärbt werden als auf NaMAS, NVP20 und NVP30.

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass

4 Ergebnisse

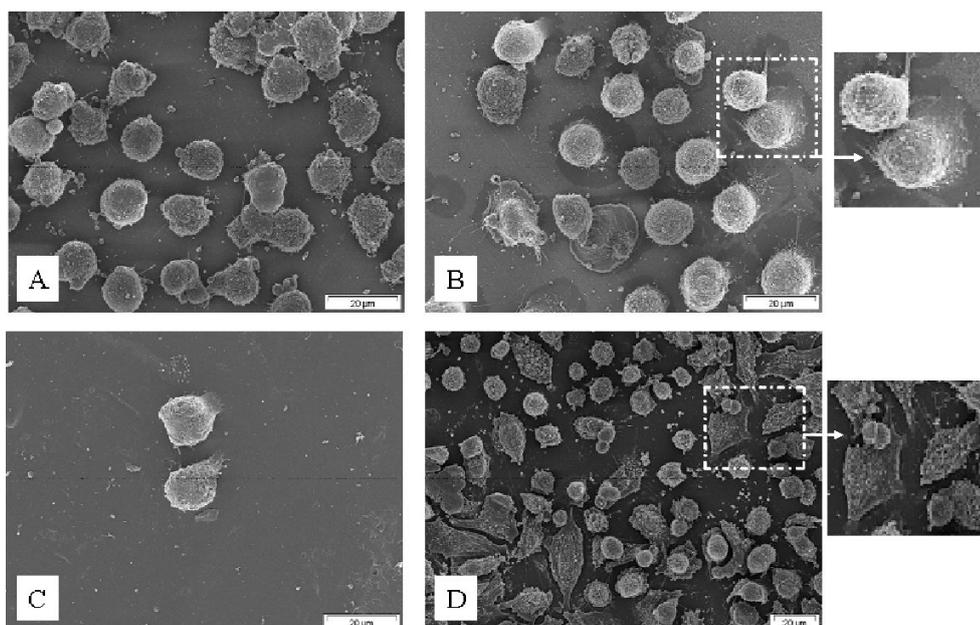


Abbildung 4.5: Morphologie von H10-Zellen nach der Kultivierung auf unterschiedlichen Polymermembranen und Polystyrol.

A) PAN; B) APMA; C) NaMAS; D) Polystyrol.

Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 2×10^4 Zellen/Napf ausgesät und 72 h kultiviert, mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in die kritische Punkt-trocknung gegeben. Für die Bilder wurde das Rasterelektronenmikroskop Leo Gemini Typ 1550 (Carl Zeiss) verwendet. (Messbalken $20 \mu\text{m}$)

sich die Morphologie von H10-Zellen ändert, wenn sie auf APMA-Membranen kultiviert werden (s. Abb. 4.5).

Hybridomzellen wachsen i.d.R. nicht adhärent, durch Abspülen lassen sie sich leicht von der Kulturoberfläche ablösen [Tharakan und Chau, 1985]. In Abb. 4.5 B ist eine starke Interaktion der Zellen mit der aminofunktionalisierten Oberfläche zu erkennen. Die Zellen verankerten sich fest in der Membran und bildeten Kontaktregionen („Spreading“) aus. Sie zeigten damit ein ausgeprägt adhäsives Verhalten, dass sich auf den hydrophilen Membranoberflächen NaMAS, NVP20 und NVP30 nicht nachweisen lässt.

Die Zellen auf der Kontrolloberfläche (Polystyrol) waren stärker verformt, als

auf den Membranen. Sie zeigten keine runde Form mehr, sondern waren stark abgeflacht und hatten eine fibroblastenartige Zellform (s. Abb. 4.5 D).

4.1.3 Produktion monoklonaler Antikörper durch Hybridomzellen

Neben den Wachstumseigenschaften ist vor allem die Produktivität der Hybridomzellen wichtig für die Optimierung der Kulturbedingungen. Die Kultivierung auf Polymermembranen beeinflusste auch die Antikörpersynthese von Hybridomzellen.

Eine höhere Antikörpersynthese zeigte sich nach der Kultivierung auf den Polymermembranen PAN, NVP20 und NVP30. Bei der Verwendung von Polystyrol oder Membranen aus NaMAS und APMA war die Produktivität etwas geringer (s. Abb. 4.6).

Die etwas höhere Zelldichte auf APMA-Membranen bedingte nicht die höchste Produktivität. Bei der Verwendung der hydrophilen NVP-Membranen war dagegen die Zelldichte geringer, die Produktivität jedoch höher.

Insgesamt konnte die Produktivität im Vergleich zu Polystyrol durch die Kultivierung auf den Polymeren PAN und NVP20 signifikant um 15-30% gesteigert werden.

4.2 Wachstum und Produktivität von Hybridomzellen auf proteinbeschichteten Oberflächen

Da davon auszugehen ist, dass sich die bei den Membranen beobachteten Effekte auf die unterschiedliche Adsorption von Proteinen aus dem Medium zurückführen lassen, wurde der Einfluss präadsorbierter Proteine auf Adhäsion, Wachstum und Produktivität von Hybridomzellen untersucht. Für diese Untersuchungen wurden Polystyrol-Gewebekulturplatten verschiedener Hersteller mit Proteinen der extrazellulären Matrix (EZM) modifiziert. In den Arbeiten von Altankov et al. [2000] konnte bereits gezeigt werden, dass die Adsorption von EZM-Proteinen wie

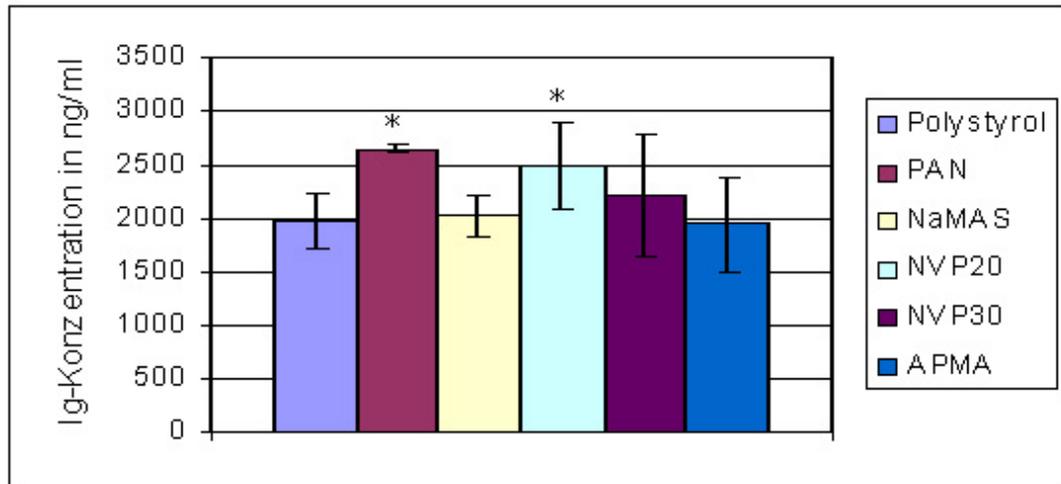


Abbildung 4.6: Antikörperproduktion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf unterschiedlichen Polymermembranen und Polystyrol.

H10-Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^4 Zellen/Napf 72 h kultiviert. Die Konzentration der Immunglobuline im KÜ wurde mit Hilfe eines Festphasen-Immunoassays bestimmt. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 6 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=6$, $p \leq 0,05$)

Fibronectin die Adäsion, das Wachstum und die Funktionalität anderer Zelltypen verbessern kann.

4.2.1 Wachstum und Produktivität des Hybridoms H10

Für das Hybridom H10 konnte in ersten Versuchen eine erhöhte Produktivität auf modifizierten Polystyrol-Oberflächen im Vergleich zum unbehandelten Polystyrol gezeigt werden. Die Steigerungen in der Antikörpersynthese konnten für den 7. Tag der Kultivierung detektiert werden. Die höchste Zelldichte wurde am Tag 4 erreicht. Die Proteinkonzentrationen für die Vorbehandlung wurden so gewählt, dass möglichst eine komplette Absättigung der Polystyrol-Oberfläche erfolgte [Grinnell, 1987; Kleinman et al., 1981].

Aufgrund dieser Steigerungen in der Produktivität sollte in nachfolgenden Experimenten untersucht werden, ob es eine Konzentrationabhängigkeit dieser Effekte

4 Ergebnisse

gibt. Dafür wurden Costar- und Nunc-Zellkulturplatten mit Proteinen modifiziert und Wachstum und Antikörpersynthese (s. Abb. 4.7, s. Abb. 4.8) von H10-Zellen untersucht. Beide Parameter wurden nach 3 Tagen Inkubation bestimmt, so dass kein zusätzlicher Mediumwechsel erfolgen musste.

Durch Modifikation der Polystyrol-Oberflächen mit Fibronectin (0,2-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) konnte das Zellwachstum auf Costar-Platten um 30-50% gesteigert werden, die Synthese monoklonaler Antikörper um 60%. Für Beschichtungen mit Kollagen I ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Es konnte ein um 30% höheres Zellwachstum bestimmt werden, die Antikörpersynthese stieg dabei um 40%.

Diese erhöhte Produktivität ist aber nur bei sehr geringen Kollagen I-Konzentrationen (1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu verzeichnen. Ab einer Beschichtungskonzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verringerte sich die Produktivität stark. Modifikationen der Costar-Platten mit BSA oder Laminin führten nur zu geringfügigen Veränderungen. Mit BSA-Konzentrationen von 10-800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konnte das Zellwachstums um maximal 30% gesteigert werden, die Synthese monoklonaler Antikörper erhöhte sich dabei nicht.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auf Laminin-modifizierten Costar-Platten. Nur in geringen Konzentrationen (0,4-1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führte die Modifikation mit Laminin zu einer Steigerung des Zellwachstums (20-30%). Die Synthese monoklonaler Antikörper ließ sich dadurch nicht steigern.

Die Kultivierung von H10-Zellen auf Fibronectin-behandelten Nunc-Platten führte zu einer 60-70%igen Steigerung des Zellwachstums. Die Antikörpersynthese konnte dabei durch geringe Fibronectinkonzentrationen (0,2-0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) erheblich gesteigert werden (+ 100-120%). Bei der Verwendung hoher Konzentrationen (0,8-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) konnte nur eine Steigerung von 60% erzielt werden.

Kollagen I-modifizierte Nunc-Platten (1-5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) führten zu einer 50-70%igen Erhöhung des Zellwachstums. Ab einer Kollagen I-Konzentration von 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ war die Steigerung in der Zelldichte etwas geringer (+ 40%). Die Antikörpersynthese war bei allen untersuchten Kollagen I-Konzentrationen um etwa 60% höher als auf Polystyrol.

Die Kultivierung von H10-Zellen auf BSA- und Laminin-modifizierten Nunc-Platten steigerte das Zellwachstum und die Antikörpersynthese um 30%. Verwendete man Laminin in höheren Konzentrationen (1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), verringerte sich

4 Ergebnisse

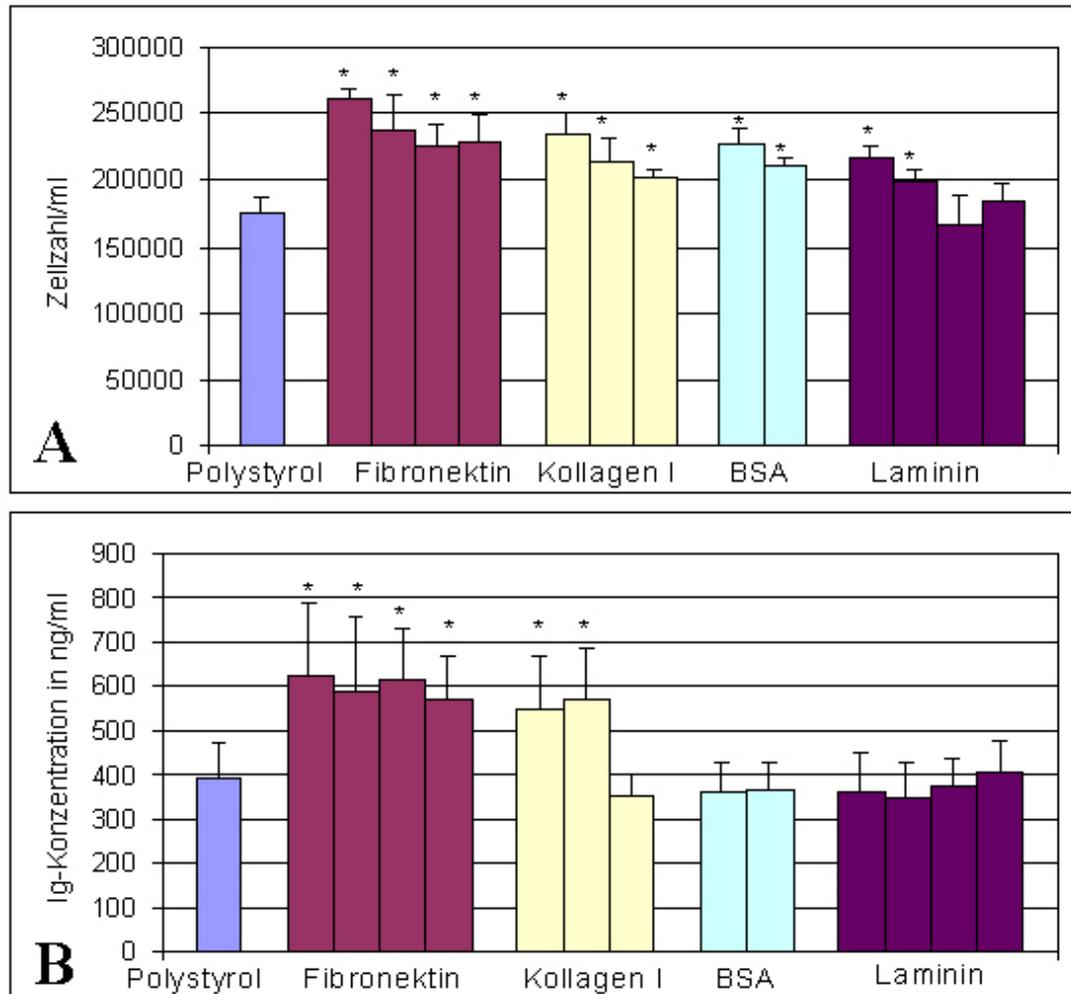


Abbildung 4.7: Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von H10-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Costar.

Die Beschichtungen erfolgten mit Proteinlösungen von Fibronectin (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 3; 5; 10; 20 $\mu\text{g/ml}$), Kollagen I (1; 3; 5; 30; 60; 80 $\mu\text{g/ml}$), BSA (10, 100, 400, 800 $\mu\text{g/ml}$) und Laminin (0,4; 0,6; 0,8; 1; 3; 5; 1; 20 $\mu\text{g/ml}$) für 2 h bei 37°C. Dargestellt sind die Werte für 0,2; 1; 5; 20 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin, 1; 5; 60 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen I, 100; 800 $\mu\text{g/ml}$ BSA und 0,4; 1; 5; 20 $\mu\text{g/ml}$ Laminin. Unbehandelte Costar-Platten dienten als Kontrolle. Die Hybridomzellen wurden mit einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen/ml ausgesät und 72 h kultiviert. Die Zelldichte wurde mit Hilfe des LDH-Assays und die Konzentration von Immunglobulinen mit Hilfe eines Festphasen-Immunoassays bestimmt. Dargestellt sind die Durchschnittswerte von 8 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=8$, $p \leq 0,0001$)

4 Ergebnisse

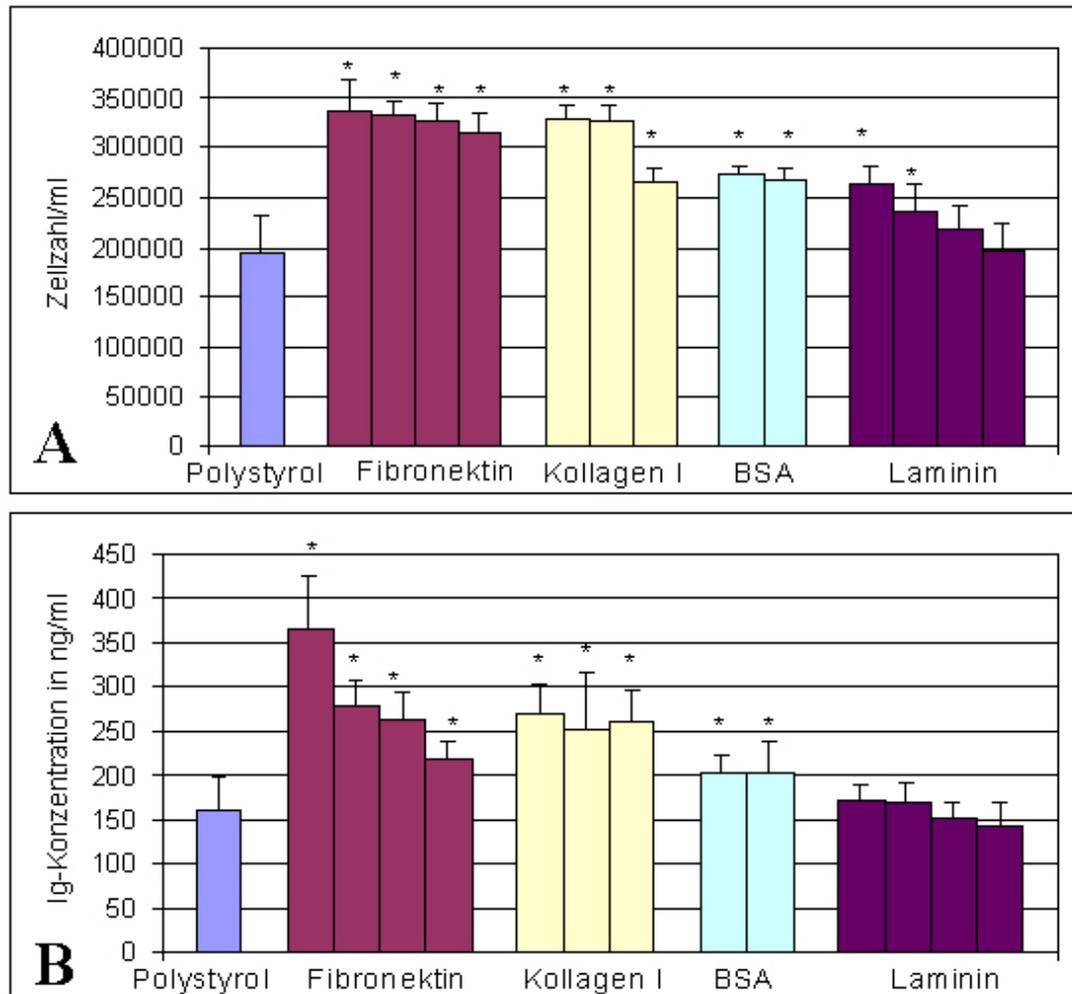


Abbildung 4.8: Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von H10-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Nunc.

