

Bereitstellung verschiedener primärer Zellen  
für biotechnologische Anwendungen und  
rekombinante Produktion von BMP2 mittels  
transienter Genexpression

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

in der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften

(BayNAT)

der Universität Bayreuth

vorgelegt von

***Simon Andreas Benedikt Riedl***

*aus Bielefeld*

Bayreuth, 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2018 bis Juni 2022 in Bayreuth am Lehrstuhl Bioprozesstechnik unter Betreuung von Frau Professor Dr. Ruth Freitag angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Bayreuther Graduiertenschule für Mathematik und Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 23.06.2022

Zulassung durch das Leitungsgremium: 15.07.2022

Wissenschaftliches Kolloquium: 22.11.2022

Amtierender Direktor: Prof. Dr. Hans Keppler

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Ruth Freitag (Gutachterin)

Prof. Dr. Heike Feldhaar (Gutachterin)

Prof. Dr. Stefan Schuster (Vorsitz)

Prof. Dr. Olaf Stemmann

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	2
2. Summary .....	5
3. Isolation primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> und Nutzung für ökotoxikologische Untersuchungen .....	7
3.1. Einleitung .....	7
3.2. Problemstellung und Zielsetzung.....	13
3.3. Material und Methoden .....	14
3.3.1. Silbernanopartikel und Metallionen.....	14
3.3.2. Puffer.....	14
3.3.3. Anzucht und Haltung von <i>E. fetida</i> .....	15
3.3.4. Herstellung eines zellfreien Wurmfiltrates von <i>E. fetida</i> .....	15
3.3.5. Präparation und Isolation des Darm-Traktes von <i>E. fetida</i> .....	16
3.3.6. Isolation primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> .....	17
3.3.7. Kultivierung primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> und Analytik .....	17
3.3.8. Beschichtung von Zellkulturplatten mit Adhärenz-verbessernden Substanzen.....	18
3.3.9. MTT-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität .....	19
3.3.10. Messung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials der AgNP .....	21
3.3.11. Statistische Analyse.....	21
3.4. Ergebnisse und Diskussion.....	22
3.4.1. Isolation primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> .....	22
3.4.2. Kultivierung primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> .....	25
3.4.3. Ökotoxizitätsassay mit primären intestinalen Zellen von <i>E. fetida</i> .....	33
3.5. Zusammenfassung und Ausblick.....	37

4. Isolation und Charakterisierung primärer humaner B-Lymphozyten aus Tonsillen und Blut.....	39
4.1. Einleitung .....	39
4.2. Problemstellung und Zielsetzung .....	43
4.3. Material und Methoden .....	44
4.3.1. Erhalt von humanen Tonsillen und Blut (Buffy Coats) .....	44
4.3.2. Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen.....	45
4.3.2.1. Isolation mononuklearer Zellen.....	45
4.3.2.2. Aufreinigung von B-Zellen mittels Nylon Wolle.....	47
4.3.3. Isolation primärer humaner B-Zellen aus Blut (Buffy Coat) .....	48
4.3.4. Bestimmung von Zelldichte und Viabilität .....	48
4.3.5. Kryokonservierung.....	48
4.3.6. Durchflusszytometrische Analyse/ Phänotypisierung.....	49
4.3.7. Statistische Analyse.....	50
4.4. Ergebnisse und Diskussion.....	50
4.4.1. Entwicklung einer Methode für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen.....	50
4.4.2. Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen und Blut.....	53
4.4.3. Charakterisierung primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen und Blut.....	59
4.5. Zusammenfassung und Ausblick.....	62
5. Transiente Transfektion primärer humaner T-Lymphozyten.....	64
5.1. Einleitung .....	64
5.2. Problemstellung und Zielsetzung .....	67
5.3. Material und Methoden .....	68
5.3.1. Plasmid-DNA und Transfektionsagenz.....	68
5.3.2. Isolation und Kultivierung primärer humaner T-Zellen.....	69

5.3.3.	Polyplex-Transfektion .....	70
5.3.4.	HZD-Transfektion .....	71
5.3.5.	Bestimmung von Zelldichte und Viabilität .....	71
5.3.6.	Kryokonservierung .....	72
5.3.7.	Durchflusszytometrische Analyse/Phänotypisierung .....	72
5.4.	Ergebnisse und Diskussion .....	73
5.5.	Zusammenfassung und Ausblick .....	75
6.	Prozessintensivierung der rekombinanten Produktion von BMP2 in Säugetierzellen mittels transienten Genexpression .....	77
6.1.	Einleitung .....	77
6.2.	Problemstellung und Zielsetzung .....	83
6.3.	Material und Methoden .....	84
6.3.1.	Plasmid-DNA und Transfektionsagenz .....	84
6.3.2.	Stammhaltung von HEK <sub>sus</sub> und CHO <sub>sus</sub> Zellen .....	85
6.3.3.	Bestimmung der Zelldichte und Viabilität .....	86
6.3.4.	Kryokonservierung und Inkulturnahme .....	87
6.3.5.	Polyplex-Transfektion von HEK <sub>sus</sub> Zellen .....	87
6.3.6.	Hochzelldichte-Transfektion von HEK <sub>sus</sub> und CHO <sub>sus</sub> Zellen .....	88
6.3.7.	Wiederholte transiente Transfektion von HEK <sub>sus</sub> Zellen .....	90
6.3.8.	Scale-up der RTT von HEK <sub>sus</sub> Zellen von Medium- zu Large-Scale .....	91
6.3.9.	Durchflusszytometrische Analyse .....	92
6.3.10.	Bestimmung der BMP2 Konzentration mittels ELISA .....	93
6.3.11.	Kultivierung und Stammhaltung von <i>E. coli</i> .....	94
6.3.12.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> und Transformation .....	95
6.3.13.	Kultivierung von <i>E. coli</i> zur Produktion von Plasmid-DNA .....	96
6.3.14.	Plasmidaufreinigung (Minipräparation) .....	96

6.3.15.	Plasmidaufreinigung (Gigapräparation).....	96
6.3.16.	Plasmid Quantifizierung.....	97
6.3.17.	Plasmid Qualifizierung mittels Agarosegelelektrophorese .....	97
6.3.18.	Statistik.....	98
6.4.	Ergebnisse und Diskussion.....	98
6.4.1.	Transfektion von HEK <sub>sus</sub> Zellen mit l-PEI und dem Nanostern nach dem Polyplex- und HZD-Protokoll .....	98
6.4.2.	Optimierung der HZD-Transfektion von CHO <sub>sus</sub> Zellen .....	100
6.4.3.	Transiente BMP2 Produktion in CHO <sub>sus</sub> Zellen mittels HZD-Transfektion im Mikro-Scale .....	102
6.4.4.	Transiente BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen mittels HZD-Transfektion im Mikro-Scale .....	105
6.4.5.	Transiente BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen mittels HZD-Transfektion im Small-Scale.....	107
6.4.6.	Etablierung einer RTT von HEK <sub>sus</sub> Zellen mit pEGFP-N1.....	110
6.4.7.	Anwendung der RTT für die transiente BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen im Mikro-Scale.....	113
6.4.8.	Scale-up der RTT von Medium- zu Large-Scale zur transienten BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen.....	119
6.5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	121
7.	Anhang.....	124
7.1.	Anhang zu Kapitel 3.....	124
7.2.	Anhang zu Kapitel 4.....	124
7.3.	Anhang zu Kapitel 6.....	132
7.4.	Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen, Kits .....	133
7.5.	Puffer.....	136
7.6.	Kulturmedien und Zusätze .....	137

7.7.	Verwendete Zelllinien, Zellen und Mikroorganismen .....	138
7.8.	Verbrauchsmaterialien.....	138
7.9.	Geräte und Laborausstattung.....	140
8.	Literaturverzeichnis .....	142
9.	Abkürzungsverzeichnis .....	173
10.	Abbildungsverzeichnis.....	178
11.	Tabellenverzeichnis .....	180
12.	Publikationsliste .....	183
13.	Danksagung.....	184
14.	Erklärung.....	185

# 1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden Aspekte der Isolation, Aufreinigung und Charakterisierung verschiedener primärer Zellen zur Bereitstellung für den biotechnologischen Einsatz sowie eine klassische biotechnologische Anwendung, die rekombinante Proteinproduktion in Säugetierzellen, untersucht. Zum einen werden primäre intestinale Zellen des Kompostwurmes *E. fetida* isoliert und kultiviert sowie die Eignung als Modellzellsystem in der Ökotoxikologie demonstriert. Zum anderen werden B-Lymphozyten aus humanen Tonsillen und Blut isoliert, aufgereinigt und charakterisiert. Weiter wird die Machbarkeit der Transfektion primärer humaner T-Lymphozyten mit einem neuartigen Polymer gezeigt. Auch wird für eine biotechnologische Anwendung, die rekombinante Proteinproduktion in etablierten Zelllinien, eine Prozessintensivierung der Produktion von BMP2, als Beispiel für ein schwer zu exprimierendes Protein, durchgeführt.

Der zunehmende Eintrag (potenzieller) Umwelttoxine in existierende Ökosysteme erhöht die Notwendigkeit, nicht nur organismische, sondern auch zelluläre Effekte in den betreffenden Organismen zu analysieren. Ein Primärzellsystem für und von Modellorganismen erlaubt die ökotoxikologische Untersuchung auf einem zellulären Level. In dieser Arbeit wird deshalb ein Modellzellsystem für den Kompostwurm *E. fetida*, ein essenzieller Organismus in terrestrischen Ökosystemen, entwickelt. Dazu wird eine Methodik für die Isolation und Kultivierung von Zellen aus dem Darmgewebe entwickelt, mit welcher eine Viabilität von über 80% über eine Kultivierungsdauer von 144 Stunden erreicht wird. Die Eignung primärer intestinaler *E. fetida* Zellen für *in vitro* ökotoxikologische Untersuchungen wird mittels bekannter Umwelttoxine, Silbernanopartikel und Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ), demonstriert. Diese induzieren eine deutliche Reduktion der metabolischen Aktivität um bis zu 45%. Die Methodik kann für weitere Umwelttoxine und Substanzen, als aktuelles Beispiel Mikroplastik, angewendet werden. Diese Arbeit stellt somit ein geeignetes zelluläres System und die Methodik für eine tiefgehende, umfassende Analyse zellulärer Reaktionen auf Umwelttoxine für *E. fetida* bereit.

B-Zellen stellen einen essenziellen Bestandteil des humanen Immunsystems dar. Ihre Bereitstellung besitzt somit eine klare Relevanz für biotechnologische und medizinische Anwendungen. In dieser Arbeit wird eine Methode für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen von Kindern und Erwachsenen entwickelt, als Alternative zu einer Aufreinigung

aus Blut mittels Antikörper gekoppelten, magnetischen Beads, dem Goldstandard der B-Zell Isolation. Das entwickelte Zwei-Schritt Protokoll setzt sich aus einer Isolation mononuklearer Zellen mittels mechanischer Freisetzung aus dem Gewebe und einer Dichtegradientenzentrifugation sowie einer spezifischen Aufreinigung von B-Zellen mittels Nylon Wolle zusammen. Die Isolation von B-Zellen aus Tonsillen mittels Nylon Wolle ist eine kostengünstige Methode, erreicht eine Reinheit  $\geq 80\%$  und erlaubt eine um Faktor 9 höhere Zellausbeute pro Isolation im Vergleich zu Blut, ein entscheidendes Kriterium für weiterführende Anwendungen. Auch zeichnet sich die Methodik durch eine Aufrechterhaltung der spezifischen B-Zell Subtypen Komposition des Ausgangsgewebes aus. Tonsillen von Kindern und Blut können durch einen hohen Anteil naiver B-Zellen charakterisiert werden, während Tonsillen von Erwachsenen eine hohe Anzahl Antigen-spezifischer B-Zellen (CD27<sup>+</sup> Zellen) zeigen. So erlaubt eine Auswahl zwischen Tonsillen und Blut die Bereitstellung verschiedener, spezifischer B-Zell Subtypen für eine gezielte Ausrichtung nachfolgender *in vitro* Anwendungen.