Die Modifikation der Platten, Zellkultivierung und Auswertung erfolgte wie in Abb. 4.7 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 8 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. (n=8, $p \leq 0,0001$)

die Antikörpersynthese im Vergleich zu Polystyrol. Dieser Effekt konnte auch bei Kollagen I- und Fibronectin-modifizierten Oberflächen beobachtet werden.

Es war offensichtlich, dass das Zellwachstum auf Nunc-Platten stärker stimuliert wurde als auf Costar-Platten. Dagegen zeigte sich eine um 50% reduzierte Antikörpersynthese auf Nunc-Platten. Dieser inverse Bezug zwischen Wachstum und Produktivität konnte schon bei der Kultivierung auf Polymermembranen beobachtet werden.

Die quantitativen Daten ließen sich durch FDA-Färbungen und elektronenmikroskopische Aufnahmen auch qualitativ bestätigen. Nach Vitalfärbung von H10-Zellen war die höchste Zelldichte auf Fibronectin-behandelten Zellkulturplatten von Nunc zu beobachten (s. Abb. 4.9 u. Abb. 4.10).

Geringere Zelldichten wurden mit Kollagen I- und Laminin-modifizierten Platten erreicht. Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigten eine starke Interaktion der Hybridomzellen mit der Fibronectin-behandelten Oberfläche (s. Abb. 4.11). Im Gegensatz zur nicht modifizierten Polystyrol-Oberfläche bildeten die Zellen Kontaktregionen bzw. Pseudopodien aus. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit Kollagen I-modifizierten Oberfläche zeigten eine geringere Zelladhäsion und keine Pseudopodienausbildung. Es war zu erkennen, dass diese Modifikation zu einer netzartigen Fibrillenstruktur führt, die die Polystyrol-Oberfläche überzieht.

4.2.2 Wachstum und Produktivität weiterer Hybridome

Für die Versuche wurden zwei weitere Hybridome eingesetzt (K2, E11AE11). Die Hybridomzelllinie K2 wurde im Laufe dieser Arbeit etabliert. Die Zellen sezernieren einen anti-idiotypischen Antikörper gegen den monoklonalen Antikörper J17. Die Subklasse des Antikörpers (IgG1) ist mit Hilfe eines subklassenspezifischen Immunoassays bestimmt worden (s. Abschnitt 3.5.2). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 24-well Costar-Platten.

Modifikationen der Polystyrol-Oberfläche von Costar-Platten mit Fibronectin, Laminin und BSA führten zu leicht gesteigertem Zellwachstum ($2,6 \times 10^5$ /ml bzw. $3,3 \times 10^5$ /ml) im Vergleich zu unbehandelten Polystyrol (2×10^5 Zellen/ml). Die Zellen wurden mit einer Startdichte 4×10^4 Zellen/ml eingesät und 72 h kultiviert.

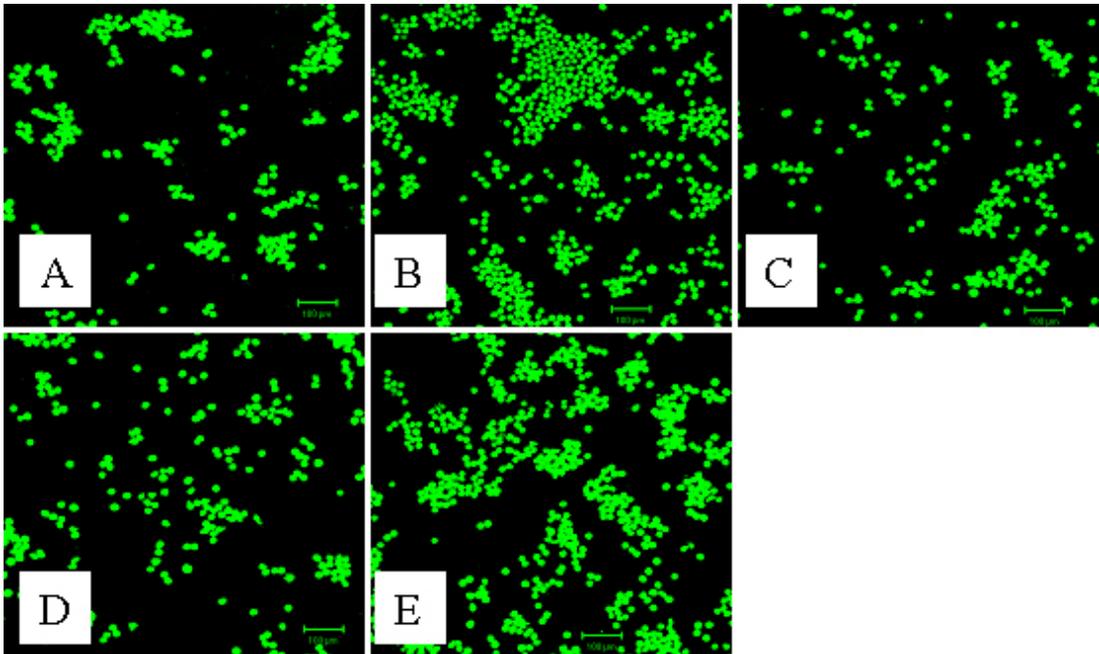


Abbildung 4.9: Adhäsion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf proteinbeschichteten Costar-Platten.

A) Polystyrol; B-E) Polystyrol modifiziert mit B) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin; C) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen I; D) 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA; E) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Laminin.

Die Hybridomzellen wurden mit einer Zelldichte von 4×10^4 Zellen/ml ausgesät und 72 h inkubiert. Die Platten wurden zentrifugiert (200 x g, 5 min). FDA wurde in einer Endkonzentration von 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zu den Zellen pipettiert, 3 min inkubiert, der Kulturüberstand wurde abgesaugt und durch 100 μl PBS ersetzt. (Messbalken 100 μm)

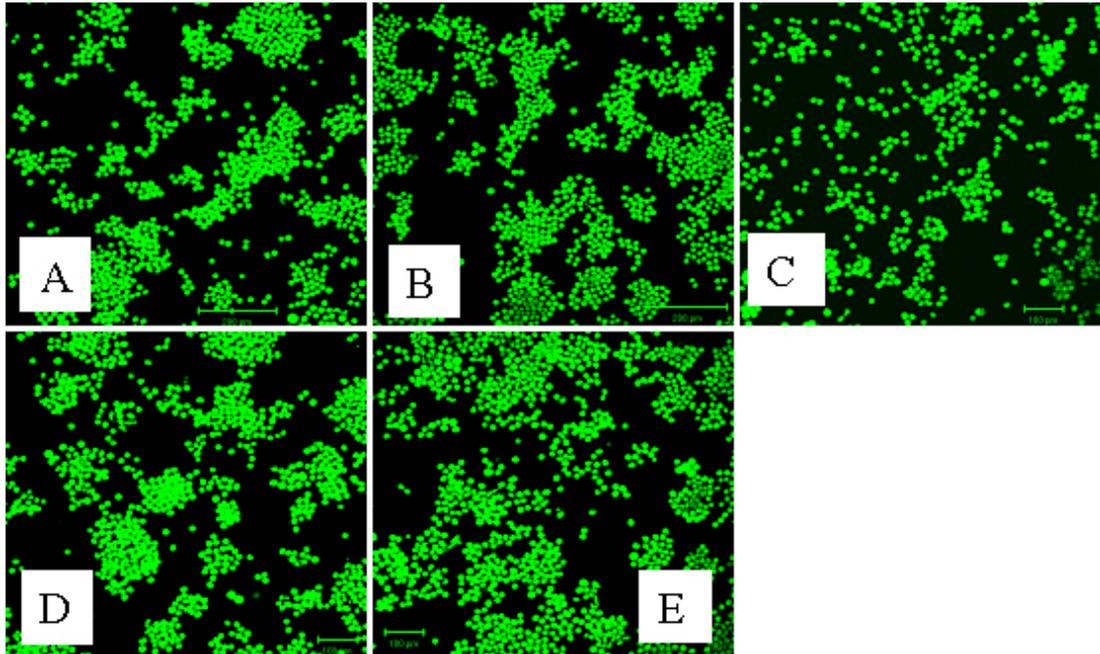


Abbildung 4.10: Adhäsion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf proteinbeschichteten Nunc-Platten.

Die Modifikation der Oberflächen und die Durchführung erfolgte wie in Abb. 4.9 beschrieben, nur für C) wurden 30 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen I für D) 800 $\mu\text{g/ml}$ BSA eingesetzt. (Messbalken 100 μm)

Die Modifikation der Platten mit Kollagen I und 100% FKS beeinflussten das Zellwachstum nicht.

Die Synthese monoklonaler Antikörper stieg durch die Proteinmodifikationen leicht an. Nur Behandlungen mit 10% FKS und Laminin ergaben Werte, die denen der unbehandelten Polystyrol-Oberfläche entsprachen.

Mit den Zellen der Hybridomzelllinie (E11AE11) wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt wie mit H10-Zellen. Das Zellwachstum ließ sich durch Modifikation der Kulturoberfläche nur geringfügig steigern, möglicherweise eine Folge der schwächeren Adhäsivität dieser Zelllinie (s. Abb. 4.12, 4.13).

Wurde mit höheren Konzentrationen gearbeitet, insbesondere mit Kollagen I und Laminin, war ein Abfall in der Zelldichte zu beobachten, ähnlich wie bei den H10-Zellen. Für die Antikörpersynthese der E11AE11-Zellen konnte eine Steigerung auf modifizierten Nunc-Platten von maximal 40% detektiert werden.

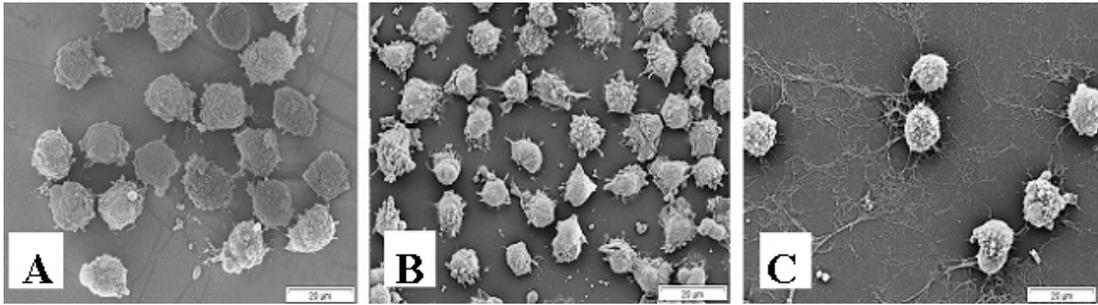


Abbildung 4.11: Morphologie von H10-Zellen nach der Kultivierung auf proteinbeschichteten Oberflächen und Polystyrol.

A) Polystyrol; B-C) Polystyrol (Thermanox, Nunc) modifiziert mit B) 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronektin; C) 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen I.

Die Hybridomzellen wurden mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/ml ausgesät, 72 h kultiviert, mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert, mit Hilfe einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert und in die kritische Punkttrocknung gegeben. Für die Bilder wurde das Rasterelektronenmikroskop Leo Gemini Typ 1550 (Carl Zeiss) verwendet. (Messbalken 20 μm)

Die Produktivität auf Nunc-Platten war insgesamt höher als auf Costar-Platten. Die Vitalfärbungen zeigten keine auswertbaren Unterschiede zwischen den Ansätzen. Auch elektronenmikroskopische Bilder waren aufgrund der schwachen Adhäsion der E11AE11-Zellen nicht möglich. Die im Laufe der Präparation erforderlichen Waschschrte führten zu einem kompletten Verlust der Zellen. Trotz quantitativ höherer Zelldichten im Vergleich zu den H10-Zellen konnten nicht mehr Zellen nachgewiesen werden.

Mit Hilfe mehrerer Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Beschichtung der Kulturoberfläche mit Proteinen der extrazellulären Matrix zu einer Steigerung des Zellwachstums und auch der Antikörpersynthese führen kann, dass diese Steigerungen jedoch stark variieren können.

4 Ergebnisse

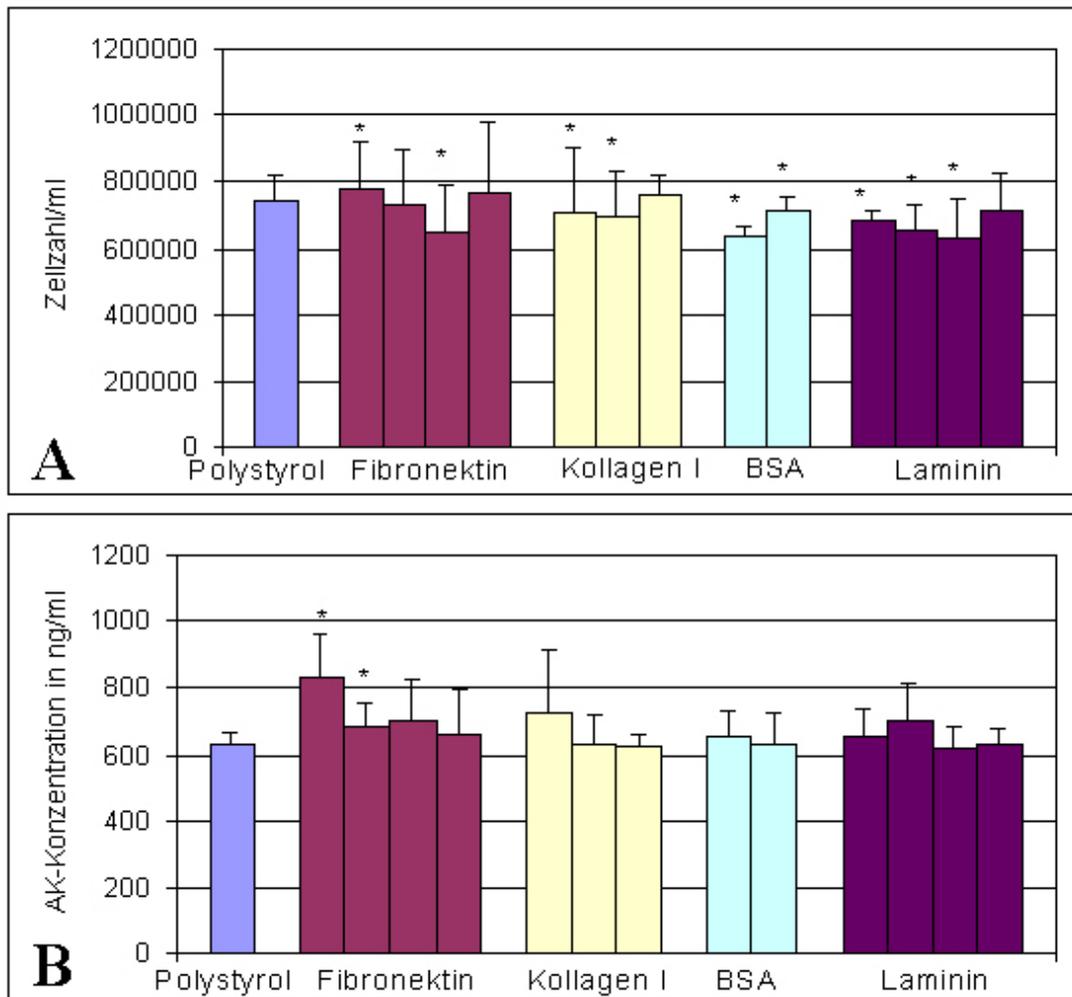


Abbildung 4.12: Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von E11AE11-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Costar. Die Modifikation der Platten, Zellkultivierung und Auswertung erfolgte wie unter Abb. 4.7 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 8 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. (n=8, $p \leq 0,09$)

4 Ergebnisse

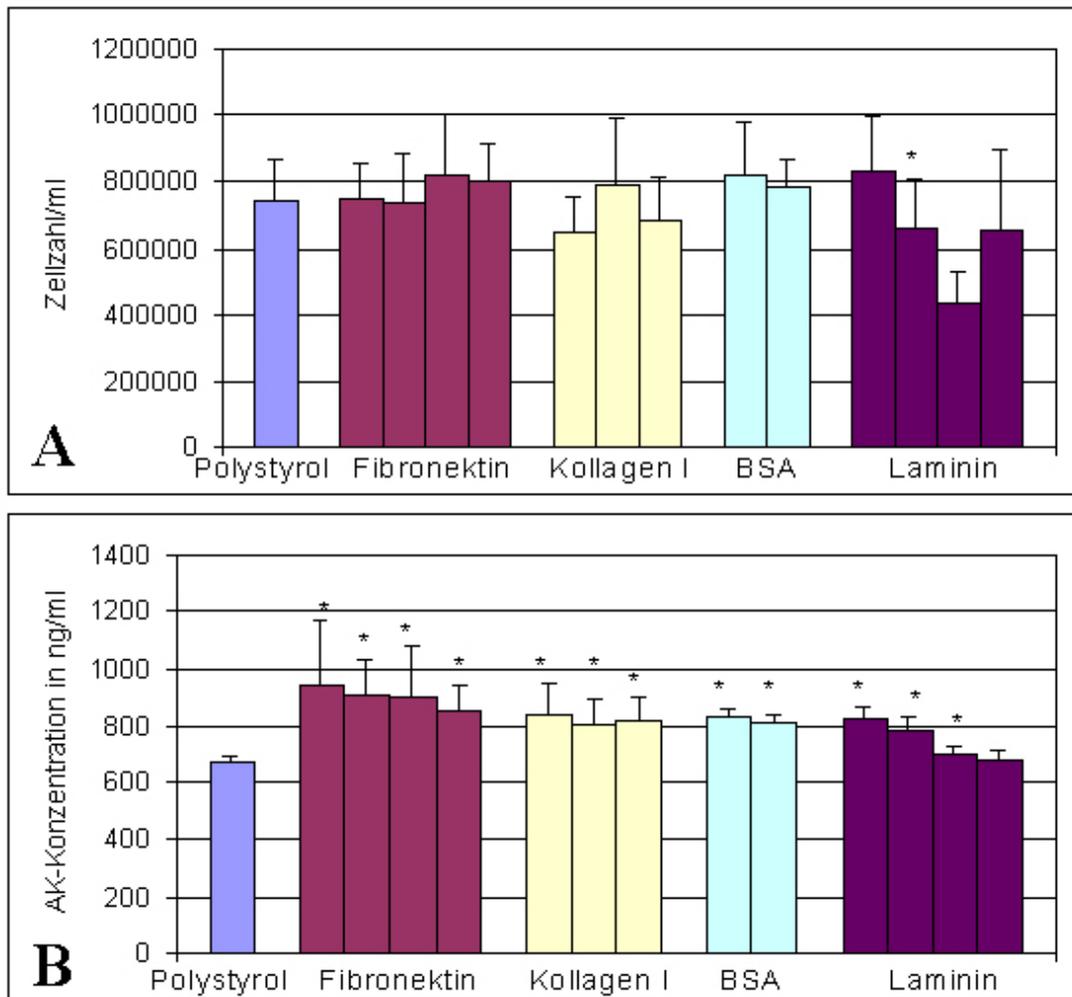


Abbildung 4.13: Proliferation (A) und Antikörpersynthese (B) von E11AE11-Zellen nach der Kultivierung auf Zellkulturplatten von Nunc. Die Modifikation der Platten, Zellkultivierung und Auswertung erfolgte wie unter Abb. 4.7 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 8 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. (n=8, $p \leq 0,09$)

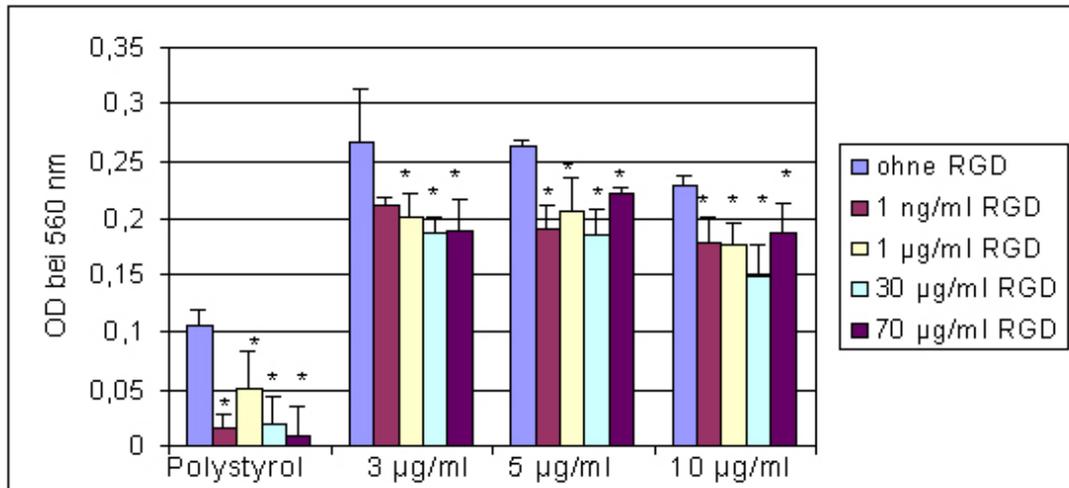


Abbildung 4.14: Inhibierung der Zelladhäsion von H10-Zellen nach der Kultivierung auf Fibronectin-modifizierten Costar-Platten.

Die Hybridomzellen wurden mit RGD-Peptiden bei 4°C (2 h) inkubiert. Danach wurden sie mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Napf ausgesät und 2 h kultiviert. Adhärenzte Zellen wurden mit Methanol fixiert und mit Kristallviolett angefärbt. Die OD wurde bei 560 nm gemessen. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 4 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=4$, $p \leq 0,05$)

4.2.3 Inhibierung von Zell-Matrix-Interaktionen durch RGD-Peptide

Um die Rolle von Integrinen bei der Adhäsion von Hybridomzellen an Matrixproteine zu untersuchen, wurden Hemmversuche mit RGD-Peptiden gemacht. Für diese Versuche wurden die Hybridome H10 und E11AE11 eingesetzt.

Durch die Zugabe von RGD-Peptiden konnte die Adhäsion der H10-Zellen auf Fibronectin-modifizierten Polystyrol (3, 5, 10 µg/ml Fibronectin) um 15-30% inhibiert werden. Im Vergleich dazu ließ sich die Zelladhäsion auf unbehandeltem Polystyrol um 50-90% hemmen (s. Abb. 4.14).

Die Kultivierung von H10-Zellen ohne RGD-Peptide führte zu den höchsten Werten für die Adhäsion. Die Versuche wurden auf Costar- und Nunc-Zellkulturplatten durchgeführt, wobei sich vergleichbare Resultate ergaben.

4 Ergebnisse

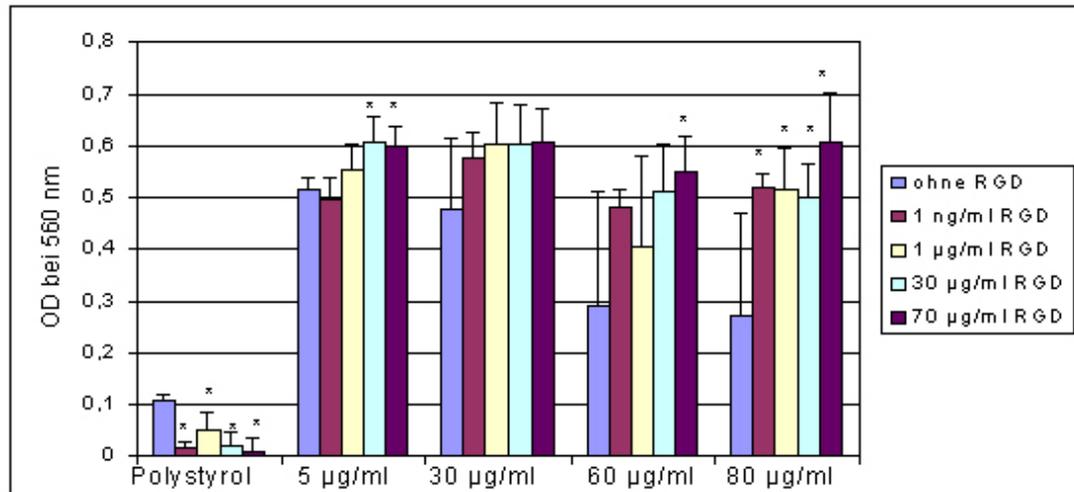


Abbildung 4.15: Einfluss der RGD-Peptide auf die Adhäsion von H10-Zellen in Kollagen I-modifizierten Costar-Platten.

Die Modifikation der Platten, Zellkultivierung und Auswertung erfolgte wie in Abb. 4.14 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 4 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=4$, $p \leq 0,07$)

Wurden die Platten mit Kollagen I beschichtet, zeigte sich keine Hemmung der Zelladhäsion durch die RGD-Peptide (s. Abb. 4.15). Im Gegenteil, die Zellen adhärten nach Inkubation mit den RGD-Peptiden sogar besser an die modifizierte Oberfläche. Dabei konnte eine Steigerung der Zelladhäsion mit Zunahme der RGD-Konzentration beobachtet werden. Diese Beobachtung konnte bei beiden Zellkulturplattentypen gemacht werden.

Die Untersuchungen mit H10-Zellen ergaben, dass sich die Zelladhäsion durch Behandlung der Platten mit Fibronectin um 150% steigern ließ, mit Kollagen I sogar um bis zu 400%. Für E11AE11 konnten die Versuche aufgrund der geringen Adhäsion der Zellen nicht gewertet werden.

4.2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Präsenz bestimmter Integrine auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen (H10, E11AE11) bestimmt. Es wurden

4 Ergebnisse

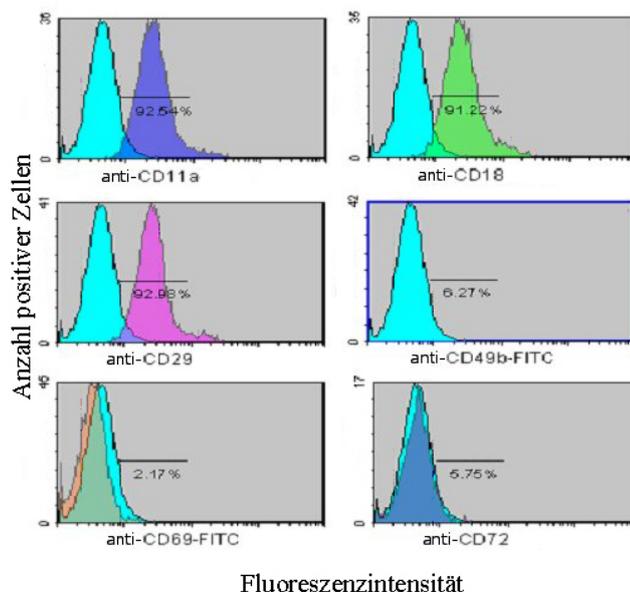


Abbildung 4.16: Ergebnisse der FACS-Analyse für H10-Zellen.

Die Hybridomzellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden 20 min bei 4°C mit Antikörpern gegen CD11a, CD18, CD29, CD49b, CD69 und CD72 inkubiert. Das Ziege-anti-Maus-Ig-FITC-Konjugat wurde in einer Konzentration von $2,6 \mu\text{g/ml}$ für die Ansätze CD11a, CD18, CD29 und CD72 eingesetzt und ebenfalls 20 min bei 4°C auf den Zellen belassen. Die Analysen erfolgten mit dem Gerät Cytomics FC500 CXP der Firma Beckman Coulter GmbH. (n=2)

Antikörper zum Nachweis von Fibronectin- und Kollagen I-Rezeptoren verwendet. Die eingesetzten Antikörper richteten sich gegen unterschiedliche α - und β -Ketten von Integrinen (Abschnitt 1.2.3.3, Tab. 1.1) sowie gegen CD69 (VEA - "very early antigen") und CD72 (CD5-Ligand), über die antikörperproduzierende Zellen im Gegensatz zu B-Lymphozyten nicht mehr verfügen.

So konnten die Oberflächenmarker CD11a/CD18 ($\alpha_L\beta_2$ -Integrin) und CD29 (β_1 -Integrin) auf den Zellen beider Klone nachgewiesen werden (s. Abb. 4.16).

CD49b (α_2 -Integrin) konnte bei keiner der beiden Hybridomzelllinien nachgewiesen werden. Es fehlt die α_2 Kette des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins, weshalb keine Bindung an Kollagen I, IV und Laminin erfolgen kann, da CD49b/CD29 ein Rezeptor

4 Ergebnisse

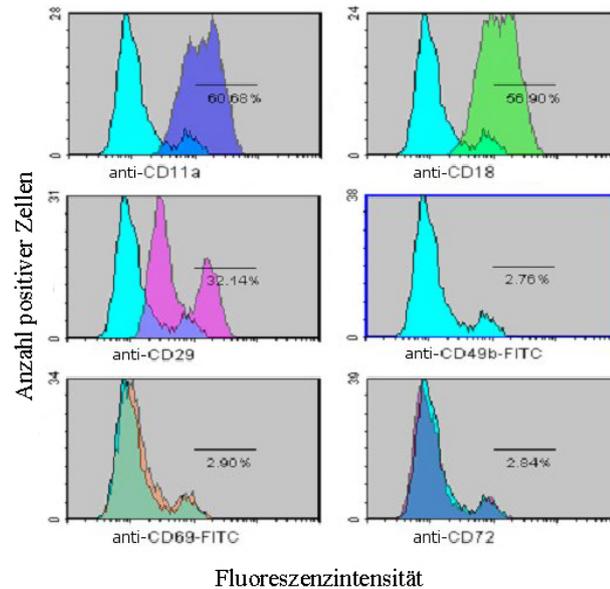


Abbildung 4.17: Ergebnisse der FACS-Analyse für E11AE11-Zellen.

Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 4.16 beschrieben. (n=2)

für diese Matrixproteine ist. Zellen des Hybridoms E11AE11 zeigten zudem ein vermindertes Fluoreszenzsignal für CD29 (s. Abb. 4.17). Der geringe Anteil positiver E11AE11-Zellen (nur 30% im Gegensatz zu 90% bei H10) weist auf eine reduzierte Rezeptordichte hin.

4.2.5 Bestimmung phosphorylierter Proteine

Während des Adhäsionsvorganges von Zellen kann über Integrine ein Signaltransfer stattfinden, der für das Wachstum und die Differenzierung von Zellen wichtig ist. Für die Untersuchung phosphorylierter Proteine in Hybridomzellen wurden zunächst Zelllysate hergestellt und deren Gesamtproteinkonzentrationen bestimmt (s. Abb. 4.18).

Abbildung 4.18 zeigt, dass der Proteingehalt im Zelllysate von H10-Zellen nach einer Kultivierung von 24 h auf mit Fibronectin-modifizierten Platten deutlich höher ist, als nach einer Kultivierung von 2 h. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in einer erfolgten Zellteilung. Zelllysate von unbehandelten Platten oder von mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin-modifizierten Platten zeigten den höchsten

4 Ergebnisse

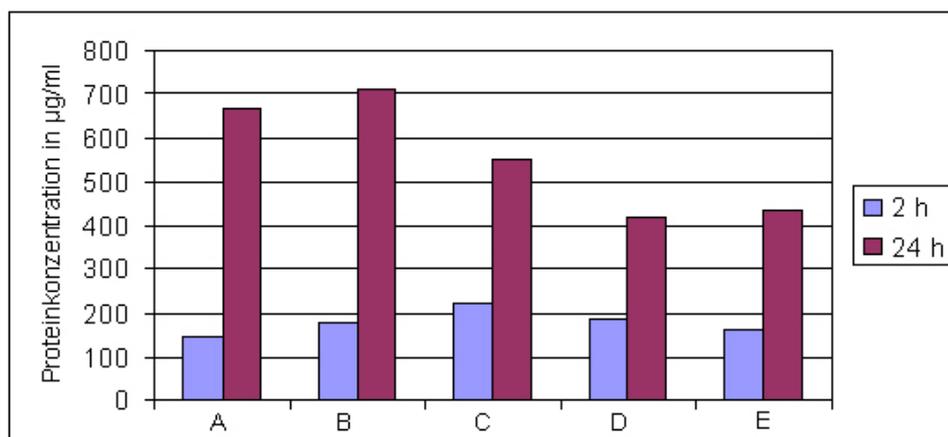


Abbildung 4.18: Bestimmung des Proteingehaltes für Zelllysate von H10-Zellen und humanen Fibroblasten auf unbehandelten und Fibronectin-modifizierten Polystyrol-Oberflächen.

A) Polystyrol, B-E) Polystyrol modifiziert mit B) 3 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin, C) 5 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin, D) 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin, E) 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin. Hybridomzellen (A-D) und humane Fibroblasten (E) (7×10^5 Zellen/ml) wurden auf den Oberflächen 2 oder 24 h kultiviert. Unbehandelte Polystyrol-Oberflächen dienen als Kontrolle. Die Platten wurden zentrifugiert (200 x g, 5 min), die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und 20 min in Lysepuffer lysiert. Das Zelllysate wurde erneut zentrifugiert (200 x g, 5 min, 4°C) und der Überstand für eine Proteinbestimmung mit Hilfe des DC Protein Assays verwendet.

Proteingehalt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Zelllysate der 24 h-Inkubation mit einer SDS-PAGE und einem Western Blot auf Tyrosin-phosphorylierte Proteine hin untersucht.

In den Lysaten von H10-Zellen konnten phosphorylierte Proteine im Bereich von 10 und 30 kDa nachgewiesen werden (s. Abb. 4.19, durch Pfeile markiert). Die Intensität der Banden war bei den Ansätzen größer, bei denen die H10-Zellen auf Fibronectin-modifizierten Oberflächen kultiviert worden waren. Es konnte so gezeigt werden, dass während des Wachstums auf Fibronectin-modifizierten Oberflächen Tyrosin-Phosphorylierungen von Proteinen stattfinden.

4 Ergebnisse

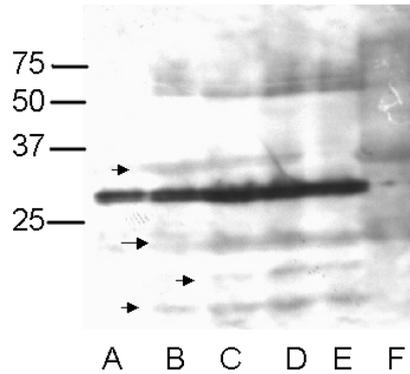


Abbildung 4.19: Detektion Tyrosin-phosphorylierter Proteine in den Zelllysaten von H10-Zellen und humanen Fibroblasten (HF) auf unbehandelten und Fibronektin-modifizierten Polystyrol-Oberflächen. A) Polystyrol, B-F) Polystyrol modifiziert mit B) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronektin, C) 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronektin, D) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronektin, E) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronektin F) HF kultiviert auf 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronektin. Jeweils 30 μg Protein wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und danach auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Nachweis Tyrosin-phosphorylierter Proteine erfolgte mit Hilfe des "WesternBreeze Chemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit" wie unter Abschnitt 3.5.1 beschrieben. Die Pfeile markieren Proteinbanden, die Tyrosin-phosphoryliert sind.