Der Transfer genetischen Materials in Säugetierzellen (Transfektion) ist die Grundlage der Herstellung genetisch modifizierter Zellen. T-Zellen besitzen, genetisch modifiziert, ein großes Potential für medizinische Anwendungen, sind jedoch schwer zu transfizierende Zellen. Nach der Isolation wird erfolgreich die Machbarkeit (*proof-of-concept*) einer genetischen Modifikation primärer humaner T-Zellen mittels eines sternförmigen, 24-armigen Polymer (Nanostern) nachgewiesen. Zwei untersuchte Transfektionsdurchführungen (Polyplex- und HZD-Transfektion) erreichen Transfektionseffizienzen von bis zu 20%. Dies ist bis zu vierfach höher im Vergleich zu Literaturwerten mit l-PEI, dem Goldstandard der kationischen Polymere, und zeigt das Potential des Nanosterns.

Eine klassische biotechnologische Anwendung, insbesondere von Säugetierzellen, ist die Produktion rekombinanter Proteine als Biopharmazeutika, die ebenfalls eine Transfektion des zellulären Expressionssystems voraussetzt. BMP2 ist ein Protein, welches routinemäßig in medizinischen Anwendungen als Induktor der Ossifikation verwendet wird. Die rekombinante Produktion von BMP2 in stabil transfizierten Zelllinien ist der aktuelle Stand der Technik, resultiert jedoch in geringen Produkttitern, denn BMP2 wird als schwierig zu exprimierendes Protein angesehen. In dieser Arbeit wird eine Prozessintensivierung der rekombinanten BMP2 Produktion basierend auf einer transienten Genexpression durchgeführt. Die BMP2 Produktion

ist in HEK<sub>sus</sub> Zellen deutlich effizienter als in CHO<sub>sus</sub> Zellen (100-fach erhöhter Produkttiter) und erreicht Werte von bis zu 1660 ng/mL. Um das intrinsische Problem einer zeitlich limitierten Transgen-Expression zu überwinden, wird eine wiederholte transiente Transfektion (RTT), in der ein initial transfizierter Zellbatch bis zu drei konsekutiven HZD-Transfektionen unterzogen wird, entwickelt. Die Etablierung mit EGFP als Reporterprotein demonstriert  $\geq 60\%$  transfizierte Zellen mit einem hohen Anteil *high producer* über den gesamten Produktionszeitraum. Der entwickelte RTT Prozess erreicht eine klare Steigerung der BMP2 Produktion und eine Gesamtausbeute von 46,6  $\mu\text{g}$  BMP2 mit einer Verlängerung der Produktionsphase auf 384 Stunden. RTT ist kompatibel mit einem Upscaling in den Liter-Maßstab und kann in den Seed Train integriert werden, was auch die Eignung für die transiente BMP2 Produktion im größeren Maßstab demonstriert.

Somit können in dieser Arbeit verschiedene Methodiken für die Isolation, Kultivierung und Charakterisierung primärer Zellen aus unterschiedlichen Organismen etabliert und angewendet werden. Für die transiente Produktion von BMP2 wird ein Methode der wiederholten transienten Transfektion entwickelt, was eine Steigerung der Produktausbeute erlaubt.

## 2. Summary

In this work, the isolation, purification, and characterization of different primary cells for biotechnological use are analyzed. Furthermore, a biotechnological application, the production of recombinant proteins, is investigated. First, primary intestinal cells of the earthworm *E. fetida* are isolated and cultivated and their suitability as a model cell system in ecotoxicology is demonstrated. Second, B lymphocytes from human tonsils and blood are isolated, purified, and characterized. Furthermore, a proof-of-concept for the transfection of human primary T lymphocytes with a novel polymer is shown. Process intensification for recombinant BMP2 production, an example for a difficult-to-express protein, in mammalian cell lines is performed.

The increasing exposition of environmental pollutants into existing ecosystems increases the necessity to analyze not only organismic effects, but also cellular effects of the respective organisms. A system of primary cells for and from model organisms allows for ecotoxicological studies on a cellular level. In this work, a primary cell system of intestinal cells from *E. fetida*, an essential organism in terrestrial ecosystems, is established. Therefore, a methodology for the isolation and cultivation of cells directly from the intestine is established, maintaining > 80% viability in cultivations for 144 hours. The suitability of primary intestinal *E. fetida* cells for *in vitro* ecotoxicological studies is demonstrated by analyzing the exposure to established environmental pollutants, silver nanoparticles and metal ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ). Exposure induces a significant decrease in the metabolic activity by up to 45%. The established methodology allows to analyze additional toxins/substances, such as microplastic as a current example. Therefore, this work provides a suitable cellular system and methodology for an in-depth and comprehensive analysis of effects of environmental pollutants on a cellular level for *E. fetida*.

B cells are essential components of the human immune system with great potential in biotechnology and medicine. In this work, a methodology for the isolation of human B cells from juvenile and adult tonsils is established, as an alternative to the gold standard of B cell isolation from blood based on magnetic beads coated with specific antibodies. The proposed two-step protocol is composed of an isolation of mononuclear cells using mechanical tissue disaggregation and density gradient centrifugation followed by a purification of B cells using nylon wool. The nylon wool-based isolation from tonsils is a low-cost method reaching purities  $\geq 80\%$  and providing 9-fold increased B cell numbers per isolation compared to blood, a crucial

factor for subsequent applications. Furthermore, the method allows to preserve the specific B cell subtype composition of the tissue. Juvenile tonsils and blood are characterized by a high incidence of naïve B cells, whereas for adult tonsils a high number of antigen-specific B cells (CD27<sup>+</sup> cells) is determined. In consequence, the use of tonsils or blood allows the isolation of different, specific B cell subtypes allowing targeted *in vitro* applications.

The transfer of genetic material into mammalian cells (transfection) is the basis of the production of genetically modified cells. T cells show a great potential for medical applications when genetically modified but are considered hard-to-transfect cells. After isolation, a proof-of-concept of a genetic modification of primary human T cells using a star-shaped, 24-armed polymer (nanostar) is demonstrated. Two different transfection protocols (polyplex- and HCD-transfection) reach transfection efficiencies up to 20%. This is higher compared to literature values for l-PEI, the gold standard of cationic polymers, showing the potential of the nanostar.

A classical biotechnological application, particularly of mammalian cells, is the production of recombinant proteins for use as biopharmaceutics, which also requires transfection of the cellular expression system. BMP2 is routinely used in medical applications as an inducer of osteoformation. The recombinant production in stably transfected cell lines is state of the art, albeit resulting in low product titers, as BMP2 is considered a difficult-to-express protein. Therefore, process intensification based on transient gene expression is performed. BMP2 production is more efficient in HEK<sub>sus</sub> cells compared to CHO<sub>sus</sub> cells (100-fold increased product titer) reaching titers up to 1660 ng/mL. To overcome the intrinsic drawback of a short-lived transgen expression, a repeated transient transfection (RTT) is established. In this process, up to three consecutive rounds of HCD-transfections are performed on a batch of initial transfected cells. The implementation using EGFP as a reporter protein shows  $\geq 60\%$  transfected cells with a high number of high producers over the production time. The RTT process improves BMP2 production reaching a process yield of 46.6  $\mu\text{g}$  BMP2 with an extension of the production phase to 384 hours. RTT is compatible with scale up to the Liter range and can be integrated into the seed train, showing suitability for large scale production.

In this work, methods for the isolation, cultivation, and characterization of different primary cells are established and applied. For the production of BMP2, a repeated transient transfection process is developed, which improves BMP2 production and process yield.

### 3. Isolation primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* und Nutzung für ökotoxikologische Untersuchungen

#### 3.1. Einleitung

Der Kompostwurm *Eisenia fetida* (*E. fetida*) ist ein terrestrischer Organismus in der Familie der Lumbricidae (Regenwürmer). Die Familie der Lumbricidae macht über 80% der Biomasse aller terrestrischen Invertebraten aus (Sivakumar, 2015), was auf die weite Verbreitung hinweist. Regenwürmer besitzen eine essenzielle Rolle in terrestrischen Ökosystemen und erfüllen vielfältige Aufgaben. So zersetzen sie chemisch und physikalisch organisches Material im Boden, stellen dadurch Nährstoffe zur Verfügung und spielen somit eine entscheidende Rolle im Wasser-, Nährstoff- und Kohlenstoffkreislauf (Bernard et al., 2015; Curieses et al., 2017; Nahmani et al., 2007; Sivakumar, 2015). Sie vermischen abgestorbenes organisches Material (Blätter, tote Organismen etc.) mit dem Boden, erhöhen die Porosität des Bodens und formen und stabilisieren gleichzeitig die Bodenstruktur (Nahmani et al., 2007; Sivakumar, 2015). Dadurch verbessern sie die Qualität des Bodens, die Bodenfruchtbarkeit, die potenzielle Nährstoffaufnahme und beeinflussen damit andere Lebewesen wie Pflanzen (z.B. in ihrem Wachstum und ihrer Ausbeute), Mikroorganismen und andere Invertebraten (Bernard et al., 2015; Nahmani et al., 2007; Sivakumar, 2015). Als Biomonitor sind sie ein Schlüsselindikator für die Gesundheit des Ökosystems und geben Informationen zu der Bodenstruktur, mikroklimatischen Bedingungen, Nährstoffgehalt und Anwesenheit von Umwelttoxinen (Bernard et al., 2015). Basierend auf diesen Fähigkeiten werden Regenwürmer oft als Ingenieure des Ökosystems bezeichnet (Jones et al., 1994). Aufgrund der sehr engen Verbundenheit mit dem Boden und konstanten Kontakt über die Epidermis und über den Darm sind sie ein anerkannter, routinemäßig verwendeter Modellorganismus in der Boden Ökotoxikologie (Bernard et al., 2015; Garcia-Velasco et al., 2016; Sivakumar, 2015; Spurgeon et al., 1994, 2003; van Gestel et al., 1993). In der ökotoxikologischen Forschung wird der Einfluss von Umwelttoxinen auf den gesamten Organismus untersucht. Dazu werden typischerweise traditionelle Endpunktmarker wie Mortalität, Wachstum, Reproduktion und Bioakkumulation analysiert. Darauf basierend werden spezifische Toxizitätsindizes ermittelt, besonders häufig der LC<sub>50</sub> Wert (letale Konzentration<sub>50</sub>), die Konzentration einer Substanz, die unter definierten Bedingungen für 50% der Organismen tödlich ist. *E. fetida* ist von der OECD seit 1984 als Organismus für die Analyse von Umwelttoxinen im Boden empfohlen (OECD,

1984). Als unspezifischer *soil feeder* nimmt *E. fetida* konstant große Mengen Erde und somit alle möglicherweise in der Erde enthaltenen Umwelttoxine auf. Folglich ist der Darm-Trakt direkt den Umwelttoxinen ausgesetzt und die intestinalen Zellen sind die erste zelluläre Barriere des Organismus, die auf die Umwelttoxine treffen.