Die anderen Proteinbanden bei 50 kDa und 25-30 kDa zeigen die schwere und die leichte Kette des Antikörpers, der von H10-Zellen synthetisiert wird. H10-Zellen weisen eine weitaus stärkere Adhäsion auf als E11AE11-Zellen, was auch in den Versuchen der Proteinbestimmung zu beobachten war. Adsorbierte E11AE11-Zellen lieferten zu wenig Protein für diese Analysen.

4.3 Versuche zur In-vitro-Immunisierung auf proteinmodifizierten Oberflächen

Da Immunzellen Kontakte zur extrazellulären Matrix benötigen, um Metabolismus und Funktionalität aufrecht zu erhalten [Rafi-Janajreh et al., 1998], wurde in diesen Versuchen der Einfluss von adsorbierten Proteinen und Glukosamino-

4 Ergebnisse

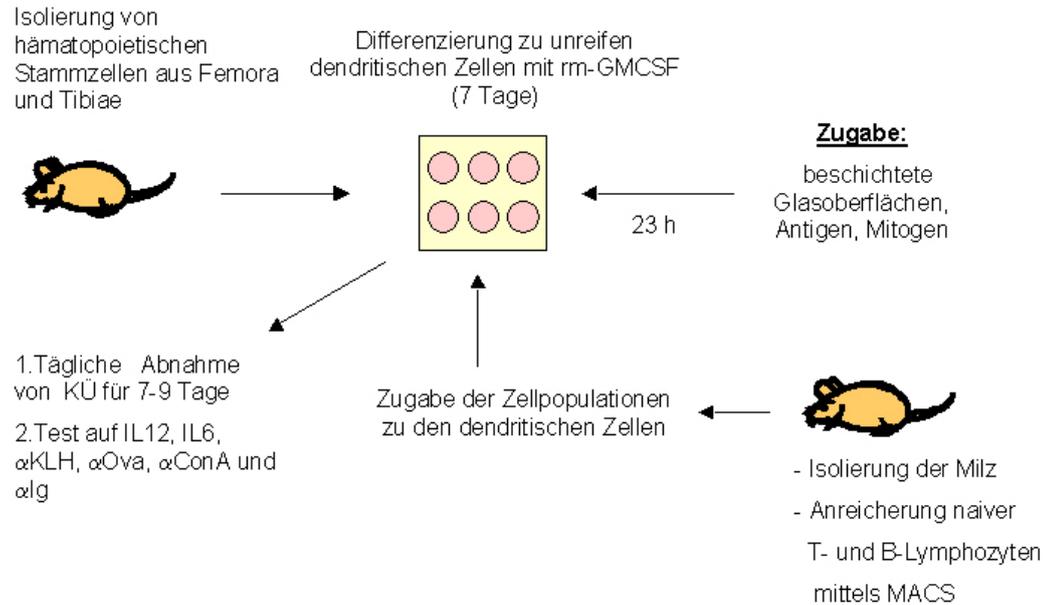


Abbildung 4.20: Schematische Darstellung der In-vitro-Immunisierung.

Für die Versuche wurden Balb/c- und TgNDO 11.10-Mäuse eingesetzt.

glykanen auf die Adhäsion und Interaktion von dendritischen Zellen, T- und B-Lymphozyten untersucht (s. Abb. 4.20).

Zur Unterstützung der Interaktion von Immunzellen wurde eine an den Paracortex des Lymphknotens angelehnte Glas-Oberfläche entwickelt. Als Matrixkomponenten wurden die Proteine Kollagen I und Fibronectin, das Glukosaminoglykan Heparansulfat und der Zucker N-Acetylglucosamin-mannose eingesetzt.

Die aus dem Knochenmark von Balb/c- bzw. TgNDO11.10-Mäusen isolierten hämatopoietischen Stammzellen differenzierten innerhalb von 7 Tagen durch die Zugabe von rm-GMCSF in unreife myeloide dendritische Zellen. Nach der Aktivierung dieser Zellen mit Ovalbumin und Concanavalin A entwickelten sie die für dendritische Zellen typische Morphologie, was durch Phasenkontrastaufnahmen belegt werden konnte (s. Abb. 4.21).

Dann wurden das Antigen und die modifizierten Oberflächen zu den dendritischen Zellen gegeben. Nach 23 h wurden frisch präparierte naive T- und B-Lymphozyten zugesetzt. Diese Zellen wurden mit Hilfe von MACS-Kits (s. Abschnitt 3.9.2) isoliert, der Hersteller gibt die Reinheit der gewonnenen Popula-

4 Ergebnisse

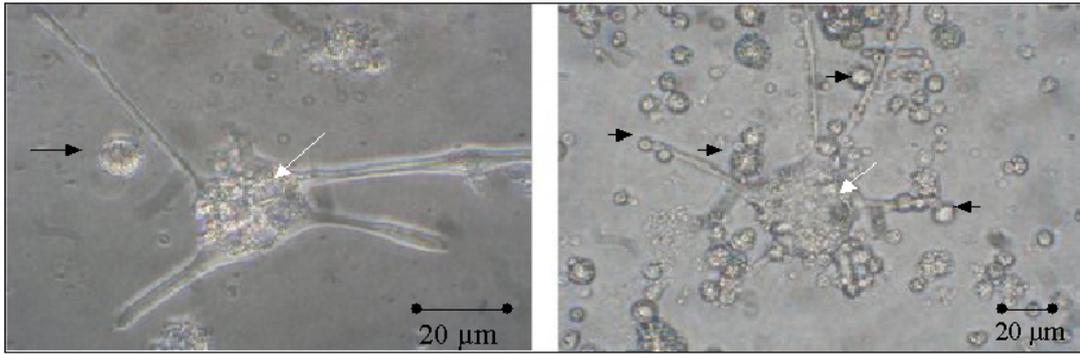


Abbildung 4.21: Phasenkontrastaufnahmen von dendritischen Zellen (weiße Pfeile) und T-Lymphozyten (schwarze Pfeile).

Dendritische Zellen (3×10^5 Zellen/Napf) wurden auf Polystyrol-Oberflächen ausgesät und 23 h mit Antigen inkubiert. Dann wurden T-Lymphozyten ($1,2 \times 10^6$ Zellen/Napf) zugesetzt und weitere 48 h kultiviert. Die Fotos wurden mit der Digitalkamera Camedia C-3040 Zoom (Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) aufgenommen. (Messbalken 20 µm)

tionen mit 90-95% an.

Durch Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass eine Anlagerung von T-Lymphozyten an die Dendriten der antigenpräsentierenden Zellen erfolgte (s. Abb. 4.21 und 4.22). Die Färbung von Aktin mit Phalloidin zeigte die ausgeprägte dendritische Morphologie der Zellen. Darüberhinaus wurde der Aktivierungszustand der dendritischen Zellen mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Für die Färbung des Aktivierungsmarkers DEC205 wurde ein Ratte-anti-Maus-CD205-FITC-Konjugat eingesetzt (s. Abb. 4.22).

Durch die Aufnahme des Antigens und der folgenden Prozessierung wird der Rezeptor DEC205 (CD205) auf der Zelloberfläche überexprimiert [Banchereau und Steinman, 1998], kann aber lt. Angaben des Herstellers auch intrazellulär vorliegen, wenn die Zellen für die Färbung zuvor fixiert worden sind. Abb. 4.22 zeigt eine dendritische Zelle, bei der CD205 intrazellulär nachweisbar war.

Für die Versuche zur In-vitro-Immunisierung wurden Zellen aus Balb/c- und TgNDO11.10-Mäusen verwendet und die Ansätze beider miteinander verglichen.

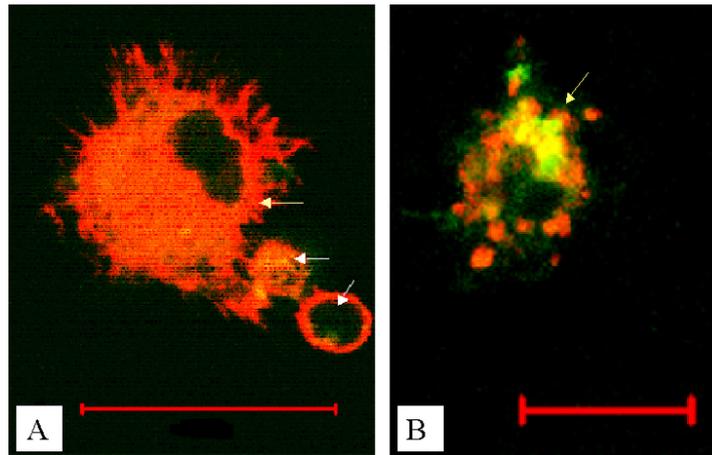


Abbildung 4.22: Immunfluoreszenzfärbung von A) aktivierten dendritischen Zellen (gelbe Pfeile) und T-Lymphozyten (weiße Pfeile) mit Bodipy Phalloidin und B) aktivierten dendritischen Zellen mit Bodipy Phalloidin und α CD205-FITC.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit 4% PFA fixiert. Die Absättigung erfolgte mit PBS/1% BSA. Die Aktinfärbung erfolgte mit Bodipy Phalloidin (rot). Für die Färbung des Rezeptors DEC205 (links) wurde ein Ratte-anti-Maus-CD205-FITC-Konjugat (grün) eingesetzt. Die Deckgläschen wurden anschließend in PBS und Aqua dest. gewaschen und in Mowiol 4.88 eingebettet. Die Zellen wurden mit der Kamera eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (LSM 510) fotografiert. Dabei wurden 63x und 100x Objektive eingesetzt. (Messbalken 20 μ m)

TgNDO 11.10-Mäuse sind transgen für einen Ovalbumin-spezifischen T-Zell Rezeptor. Alle Zellpopulationen in einem Ansatz entstammten demselben Mausstamm.

Die Inkubationsdauer für das Antigen wurde in mehreren Vorversuchen optimiert. Dendritische Zellen wurden mit Ovalbumin und Concanavalin A auf Polystyrol-Oberflächen 3 bzw. 23 h vorinkubiert. Um die Aktivierung der dendritischen Zellen miteinander zu vergleichen, wurde bei beiden Ansätzen der Interleukin 12-Gehalt bestimmt. Wurde die Inkubation der dendritischen Zellen mit dem Antigen auf 23 h ausgedehnt, erhöhte sich der Interleukin 12-Gehalt.

4 Ergebnisse

Dieses Prinzip wurde für die In-vitro-Ansätze eingesetzt.

Bei der Sekretion von Interleukin 6 gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen der beiden Mäusestämme, nur wenn Zellen aus Balb/c-Mäusen auf unbehandelten Polystyrol-Oberflächen kultiviert wurden, war die IL6-Freisetzung erhöht (s. Abb. 4.23).

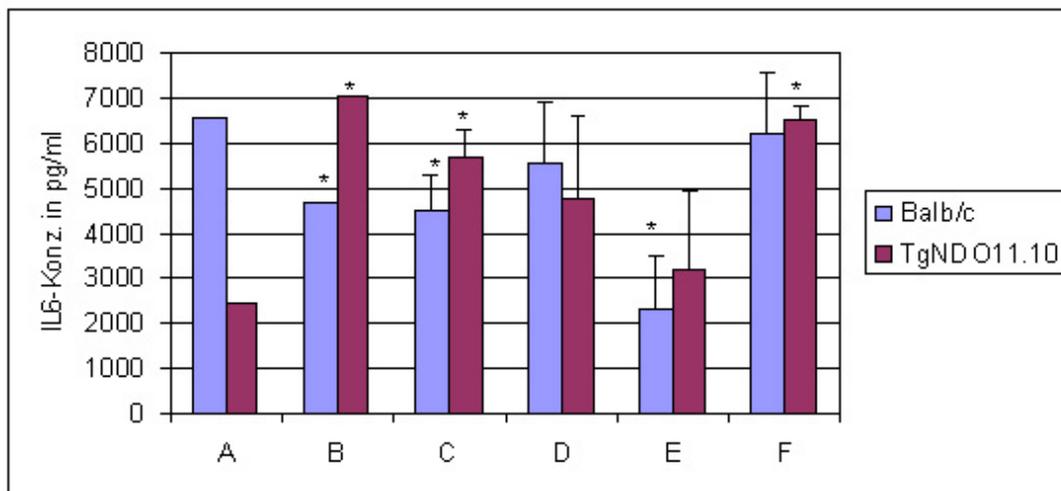


Abbildung 4.23: Interleukin 6-Freisetzung von Balb/c- und TgND O11.10-Zellen nach Stimulierung mit Ovalbumin und Concanavalin A.

A) Polystyrol; B) unbehandeltes Glas; C-F) Glasoberflächen modifiziert mit Proteinlösungen von C) Kollagen I, Fibronectin; D) Kollagen I, Heparansulfat; E) Kollagen I, N-Acetylglucosamin-mannose; F) Kollagen I, Heparansulfat, N-Acetylglucosamin-mannose. Dendritische Zellen (1×10^6 /Napf) wurden auf den verwendeten Oberflächen mit Ovalbumin und Concanavalin A für 23 h inkubiert. Danach wurden 3×10^5 T-Lymphozyten und 3×10^6 B-Lymphozyten in die Ansätze gegeben und 7 Tage kultiviert. Die Interleukin-Bestimmung erfolgte mit Hilfe von Festphasen-Immunoassays. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 2 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=2$, $p \leq 0,07$)

Die Sekretion von Interleukin 12 (s. Abb. 4.24) ist bei Zellen aus transgenen Mäusen im Vergleich zu denen aus Balb/c-Mäusen erhöht. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung auf der mit Kollagen I, Heparansulfat und N-Acetylglucosamin-

4 Ergebnisse

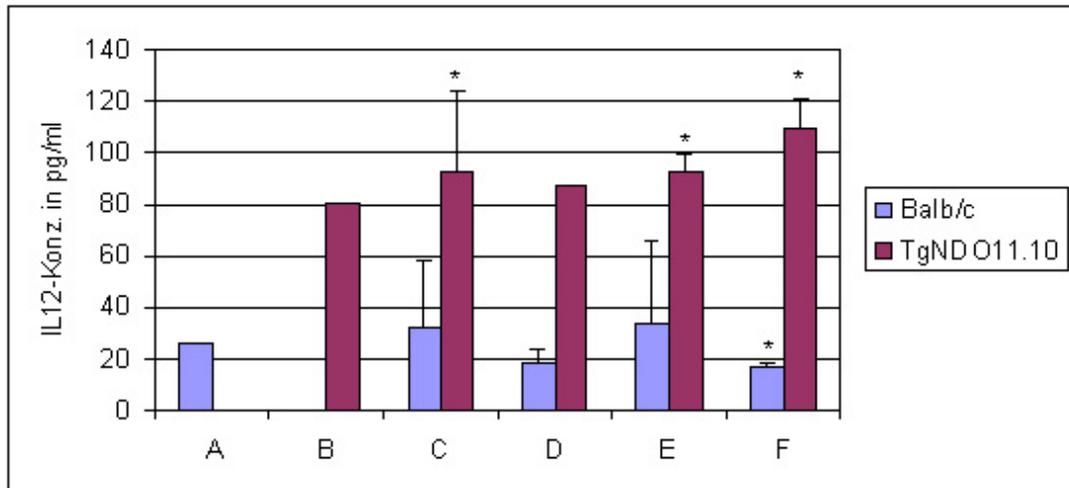


Abbildung 4.24: Interleukin 12-Freisetzung von Balb/c- und TgND O11.10-Zellen nach Stimulierung mit Ovalbumin und Concanavalin A.

Die Modifikation der Oberflächen, Zellkultivierung und Auswertung erfolgte wie in Abb. 4.23 beschrieben. Dargestellt sind Durchschnittswerte aus 2 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=2$, $p \leq 0,05$)

mannose modifizierten Oberfläche.

Ovalbumin wurde während dieser Versuche als Antigen eingesetzt und die Synthese von Antikörpern durch Balb/c- und TgND O 11.10-Zellen miteinander verglichen. Durch die Bestimmung des Gesamtimmunglobulinspiegels konnte gezeigt werden, dass Ovalbumin als Antigen bei Zellen aus TgND O 11.10-Mäusen eine stärkere Antikörperantwort auslöst, als bei den Zellen aus Balb/c-Mäusen (s. Abb. 4.25).

Abbildung 4.26 zeigt die spezifische Antikörperantwort gegen Ovalbumin in den Ansätzen. Im Ansatz mit Balb/c-Zellen konnten keine Ovalbumin-spezifischen Antikörper detektiert werden.

Bei der Verwendung von TgND O 11.10-Zellen ergab sich erwartungsgemäß eine stärkere Reaktion auf das Antigen Ovalbumin. Die Synthese Ovalbumin-spezifischer Antikörper ist auf der mit Kollagen I, Heparansulfat und N-Acetylglucosamin-mannose behandelten Oberfläche am Größten (s. Abb. 4.26 F). Im

4 Ergebnisse

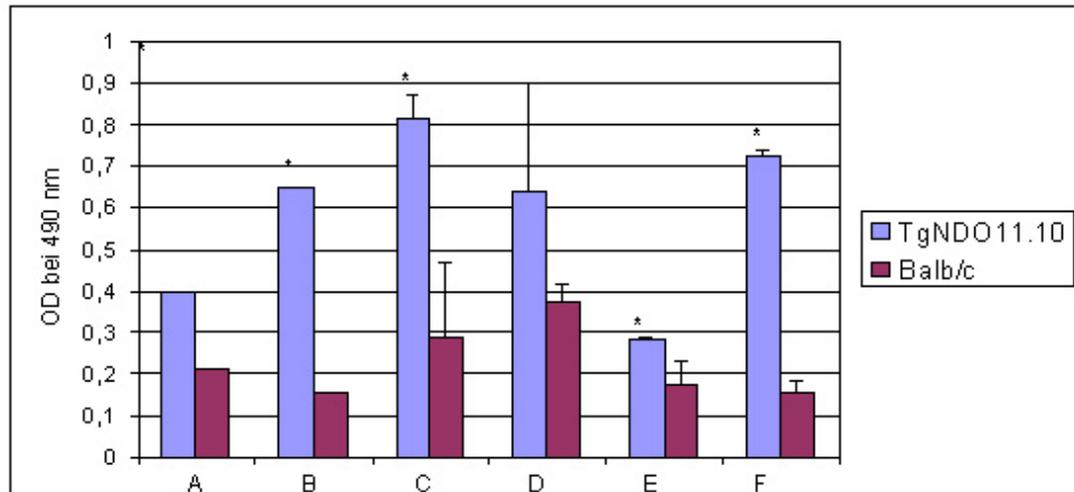


Abbildung 4.25: Gesamtimmunglobulingehalt in Ansätzen von Balb/c- und TgNDO11.10-Zellen.

Die Modifikation der Oberflächen und Zellkultivierung erfolgte wie in Abb. 4.23 beschrieben. Die Bestimmung des Gesamtimmunglobulins erfolgte mit Hilfe eines Festphasenassays. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 2 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=2$, $p \leq 0,01$)

Vergleich zu unbehandelten Polystyrol- oder Glas-Oberflächen konnte die Antikörpersynthese verdoppelt werden. Es konnte damit gezeigt werden, dass die modifizierten Oberflächen für In-vitro-Versuche essentiell sind.

Concanavalin A wurde in diesen Tests als Mitogen, d.h. zur T-Zell-Stimulierung, eingesetzt. Die detektierten Antikörperantworten für ConA (s. Abb. 4.26) waren in den Ansätzen am höchsten. Concanavalin A ist ein Lectin und damit in der Lage, Kohlenhydrate bzw. auch glykolisierte Antikörper zu binden. Es konnte gezeigt werden, dass ähnlich hohe Antikörperantworten auch bei Negativkontrollen (z.B. Ansätze ohne B-Lymphozyten) detektiert worden sind, so dass diese Antworten nicht als spezifisch gelten können.

4 Ergebnisse

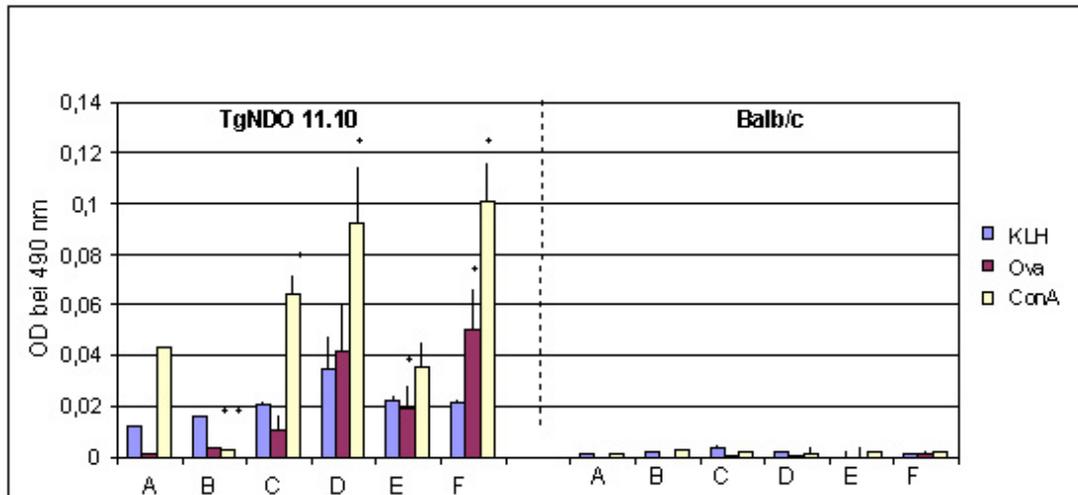


Abbildung 4.26: Nachweis Ovalbumin- und ConA-spezifischer Antikörper von Zellen aus Balb/c- und TgNDO 11.10-Mäusen.

Die Modifikation der Oberflächen und Zellkultivierung erfolgte wie in Abb. 4.23 beschrieben. Die Bestimmung spezifischer Antikörper erfolgte mit Festphasen-Immunoassays. Dargestellt sind Durchschnittswerte von 2 Wiederholungen. Signifikante Unterschiede sind mit * markiert. ($n=2$, $p \leq 0,05$ für Ovalbumin und $p \leq 0,09$ für ConA)

5 Diskussion

5.1 Wachstum und Produktivität von Hybridomzellen auf Polymermembranen

Kultivierungen von Zellen im Labormaßstab wurden seit 1975 hauptsächlich in Kulturgefäßen aus Polystyrol durchgeführt [Amstein und Hartman, 1975].

Die industrielle Großproduktion monoklonaler Antikörper wird in Fermentern und mit Hilfe von Hohlfaserreaktoren durchgeführt. Die Herstellung von Maus- und Rattenantikörpern mit Hilfe von Ascites-Tumoren wurde aus ethischen Gründen in Deutschland verboten und war auch aus Gründen der Standardisierung und Sicherheit für therapeutische Anwendungen nicht zulässig. Die Produktion humaner monoklonaler Antikörper war in diesem System ohnehin nicht möglich [Kuhlmann et al., 1989]. Die Massenproduktion stellt immer noch eine sehr große Hürde für die Anwendung von monoklonalen Antikörpern in der Therapie dar. Darum muss der Entwicklung neuer synthetischer Materialien für diese wichtige Produktion besondere Aufmerksamkeit zukommen.

In Bioreaktoren werden häufig hydrophile Membranen genutzt, die eine geringe Interaktion mit den Proteinen des Mediums aufweisen [Ishihara et al., 1994]. Die Porengrößen der Membranen variieren dabei zwischen 10 und 15 kDa, um einen kontinuierlichen Durchfluss von Nährstoffen, aber auch den Abtransport von toxischen Metaboliten wie Ammoniak und Lactat zu gewährleisten [Nagel et al., 2003]. Antikörper verbleiben aufgrund ihrer Molekülgröße innerhalb der von den Membranen umschlossenen Kompartimente und können auf diese Weise angereichert werden. Über die Auswirkungen solcher Membranen auf das Wachstum und die Produktivität von Hybridomzellen ist jedoch relativ wenig bekannt.

Aus diesem Grund wurden Polymermembranen mit unterschiedlicher chemischer Komposition synthetisiert und deren Einfluss auf Adhäsion, Wachstum und Antikörperproduktion von Hybridomzellen bestimmt. Beim Einsatz dieser Polymere in Primärzellkulturen konnten Einflüsse auf die Zelladhäsion, Wachstum und Funktion bereits gezeigt werden [Krasteva et al., 2002; Groth et al., 2002].

Die Verwendung unterschiedlicher Comonomere wie NVP, NaMAS und APMA führte zu einer veränderten Benetzbarkeit der Polymere. So zeigten die NVP-Membranen eine erhöhte Hydrophilie im Vergleich zu APMA- und PAN-Membranen. Die Adhäsion von Hybridomzellen reduzierte sich bei der Kultivierung auf NVP-Membranen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits mit anderen Zelltypen, wie humanen Fibroblasten, gemacht [Groth et al., 2002]. Bei diesen Untersuchungen wurde auch eine erhöhte Wasseraufnahme der NVP-Membranen beobachtet, verbunden mit einem Aufquellen der Membranoberfläche. Das kann zu einer verringerten Proteinadsorption und damit geringeren Zelladhäsion führen, wie es auch für hydrophile Polyethylenoxid-Membranen oder Polysaccharid-modifizierte Oberflächen bereits gezeigt wurde [Leckband et al., 1999; Morra und Cassinelli, 1999]. Hydrophile Membranen verfügen über eine geringere Grenzflächenenergie, welche eine geringe Adsorption von Proteinen und Zellen bedingt [Ruckenstein und Chen, 1991]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Vitalfärbungen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Hybridomzellen bestätigten das geringere adhäsive Potential der NVP-Membranen.

PAN-Membranen wiesen eine moderat benetzbare Oberfläche mit einem Randwinkel von 50° auf. Optimale Bedingungen für die Wechselwirkungen von Zellen und Materialien werden bei Randwinkeln zwischen 50 und 80° vermutet [Tamada und Ikada, 1994; Groth und Altankov, 1998]. Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass mit Zunahme der Hydrophilie eine signifikante Reduzierung der Proteinadsorption und der Zelladhäsion einherging [Baier, 1980; Fletcher und Loeb, 1979]. Die Antikörpersynthese von Hybridomzellen war bei der Kultivierung auf NVP- und PAN-Membranen am höchsten, obwohl das Zellwachstum in diesen Kulturen geringer war.

Die Kultivierung von Hybridomzellen auf aminofunktionalisierten Membranen (APMA) führte zu einer starken Adhäsion der Zellen und zu einer Änderung ihrer Morphologie. Hier war das Zellwachstum am höchsten, wobei die Antikörper-

synthese gering war. Die Zellen schienen fester an der Membran zu adhären und bildeten Kontaktflächen aus. Das konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden. Eine mögliche Ursache für diesen Effekt kann in dem Vorhandensein der Aminogruppen im Comonomer gesehen werden, die eine Zunahme der Bindung von Fibronectin und eine nachfolgende Erhöhung von Zelladhäsion und Wachstum bewirkt [Faucheux et al., 2004]. Es konnte auch gezeigt werden, dass stark adhäsive und rigide Kultursubstrate eher die Proliferation von Zellen begünstigen [Ingber, 1996].

Polystyrol zeigte ein ähnliches Verhältnis zwischen Wachstum und Antikörpersynthese wie die aminofunktionalisierte Membran. Auch hier stand einer hohen Zelldichte eine geringere Synthese gegenüber. Herkömmliches Zellkulturmaterial wird vor dem Einsatz in der Zellkultur unterschiedlich modifiziert. Dafür können Stickstoff-haltige Gase (Ammoniak, Dimethyl-Azetamid) oder Sauerstoff-haltige Monomere wie Methanol oder Methylmethacrylat verwendet werden. Die dabei entstehenden funktionellen Gruppen mit unterschiedlichen Sauerstoff- oder Stickstoffgehalten haben Auswirkungen auf die Adsorption von Serumproteinen, wie Fibronectin oder Vitronectin, und somit auch auf die Adhäsion von Zellen [Steele et al., 1994].

Bei der Kultivierung von Hybridomzellen auf NaMAS-Membranen wurde ein reduziertes Zellwachstum beobachtet, wahrscheinlich bedingt durch die negativ geladenen Sulfongruppen auf der Oberfläche der Membran [Mestries et al., 1998]. Ähnlich verhielten sich zuvor untersuchte Fibroblasten [Groth et al., 2002]. Viele Serumproteine sind aufgrund von Aspartat- und Glutamatresten negativ geladen. Das kann zu einer Abstossungsreaktion mit einer negativ geladenen Oberfläche führen. Diese Proteine müssten Konformationswechsel durchführen, um positiv geladene Aminosäuren nach außen zu tragen [Ruckenstein und Chen, 1991]. Deshalb kann vermutet werden, dass die für die Adhäsion von Hybridomzellen notwendigen Proteine wahrscheinlich nicht an NaMAS-Membranen adsorbieren können.

Die hier vorgestellten Experimente zeigten, dass sich eine starke Adhäsion (z.B. an APMA-Membranen und Polystyrol) und eine hohe Zelldichte nachteilig auf die Antikörpersynthese der Hybridomzellen auswirkt. Der Einsatz von Membranen, die die Adhäsion der Zellen verringern (PAN) oder stark abschwächen (NVP),

führte zu einer signifikanten Steigerung der Synthese monoklonaler Antikörper. Die Parameter Wachstum, Produktivität und Adhäsion korrelieren invers miteinander. Ähnliche Schlussfolgerungen sind schon in Arbeiten von Hayter et al. [1992]; Luo und Yang [2004] zu finden. Es wird vermutet, dass sich die Hybridomzellen dann in einer verlängerten G1-Phase befinden, was zu einer höheren Synthese monoklonaler Antikörper führt [Luo und Yang, 2004].

Da sich die Produktivität beim Einsatz der Membranen aus PAN und NVP erhöhte, wurden weitere Parameter untersucht, die für einen Einsatz im Bioreaktor von Bedeutung sind. Zu diesem Zwecke wurde untersucht, wie BSA, welches in Kulturmedien enthalten ist, die Membranporen verstopft. Der Prozess des "Foulings" beginnt mit der physikalischen Adsorption der Proteine in Form einer Monoschicht. Die Proteine werden meist über hydrophobe Interaktionen gebunden [Marshall et al., 1993]. Ein schnelles Verstopfen der Membranporen in einem Reaktor würde eine reduzierte Nährstoffversorgung verursachen und den Abtransport toxischer Metabolite beeinträchtigen. Für die Messung der Permeabilität wurde die Durchflussgeschwindigkeit von Wasser vor und nach einer 24stündigen Proteinadsorption gemessen und verglichen. Membranen aus NVP20, NVP30 und APMA zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Durchflussrate, wohingegen PAN-Membranen nach der 24stündigen Proteinadsorption eine fast 50%ige Reduktion im Durchfluss aufwiesen. Damit scheinen PAN-Membranen für den Einsatz in einem Bioreaktor weniger geeignet, da die Membranporen zu schnell verstopfen. Das starke "Fouling" für Dialyse-Membranen aus PAN konnte auch für Zytokine wie $IL1\beta$, $IL6$ und $TNF\ \alpha$ gezeigt werden [Fujimori et al., 1998]. NVP20 wies eine sehr niedrige Durchflussrate auf, die durch die geringe Porosität der Membran bedingt ist.

Andere Autoren zeigten, dass die Einführung hydrophiler Elemente, wie Vinylpyrrolidon (VP), in hydrophobe Polysulfonmembranen zu einer geringeren Proteinadsorption und gleichzeitig zu einer reduzierten Adhäsion von Thrombozyten führt [Higuchi et al., 1990; Woffinfin und Hoenich, 1999]. NVP20-Membranen zeigten ein geringes "Fouling", eine geringe Zelladhäsion und förderten die Synthese monoklonaler Antikörper. Darum erscheinen sie für Bioreaktoren als gut geeignet. Die Herstellung von NVP-Hohlmembranen ist möglich [Fey-Lamprecht et al., 2003] und ihre Porosität kann über eine weite Spanne variiert werden [Kras-

teva et al., 2004].

Die Beschichtung der Membranen mit Proteinen der extrazellulären Matrix wurde nicht untersucht, da die Hydrophilie der Membranen NVP20 und NVP30 eine schlechte Proteinadsorption erwarten ließ. PAN Membranen zeigten dagegen eine zu hohe Adsorption von BSA, was zum Verstopfen der Membranporen führte. Deshalb wurden herkömmliche Zellkulturmaterialien mit Proteinen der extrazellulären Matrix modifiziert und für die Kultivierung von Hybridomzellen eingesetzt, um den Einfluss dieser Modifikationen auf das Zellwachstum und die Antikörpersynthese zu untersuchen.

5.2 Wachstum und Produktivität von Hybridomzellen auf proteinbeschichteten Oberflächen

Die Adhäsion von Zellen erfolgt *in vivo* an Proteine der extrazellulären Matrix (EZM), was Auswirkungen auf Funktionalität und Zellwachstum hat. Hybridomzellen werden hauptsächlich als Suspensionszellen beschrieben [Tharakan und Chau, 1985], aber durch die Fusion von ausgereiften B-Lymphozyten mit Myelomzellen könnte das Adhäsionsverhalten der Hybridomzellen verändert werden. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen Adhäsion, Produktivität und Wachstum gezeigt werden [Heilmann et al., 2005]. Desweiteren implizierten die Kultivierungsversuche mit Polymermembranen einen Einfluss von adsorbierten Serumproteinen auf die Adhäsion der Hybridomzellen.

Da Proteine der extrazellulären Matrix (EZM-Proteine) eine wichtige Rolle bei den Adhäsionsvorgängen von Lymphozyten spielen, wurden Fibronectin, Kollagen I und Laminin in unterschiedlichen Konzentrationen zur Modifikation von Polystyrol verwendet. Durch das Modifizieren von Polystyrol-Oberflächen mit diesen Proteinen konnte die Produktivität und auch das Zellwachstum gesteigert werden. Der Einfluss von Albumin als Hauptkomponente des Serums wurde ebenfalls untersucht. Da sich die Zellkulturmaterialien in Abhängigkeit vom Hersteller oftmals in der chemischen Oberflächenbeschaffenheit unterscheiden [Steele et al., 1994], wurden Polystyrolplatten von zwei unterschiedlichen Herstellern

miteinander verglichen.

Die größten Effekte hinsichtlich des Zellwachstums und der Antikörpersynthese konnten bei der Verwendung von sehr geringen Fibronektinkonzentrationen (0,2-0,4 $\mu\text{g/ml}$) beobachtet werden. Das Zellwachstum konnte dabei um 50-70% gesteigert werden. Die Synthese monoklonaler Antikörper erhöhte sich um 40-120%. EZM-Proteine in niedrigen Konzentrationen bewirken, dass sich die Zellen seltener teilen und dafür schneller differenzieren [Ingber und Folkman, 1989], was sich bei Hybridomzellen vielleicht auch auf die Antikörpersynthese auswirken könnte. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Fibronektin-modifizierten Oberflächen war eine vermehrte Pseudopodienbildung durch die Hybridomzellen zu erkennen. Effekte durch Fibronektin-Modifizierungen konnten auch bei Endothelzellen beobachtet werden, die vermehrt Aktinfasern ausbildeten und sich stärker ausbreiteten ("Spreading") [Flemming et al., 1999].

Das Herstellungsverfahren der Zellkulturplatten hatte ebenfalls Auswirkungen auf die untersuchten Parameter. Bei der Kultivierung der Zellen auf Nunc-Platten ergab sich generell ein höheres Zellwachstum, aber eine geringere Antikörpersynthese als auf vorbehandelten Costar-Platten. Wachstum und Produktsynthese der Hybridomzellen zeigten in diesen Versuchen keine Korrelation. Das konnte auch bei der Kultivierung auf Polymermembranen beobachtet werden und ist von anderen Autoren ebenfalls beschrieben worden [Luo und Yang, 2004; Hayter et al., 1992]. Die chemische Oberflächenzusammensetzung der verwendeten Zellkulturplatten von Nunc und Costar wurde nicht bestimmt. Es ist jedoch anzunehmen, dass beide Plattentypen Unterschiede in ihrer Oberflächenzusammensetzung aufweisen.