Nanomaterial und Metalle bzw. Metallionen repräsentieren zwei große und weit verbreitete Gruppen von Umwelttoxinen. Silbernanopartikel (Ag Nanopartikel, AgNP) stellen aufgrund der Vielzahl der aktuellen und potenziellen zukünftigen Anwendungen von AgNP eines der am häufigsten verwendeten Nanomaterialien dar (Dubey et al., 2015; Vance et al., 2015). Sie zeigen vielfältigen Eigenschaften, unter anderem eine antimikrobielle Wirkungsweise, und finden darum Verwendung in Haushaltsprodukten und Konsumartikeln (beispielsweise Reinigungsmittel, Farben, Textilien), in biomedizinischen Produkten und Anwendungen sowie in der Agrarindustrie (beispielsweise Nanopestizide, Herbizide, Düngemittel) (Garcia-Velasco et al., 2016; Kwak et al., 2014; Nowack et al., 2011; Vance et al., 2015). Eine der Hauptquellen für AgNP im Boden stellt die Freisetzung von Klärschlamm bzw. Feststoffen aus der Abwasserbehandlung dar (Curieses et al., 2017; Tourinho et al., 2012). Silbernanopartikel induzieren auf der Ebene des Organismus bei *E. fetida* keine oder nur geringe Effekte bezüglich ökotoxikologischer Endpunktmarker wie Mortalität, Wachstum, Reproduktion und Bioakkumulation (Curieses et al., 2017; Kwak et al., 2014; Shoults-Wilson et al., 2011; Swart et al., 2020). Lediglich bei sehr hohen Konzentrationen von AgNP treten in *E. fetida* deutliche Effekte auf. Garcia-Velasco et al. konnte für *E. fetida* eine Mortalität mit einem  $LC_{50}$  Wert von 144 mg/kg Erde sowie eine Reduktion im Wachstum und in der Reproduktion nachweisen (Garcia-Velasco et al., 2016). Gottschalk et al. modelliert einen jährlichen Eintrag von AgNP in den Boden zwischen 17,4 und 58,7 ng/kg Erde in Europa (Gottschalk et al., 2009). Diskutiert wird auch die Frage, ob die Effekte bzw. Toxizität von Nanomaterial allgemein durch die intrinsischen Eigenschaften des Nanomaterials oder durch die Löslichkeit und Freisetzung von Ionen oder durch einen kombinierten Effekt induziert wird (Garcia-Velasco et al., 2016).

Metalle treten zum einen als natürliche Bestandteile der Erdkruste auf, stellen mittlerweile jedoch das weitverbreitetste Umwelttoxin im Boden dar, aufgrund Emission in der Metallindustrie, Bergbau sowie Agrar- und Automobilindustrie (Irizar, Rodríguez, et al., 2015; Sivakumar, 2015). Kupfer wird in niedrigen Konzentrationen als essenzielles Element angesehen, kann jedoch in hohen Konzentrationen toxisch wirken (Bernard et al., 2015). Für Cadmium hingegen ist keine biologische Funktion in Organismen bekannt. Cadmium stellt

eines der toxischsten Metalle dar, zeigt bereits in niedrigen Konzentrationen eine hohe Toxizität und wirkt in Menschen und Nagetieren karzinogen (Bernard et al., 2015; Irizar, Rodríguez, et al., 2015; Robards & Worsfold, 1991; X. Zhang et al., 2009). Verschiedene Metalle bzw. Metallionen bewirken gegenüber Regenwürmern bezüglich ökotoxikologischer Endpunktmarker eine Mortalität, Reduktion des Wachstums und der Reproduktion sowie eine Reduktion der Kokon Produktion und Viabilität (Nahmani et al., 2007; Sivakumar, 2015). Auch verhaltensspezifische und morphologische Symptome wie langsame Bewegungen, Anschwellung und Sekretabsonderungen sind beschrieben (Sivakumar, 2015).

Es wird angenommen, dass der Effekt von Umwelttoxinen auf Regenwürmer teilweise über einen negativen Einfluss auf das Darm-Gewebe und die intestinalen Zellen vermittelt wird. Auch eine Vermittlung von Effekten über eine dermale Aufnahme über die Epidermis ist möglich. Welcher Aufnahmeweg eine bedeutendere Rolle spielt, ist nicht bekannt. Garcia-Velasco et al. konnte für AgNP zeigen, dass diese Partikel hauptsächlich durch die Aufnahme von Erde in den Darm des Organismus (*E. fetida*) gelangen, dann weiter in das intestinale Epithelgewebe aufgenommen werden und Effekte auf organismischer Ebene vermitteln (Garcia-Velasco et al., 2016). Ökotoxikologischen Endpunktmarker erlauben eine Beschreibung des Effektes von Umwelttoxinen auf den gesamten Organismus. Organismische Effekte und Reaktionen sind jedoch äußerst komplex und bieten keine Erklärung der mechanistischen Effekte, z.B. den genauen Wirkungsprozess. Für eine umfassende Erklärung der organismischen Effekte ist folglich die Identifizierung von Effekten auf niedrigeren Leveln biologischer Komplexität (biochemisches, gewebespezifisches, zelluläres und molekulares Level) essenziell. Eine Möglichkeit für die Analyse des zellulären Levels sind Zelllinien oder Primärzellen, besonders aus dem spezifischen Gewebe, von dem Effekte vermittelt werden (Garcia-Velasco et al., 2016, 2019; Revel et al., 2021).

Primärzellen werden spezifisch aus einem Gewebe isoliert und repräsentieren somit das Ursprungsgewebe und damit den physiologischen Zustand des Gewebes bzw. der Zellen *in vivo* (Kengla et al., 2017; Li, 2019). Die Zellen weisen eine maximal vergleichbare Charakteristik zu den Zellen des Ursprungsgewebes *in vivo* auf und zeigen auch die zellulären Funktionen und Reaktionen der *in vivo* Zellen (Kengla et al., 2017; Li, 2019). Folglich sind Primärzellen ein exzellentes *in vitro* Modellsystem für die Analyse der Physiologie und Biochemie der Zellen sowie für Effekte von verschiedenen Substanzen (z.B. medizinische Wirkstoff, Umwelttoxine)

auf die Zellen (Li, 2019; A. Verma et al., 2020). Primärzellen werden vergleichbar mit etablierten Zelllinien unter optimierten Kulturbedingungen, z.B. hinsichtlich Temperatur sowie Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidversorgung, spezifisch für die isolierten Zellen, kultiviert (ATCC, 2012). Jedoch sind sie in der Kultivierung und Handhabung schwieriger bzw. anspruchsvoller als etablierte Zelllinien. Des Weiteren besitzen sie nur eine limitierte Lebensdauer, da sie nicht immortalisiert sind (Gillooly et al., 2012; Kengla et al., 2017; A. Verma et al., 2020) und nicht wie Zelllinien die Hayflick-Grenze überwunden haben (Hayflick & Moorhead, 1961). Genauso wie etablierte Zelllinien benötigen Primärzellen ein vollständiges Kulturmedium, bestehend aus einem Basalmedium und Supplementen, z.B. Wachstumsfaktoren (ATCC, 2012). Das Basalmedium gibt die entscheidenden Faktoren wie die enthaltenen Substanzen und Nährstoffe, Konzentration der Nährstoffe (Nährstoffgehalt), Osmolalität, Puffersystem und -kapazität sowie den pH-Wert vor (A. Verma et al., 2020). Diese Faktoren können durch die Zugabe von Supplementen in gewissem Maße beeinflusst werden. Die Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren wird typischerweise über die Zugabe von Zellhomogenisat oder Blutserum erreicht. Dafür wird routinemäßig fetales Kälberserum (*Fetal Calf Serum*, FCS) verwendet (A. Verma et al., 2020). Bei der Etablierung eines Protokolls für die Kultivierung von bisher nicht untersuchten Primärzellen müssen die Kulturbedingungen sowie das Kulturmedium basierend auf der bekannten Literatur neu entwickelt und optimiert werden. Besonders in der Primärzellkultivierung ist die Zelldichte ein wichtiger und kritischer Faktor, sowohl bei der Aussaat als auch im Verlauf der Kultivierung (ATCC, 2012). Dieser Faktor ist spezifisch für die isolierten primären Zellen. Bei der Aussaat ist eine ausreichend hohe Anzahl an Zellen notwendig, damit Zell-Zell Interaktionen gewährleistet sind sowie die Produktion von autokrinen Wachstumsfaktoren ausreichend hoch ist, um eine Proliferation der Zellen zu ermöglichen (Freshney, 2010; Lauffenburger & Cozens, 1989). Auf der anderen Seite ist für Primärzellen eine sehr hohe Zelldichte (Konfluenz) ein kritischer Punkt, denn die Zellen zeigen nach Erreichen einer Konfluenz oftmals eine Proliferationsinhibition oder eine Differenzierung, was es zu vermeiden gilt (Freshney, 2010; Pavel et al., 2018; Xiao et al., 2013). Für die Gewinnung von Primärzellen aus einem spezifischen Gewebe erfolgt zuerst die Präparation und Isolation des Ursprungsgewebes, und nachfolgend die Isolation und Freisetzung primärer Zellen aus dem erhaltenen Gewebe. Für die Isolation von Zellen aus einem Gewebe werden enzymatische, chemische oder mechanische Methoden oder auch eine Kombination dieser verwendet (Reichard & Asosingh, 2019; Richter et al., 2021; A. Verma et

al., 2020). Die Auswahl der Methoden begründet sich vor allem in der Charakteristik des Ursprungsgewebes. Oftmals wird eine enzymatische Disaggregation des Gewebes verwendet. Verschiedene digestive Enzyme können genutzt werden, um die komplexe extrazelluläre Matrix (EZM) der Zellen zu verdauen und Zell-Zell-Bindungen zu spalten, was zu einer Freisetzung von einzelnen Zellen aus dem Gewebe führt (Reichard & Asosingh, 2019; Richter et al., 2021). Die EZM besteht hauptsächlich aus verschiedenen Proteinen, Glykoproteinen und Proteoglykanen (Halper & Kjaer, 2014; Oskarsson, 2013). Collagen ist ein fibröses Protein und stellt das Hauptstrukturelement der EZM dar (Rahman, 2019; Ricard-Blum, 2011). Das digestive Enzym Collagenase ist eine Endopeptidase und kann effizient die EZM verdauen, indem es selektiv Peptidbindungen im Collagen spaltet (Reichard & Asosingh, 2019; Richter et al., 2021). Im Detail wirkt Collagenase in der Tripelhelix-Region des Collagens und spaltet dort die N-terminale Peptidbindung von Glycin in einer Prolin-Xaa-Glycin-Prolin Sequenz (C.-M. Jung et al., 1999). Dies bewirkt einen sanften Verdau der EZM im Vergleich zu anderen häufig verwendeten digestiven Enzymen wie z.B. Trypsin (Reichard & Asosingh, 2019). Primärzellen ermöglichen eine Analyse von Effekten auf dem zellulären Level. Aufgrund der maximalen Nähe zu den *in vivo* Zellen sind Primärzellen jedoch repräsentativer für die *in vivo* Situation als etablierte Zelllinien und erlauben somit aussagekräftigere Analysen. Des Weiteren ermöglichen Primärzellen die Durchführung von Analysen in Bezug auf Organismen und Geweben, für die keine etablierten Zelllinien existieren.

Für den Kompostwurm *E. fetida* existieren keine etablierten Zelllinien sowie keine Protokolle für die Isolation und nachfolgende Kultivierung primärer intestinaler Zellen. In Regenwürmern stellen Coelomozyten einen etablierten Typ primärer Zellen dar und es existiert eine Vielzahl von verschiedenen Protokollen für die Isolation und Kultivierung von Coelomozyten, auch aus dem Kompostwurm *E. fetida* (Diogéne et al., 1997; Eyambe et al., 1991; Fuller-Espie et al., 2015; Garcia-Velasco et al., 2019; Stein & Cooper, 1981; Toupin et al., 1977). Primäre Coelomozyten werden oftmals für *in vitro* Analysen auf einem zellulären Level in der Boden Ökotoxikologie und damit für Analysen des Immunsystems bzw. der Immunantwort von Regenwürmern verwendet (Garcia-Velasco et al., 2019; Irizar, Rivas, et al., 2015). Coelomozyten sind eine heterogene Gruppe von Leukozyten-ähnliche Zellen, die in dem Coelom vieler Invertebraten vorkommen und das Immunsystem bzw. die Immunzellen von Regenwürmern darstellen (Curieses et al., 2017; Garcia-Velasco et al., 2019; Irizar, Rivas, et

al., 2015; Tahseen, 2009). Sie zirkulieren in der Coelomflüssigkeit, besitzen eine Makrophagen ähnliche Funktion und sind damit für die Erkennung und Aufnahme von exogenem Material sowie für die Blutgerinnung und Wundheilung zuständig (Cooper et al., 2002; Curieses et al., 2017; Kurek et al., 2007; Tahseen, 2009).

Coelomozyten sind folglich physiologisch und funktional deutlich unterschiedlich im Vergleich zu intestinalen Zellen. Für die Isolation von Coelomozyten werden hauptsächlich zwei verschiedene Puffer verwendet, M-HBSS (*Modified Hanks Balanced Salt Solution*) und LBSS (*Lumbricus Balanced Salt Solution*) (Diogéne et al., 1997; Stein & Cooper, 1981). Aufgrund der Unterschiede zwischen beiden Zelltypen (Immunzellen vs. intestinalen Zellen) und des Ursprungsgewebes (Coelomflüssigkeit vs. festes intestinales Epithelzellgewebe) sind die Protokolle für die Isolation von Coelomozyten nicht auf die Isolation primärer intestinaler Zellen übertragbar, dennoch können die Puffer eine Grundlage für eine Protokollentwicklung darstellen. Dasselbe gilt für die verwendeten Kulturmedien, denn es wird erwartet, dass auch die spezifischen Anforderungen der jeweiligen Zelltypen an ein Kulturmedium verschieden sind. Für die Kultivierung von Coelomozyten werden unterschiedliche Basalmedien verwendet, oftmals Leibovitz's L-15 Medium (Bilej et al., 1990; Garcia-Velasco et al., 2019; Irizar et al., 2014; Roch et al., 1975; Toupin et al., 1977), aber auch BME (*Basal Medium Eagle*), DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute-1640*) oder SFX Insektenmedium (Diogéne et al., 1997; Engelmann et al., 2004; Fuller-Espie et al., 2015; Garcia-Velasco et al., 2019). L-15 Medium ermöglicht im Vergleich zu den anderen verwendeten Kulturmedien eine Kultivierung von Zellen ohne das in der Zellkultur übliche (Natrium-) Carbonat/CO<sub>2</sub> Puffersystem. Die hohen Mengen an enthaltenen Aminosäuren mit einer freien Base (Arginin, Histidin, Cystein) wirken im L-15 Medium als Puffer (Leibovitz, 1963). Gong et al. verwendet für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen des Regenwurmes *Pheretima aspergillum* (*P. aspergillum*) Schneider's Drosophila Medium (SDM) (Gong et al., 2014). Fragmente von *E. fetida* konnten in Hansen S-301, ein Medienformulierung basierend auf einer starken Verdünnung von SDM, über einen längeren Zeitraum in Kultur gehalten werden (Battaglia & Davoli, 1997). Alle verwendeten Kulturmedien werden mit unterschiedlichen Supplementen und zum Teil mit angepassten Verdünnungen, d.h. mit modifizierter Osmolalität, verwendet. Dies erschwert die Vergleichbarkeit zwischen ökotoxikologischen Studien mit Coelomozyten, denn eine definierte Medienzusammensetzung stellt die Grundlage für eine experimentelle Reproduzierbarkeit dar.

Des Weiteren kann die Medienzusammensetzung die Bioverfügbarkeit und Toxizität der analysierten Umwelttoxine verändern und folglich die zelluläre Reaktion und die ermittelten Effekte beeinflussen (Garcia-Velasco et al., 2019; Irizar et al., 2014).

### 3.2. Problemstellung und Zielsetzung

Der Kompostwurm *E. fetida* ist ein essenzieller Organismus in terrestrischen Ökosystemen und ein routinemäßig verwendeter Modellorganismus in der Boden Ökotoxikologie. Aufgrund der unspezifischen Nahrungsaufnahme großer Mengen Erde ist der Darm-Trakt und somit die intestinalen Zellen die erste zelluläre Barriere des Organismus *E. fetida*, die auf mitaufgenommene, potenzielle Umwelttoxine treffen. Aus diesem Grund bieten intestinale Zellen eine optimale Möglichkeit für die (mechanistische) Analyse toxischer Effekte von potenziellen Umwelttoxinen auf einem zellulären Level. Dies erlaubt einen Vergleich zu den bereits untersuchten Effekten auf dem organismischen Level und könnte sogar Erklärungen für dort beobachtbare Reaktionen liefern. Das Ziel der Arbeiten ist es, eine Methode für die Isolation und Kultivierung primärer intestinaler *E. fetida* Zellen zu entwickeln und die isolierten und kultivierten Zellen für *in vitro* ökotoxikologische Untersuchungen anzuwenden. Somit wird ein Modellzellsystem *in vitro* etabliert. Dafür ist zuerst die Etablierung eines Primärzellsystems für die intestinalen *E. fetida* Zellen notwendig. Der nachfolgende Schritt ist die Nutzung der Zellen für *in vitro* ökotoxikologische Untersuchungen. Für die Gewinnung von Primärzellen aus dem isolierten Darm-Trakt muss ein Isolationsprotokoll entwickelt werden, welches eine effiziente und gleichzeitig sanfte Isolation der Zellen ermöglicht, also eine hohe Ausbeute an Zellen mit hoher Zellviabilität liefert. Nach der Gewinnung der Primärzellen ist der nächste Schritt die Etablierung einer Kultivierungsmethodik. Dazu müssen sowohl die Kulturbedingungen als auch das Kulturmedium basierend auf der Literatur neu entwickelt und optimiert werden. Die Etablierung eines Primärzellsystems ist komplex, denn für eine Kultivierung müssen eine Vielzahl an Parametern evaluiert und determiniert werden. Dazu zählen die Temperatur und Gasversorgung sowie die Wahl eines Basalmedium und geeigneter Supplemente. Zusätzlich sind Parameter wie die Zugabe von Antibiotika, die Animpfzellichte und die zusätzliche Beschichtung des Kulturgefäßes zu untersuchen und zu bestimmen.

Um die Eignung primärer intestinaler *E. fetida* Zellen für ökotoxikologische Untersuchungen zu zeigen, muss der Einfluss von (potenziellen) Umwelttoxinen auf die Zellen analysiert werden. Hier steht eine große Auswahl an Umwelttoxinen zur Verfügung, in dieser Arbeit

werden Silbernanopartikel und Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) ausgewählt. Beide Substanzgruppen sind ein Beispiel für weit verbreitete Umwelttoxine, von denen erwartet wird, dass ihre Exposition in Zukunft weiter zunimmt. Für die Analyse des Effekts auf die Zellen muss eine geeignete Analytik etabliert werden. Hier wird ein MTT-Assay genutzt, der die metabolische Aktivität der Zellen misst, welche ein Maß für die Zellvitalität darstellt.

### 3.3. Material und Methoden

#### 3.3.1. Silbernanopartikel und Metallionen

Die verwendeten Silbernanopartikel (AgNP) haben eine Größe von 40 nm und sind in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 2 mM Natriumcitrat-Lösung gelöst. Für die Verwendung im MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.9) wird mittels eines Vakuumkonzentrators (Parameter: 60 min, 45 °C) eine höher konzentrierte Stammlösung von 65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  AgNP in 6,5 mM Natriumcitrat-Lösung hergestellt.

$\text{CuCl}_2$  und  $\text{CdCl}_2$  werden in einer Konzentration von 100  $\text{mg}/\text{mL}$  in hochreinem Wasser gelöst und mittels Sterilfiltration (0,2  $\mu\text{m}$ , Celluloseacetat) sterilisiert. Diese Stammlösung wird für die Analyse von hohen Kupfer- bzw. Cadmiumionen-Konzentrationen (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bzw. 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) im MTT-Assay (siehe Kapitel 3.3.9) verwendet. Für die Analyse von niedrigen Kupfer- bzw. Cadmiumionen-Konzentrationen (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bzw. 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) wird die Stammlösung mit hochreinem Wasser auf eine Konzentration von 10  $\text{mg}/\text{mL}$  verdünnt.

#### 3.3.2. Puffer

M-HBSS ohne GGE (*Guaiacol Glyceryl Ether*) mit einem pH-Wert von 7,25 und einer Osmolalität von 210 mOsmol/kg wird nach dem Protokoll von Diogéne et al. hergestellt (Diogéne et al., 1997). Für die Herstellung wird GGE durch NaCl ersetzt, um eine konstante Osmolalität zu gewährleisten. Wenn angegeben, wird GGE in einer finalen Konzentration von 50,4 mM aus einer 500 mM GGE Stammlösung in hochreinem Wasser in den Puffer supplementiert.

LBSS mit einem pH-Wert von 7,3 und einer Osmolalität von 171 mOsmol/kg wird nach dem Protokoll von Stein & Cooper hergestellt (Stein & Cooper, 1981).

Beide Puffer werden durch Sterilfiltration (0,2  $\mu\text{m}$ , Celluloseacetat) sterilisiert. Die Zusammensetzung beider Puffer ist in Tabelle 3-1 detailliert angegeben.

**Tabelle 3-1:** Eigenschaften und detaillierte Zusammensetzung von M-HBSS und LBSS.

M-HBSS ist beschrieben von Diogéne et al., 1997 und LBSS von Stein & Cooper, 1981.

Eigenschaft/Komponente	M-HBSS	LBSS
pH-Wert [-]	7,25	7,3
Osmolalität [mOsmol/kg]	210	171
KCl [mM]	5,3	4,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [mM]	0,396	0,4
NaHCO <sub>3</sub> [mM]	4,09	4,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O [mM]	0,298	-
Glucose [mM]	5,5	-
HEPES [mM]	10,0	-
NaCl [mM]	84,9	71,5
CaCl <sub>2</sub> [mM]	-	3,8
MgSO <sub>4</sub> [mM]	-	1,1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [mM]	-	0,4

### 3.3.3. Anzucht und Haltung von *E. fetida*

In diesem Teil der Arbeit wird der Kompostwurm *E. fetida* als biologischer Organismus genutzt. Die verwendeten Kompostwürmer stammen aus synchronisierten Laborkulturen, die unter kontrollierten Bedingungen am Lehrstuhl Tierökologie I, Prof. Dr. Heike Feldhaar, Universität Bayreuth (Bayreuth, Deutschland) gehalten werden. Die Temperatur beträgt konstant 15 °C, die Bodenfeuchtigkeit 70% und die Licht-Dunkel-Periode 16 h Licht und 8 h Dunkelheit. Die Zucht findet in speziellen Wurm-Kompostern, befüllt mit feuchter Blumenerde, vermischt mit Torfmoos, statt. Um die Feuchtigkeit aufrechtzuerhalten, wird die Erde bei Bedarf mittels einer Sprühflasche mit Wasser angefeuchtet. Die Kulturen werden wöchentlich mit einem gehäuften Esslöffel Haferflocken und einem gehäuften Esslöffel speziellem Wurmfutter (Superwurm e.K., Düren, Deutschland) gefüttert. Dazu wird das Futter in einer dünnen Schicht auf der Oberfläche der Erde aufgetragen. Für die Haltung werden die Wurm-Komposter mit einer Hanfmatte (Albert Kerbl GmbH, Buchbach, Deutschland) bedeckt, um ein schnelles Austrocknen der Erde zu verhindern.