Bei der Verwendung höherer Konzentrationen von EZM-Proteinen wurde in beiden Zellkulturplatten ein Abfall sowohl in der Zelldichte, als auch in der Sekretion monoklonaler Antikörper beobachtet. Eine höhere Konzentration von EZM-Proteinen auf der Kulturoberfläche scheint sich damit inhibierend auf Wachstum und Funktion der Zellen auszuwirken und die zuvor beobachtete inverse Korrelation scheint nicht mehr gegeben. Es konnte gezeigt werden, dass eine starke adsorptive Bindung von Fibronektin an die Kulturoberfläche die Wechselwirkung mit den Zellen beeinträchtigen kann [Petitt et al., 1994]. Die Modifikation von benetzbaren Oberflächen mit hohen Fibronektin-Konzentrationen

führt zu der Adsorption von Molekülen mit nichtaktiven Konformationen [Grinnell, 1987]. Es kann dabei auch zur Ausbildung mehrerer Adsorbatschichten kommen. Bei Proteinen mit geringer Konformationsstabilität bleibt dabei die natürliche Konformation nicht immer erhalten, was sich auf die Interaktion mit Zellen auswirken kann [Andrade et al., 1987; Young et al., 1988]. Die mit wachsender Moleküldichte vermutlich einhergehende Modifikation der Oberfläche mit denaturierten Molekülen könnte Ursache für das Absinken der Zelldichte und der Antikörpersynthese sein.

Der Einsatz geringerer Konzentrationen von EZM-Proteinen für die Modifikation von Polystyrol führte zu einem gesteigerten Zellwachstum und zu einer erhöhten Synthese monoklonaler Antikörper. Die geringen Proteinkonzentrationen könnten zu einer gemischten Adsorption mit Serumproteinen führen. Eine dieser Serumkomponenten ist z.B. Vitronektin, das eine starke adhäsive Wirkung auf Lymphozyten ausübt [Groth et al., 1994].

Die Verwendung von Kollagen I und Albumin bedingte moderate Erhöhungen in der Zelldichte und der Synthese monoklonaler Antikörper. Laminin hatte nur geringen Einfluss auf die untersuchten Parameter. Mit Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass Laminin, im Gegensatz zu Fibronektin, die Migration von Zellen verhindern kann und dass durch eine zu starke Zell-Matrix-Adhäsion das Zytoskelett reorganisiert wird [Flemming et al., 1999]. Desweiteren ist bekannt, dass verschiedene EZM-Proteine auch verschiedene funktionelle Effekte im gleichen Zelltyp (z.B. in Endothelzellen) hervorrufen können [Ingber et al., 1987]. Dies könnte u.a. eine Erklärung für die unterschiedlichen Produktivitäten und Zelldichten sein.

Um zu untersuchen, welche Rolle Integrine für Wachstum und Funktion der Hybridomzellen spielen, wurden Untersuchungen mit einem RGD-Peptid durchgeführt. Durch den Einsatz von RGD-Peptiden kann die Adhäsion von Zellen an Matrixproteine, die eine RGD-Sequenz enthalten, unterbunden werden, da die dafür nötigen Integrine blockiert werden [Schaffner und Dard, 2003]. Für Fibronektin-modifizierte Oberflächen konnte eine Hemmung der Zelladhäsion durch die eingesetzten RGD-Peptide gezeigt werden, d.h. dass Hybridomzellen an Fibronektin-modifizierte Oberflächen adhäreren und diese Adhäsion erfolgt teilweise Rezeptor-vermittelt und spezifisch. Auf unbeschichteten Polystyrol-

oberflächen konnte die Adhäsion der Zellen am deutlichsten gehemmt werden. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf Adhäsionsproteinen im Serum wie z.B. Vitronektin, die die Adhäsion von Lymphozyten fördern [Groth et al., 1994]. Überraschend waren die Ergebnisse für Kollagen I-modifizierte Oberflächen. Es wurde gezeigt, dass die Adhäsion der Zellen nicht gehemmt werden konnte. Die Adhäsion wurde durch RGD-Peptide gesteigert. Die Ursachen dafür sind jedoch unklar.

Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass die α_2 -Kette des $\alpha_2\beta_1$ -Integrins nicht auf der Oberfläche der H10- und E11AE11-Zellen vorkommt. Das $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ist wichtig für die Bindung an Kollagen I und Laminin (s. Tab. 1.1). Die Expression der β_1 -Kette war bei E11AE11-Zellen im Vergleich zu H10-Zellen (90%) auf 30% reduziert. Damit kann dieser Rezeptor wahrscheinlich nicht gebildet werden, was den geringen Einfluss der Proteinbeschichtungen auf Zelldichte und Produktivität von E11AE11-Zellen erklären könnte.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Rezeptoren für die Bindung von Kollagen I und Laminin auf der Oberfläche der untersuchten Hybridomzellen reduziert ist. Das Fehlen von α -Ketten führt auch bei anderen malignen Zellen, z.B. M21L, zu einer Inhibierung der Adhäsion an EZM-Proteine. M21L ist eine humane Melanomzelllinie, die keine α_V -Kette auf der Zelloberfläche exprimiert. Sie ist damit nicht in der Lage, EZM-Proteine wie z.B. Fibronektin, Vitronektin oder Kollagen zu binden [Kantlehner et al., 2000]. Die veränderte Expression von Rezeptoren auf der Oberfläche von Hybridomzellen könnte durch die malignen Eigenschaften der Myelomzellen verursacht werden.

Durch Untersuchungen der Tyrosin-Phosphorylierungen von Proteinen konnte gezeigt werden, dass der Anteil Tyrosin-phosphorylierter Proteine in den adhärent wachsenden Hybridomzellen abhängig von der eingesetzten Fibronektin-Konzentration war. Phosphorylierte Proteine sind Bestandteil vieler Signalkaskaden. Daraus folgt, dass Fibronektin bzw. der Fibronektinrezeptor für Adhäsionsvorgänge, Wachstum und Funktion der verwendeten Hybridomzellen von Bedeutung war. Auch für viele andere Zelltypen wurde bereits beschrieben, dass eine verstärkte Phosphorylierung von Signalproteinen stattfindet, wenn Integrinrezeptoren durch die Bindung an EZM-Proteine verclustern [Schlaepfer et al., 1999]. Nach der Bindung von Integrinen an die extrazelluläre Matrix wird Ak-

tin mithilfe weiterer Proteine wie Talin oder α -Actinin komplexiert, wodurch es zur Aggregation der Integrine untereinander und damit zur Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe kommt. Bei diesen Vorgängen werden verschiedene Rho-GTPasen aktiviert, die Signalkaskaden für die Motilität oder auch Differenzierung der Zellen einleiten [Brakebusch et al., 2002]. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Veränderung von Zellfunktionen, wie Wachstumsrate oder Differenzierung, der Grad der Phosphorylierung zellulärer Proteine stark ansteigt [Schaller et al., 1992].

Die hier gewonnenen Daten belegen für mehrere Hybridomzelllinien, dass die Modifizierung der Kulturoberfläche mit geringen Proteinkonzentrationen (0,2-0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fibronectin) zu einer Steigerung sowohl der Zelldichte als auch der Antikörpersynthese führen kann. Eine erhöhte Produktivität von monoklonalen Antikörpern ließ sich bei allen Hybridomen feststellen. Die Erhöhung der Synthese um bis zu 120% (z.B. bei H10-Zellen) kann für die industrielle Herstellung monoklonaler Antikörper von Bedeutung sein. Die Effekte sind jedoch nicht bei allen untersuchten Hybridomzelllinien gleich stark. Für die zweite untersuchte Zelllinie E11AE11 konnte nur eine Steigerung um 40% erreicht werden, bei im Wesentlichen gleichbleibender Zelldichte. Die für die Modifikation verwendeten Proteinkonzentrationen müssen daher für jede Zelllinie optimiert werden, da sich Hybridomzellen hinsichtlich ihres Adhäsionsverhaltens deutlich unterscheiden.

5.3 Versuche zur In-vitro-Immunisierung

Durch die Entwicklung der Hybridomtechnologie haben monoklonale Antikörper eine breite Anwendung in Biowissenschaften und Medizin gefunden, jedoch ist der Einsatz muriner Antikörper für humane Therapien durch die Immunogenität der Maus-Antikörper stark eingeschränkt. Aufgrund der murinen Herkunft der Antikörper generiert das humane Immunsystem polyklonale Human-Anti-Maus-Ig-Antikörper (HAMA), so dass keine langfristige Behandlung möglich ist [Green, 1999]. Im Laufe der Jahre wurden deshalb viele Ansätze verfolgt, um die Immunogenität muriner monoklonaler Antikörper zu reduzieren oder humane Antikörper direkt zu generieren. Es wurden chimäre Antikörper entwickelt, bei denen die murinen variablen Regionen (ca. 34% des Antikörpers) an die kon-

stanten Domänen von humanen Antikörpern fusioniert wurden [Morrison und Oi, 1989] oder humanisierte Antikörper, bei denen nur noch die CDR-Regionen (ca. 5-10% des Antikörpers) murinen Ursprungs sind [Riechmann et al., 1988]. Der Einsatz von transgenen, sogenannten Xeno-Mäusen [Green und Jakobovits, 1998], die Übertragung humaner Stammzellen in immundefiziente Mäuse [Dick, 1991] und die Verwendung von Antikörper-Phagen-Banken [Barbas III. et al., 1991] dagegen erlauben die Generierung vollständig humaner Antikörper.

Ein weiterer Ansatz zur Gewinnung humaner Antikörper ist die sogenannte *In-vitro*-Immunisierung [Borrebaeck et al., 1988], d.h. B-Lymphozyten werden *in vitro* gegen T-Zell-abhängige Antigene aktiviert. Die Gestaltung einer komplexeren Immunantwort außerhalb des menschlichen Organismus wäre ein interessantes Verfahren für die Gewinnung von antigenspezifischen humanen B- oder T-Lymphozyten, die anschließend immortalisiert werden sollen. Sie wäre auch für die Induktion einer spezifischen Immunantwort bei Krebspatienten einsetzbar. Die Schlüsselfunktion kommt dabei der Aktivierung dendritischer Zellen zu.

Dendritische Zellen sind höchst potente antigen-präsentierende Zellen, die über eine beeindruckende Kapazität für die Stimulation von naiven T-Lymphozyten verfügen [Storni und Bachmann, 2003]. Im Paracortex des Lymphknotens interagieren sie mit den T-Lymphozyten, um die Aktivierung von T-Helfer- und Killerzellen zu unterstützen [Steinman, 1991; Hart, 1997] und spezifische Immunreaktionen einzuleiten. Dendritische Zellen sind in der Lage mit stimulierten T-Lymphozyten zu aggregieren. Infolge dessen kommt es zur Ausschüttung großer Mengen B-Zell-aktivierender Faktoren, wie Interleukin 2 und 6 [Witmer und Steinman, 1984; Cumberbatch et al., 1996]. Die Aktivierung von T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen geschieht auf der Ebene der immunologischen Synapse. Das ist der spezielle Kontaktbereich, in dem Adhäsionsmoleküle und T-Zell-Rezeptoren in supramolekulare Komplexe getrennt werden. Das Signal kann sehr lange aufrecht erhalten werden, weil die Rezeptoren durch Peptid-MHC-Komplexe verstärkt aktiviert werden [Sallusto und Lanzavecchia, 2002]. Aktivierte dendritische Zellen werden derzeit vorrangig für die Generierung zytotoxischer T-Lymphozyten eingesetzt. Die Erzeugung solcher Zellpopulationen wurde in den Arbeiten von Zitvogel et al. [1996] und Paglia et al. [1996] be-

schrieben, in denen humane dendritische Zellen mit antigenen Peptiden aber auch intakten löslichen Proteinen aktiviert wurden. In anderen Arbeiten wurden Viruspartikel oder auch Mitogene für die Aktivierung dendritischer Zellen eingesetzt [Krug et al., 2003].

In dieser Arbeit wurde versucht, alle bekannten, an einer humoralen Immunantwort *in vivo* beteiligten, Zellpopulationen einzubeziehen und auf einer komplexen Matrix-Oberfläche zu kultivieren. Myeloide dendritische Zellen wurden aus murinen hämatopoietischen Stammzellen generiert. Naive T- und B-Lymphozyten wurden aus der Milz von Mäusen selektiert. Für die Gestaltung der Oberflächen wurden Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und Kollagen I verwendet. Zusätzlich wurde das Proteoglykan Heparansulfat eingesetzt. N-Acetylglucosamin-mannose wurde in die Modifizierungen miteinbezogen, da die Bindungsfähigkeit der dendritischen Zellrezeptoren in Gegenwart dieses Zuckers um das 5-25fache verstärkt wird [Figdor et al., 2002]. Ovalbumin erschien aufgrund einer Seitenkette mit Mannose- und Glucosaminresten als ein geeignetes Antigen für die Aktivierung von dendritischen Zellen, da diese Zuckerreste ähnlich wie N-Acetylglucosamin-mannose die Aufnahme des Antigens verstärken. Um die Generierung Ovalbumin-spezifischer Antikörper wahrscheinlicher zu machen und die Detektion zu erleichtern, kamen transgene Mäuse (TgNDO11.10) zum Einsatz, die Ovalbumin-spezifische T-Zellen in erhöhtem Maße exprimieren. Die Messung von Interleukinen während der Experimente gab Auskunft über den Aktivierungszustand der beteiligten Zelltypen.

Die Freisetzung des Zytokins IL12 durch Zellen, die aus transgenen Mäusen präpariert wurden, war im Vergleich zu Balb/c-Zellen auf allen modifizierten Oberflächen und unbehandeltem Glas stark erhöht. Interleukin 12 wird vorrangig von dendritischen Zellen gebildet, dient als Aktivator für naive T-Lymphozyten und ist damit ein wichtiger Mediator der Zell-vermittelten Immunität. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es nach der Aktivierung von T-Lymphozyten zu einer Rückkopplung kommt, indem aktivierte T-Lymphozyten ihrerseits wiederum die Produktion von IL12 durch dendritische Zellen verstärken [Wong et al., 1997]. Daraus läßt sich schließen, dass es im Ansatz mit TgNDO11.10-Zellen im Vergleich zum Ansatz mit Balb/c-Zellen mehr aktivierte T-Lymphozyten gibt, die ein Rückkopplungssignal bewirken. Bei der Sekretion des zweiten

Zytokins (IL6) durch Balb/c-Zellen ergaben sich die höchsten Werte bei der Kultivierung auf Polystyrol bzw. der mit Kollagen I, Heparansulfat und N-Acetyl-glucosamin-mannose modifizierten Oberfläche. Die anderen Beschichtungen hatten nur geringen Einfluss auf die IL6-Sekretion. Die höchste Freisetzung durch TgNDO11.10-Zellen im Vergleich zu Polystyrol konnte bei der Kultivierung auf unbehandeltem Glas bzw. auf der mit Kollagen I, Heparansulfat und N-Acetyl-glucosamin-mannose modifizierten Oberfläche beobachtet werden. Interleukin 6 wird von dendritischen Zellen abgegeben, um die Aktivierung von T-Lymphozyten zu steuern, aber auch von B- und T-Lymphozyten selbst und gilt daher als pleiotropes Zytokin mit einer Vielzahl von Funktionen [Morales-Montor, 2005]. Es kann vermutet werden, dass eine verstärkte Zytokin-Sekretion durch dendritische Zellen in auto- oder parakriner Weise eine Reorganisation der umliegenden Matrix, die Expression von IL-Rezeptoren und die Reifung dendritischer Zellen beeinflusst [Mahnke et al., 1996]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Zugabe von IL6 zu einer polyklonalen Stimulierung von B-Lymphozyten führt [Carroll et al., 1991].

Heparansulfate üben aufgrund der Interaktion mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen oder Proteinen der extrazellulären Matrix einen unterstützenden Einfluss auf die Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen aus [Elenius und Jalkanen, 1994]. Heparansulfate werden u.a. von Zellen exprimiert und können Kollagen I, III und V, Fibronectin und Thrombospondin binden, was für den Aufbau einer stabilen, kohäsiven Matrix von Bedeutung ist [Hardingham und Fosang, 1992]. Die Regulierung der Expression erfolgt u.a. durch Interleukin 6 [Sanderson et al., 1989]. Durch die hohen Interleukin 6-Konzentrationen in den Versuchsansätzen könnte eine Regulierung *in vitro* erfolgen und damit der *in vivo*-Zustand besser simuliert werden. Diese Vermutung bedarf allerdings weiterer Untersuchungen.

Eine In-vitro-Immunreaktion von TgNDO11.10-Zellen konnte durch den Einsatz der mit Kollagen I, Heparansulfat und N-Acetylglucosamin-mannose modifizierten Oberfläche signifikant verstärkt werden. Auf unbehandelten Glas- oder Polystyroloberflächen war die Aktivierung der dendritischen Zellen am schwächsten. Damit konnte gezeigt werden, dass die Modifizierung von Kultivierungsoberflächen mit extrazellulären Matrixkomponenten die Interaktion und Funktion

der Immunzellen *in vitro* begünstigt. In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Modifizierungen mit Kollagen I im Vergleich zu Fibronectin oder Laminin den stärksten Effekt auf die Adhäsion und Reifung von dendritischen Zellen ausüben und dies zu einer gesteigerten T-Zell-Stimulierung führt [Mahnke et al., 1996]. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf eine Generierung humaner Antikörper *in vitro* ist zur Zeit jedoch kaum möglich. Die Aktivierung von dendritischen Zellen kann mittlerweile häufiger erreicht werden, aber die hier vorgestellten Versuche sind zur Zeit nur mit Zellen aus transgenen Mäusen möglich. Zudem ist noch nicht untersucht, welcher Zelltyp durch die Modifizierung der Kultivierungsoberfläche überhaupt gefördert wird. Auch müssten für die In-vitro-Immunisierung ständig T- und B-Lymphozyten dazu gegeben werden, die *in vivo* durch die Differenzierung von Stammzellen gebildet werden. Dieser Prozess ist *in vitro* noch nicht zu realisieren.