### 3.3.4. Herstellung eines zellfreien Wurmfiltrates von *E. fetida*

Für die Herstellung eines zellfreien Wurmfiltrates (WF) von *E. fetida*, das für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* verwendet wird, wird ein eigenes Protokoll

entwickelt. Ca. 30 ausgewachsene Kompostwürmer werden dem Wurm-Komposter entnommen und gewaschen, um die Erde, die sich außen an den Kompostwürmern befindet, abzuspülen. Die Kompostwürmer werden in eine Zellkulturschale, ausgelegt mit feuchtem Filterpapier, gelegt, damit sie während einer Inkubationszeit von 24 h auf natürliche Weise ihren Darm entleeren. Nach der Inkubationszeit wird das Feuchtgewicht der Kompostwürmer bestimmt. Um die Kompostwürmer zu betäuben, werden sie für 10 min bei -20 °C inkubiert. Danach werden auf 10 g Kompostwürmer 50 mL M-HBSS gegeben und sie mit einem Stabmixer homogenisiert. Die entstehende Suspension wird mit Hilfe des Kolbens einer 20 mL Spritze durch ein 70 µm Zellsieb filtriert, dabei wird der Durchlauf in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen auf Eis aufgefangen. Um verbleibende Feststoffe, wie z.B. Gewebereste oder größere Zellverbände, die nicht durch die Filtration entfernt werden, abzutrennen, wird das Filtrat zentrifugiert (3990 x g, 2,5 h, 4 °C) und der Überstand bei -20 °C gelagert.

### 3.3.5. Präparation und Isolation des Darm-Traktes von *E. fetida*

Die Präparation und Isolation des Darm-Traktes von *E. fetida* wird von Mitarbeitenden des Lehrstuhls Tierökologie I, Prof. Dr. Heike Feldhaar, Universität Bayreuth (Bayreuth, Deutschland) durchgeführt. Ausgewachsene Kompostwürmer werden dafür 24 h vor der Präparation gewaschen und in eine Zellkulturschale, ausgelegt mit feuchtem Filterpapier, gelegt, damit sie während der Inkubationszeit auf natürliche Weise ihren Darm entleeren. Der für die Sektion des Darm-Traktes zu verwendende M-HBSS wird vor der Benutzung mit 100 *Units*/mL (U/mL) Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 60 µg/mL Tetracyclin, 50 µg/mL Gentamicin und 2,5 µg/mL Amphotericin B (im Weiteren zusammenfassend abgekürzt als PSTGA) supplementiert, um das Wachstum von Bakterien und Pilzen zu verhindern. Die Kompostwürmer werden durch eine Inkubation bei -20 °C für 10 min betäubt und dann der Kopf mit einem sauberen Skalpell abgetrennt. In einer Zellkulturschale, gefüllt mit 4 °C kaltem M-HBSS/PSTGA, wird unter einem Binokular der Darm-Trakt des Kompostwurmes präpariert. Dabei wird besonders vorsichtig vorgegangen, um einen möglichst intakten Darm-Trakt zu erhalten und Kontaminationen mit unerwünschten Teilen des umliegenden Gewebes zu verhindern. Aufgrund der engen Verbindung des Darm-Traktes mit weiteren Gewebetypen, wie beispielsweise Chloragogen-Zellen, kann eine Kreuzkontamination des Darm-Traktes mit anderen Gewebe- bzw. Zelltypen während der Präparation nicht vollständig ausgeschlossen werden. Der isolierte Darm wird in frischen, 4 °C kaltem M-HBSS/PSTGA transferiert und von

verbleibendem Darminhalt oder anderen Kontaminanten gesäubert. Der saubere Darm wird dann in ein Reaktionsgefäß mit 0,5 mL 4 °C kaltem M-HBSS/PSTGA überführt, das Feuchtgewicht des Darmes bestimmt und dieser bis zu der Zellisolation auf Eis gelagert.

### 3.3.6. Isolation primärer intestinaler Zellen von *E. fetida*

Die Isolation primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* findet möglichst zeitnah nach der Präparation und Isolation des Darm-Traktes statt, um die Inkubationszeit des Gewebes zu minimieren und möglichst frische Zellen zu isolieren. Für die Zellisolation wird der Darm enzymatisch mit Collagenase II verdaut. Die verwendete Collagenase II von *Clostridium histolyticum* ist eine Rohcollagenase, ein Enzymgemisch verschiedener proteolytisch wirksamer Enzyme wie beispielsweise Clostripain sowie tryptischen und proteolytischen Aktivitäten. Der Verdau findet in einem Reaktionsgefäß mit 500 µL M-HBSS/PSTGA supplementiert mit 10 µg/mL Collagenase II (aus einer 2 mg/mL Collagenase II Stammlösung in DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*)) für 90 min in einem Heiz-/Schüttelblock bei 37 °C und 500 rpm (*rounds per minute*) statt. Nach der Inkubationszeit wird nur der Überstand, der die freigesetzten Zellen enthält, ohne das Darmgewebe, abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (200 x g, 5 min) wird der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in 1 mL M-HBSS/PSTGA resuspendiert und durch ein 20 µm Zellsieb filtriert. Die erhaltenen Zellen im Durchlauf werden erneut durch Zentrifugation (200 x g, 5 min) pelletiert, der Überstand entfernt und die Zellen in 100 µL M-HBSS/PSTGA resuspendiert. Die konzentrierte Zellsuspension wird nachfolgend für die Inokulation der Zellkulturplatten für die Kultivierung genutzt.

### 3.3.7. Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* und Analytik

Für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* wird ein eigenes Kultivierungsprotokoll sowie eine definierte Medienformulierung entwickelt. Die frisch isolierten Zellen werden in einer finalen Medienformulierung kultiviert, die aus 60% (v/v) L-15 Medium, 20% (v/v) hochreinem Wasser, 10% (v/v) FCS und 10% (v/v) WF zusammengesetzt ist und mit 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) und PSTGA supplementiert wird. Da die Medienformulierung im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wird, werden die Zellen auch in anderen Medienformulierungen kultiviert, z.B. in SDM. Abweichungen von der oben genannten finalen Medienformulierung, die vor allem bei der Entwicklung des Kultivierungsprotokolles

verwendet werden, sind explizit angegeben bzw. dargestellt. Das Wurmfiltrat wird direkt vor der Verwendung durch zweimalige Sterilfiltration (0,2 µm, Celluloseacetat) sterilisiert.

Die Osmolalität der Medienformulierungen wird mittels eines Gefrierpunktsmometers bestimmt. Dazu wird die Messung nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Es werden drei Standards, 0, 300 und 850 mOsmol/kg, für die vorhergehende Kalibration des Gerätes und das Erstellen einer Standardkurve verwendet.

Für die Kultivierung werden die Zellen in einer Zelldichte (in dieser Arbeit immer bezogen auf die Lebendzellendichte) von 0,3 bis 0,4 x 10<sup>6</sup> Zellen (Z)/Well in 24-Well-Zellkulturplatten (Kultivierungsvolumen 1 mL) und 0,1 bis 0,15 x 10<sup>6</sup> Z/Well in 48-Well-Zellkulturplatten (Kultivierungsvolumen 500 µL) ausgesät, in Abhängigkeit der Zellausbeute bei der Zellisolation. Die äußeren Wells der Zellkulturplatte werden mit sterilem Wasser befüllt, um Verdunstungseffekte während der Kultivierung zu minimieren. Für L-15 basierte Medienformulierungen, beispielsweise die oben genannte finale Medienformulierung, wird die Zellkulturplatte in einer luftdichten Box mit einem Reservoir mit sterilem Wasser im Dunklen bei Raumtemperatur (RT) (20 – 22 °C) inkubiert. Für SDM basierte Medienformulierungen findet die Kultivierung im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit statt.

Für die mikroskopische Analyse der Zellen wird ein inverses Lichtmikroskop (Primovert) verwendet. Bilder werden mittel der verbundenen Kamera und der entsprechenden Software aufgenommen.

Ein automatisches Zellzählgerät wird verwendet, um die Zelldichte, Zellgröße und Viabilität der Zellen zu bestimmen. Dazu wird nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Im Detail werden 18 µL einer Zellsuspension mit 2 µL Färbelösung (Acridinorange-/Propidiumiodid-Lösung) vermischt und 30 sec inkubiert. 11 µL der Suspension werden dann auf den Proben-Slide aufgetragen und eine automatische Zellzählung durchgeführt.

### 3.3.8. Beschichtung von Zellkulturplatten mit Adhärenz-verbessernden Substanzen

Um die Adhärenz primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* an die Zellkulturplatte zu erhöhen bzw. zu fördern, werden verschiedene Beschichtungen für Zellkulturplatten evaluiert. Es wird eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin, Gelatine (Schwein), Collagen Typ I (Human) und Collagen Typ II (Rind) durchgeführt. Es werden 24-Well-Zellkulturplatten

(Kultivierungsvolumen 1 mL, Oberfläche 1,9 cm<sup>2</sup>) verwendet. Jedes Well wird vor der Beschichtung mit 1 mL Wasser ausgespült, um die Oberflächenspannung zu reduzieren. Das entsprechende Volumen der jeweiligen Lösung wird in ein Well pipettiert und die Zellkulturplatte leicht geschwenkt, um die Flüssigkeit gleichmäßig in dem Well zu verteilen und sicherzustellen, dass die gesamte Oberfläche bedeckt ist. Die genauen Parameter der Beschichtung sind in Tabelle 3-2 übersichtlich dargestellt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wird die Lösung aus dem Well entfernt und in Falle der Poly-L-Lysin Beschichtung, das Well viermal mit Wasser ausgespült. Alle Wells werden durch Inkubation der Zellkulturplatte mit halb geöffnetem Deckel unter der Sicherheitswerkbank für 2 h getrocknet und die Platte direkt für eine Kultivierung genutzt. Collagen beschichtete Wells werden vor der Zugabe von Medium und Zellen zweimal mit DPBS ausgespült.

**Tabelle 3-2:** Parameter der Beschichtung von 24-Well-Zellkulturplatten mit Adhärenzverbessernden Substanzen.

Parameter	Poly-L-Lysin	Gelatine (Schwein)	Collagen Typ I (Human)	Collagen Typ II (Rind)
Konzentration [ $\mu\text{g/mL}$ ]	5000	1000	20	7,6
Lösungsmittel	Hochreines Wasser	Hochreines Wasser	10 mM HCl	500 mM Essigsäure
Volumen pro well [ $\mu\text{L}$ ]	76	190	475	500
Konzentration während der Beschichtung [ $\mu\text{g/cm}^2$ ]	200	100	5	2
Inkubationszeit [min]	5	120	ÜN <sup>a</sup>	ÜN
Inkubationstemperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	RT	37	RT	RT

<sup>a</sup> ÜN: über Nacht

### 3.3.9. MTT-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität

Der MTT-Assay ist ein kolorimetrischer Assay und misst die metabolische Aktivität der Zellen, welche mit der Zellvitalität korreliert, basierend auf der Reduktion von gelbem MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in blau-violette Formazan-Kristalle durch metabolisch aktive Zellen. Dazu werden frisch isolierte Zellen in einer Zelldichte von 0,1 bis 0,15 x 10<sup>6</sup> Z/Well in 500  $\mu\text{L}$  Kulturmedium in 48-Well-Zellkulturplatten ausgesät und

für 48 oder 96 h kultiviert. Eine 10 mg/mL MTT-Lösung in M-HBSS wird frisch angesetzt und durch Sterilfiltration (0,2 µm, Celluloseacetat) sterilisiert. 24 h vor der Messung werden 50 µL der frischen MTT-Lösung (10 mg/mL) in jedes Well gegeben (finale MTT Konzentration 1 mg/mL), durch vorsichtiges Pipettieren gemischt und die Zellen für 24 h weiter kultiviert. 24 h nach der MTT Zugabe, was einer Kultivierungsdauer von 48 oder 96 h entspricht, wird die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (400 x g, 5 min). Der Überstand wird vorsichtig und möglichst vollständig abgenommen und das Pellet, welches die Zellen mit den Formazan-Kristallen enthält, in 250 µL Isopropanol resuspendiert. Die Suspension wird gleichmäßig in zwei Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte überführt (je 125 µL pro Well) und 5 min bei 600 rpm leicht geschüttelt, bevor die Absorption bei 570 nm mit einer Referenz-Wellenlänge bei 650 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen wird. Mit Hilfe des MTT-Assays werden die Kultivierungsbedingungen für primäre intestinale Zellen von *E. fetida* evaluiert. Auch wird der MTT-Assay genutzt, um den Einfluss von AgNP sowie von Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ) auf die isolierten Zellen zu analysieren. Dazu werden direkt nach der Zellaussaat AgNP in einer finalen Konzentration von 1, 3 und 6 µg/mL AgNP sowie  $\text{CuCl}_2$  in einer finalen Konzentration von 40 und 400 µg/mL und  $\text{CdCl}_2$  in einer finalen Konzentration von 80 und 800 µg/mL aus konzentrierten Stammlösungen (siehe Kapitel 3.3.1) auf die isolierten Zellen gegeben und die Zellen zusammen mit den Zusätzen kultiviert. Für die Analyse des Effektes der AgNP wird eine zusätzliche Citrat-Kontrolle durch Zugabe einer reinen 6,5 mM Natriumcitrat-Lösung durchgeführt (finale Konzentration 0,65 mM Natriumcitrat). Das Volumen entspricht dem maximal verwendeten Volumen Natriumcitrat-Lösung (bei einer Konzentration von 6 µg/mL AgNP), sodass die Kontrolle der maximal verwendeten Konzentration von Natriumcitrat entspricht. Dies ermöglicht es, potenzielle Effekte des Lösungsmittels von potenziellen Effekten des Zytotoxins (AgNP) zu trennen. Für die AgNP ist in nachfolgender Tabelle 3-3 neben der verwendeten Konzentration auch die Anzahl der Partikel pro µg sowie die Anzahl der Partikel pro Zelle (für  $0,1 \times 10^6$  Z) angegeben. Zellen, die ohne den Zusatz von AgNP oder Metallionen kultiviert werden, werden als Negativkontrolle (Referenz für die Normierung der metabolischen Aktivität) genutzt. Für die Durchführung des Supplement Screenings mit FCS und WF werden Zellen, die in L-15-60% ohne Zusatz von FCS/WF kultiviert werden, als entsprechende Negativkontrolle genutzt.

**Tabelle 3-3:** Verwendete Bedingungen bei der Analyse des Einflusses von 40 nm AgNP auf primäre intestinale Zellen von *E. fetida*.

Konzentration AgNP [ $\mu\text{g/mL}$ ]	Anzahl Partikel/ $\mu\text{g}$	Anzahl der Partikel/ ( $0,1 \times 10^6 \text{ Z}$ )
1	$2,83 \times 10^9 / 1 \mu\text{g}$	$2,83 \times 10^4$
3	$8,48 \times 10^9 / 3 \mu\text{g}$	$8,48 \times 10^4$
6	$1,70 \times 10^{10} / 6 \mu\text{g}$	$1,70 \times 10^5$

### 3.3.10. Messung der Partikelgröße und des Zeta-Potentials der AgNP

Die Partikelgröße der AgNP wird mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) in einem Partikelgrößenanalysator (Litesizer 500) in Omega-Küvetten bestimmt (beides Anton Paar Germany GmbH, Ostfildern-Scharnhausen, Deutschland). Dazu werden 70  $\mu\text{L}$  der AgNP-Lösung (65  $\mu\text{g/mL}$  in 6,5 mM Natriumcitrat-Lösung) in 1 mL einer 1 mM KCl-Lösung (pH-Wert 6) verdünnt und die Messung mit mindestens 10 Wiederholungen bei 21 °C im Rückstreu-Modus (Winkel 175 °) durchgeführt. Des Weiteren werden 70  $\mu\text{L}$  der AgNP-Lösung in 1 mL finalem Kulturmedium verdünnt und über Nacht (ÜN) bei RT inkubiert. Die Probe wird zentrifugiert (17000 x g, 40 min) und in 1 mL einer 1 mM KCl-Lösung (pH-Wert 6) resuspendiert und unter identischen Bedingungen vermessen.

Die Messung des Zeta-Potentials der AgNP wird mittels elektrophoretischer Lichtstreuung (ELS) im identischen Partikelgrößenanalysator in Omega-Küvetten durchgeführt. 70  $\mu\text{L}$  der AgNP-Lösung (65  $\mu\text{g/mL}$  in 6,5 mM Natriumcitrat-Lösung) werden in 1 mL einer 1 mM KCl-Lösung (pH-Wert 6) verdünnt und vermessen. Des Weiteren werden 70  $\mu\text{L}$  der AgNP-Lösung in 1 mL finalem Kulturmedium verdünnt und über Nacht (ÜN) bei RT inkubiert. Die Probe wird zentrifugiert (17000 x g, 40 min) und in 1 mL einer 1 mM KCl-Lösung (pH-Wert 6) resuspendiert und vermessen. Es werden für beide Proben jeweils drei Messungen mit mindestens 100 Wiederholungen pro Messung bei 21 °C und 200 V durchgeführt. Das Zeta-Potential wird basierend auf der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung berechnet (von Smoluchowski, 1906).

### 3.3.11. Statistische Analyse

Die Anzahl unabhängiger Experimente wird als n angegeben. Wenn angegeben, wird der Mittelwert mit Standardabweichung (*standard deviation*, SD) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten wird mit der Software R in der Version 4.0.3. (R Core Team, 2020)

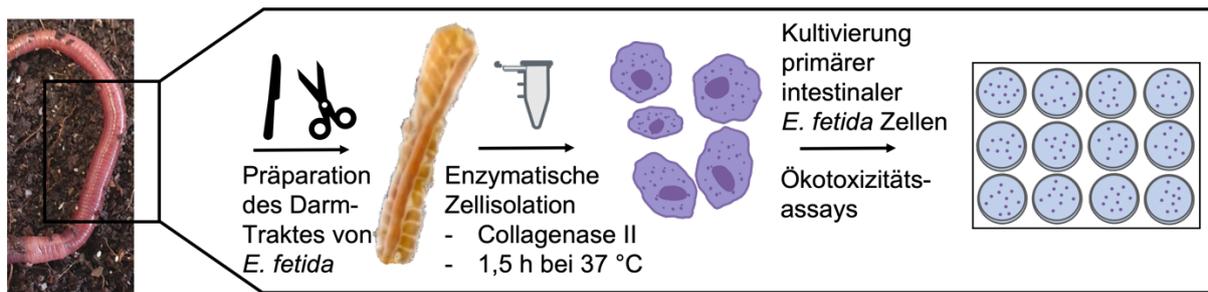
durchgeführt. Ein Kruskal-Wallis Test in Kombination mit dem Dunn's Test als Post-hoc-Test (unter Verwendung des *dunn.test* Software Pakets (Dinno, 2017)) wird für den Vergleich der verwendeten Puffer bei der Zellisolation genutzt. Der Einfluss verschiedener Parameter auf die metabolische Aktivität der Zellen (im Supplement Screening und in Ökotoxizitätsassays) wird mittels eines linearen Modells (LM) mit dem Tukey-Test als Post-hoc-Test (unter Verwendung des *multcomp* Software Pakets (Hothorn et al., 2008)) analysiert. Statistische Signifikanz ist definiert als  $p < 0,05$  und wird mit \* dargestellt.

In den Box-Whisker-Darstellungen stellt die Box die 25% und 75% Quartile dar, während die Whiskers die minimalen und maximalen Werte repräsentieren. Werte, die über das 1,5-fache der Box (25% und 75% Quartil Schwellenwert) hinausgehen, werden als Ausreißer definiert. Der Median wird durch eine schwarze Linie repräsentiert und der Mittelwert als weißer Kreis dargestellt.

### 3.4. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.4.1. Isolation primärer intestinaler Zellen von *E. fetida*

Für die Etablierung eines effizienten Isolationsprotokolls für primäre intestinale Zellen von *E. fetida* müssen die Schritte vom lebenden Organismus bis zum Erhalt einzelner Zellen berücksichtigt werden. Dies sind die Präparation und Isolation des Darm-Traktes von *E. fetida*, und nachfolgend die Isolation und Freisetzung primärer Zellen aus dem erhaltenen Darm-Trakt. Die Präparation des Darm-Traktes basiert auf einem Standard Vorgehen. Das Feuchtgewicht der isolierten Därme beträgt zwischen 23 und 126 mg Gewebe pro Kompostwurm und schwankt deutlich in Abhängigkeit der Größe bzw. des Gewichtes des Kompostwurmes. Für die Freisetzung einer maximalen Anzahl an vitalen Zellen aus dem Darm-Trakt wird ein sanftes, aber effizientes experimentelles Protokoll basierend auf einer enzymatische Disaggregation des Gewebes mit Collagenase II etabliert. Abbildung 3-1 zeigt das entwickelte Protokoll für die Isolation primärer intestinaler Zellen von *E. fetida*.



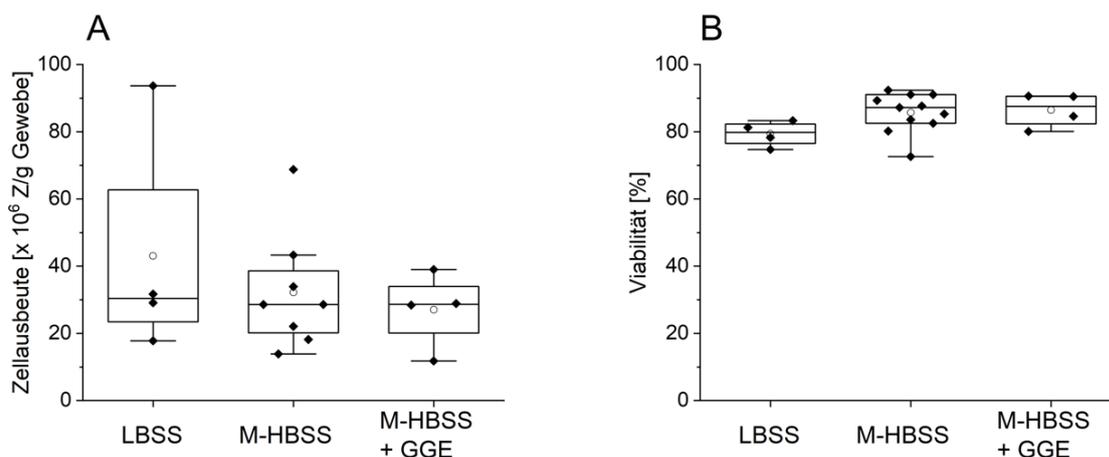
**Abbildung 3-1:** Entwickeltes experimentelles Protokoll für die Isolation primärer intestinaler Zellen des Kompostwurmes *E. fetida* mit nachfolgender Kultivierung und Analytik.