Zur Optimierung des Systems wären zunächst Arbeiten mit einer Ovalbuminspezifischen T-Zelllinie und Zellpopulationen (DCs und B-Lymphozyten) aus Balb/c-Mäusen denkbar. Desweiteren könnte untersucht werden, ob dendritische Zellen auch in der Lage sind, B-Lymphozyten ohne die Anwesenheit von T-Lymphozyten zur Antikörpersynthese zu stimulieren [Bergtold et al., 2005] bzw. die Funktion der T-Lymphozyten z.B. durch die Zugabe B-Zell-spezifischer Interleukine oder Mitogene zu ersetzen. Um die Immunreaktion zu verstärken, könnte man auch Superantigene in der In-vitro-Immunisierung einsetzen. Die Vernetzung von MHC-II-Molekülen und T-Zell-Rezeptoren durch "Superantigene" führt zu einer Stimulation der T-Zellen, ohne dass eine spezifische Erkennung eines vom MHC-II-Molekül präsentierten Peptids benötigt wird [Marzi et al., 2004].

Zusammenfassend läßt sich anhand der Ergebnisse sagen, dass die Kultivierung von Immunzellen unter *in vitro*-Bedingungen durch verschiedene Modifikationen der Zellkulturmaterialien entscheidend verbessert werden kann. Für Hybridomzellen konnte gezeigt werden, dass synthetische Materialien wie die verwendeten Polymermembranen die Synthese monoklonaler Antikörper steigern konnten, dass jedoch die Verwendung proteinbeschichteter Kultivierungsoberflächen eine weitaus höhere Antikörpersynthese ermöglichen kann. Damit sind Hybridomzellen zum Teil adhäsive Zellen und nicht mehr nur als Suspensionszellen

5 Diskussion

zu betrachten. Für die Kultivierung naiver Zellpopulationen und für deren Interaktion *in vitro* konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von Proteinen der extrazellulären Matrix zu einer gesteigerten Aktivität führen kann. Erste Ergebnisse zeigten, dass damit auch eine erhöhte Antikörpersynthese durch B-Lymphozyten *in vitro* möglich ist. Für die Realisierung einer Immunreaktion *in vitro* sind jedoch noch umfangreiche weitere Experimente erforderlich.

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Micheel für die immerwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Vor allen Dingen möchte ich mich für die sehr gute Betreuung, die stete Diskussionsbereitschaft und die manchmal notwendigen tröstenden Worte bedanken.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Th. Groth, der mich am Institut für Chemie des GKSS Forschungszentrums in Teltow betreut hat. Ich bin froh über die schöne, unkomplizierte Zusammenarbeit und das ständige Interesse an den Experimenten und dem Fortbestand der Arbeit.

Ich danke insbesondere Herrn Prof. Dr. A. Lendlein für die Finanzierung des Projektes, für die Begutachtung der Arbeit, die Unterstützung und das große Interesse.

Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Olaf Behrsing, der mich in sämtliche Techniken der Zellkultur, der Antikörperherstellung und -reinigung und der Durchführung von Enzymimmuntests eingearbeitet hat. Ich bedanke mich darüber hinaus für die ständige Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten und Probleme zu diskutieren.

6 Danksagung

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Biotechnologie und der CBM Teltow für die herzliche Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Besonders danke ich dabei Manuela Heiner und Franziska Matyssek für die Betreuung meiner Zellkulturen, wenn ich nicht in Potsdam sein konnte, sowie Katrin Messerschmidt, Gerda Wilhelm, Jörg Schenk und Frank Sellrie für wertvolle Tipps, Anregungen und Gespräche. Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Frau Dr. Karola Lützow, Frau Dr. Barbara Seifert, Herrn Dr. Gregor Boehse und vor allem bei Ruth Hesse bedanken, die für mich in Teltow immer zuverlässige Ansprechpartner und hilfsbereite, nette Kollegen waren.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Dr. Günther Malsch für die Herstellung der Polymermembranen und bei Herrn Dr. Michael Schossig für die elektronenmikroskopischen Bilder bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei Leif bedanken, der mich bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr unterstützt hat und der meine Launen und Ängste immer wieder mit viel Liebe, Optimismus und Motivation abgefedert hat. Ein ganz großer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder und meinen Großeltern, ohne deren Rückhalt und ständigen Zuspruch diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Literaturverzeichnis

- [Albelda und Buck 1990] ALBELDA, S.M. ; BUCK, C.A.: Integrins and other cell adhesion molecules. In: *FASEB J.* 4(11), 2868-2880 (1990)
- [Altankov et al. 2000] ALTANKOV, G. ; THOM, V. ; GROTH, T. ; JANKOVA, K. ; JONSSON, G. ; ULBRICHT, M.: Modulating the biocompatibility of polymer surfaces with poly(ethylene glycol): effect of fibronectin. In: *J Biomed Mater Res.* 52(1), 219-230 (2000)
- [Alteheld et al. 2005] ALTEHELD, A. ; FENG, Y. ; KELCH, S. ; LENDLEIN, A.: Biodegradable, Amorphous Copolyester-Urethane Networks Having Shape-Memory Properties. In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 1188-1192 (2005)
- [Amstein und Hartman 1975] AMSTEIN, C.F. ; HARTMAN, P.A.: Adaption of plastic surfaces for tissue culture by glow discharge. In: *J. Clin. Microbiol.*, 46-54 (1975)
- [Andrade et al. 1987] ANDRADE, J.D. ; HERRON, J. ; HLADY, V. ; HORSLEY, D.: Simulation of protein adsorption. The denaturation correlation. In: *Croatica Chemica Acta* 60, 495-503 (1987)
- [Andrade und Hlady 1991] ANDRADE, J.D. ; HLADY, V.: Vroman effects, techniques, and philosophies. In: *J Biomater Sci Polym Ed.* 2(3), 161-172 (1991)
- [Baier 1980] BAIER, R.E.: Substrata influences on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties. In: *G. Bitton and K.C. Marshall: Adsorption of Microorganisms to Surfaces, John Wiley and Sons*, 59-104 (1980)

- [Banchereau und Steinman 1998] BANCHEREAU, J. ; STEINMAN, R.M.: Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392, 245-252 (1998)
- [Barbas III. et al. 1991] BARBAS III., C.F. ; KANG, A.S. ; LERNER, R.A. ; BENKOVIC, S.J.: Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7978-7982 (1991)
- [Beck et al. 1990] BECK, K. ; HUNTER, I. ; ENGEL, J.: Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. In: *FASEB J.* 4, 148-160 (1990)
- [Bergtold et al. 2005] BERGTOLD, A. ; DESAI, D.D. ; GAVHANE, A. ; CLYNES, R.: Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. In: *Immunity* 23, 503-514 (2005)
- [Borrebaeck et al. 1988] BORREBAECK, C.A.K. ; DANIELSSON, L. ; MÖLLER, S.A.: Human monoclonal antibodies produced by primary *in vitro* immunization of peripheral blood lymphocytes. In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 3995-3999 (1988)
- [Bosman und Stamenkovic 2003] BOSMAN, F.T. ; STAMENKOVIC, I.: Functional structure and composition of the extracellular matrix. In: *J Pathol.* 200, 423-428 (2003)
- [Brakebusch et al. 2002] BRAKEBUSCH, C. ; BOUVARD, D. ; STANCHI, F. ; SAKAI, T. ; FÄSSLER, R.: Integrins in invasive growth. In: *J Clin Invest.* 109(8); 999-1006 (2002)
- [Braun et al. 1999] BRAUN, D. ; CHERDRON, H. ; RITTER, H.: Praktikum der makromolekularen Stoffe. In: *Wiley-VCH, Weinheim* (1999)
- [Bruck 1980] BRUCK, S.D.: Properties of Biomaterials in the Physiological Environment. In: *Journal* (1980)
- [Carroll et al. 1991] CARROLL, K. ; PROSSER, E. ; O'KENNEDY, R.: In Vitro Immunization of Human Tonsillar Lymphocytes: Effects of PWM and rIL-6. In: *Hybridoma* 10(2), 229-239 (1991)

- [Cohen 1979] COHEN, A.L.: Critical point drying-principles and procedures. In: *Scanning Electron Microscopy, 2, 303-324* (1979)
- [Coligan et al. 1992–2002] COLIGAN, J.E. ; KRUISBEEK, A.M. ; MARQUILIES, D.H. ; SHEVACH, E.M. ; STROBER, W.: Current Protocols in Immunology. In: *Wiley, J. and Sons, Inc.* (1992-2002)
- [Cumberbatch et al. 1996] CUMBERBATCH, M. ; DEARMAN, R.J. ; KIMBER, I.: Constitutive and inducible expression of interleukine-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. In: *Immunology 87(4), 513-518* (1996)
- [Dann 1970] DANN, J.R.: Forces involved in the adhesive process I. Critical surface tensions of polymeric solids as determined with polar liquids. In: *J Colloid Interface Sci. 32(2), 302-320* (1970)
- [Darribere et al. 2000] DARRIBERE, T. ; SKALSKI, M. ; COUSIN, H.L. ; GAULTIER, A. ; MONTMORY, C. ; ALFANDARI, D.: Integrins: regulators of embryogenesis. In: *Biol Cell. 92(1), 5-25* (2000)
- [Dick 1991] DICK, J.E.: Immune-deficient mice as models for human hematopoietic disease. In: *Mol Genet Med. 1, 77-115* (1991)
- [Dimitrov et al. 1991] DIMITROV, A.S. ; KRALCHEVSKY, P.A. ; NIKOLOV, A.D. ; NOSHI, H. ; MATSUMOTO, M.: Contact Angle Measurements with Sessile Drops and Bubbles. In: *J Colloid Interface Sci. 145, 279-282* (1991)
- [Dörfler 1994] DÖRFLER, H.D.: Grenzflächen- und Kolloidchemie. In: *VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp. 83-111* (1994)
- [Elenius und Jalkanen 1994] ELENIUS, K. ; JALKANEN, M.: Function of the syndecans - a family of cell surface proteoglycans. In: *J Cell Sci. 107(11), 2975-2982* (1994)
- [Engering et al. 2002] ENGERING, A. ; GEIJTENBEEK, T.B.H. ; KOOYK, Y. van: Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. In: *Trends Immunol. 23(10), 480-485* (2002)

- [Faucheux et al. 2004] FAUCHEUX, N. ; SCHWEISS, R. ; LUETZOW, K. ; WERNER, C. ; GROTH, T.: Self-assembled monolayers with different terminating groups as model substrates for cell adhesion studies. In: *Biomaterials* 25(14), 2721-2730 (2004)
- [Fey-Lamprecht et al. 2003] FEY-LAMPRECHT, F. ; ALBRECHT, W. ; GROTH, Th. ; WEIGEL, T. ; GROSS, U.: Morphological studies on the culture of kidney epithelial cells in a fibre-in-fibre bioreactor design with hollow fibre membranes. In: *J.Biomed.Mater Res.*, 65A, 144-157 (2003)
- [Figdor et al. 2002] FIGDOR, C.G. ; KOOYK, Y. van ; ADEMA, G.J.: C-Type Lectin Receptors on dendritic cells and Langerhans cells. In: *Nat Rev Immunol.* 2(2), 77-84 (2002)
- [Flemming et al. 1999] FLEMMING, R.G. ; MURPHY, C.J. ; ABRAMS, G.A. ; GOODMAN, S.L. ; NEALEY, P.F.: Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. In: *Biomaterials* 20, 573-588 (1999)
- [Fletcher und Loeb 1979] FLETCHER, M. ; LOEB, G.I.: The Influence of substratum characterization on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. In: *Appl Env Microbial.* 37, 67 (1979)
- [van der Flier und Sonneberg 2001] FLIER, A. van der ; SONNEBERG, A.: Function and interactions of integrins. In: *Cell Tissue Res.* 305(3), 285-298 (2001)
- [Fujimori et al. 1998] FUJIMORI, A. ; NAITO, H. ; MIYAZAKI, T.: Adsorption of complement, cytokines and proteins by different dialysis membrane materials: evaluation by confocal laser scanning fluorescence microscopy. In: *Artif Organs* 22, 1014 (1998)
- [Geiger et al. 2001] GEIGER, B. ; BERSHADSKY, A. ; PANKOV, R. ; YAMADA, K.M.: Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. In: *Nature Reviews-Molecular Cell Biology* 2, 793-805 (2001)
- [Giancotti und Ruoslahti 1999] GIANCOTTI, F.G. ; RUOSLAHTI, E.: Integrin Signaling. In: *Science* 13, 285(5430), 1028-1032 (1999)

- [Green 1999] GREEN, L.L.: Antibody engineering via genetic engineering of the mouse: Xenomouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. In: *J Immunol Methods*. 231, 11-23 (1999)
- [Green und Jakobovits 1998] GREEN, L.L. ; JAKOBOVITS, A.: Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes. In: *J Exp Med*. 188, 483-495 (1998)
- [Grinnell 1987] GRINNELL, F.: Fibronectin adsorption on material surfaces. In: *Ann N Y Acad Sci*. 516, 280-290 (1987)
- [Groth und Altankov 1998] GROTH, Th. ; ALTANKOV, G.: Cell-surface interactions and the tissue compatibility of biomaterials. In: *New Biomedical Materials, IOS Press, Amsterdam, 12-23* (1998)
- [Groth et al. 2002] GROTH, Th. ; SEIFERT, B. ; MALSCH, G. ; ALBRECHT, W. ; PAUL, D. ; KOSTADINOVA, A. ; KRASTEVA, N. ; ALTANKOV, G.: Interaction of human skin fibroblasts with moderate wettable polyacrylonitrile-copolymer membranes. In: *J.Biomed.Mater Res.*, 61, 290-300 (2002)
- [Groth et al. 1994] GROTH, Th. ; ZLATANOV, I. ; ALTANKOV, G.: Adhesion of human peripheral lymphocytes on biomaterials preadsorbed with fibronectin and vitronectin. In: *J.Biomater.Sci.Polymer Edn*, 6(8), 729-739 (1994)
- [Gunzer et al. 2000] GUNZER, M. ; SCHÄFER, A. ; BORGMANN, S. ; GRABBE, S. ; ZÄNKER, K.S. ; BRÖCKER, E.B. ; KÄMPGEN, E. ; FRIEDL, P.: Antigen Presentation in Extracellular Matrix: Interactions of T Cells with Dendritic Cells are Dynamic, Short Lived, and Sequential. In: *Immunity* 13, 323-332 (2000)
- [Hallek et al. 1998] HALLEK, M. ; BERGSAGEL, L.P. ; ANDERSON, K.: Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. In: *Blood* 91, 3-21 (1998)
- [Hammel et al. 2001] HAMMEL, M. ; WEITZ-SCHMIDT, G. ; KRAUSE, A. ; MOLL, T. ; VESTWEBER, D. ; ZERWES, H.-G. ; HALLMANN, R.: Species-

- specific and conserved epitopes on mouse and human E-selectins important for leucocyte adhesion. In: *Exp Cell Res.* 269, 266-274 (2001)
- [Hardingham und Fosang 1992] HARDINGHAM, T.E. ; FOSANG, A.J.: Proteoglycans: many forms and functions. In: *FASEB J.* 6, 861-870 (1992)
- [Hart 1997] HART, D.N.J.: Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. In: *Blood* 90, 3245-3278 (1997)
- [Hayter et al. 1992] HAYTER, P.M. ; KIRKBY, N.F. ; SPIER, R.E.: Relationship between hybridoma growth and monoclonal antibody production. In: *Enzyme Microb. Technol.* 14(6), 454-456 (1992)
- [Heilmann et al. 2005] HEILMANN, K. ; GROTH, T. ; BEHRING, O. ; ALBRECHT, W. ; SCHOSSIG, M. ; LENDLEIN, A. ; MICHEEL, B.: The influence of the chemical composition of cell culture material on the growth and antibody production of hybridoma cells. In: *J. Biotechnol.* 115(3), 291-301 (2005)
- [Higuchi et al. 1990] HIGUCHI, A. ; IWATA, N. ; NAKAGAWA, T.: Surface-modified polysulfone hollow fibers. II. Fibers having $CH_2CH_2CH_2SO_3^-$ segments and immersed in HCL solution. In: *J Appl Polym Sci.* 40, 709 (1990)
- [Hirano et al. 1987] HIRANO, S. ; NOSE, A. ; HATTA, K. ; KAWAKAMI, A. ; TAKEICHI, M.: Calcium-dependent Cell-Cell Adhesion Molecules (Cadherins): Subclass Specificities and Possible Involvement of Actin Bundles. In: *Journal of Cell Biology* 105, 2501-2510 (1987)
- [Horbett 1984] HORBETT, T.A.: Mass action effects on competitive adsorption of fibrinogen from hemoglobin solutions and from plasma. In: *Thromb Haemost.* 30;51(2), 174-181 (1984)
- [Humphries et al. 2003] HUMPHRIES, M.J. ; SYMONDS, E.J. ; MOULD, A.P.: Mapping functional residues onto integrin crystal structures. In: *Curr Opin Struct Biol.* 13(2), 236-243 (2003)
- [Hynes 1987] HYNES, R.O.: Integrins: a family of cell surface receptors. In: *Cell* 48, 549-554 (1987)

- [Hynes 1992] HYNES, R.O.: Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. In: *Cell* 69, 11-25 (1992)
- [Hynes 2002] HYNES, R.O.: Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. In: *Cell* 110, 673-687 (2002)
- [Inaba et al. 1992] INABA, K. ; INABA, M. ; ROMANI, N. ; AYA, H. ; DEGUCHI, M. ; IKEHARA, S. ; MURAMATSU, S. ; STEINMAN, R.: Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony stimulating factor. In: *J. Exp. Med.* 176, 1693-1702 (1992)
- [Ingber 1996] INGBER, D.E.: Engineering cell shape and function through control of substrate adhesion. In: *Polymer Surfaces and Interfaces: Characterization, Modification and Application*, 413-424 (1996)
- [Ingber und Folkman 1989] INGBER, D.E. ; FOLKMAN, J.: Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. In: *J Cell Biol.* 109(1), 317-330 (1989)
- [Ingber et al. 1987] INGBER, D.E. ; MADRI, J.A. ; FOLKMAN, J.: Endothelial growth factors and extracellular matrix regulate DNA synthesis through modulation of cell and nuclear expansion. In: *In Vitro Cell Dev Biol.* 23(5), 387-394 (1987)
- [Isacke und Horton 2000] ISACKE, C.M. ; HORTON, A.: The Adhesion Molecule Fact Book. In: *Academic Press, 2nd ed., London* (2000)
- [Ishihara et al. 1994] ISHIHARA, K. ; FUKUMOTO, K. ; MIYAZAKI, H. ; NAKABAYASHI, N.: Improvement of hemocompatibility on a cellulose dialysis membrane with a novel biomedical polymer having a phospholipid polar group. In: *Artif.Organs*, 18(8), 559-564 (1994)
- [Kamusewitz et al. 1991] KAMUSEWITZ, H. ; MALSCH, G. ; PAUL, D.: Contact angle measurements on surface modified cellulose membranes. In: *Acta Polymerica* 42, 454-457 (1991)