Abbildung nach (Riedl et al., 2021), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Die Bedingungen während des enzymatischen Verdaus und der Weiterbehandlung der Zellen bis zur Kultivierung beeinflussen sowohl das Ursprungsgewebe als auch die isolierten Zellen und haben einen entscheidenden Einfluss hinsichtlich Ausbeute und Viabilität. Die Temperatur des Verdaus wird auf 37 °C festgelegt, da dies das Temperaturoptimum der Collagenase darstellt (Mandl et al., 1953; Wunsch & Heidrich, 1963). Die Einwirkzeit wird auf 1,5 h festgelegt, da in Vorversuchen bei dieser Dauer eine ausreichende Anzahl Zellen mit hoher Viabilität isoliert werden konnten. Die weiteren Bedingungen werden durch den verwendeten Puffer bestimmt, beispielsweise durch dessen Zusammensetzung, die Verfügbarkeit von Nährstoffen, der Osmolalität und den pH-Wert. Basierend auf der Literatur werden zwei verschiedene Puffer für die Isolation primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* verglichen, M-HBSS und LBSS (siehe Kapitel 3.1). Das pH-Wert Optimum der Collagenase II liegt bei 7,1 (Wunsch & Heidrich, 1963) und damit eignen sich diesbezüglich beide Puffer (siehe Tabelle 3-1). Die Puffer werden sowohl für die Präparation und Isolation des Darm-Traktes als auch für die enzymatische Zellvereinzlung verwendet. Die Ergebnisse der Isolationen bezüglich Zellausbeute und Viabilität sind in Abbildung 3-2 in Abhängigkeit der verwendeten Puffer dargestellt.

Die Zellausbeute pro Isolation liegt zwischen  $11,8 \times 10^6$  und  $93,7 \times 10^6$  Z/g Gewebe und variiert somit deutlich zwischen einzelnen Isolationen. Der Puffer hat dabei keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellausbeute (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 0,68$ ; p-Wert = 0,71). Der erreichte Median ( $28,6 \times 10^6$  Z/g Gewebe für M-HBSS vs.  $30,4 \times 10^6$  Z/g Gewebe für LBSS) weist keine deutlichen Unterschiede auf. Die auftretenden Schwankungen sind bei der

Verwendung von LBSS deutlich stärker ausgeprägt, was eine schlechtere Reproduzierbarkeit der Zellisolation bedeutet und als negativ bewertet wird.



**Abbildung 3-2:** Einfluss von LBSS, M-HBSS und M-HBSS supplementiert mit 50,4 mM GGE auf den Isolationsprozess von primären intestinalen Zellen des Kompostwurmes *E. fetida*.

A) Zellausbeute. B) Viabilität primärer intestinaler Zellen direkt nach der Isolation.  $n \geq 4$ . Abbildung nach (Riedl et al., 2021), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Die Viabilität der isolierten Zellen ist bei der Verwendung beider Puffer  $\geq 73\%$  ( $n = 15$ ) und wird damit als ausreichend hoch für die nachfolgende Kultivierung der Zellen angesehen. Auch auf den Faktor Viabilität hat der Puffer keinen statistisch signifikanten Einfluss (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 4,42$ ;  $p$ -Wert = 0,11). Zu erkennen ist jedoch ein Trend in Richtung einer höheren Viabilität bei der Verwendung von M-HBSS (Median 87,2% ( $n = 11$ )) im Vergleich zu der Verwendung von LBSS (Median 79,8% ( $n = 4$ )). Die Faktoren, dass M-HBSS 5,5 mM Glukose enthält, sowie das Vorhandensein von 10 mM HEPES können für diese Beobachtung verantwortlich sein. Zum einen ist so die Versorgung mit Glukose, welches den Zellen als potenzielle Kohlenstoffquelle dienen kann, während des Verdaus gegeben, zum anderen besitzt HEPES eine hohe Pufferkapazität im physiologischen pH-Wert Bereich, sodass die höhere Pufferkapazität von M-HBSS die Zellen in diesem Bereich besser stabilisieren kann. Im Vergleich dazu enthält LBSS keine potenzielle Kohlenstoffquelle und nur eine geringe Konzentration (0,4 mM) an Phosphat, welches eine gewisse, aber schwächere Pufferwirkung besitzt. Die geringere Pufferkapazität von LBSS kann auch zu der geringeren

Reproduzierbarkeit des Isolationsprotokolls hinsichtlich der Zellausbeute beigetragen haben. Die Osmolalität von M-HBSS ist mit 210 mOsmol/kg leicht erhöht im Vergleich zu LBSS (171 mOsmol/kg), und liegt damit näher an der charakteristischen Osmolalität von terrestrischen Tieren (285 – 320 mOsm) (Stankiewicz & Plytycz, 1998). Dies könnte ein weiterer Grund für die erhöhte Viabilität sowie die reproduzierbareren Zellausbeuten bei der Verwendung von M-HBSS sein. Basierend auf den Ergebnissen wird M-HBSS für die weiteren Anwendungen genutzt.

Die isolierten Zellen haben eine Größe zwischen 5,9 und 20,7  $\mu\text{m}$  (Mittelwert  $12,6 \pm 3,4 \mu\text{m}$ , Median 11,9  $\mu\text{m}$ ).

Um die Zellisolation weiter zu verbessern, wird der Einfluss von GGE (*Guaiacol Glyceryl Ether*) während der enzymatischen Zellvereinzelnung analysiert. GGE ist ein mukolytisches Reagenz und wird in der Literatur oftmals bei der Isolation von Coelomozyten eingesetzt (Diogéne et al., 1997; Engelmann et al., 2004; Eyambe et al., 1991). Seine Eigenschaft, Schleimschichten (Mucus) aufzulösen, könnte dabei die Isolation von Zellen aus dem Darm-Trakt verbessern. Dieser besteht unter anderem aus einem intestinalen Mucus bzw. wird durch diesen geschützt, sodass GGE die Zellausbeute sowie die Viabilität der Zellen erhöhen könnte, da es eine sanftere Isolation ermöglichen könnte. Bei der Verwendung von M-HBSS supplementiert mit 50,4 mM GGE ( $n = 4$ ), wie es in der Literatur beschrieben ist (Diogéne et al., 1997), zeigt GGE keine Auswirkungen auf den Isolationsprozess. Weder in der Zellausbeute (Dunn's Post-hoc-Test:  $p$ -Wert = 0,35) noch in der Viabilität (Dunn's Post-hoc-Test:  $p$ -Wert = 0,48) gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied zu der Verwendung von M-HBSS ohne GGE ( $n = 11$ ). Aus diesem Grund wird in weiterführenden Anwendungen auf die Supplementation von GGE verzichtet.

#### 3.4.2. Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida*

Ein übliches Problem bei der Etablierung einer Primärzellkultur ist eine mikrobielle Kontamination, eingebracht durch das Ursprungsgewebe (A. Verma et al., 2020). In Vorversuchen zur Kultivierung kann bereits nach 24 h eine hohe mikrobielle Belastung der Kultur ohne Verwendung von Antibiotika festgestellt werden. Dies ist besonders in diesem Fall erwartbar, denn Kompostwürmer besitzen ein komplexes intestinales Mikrobiom (Aira et al., 2018; Pass et al., 2015; Pérez-Pérez et al., 2018) und aufgrund der Ernährung (unspezifische Aufnahme von Erde und darin enthaltenen Mikroorganismen) ist eine hohe Zahl an Bakterien

und Pilzen in variabler Zusammensetzung im Darm-Trakt zu erwarten. Die Waschschriffe während des Isolationsprozesses führen nicht zu einer ausreichenden Reduktion der mikrobiellen Belastung. Ein Grund könnte die Einbettung der Mikroben in einem Mukus sein, der die Mikroben schützt und nicht durch einfaches Waschen aufgelöst werden kann. Deswegen ist die Verwendung von Antibiotika unumgänglich. Die Zugabe einer komplexen Mischung aus verschiedenen Antibiotika (Penicillin, Streptomycin, Tetracycline, Gentamicin) sowie dem Antimykotikum Amphotericin B (zusammenfassend abgekürzt als PSTGA) in den Puffer während der Präparation des Gewebes und der Zellisolation sowie auch in das Kulturmedium verhindert eine mikrobielle Kontamination in der Kultivierung für mindestens 144 h.

Für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* müssen sowohl die Kultivierungsbedingungen hinsichtlich Temperatur und Gasversorgung ermittelt als auch ein geeignetes Kultivierungsmedium identifiziert werden. Basierend auf der Literatur werden zwei verschiedene Basalmedien verglichen, L-15 Medium und Schneider's Drosophila Medium (SDM) (siehe Kapitel 3.1 und Tabelle 7-1). Diese werden in unterschiedlichen Medienformulierungen analysiert, d.h. ein Basalmedium wird mit unterschiedlichen Supplementen versetzt. Die detaillierte Zusammensetzung und die gemessene Osmolalität der Medienformulierungen sind in Tabelle 3-4 gezeigt.

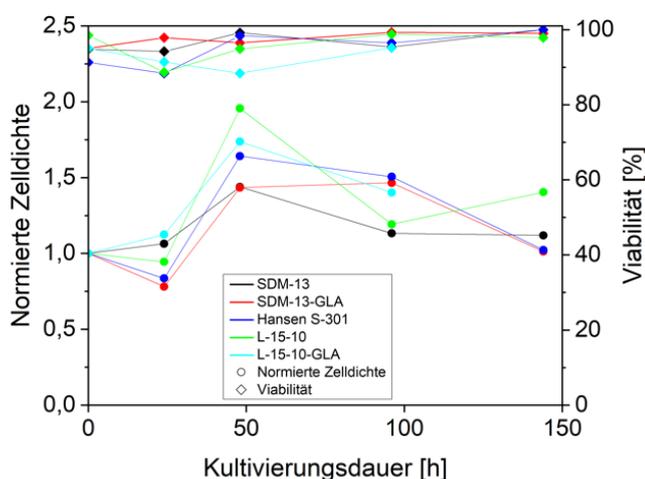
**Tabelle 3-4:** Zusammensetzung der analysierten Medienformulierungen<sup>a</sup> für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida*.

Medien- formulierung	Basalmedium [% v/v]	FCS [% v/v]	Hochreines Wasser [% v/v]	Galactose [g/L]	Lactalbumin- Hydrolysat [g/L]	Osmolalität <sup>b</sup> [mOsmol/kg]
L-15-10	90	10	-	-	-	339 ± 4
L-15-10-GLA	90	10	-	1,3	4,5	345 ± 3
SDM-13	87	13	-	-	-	326 ± 9
SDM-13-GLA	87	13	-	1,3	4,5	344 ± 2
Hansen S-301	22	13	65	1,3	4,5	157 ± 5

<sup>a</sup> Alle Medienformulierungen werden mit PSTGA supplementiert. L-15 Medium wird zusätzlich mit 4 mM L-Glutamin supplementiert, SDM enthält 12 mM L-Glutamin. Wenn angegeben, werden die Medienformulierungen mit Galactose und Lactalbumin-Hydrolysat (GLA) supplementiert.

<sup>b</sup> Experimentell ermittelte Osmolalität ist gezeigt als Mittelwert ± SD (n = 5).