Literaturverzeichnis

- [Kantlehner et al. 2000] KANTLEHNER, M. ; SCHAFFNER, P. ; FREISINGER, D. ; MEYER, J. ; JONCZYK, A. ; DIEFENBACH, B. ; NIES, B. ; HÖLZEMANN, G. ; GOODMAN, S.L. ; KESSLER, H.: Surface Coating with Cyclic RGD Peptides Stimulates Osteoblast Adhesion and Proliferation as well as Bone Formation. In: *Chembiochem.* 18;1(2), 107-114 (2000)
- [Kearney et al. 1979] KEARNEY, J.F. ; RADBRUCH, A. ; LIESEGANG, B. ; RAJEWSKY, K.: A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreted hybrid cell lines. In: *J Immunol.* 123, 1548-1550 (1979)
- [Köhler und Milstein 1975] KÖHLER, G. ; MILSTEIN, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature (London)*, 256, 495-497 (1975)
- [Kim et al. 2003] KIM, M. ; CARMAN, C.V. ; SPRINGER, T.A.: Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. In: *Science* 19,301(5640), 1720-1725 (2003)
- [Kleinman et al. 1981] KLEINMAN, H.K. ; KLEBE, R.J. ; MARTIN, G.R.: Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. In: *J Cell Biol.* 88(3), 473-485 (1981)
- [Kolff und Berk 1944] KOLFF, W.J. ; BERK, H.T.: De kunstmatige nier, een dialysator met groot opperlak. In: *Ned Tijdschr Geneesk* 87, 1684-1688 (1944)
- [Krasteva et al. 2002] KRASTEVA, N. ; HARMS, U. ; ALBRECHT, W. ; SEIFERT, B. ; HOPP, M. ; ALTANKOV, G. ; GROTH, T.: Membranes for biohybrid liver support systems investigations of hepatocyte attachment, morphology and growth. In: *Biomaterials*, 23(12), 2467-2478 (2002)
- [Krasteva et al. 2004] KRASTEVA, N. ; SEIFERT, B. ; ALBRECHT, W. ; WEIGEL, T. ; SCHOSSIG, M. ; ALTANKOV, G. ; GROTH, T.: Influence of polymer membrane porosity on C3A hepatoblastoma cell adhesive interaction and function. In: *Biomaterials* 25(13), 2467-2476 (2004)

- [Krug et al. 2003] KRUG, A. ; ROTHENFUSSER, S. ; SELINGER, S. ; BOCK, C. ; KERKMANN, M. ; BATTIANY, J. ; SARRIS, A. ; GIESE, T. ; SPEISER, D. ; ENDRES, S. ; HARTMANN, G.: CpG-A Oligonucleotides Induce a Monocyte-Derived Dendritic Cell-Like Phenotype That Preferentially Activates CD8 T Cells. In: *J. Immunol.* 170, 3468-3477 (2003)
- [Kubota und Tamauchi 1988] KUBOTA, K. ; TAMAUCHI, H.: Three-dimensional collagen matrices as cell culture substrata affect the generation of alloreactive cytotoxic T lymphocytes. In: *Immunol. Lett.* 18, 119-124 (1988)
- [Kuhlmann et al. 1989] KUHLMANN, I.I. ; KURTH, W. ; RUHDEL, I.I.: Monoclonal antibodies: in vivo- and in vitro-production in laboratory scale with consideration of the legal aspects of animal protection. In: *ALTEX* 6(2), 12-26 (1989)
- [Laemmli 1970] LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 15;227(5259), 680-685 (1970)
- [Leckband et al. 1999] LECKBAND, D. ; SHETH, S. ; HALPERIN, A.: Grafted poly(ethylene oxide) brushes as nonfouling surface coatings. In: *J Biomater Sci Polym Ed.*, 10(10), 1125-1147 (1999)
- [Lendlein et al. 2005] LENDLEIN, A. ; JIANG, H. ; JÜNGER, O. ; LANGER, R.: Light-induced shape-memory polymers. In: *Nature* 434, 879-882 (2005)
- [Leuker et al. 2001] LEUKER, C.E. ; LABOW, M. ; MULLER, W. ; WAGNER, N.: Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response. In: *J Exp Med.* 193(6), 755-768 (2001)
- [Lowrey et al. 1994] LOWREY, D. ; MURPHY, S. ; GOFFE, R.A.: A comparison of monoclonal antibody productivity in different hollow fiber bioreactors. In: *J. Biotechn.*, 36, 35-38 (1994)

Literaturverzeichnis

- [Lowry et al. 1951] LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGH, N.J. ; FARR, A.L. ; RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J Biol Chem.* 193(1), 265-275 (1951)
- [Luo und Yang 2004] LUO, J. ; YANG, S.T.: Effects of Three-Dimensional Culturing in a Fibrous Matrix on Cell Cycle, Apoptosis, and Mab Production by Hybridoma Cells. In: *Biotechnol. Prog.* 20, 306-315 (2004)
- [Maeda et al. 1986] MAEDA, M. ; KIMURA, M. ; INOUE, S. ; KATAOKA, K. ; OKANO, T. ; SAKURAI, Y.: Adhesion behaviour of rat lymphocyte subpopulations (B cell and T cell) on the surface of polystyrene/polypeptide graft copolymer. In: *J Biomat Res.* 20, 25-30 (1986)
- [Mahnke et al. 1996] MAHNKE, K. ; BHARDWAJ, R.S. ; LUGER, T.A. ; SCHWARZ, T. ; GRABBE, S.: Interaction of murine dendritic cells with collagen up-regulates allostimulatory capacity, surface expression of heat stable antigen, and release of cytokines. In: *J Leukoc Biol.* 60, 465-472 (1996)
- [Marshall et al. 1993] MARSHALL, A.D. ; MUNRO, P.A. ; TRÄGARDH, G.: The effect of protein fouling in microfiltration and ultrafiltration on permeate flux, protein retention and selectivity: A literature review. In: *Desalination* 91, 65 (1993)
- [Marzi et al. 2004] MARZI, M.C. D. ; FERNANDEZ, M.M. ; SUNDBERG, E.J. ; MOLINERO, L. ; ZWIRNER, N.W. ; LLERA, A.S. ; MARIUZZA, R.A. ; MALCHIODI, E.L.: Cloning, expression and interaction of human T-cell receptors with bacterial superantigen SSA. In: *Eur. J. Biochem.* 271, 4075-4083 (2004)
- [McLeod et al. 2004] MCLEOD, S.J. ; SHUM, A.J. ; LEE, R.L. ; TAKEI, F. ; GOLD, M.R.: The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes. In: *J. Biol. Chem.*, 279 (13), 12009-12019 (2004)
- [Mestries et al. 1998] MESTRIES, P. ; BORCHIELLINI ; BARBAUD, C. ; DUCHESNAY, A. ; ESCARTIN, Q. ; BARRITAU, D. ; CARUELLE, J.P. ; KERN, P.: Chemically modified dextrans modulate expression of collagen phenotype

- by cultured smooth muscle cells in relation to the degree of carboxymethyl, benzylamide and sulfation substitutions. In: *J.Biomed.Mater Res.*, 42, 286-294 (1998)
- [Micheel 2003] MICHEEL, B. ; EDITOR (Hrsg.): *Monoklonale Antikörper In: Ganten & Ruckpaul: Grundlagen der molekularen Medizin.* Springer Verlag, Berlin, pp. 494-523, 2003
- [Morales-Montor 2005] MORALES-MONTOR, J.: The role of the pleiotropic cytokine interleukin-6 (IL-6) during disease. In: *Mod Asp Immunobiol.* 16, 21-26 (2005)
- [Morra und Cassinelli 1999] MORRA, M. ; CASSINELLI, C.: Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces. In: *J Biomater Sci Polym Ed.*, 10(10), 1107-1121 (1999)
- [Morrison und Oi 1989] MORRISON, S.L. ; OI, V.T. ; EDITOR (Hrsg.): *Chimeric Immunoglobulin Genes In: Immunoglobulin Genes.* Academic Press London, p. 260, 1989
- [Nagase und Woesner 1999] NAGASE, H. ; WOESNER, J.F.: Matrix metalloproteinases. In: *J Biol Chem.* 274, 21491-21494 (1999)
- [Nagel et al. 2003] NAGEL, A. ; KOCH, S. ; VALLEY, U. ; EMMRICH, F. ; MARX, U.: Membrane based cell culture systems an alternative to in vivo production of monoclonal antibodies. In: *Report Integra Biosciences* (2003)
- [Ortega et al. 1988] ORTEGA, E. ; SCHWEITZER-STENNER, R. ; PECHT, I.: Possible orientational constraints determine secretory signals induced by aggregation of IgE receptors on mast cells. In: *EMBO J.*, 7(13), 4101-4109 (1988)
- [Paglia et al. 1996] PAGLIA, P. ; CHIODONI, C. ; RODOLFO, M. ; COLOMBO, M.P.: Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. In: *J Exp Med.* 1, 183(1), 317-322 (1996)

- [Petitt et al. 1994] PETITT, D.K. ; HOFFMANN, A.S. ; HORBETT, T.A.: Correlation between corneal epithelial outgrowth and monoclonal antibody binding to the cell-binding domain of adsorbed fibronectin. In: *J Biomed Mater Res.*, 28, 685-691 (1994)
- [Pierschbacher und Ruoslahti 1984] PIERSCHBACHER, M.D. ; RUOSLAHTI, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. In: *Nature* 309(5963), 30-33 (1984)
- [Qin et al. 2004] QIN, J. ; VINOGRADOVA, O. ; PLOW, E.F.: Integrin bidirectional signaling: a molecular view. In: *PLoS Biol.* 2(6), 726-729 (2004)
- [Rafi-Janajreh et al. 1998] RAFI-JANAJREH, A.Q. ; NAGARKATTI, P.S. ; NAGARKATTI, M.: Role of CD44 in CTL and NK Cell Activity. In: *Frontiers in Bioscience* 3, 665-671 (1998)
- [Rao et al. 2000] RAO, W.H. ; HALES, J.M. ; CAMP, R.D.: Potent costimulation of effector T lymphocytes by human collagen type I. In: *J Immunol.* 1,165(9), 4935-4940 (2000)
- [Riechmann et al. 1988] RIECHMANN, L. ; CLARK, M. ; WALDMANN, H. ; WINTER, G.: Reshaping human antibodies for therapy. In: *Nature* 332, 323-327 (1988)
- [Ruckenstein und Chen 1991] RUCKENSTEIN, E. ; CHEN, J.-H.: Surfactant modification of the surface energetics of hydrophobic polymers and protein adsorption. In: *Journal* (1991)
- [Ruoslahti 1997] RUOSLAHTI, E.: Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. In: *Kidney International* 51, 1413-1417 (1997)
- [Sallusto und Lanzavecchia 2002] SALLUSTO, F. ; LANZAVECCHIA, A.: The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. In: *Arthritis Res.* 4, 127-132 (2002)
- [Sanderson et al. 1989] SANDERSON, R.D. ; LALOR, P. ; BERNFIELD, M.: B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. In: *Cell Regul.* 1, 27-35 (1989)

Literaturverzeichnis

- [Schaffner und Dard 2003] SCHAFFNER, P. ; DARD, M.M.: Structure and function of RGD peptides involved in bone biology. In: *Cell Mol Life Sci.* 60(1), 119-132 (2003)
- [Schaller et al. 1992] SCHALLER, M.D. ; BORGMAN, C.A. ; COBB, B.S. ; VINES, R.R. ; REYNOLDS, A.B. ; PARSONS, J.T.: pp125FAK, a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. In: *Proc Natl Acad Sci.* 89, 5192-5196 (1992)
- [Schlaepfer et al. 1999] SCHLAEPFER, D.D. ; HAUCK, C.R. ; SIEG, D.J.: Signaling through focal adhesion kinase. In: *Prog Biophys Mol Biol.* 71(3-4), 435-478 (1999)
- [Shimizu und Shaw 1991] SHIMIZU, Y. ; SHAW, S.: Lymphocyte interactions with extracellular matrix. In: *FASEB J.* 5, 2292-2299 (1991)
- [Springer 1990] SPRINGER, T.A.: Adhesion receptors of the immune system. In: *Nature*, 346, 425-433 (1990)
- [Steele et al. 1994] STEELE, J.G. ; JOHNSON, G. ; MCFARLAND, C. ; DALTON, B.A. ; GENGENBACH, T.R. ; CHATELIER, R.C. ; UNDERWOOD, P.A. ; GRIESSER, H.J.: Roles of serum vitronectin and fibronectin in initial attachment of human vein endothelial cells and dermal fibroblasts on oxygen- and nitrogen-containing surfaces made by radiofrequency plasmas. In: *J. Biomater Sci Polym. Ed.*, 6(6), 511-532 (1994)
- [Steinman 1991] STEINMAN, R.M.: The dendritic cell and its role in immunogenicity. In: *Annu Rev Immunol.* 9, 271-296 (1991)
- [Stoicheva und Hui 1994] STOICHEVA, N.G. ; HUI, S.W.: Electrically induced fusion of mammalian cells in the presence of polyethylene glycol. In: *J Membr Biol.* 141(2), 177-182 (1994)
- [Storni und Bachmann 2003] STORNI, T. ; BACHMANN, M.F.: On the role of APC-activation for in vitro versus in vivo T cell priming. In: *Cell Immunol.* 225, 1-11 (2003)

- [Sugahara und Kitagawa 2000] SUGAHARA, K. ; KITAGAWA, H.: Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. In: *Curr Opin Struct Biol.* 10, 518-527 (2000)
- [Tamada und Ikada 1994] TAMADA, Y. ; IKADA, Y.: Fibroblast growth on polymer surfaces and the biosynthesis of collagen. In: *J Biomed Mater Res.*, 28(7), 783-789 (1994)
- [Tamada et al. 1995] TAMADA, Y. ; KULIK, E.A. ; IKADA, Y.: Simple method for platelet counting. In: *Biomaterials* 16(3), 259-261 (1995)
- [Tasaki et al. 2004] TASAKI, A. ; YAMANAKA, N. ; KUBO, M. ; MATSUMOTO, K. ; KUROKI, H. ; NAKAMURA, K. ; NAKAHARA, C. ; OHISHI, H. ; KUGA, H. ; BABA, E. ; TANAKA, M. ; MORISAKI, T. ; KATANO, M.: Three-dimensional two-layer collagen matrix gel culture model for evaluating complex biological functions of monocyte-derived dendritic cells. In: *J Immunol Methods.* 287(1-2), 79-90 (2004)
- [Tharakan und Chau 1985] THARAKAN, J.P. ; CHAU, P.C.: A Radial Flow Hollow Fiber Bioreactor for the Large-Scale Culture of Mammalian Cells. In: *Biotechnol. Bioeng.* 18, 329-342 (1985)
- [van den Tweel 1999] TWEEL, J.G. van den: Das menschliche Abwehrsystem. In: *Spektrum Akademischer Verlag, Berlin* (1999)
- [Vroman und Adams 1969] VROMAN, L. ; ADAMS, A.L.: Effect of heparin on reactions at aminated polymer-blood interfaces. In: *J Colloid Interface Sci.* 31(2), 188-195 (1969)
- [Winzler et al. 1997] WINZLER, C. ; ROVERE, P. ; RESCIGNO, M. ; GRANUCCI, F. ; PENNA, G. ; ADORINI, L. ; ZIMMERMANN, V.S. ; DAVOUST, J. ; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.: Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth-Factor-dependent Long-Term-Cultures. In: *J. Exp. Med.* 185(2), 317-328 (1997)
- [Witmer und Steinman 1984] WITMER, M.D. ; STEINMAN, R.M.: The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: light

- microscopic, immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node and Peyer's patch. In: *Am. J. Anat.* 170, 465 (1984)
- [Woffinfin und Hoenich 1999] WOFFINFIN, C. ; HOENICH, N.A.: Blood-membrane interactions during haemodialysis with cellulose and synthetic membranes. In: *Biomaterials* 9, 53 (1999)
- [Wong et al. 1997] WONG, B.R. ; JOSIEN, R. ; LEE, S.Y. ; SAUTER, B. ; LI, H. ; STEINMAN, R.M. ; CHOI, Y.: TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. In: *J Exp Med.* 186, 2075-2080 (1997)
- [Yamada 1989] YAMADA, K.M.: Fibronectins: structure, functions and receptors. In: *Curr Opin Cell Biol.* 1, 956-963 (1989)
- [Young et al. 1988] YOUNG, B.R. ; PITT, W.G. ; COOPER, S.L.: Protein adsorption on polymeric biomaterials. II. Adsorption kinetics. In: *J Colloid Interface Sci.* 125, 246-260 (1988)
- [Zitvogel et al. 1996] ZITVOGEL, L. ; MAYORDOMO, J.I. ; TJANDRAWAN, T. ; DELEO, A.B. ; CLARKE, M.R. ; LOTZE, M.T. ; STORKUS, W.J.: Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. In: *J Exp Med.* 1, 183(1), 87-97 (1996)
- [Zubler 2002] ZUBLER, S.: Herstellung und Charakterisierung von verschiedenen Trx-polyRGD-Konstrukten. In: *Diplomarbeit, ETH Zürich* (2002)

Eidesstatt

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Potsdam, den 30.01.2006

Katja Heilmann