Die Kultivierung findet in L-15 basierten Medienformulierungen bei RT ohne zusätzliche Gasversorgung statt, wohingegen für SDM basierte Medienformulierungen die Kultivierung bei 37 °C mit konstant 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt wird, wie in der Literatur beschrieben (Gong et al., 2014; Irizar et al., 2014). Der Verlauf der Zelldichte und Viabilität über eine Kultivierungsdauer von 144 h ist in Abbildung 3-3 gezeigt.



**Abbildung 3-3:** Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* in unterschiedlichen Medienformulierungen basierend auf den Basalmedien L-15 und SDM.

Die Kultivierung findet bei L-15 basierten Medienformulierungen bei RT ohne zusätzliche Gasversorgung statt, bei SDM basierten Medienformulierungen bei 37 °C mit 5% CO<sub>2</sub> im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank. Animpfzelldichte:  $0,22 \times 10^6$  Z/Well. Die Zelldichte ist normiert gegen die Animpfzelldichte dargestellt (n = 1).

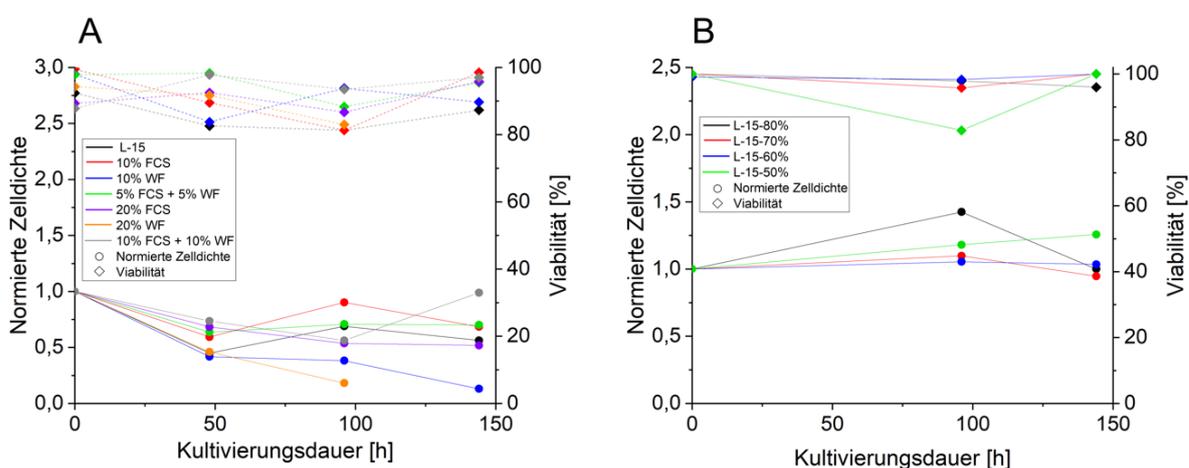
Zwischen 24 und 48 h ist in allen Medienformulierungen eine Zunahme der Zelldichte erkennbar, die bei L-15-10 am stärksten ausfällt. Im weiteren Verlauf sinkt die Zelldichte in allen Medienformulierungen jedoch und erreicht nur leicht über der Animpfzelldichte liegende Werte, wobei L-15-10 nach 144 h den höchsten Wert erreicht (Erhöhung auf 1,4). Aufgrund der Schwankungen kann jedoch nicht von einer Proliferation der primären intestinalen Zellen ausgegangen werden. Für primäre intestinale Zellen von *P. aspergillum* konnte in verschiedenen Medienformulierungen bereits Proliferation nachgewiesen werden, unter anderem in SDM basierten Medienformulierungen (Gong et al., 2014). Beide Organismen, die zur identischen Ordnung der Oligochaeta gehören, unterscheiden sich jedoch in der

Klassifikation der Familie und Gattung. Dies könnte auch das unterschiedliche zelluläre Verhalten erklären. Die Viabilität der Zellen ist in allen Medienformulierungen über die Kultivierungsdauer mit  $\geq 88\%$  sehr hoch. Die Zellen können somit in den verwendeten Medienformulierungen für 144 h überleben, zeigen jedoch keine Proliferation. Die deutlich reduzierte Osmolalität von Hansen S-301 zeigt keinen negativen Effekt auf die Zellen, während die Zugabe von Galactose und Lactalbumin-Hydrolysat (GLA) wiederum keinen positiven Effekt zeigt. Da keine Medienformulierung eine klar bessere Eignung zeigt, wird für weitere Experimente L-15 Medium als Basalmedium verwendet und auf die Supplementation mit GLA verzichtet. Die Möglichkeit einer Kultivierung bei RT ohne nötige CO<sub>2</sub> Begasung ist ein einfacher und praktikabler Ansatz, auch für Labore ohne entsprechende Ausstattung. RT ist näher an der natürlichen Umgebungstemperatur, denn das natürliche Habitat von *E. fetida* ist der Boden und auch *E. fetida* Laborkulturen werden routinemäßig zwischen 15 und 20 °C gehalten (Miles, 1963; Presley et al., 1996; Tripathi & Bhardwaj, 2004). Für isolierte Coelomozyten des Regenwurmes der identischen Gattung (*Eisenia hortensis*) führt eine Kultivierungstemperatur von 29 oder 37 °C zu einer signifikanten Erhöhung des Zelltodes im Vergleich zu einer Referenztemperatur von 25 °C (Fuller-Espie et al., 2015). Dieser Effekt kann hier bei den primären intestinalen Zellen von *E. fetida* nicht beobachtet werden und könnte auf Unterschiede im Zelltyp zurückzuführen sein.

L-15 Medium wird bei der Kultivierung von Coelomozyten oftmals mit HEPES zur Erhöhung der Pufferkapazität supplementiert (Diogéne et al., 1997; Toupin et al., 1977). Bei den primären intestinalen Zellen beeinflusst die Zugabe von HEPES in das Kultivierungsmedium weder die Zellzahl noch die Viabilität im Verlauf der Kultivierung. Um die Pufferkapazität des L-15 Mediums gerade im Hinblick auf eine längere Kultivierungsdauer zu erhöhen, wird für weitere Experimente das Medium mit 25 mM HEPES supplementiert.

Die fehlende Proliferation zusammen mit der hohen Viabilität der Zellen deuten auf das Fehlen bzw. einen Mangel an spezifischen Wachstumsfaktoren für Zellen von *E. fetida* hin. Die hier verwendeten Mengen FCS, welches als Standard Mediumsupplement in der Zellkultur routinemäßig verwendet wird, konnten keine Proliferation der Zellen induzieren. Für ökotoxikologische Untersuchungen ist eine Proliferation der Zellen nicht zwingenderweise notwendig, ist jedoch ein wünschenswertes Ziel für weitere Forschungsfragen. Aus diesem Grund wird die Medienformulierung in einem Drei-Schritt-Ansatz weiter optimiert. Dafür wird

zuerst ein Supplement Screening mittels eines Kultivierungsvergleiches durchgeführt und als zweiter Schritt die Anpassung der Osmolalität, ebenfalls durch einen Kultivierungsvergleich. Als dritter Schritt wird mit der gewählten Osmolalität das Supplement Screening mittels eines MTT-Assays wiederholt, um die gewählte Supplement Bedingung zu bestätigen bzw. anzupassen. Der erste Schritt, das Zwei-Komponenten Supplement Screening, wird mit FCS als Standard Mediumsupplement sowie mit einem zellfreien Wurmfiltrat (WF) von *E. fetida*, welches spezifische Wachstumsfaktoren von und für *E. fetida* Zellen enthalten sollte, durchgeführt. Die Ergebnisse einer repräsentativen Kultivierung mit unterschiedlichen Konzentrationen von FCS und WF sind in Abbildung 3-4 gezeigt.



**Abbildung 3-4:** Anpassung der Medienformulierung für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida*.

A) Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* in L-15 basierten Medienformulierungen mit den angegebenen Konzentrationen FCS und/oder WF. Alle Medienformulierungen werden mit 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und PSTGA supplementiert. Animpfzelldichte:  $0,49 \times 10^6$  Z/Well. B) Kultivierung primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* in L-15 basierten Medienformulierungen mit reduzierter Osmolalität. Die detaillierten Medienformulierungen sind in Tabelle 3-5 angegeben. Animpfzelldichte:  $0,28 \times 10^6$  Z/Well. n = 1. Abbildung teilweise nach (Riedl et al., 2021), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

FCS und WF, jeweils allein sowie in Kombination, induzieren in keiner der untersuchten Bedingungen eine Proliferation der Zellen in einem Zeitraum von 144 h. Über die Kultivierungsdauer zeigt die Zelldichte erneut Schwankungen, erreicht jedoch am Ende der

Kultivierung einen geringeren Wert als zu Beginn. Dies deutet auf ein Zellsterben hin, auch wenn die Viabilität während der Kultivierung über 80% liegt. Die Abnahme der Zelldichte wird besonders deutlich bei den Bedingungen, die nur WF enthalten. L-15 mit 10% FCS + 10% WF weist nach 144 h Kultivierung die höchste Zelldichte auf. L-15 Medium ohne Supplementation von FCS/WF zeigt die geringste Viabilität über den Kultivierungsverlauf. Somit scheinen sowohl FCS als auch WF die Zellviabilität leicht zu verbessern, möglicherweise erhöhen sie die Viskosität des Mediums, wodurch ein erhöhter Schutz vor mechanischer Schädigung gegeben ist, oder die enthaltenen Proteine wirken als Schutz vor Scherstress (Legazpi et al., 2009; A. Verma et al., 2020). Da kein klarer Unterschied festgestellt werden konnte, wird eine Mischung von 10% FCS + 10% WF für die Anpassung der Osmolalität verwendet. Dazu wird ausgehend von der bisherigen Medienformulierung (80% L-15 mit 10% FCS + 10% WF) der Anteil an L-15 Medium reduziert und ein entsprechender Anteil hochreines Wasser verwendet. Die verwendeten Medienformulierungen sind in Tabelle 3-5 zusammen mit der gemessenen Osmolalität angegeben.

**Tabelle 3-5:** Verwendete Medienformulierungen<sup>a</sup> für die Anpassung der Osmolalität mittels unterschiedlich hoher Verdünnung des Basalmediums L-15.

<b>Medienformulierung</b>	<b>L-15 [% v/v]</b>	<b>Hochreines Wasser [% v/v]</b>	<b>Osmolalität<sup>b</sup> [mOsmol/kg]</b>
L-15-80%	80	0	381 ± 10
L-15-70%	70	10	347 ± 3
L-15-60%	60	20	308 ± 11
L-15-50%	50	30	284 ± 6

<sup>a</sup> Alle Medienformulierungen werden mit 10% (v/v) FCS + 10% (v/v) WF, 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und PSTGA supplementiert.

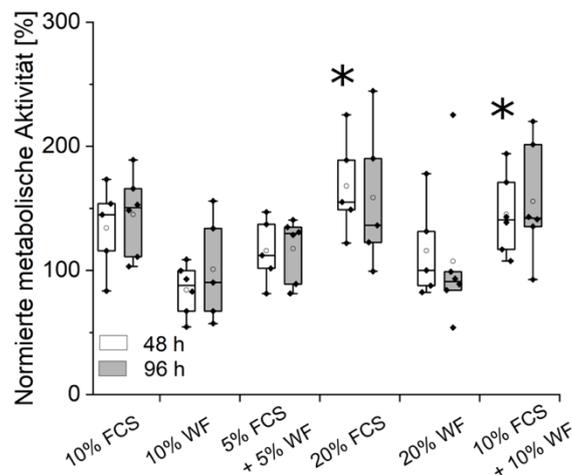
<sup>b</sup> Experimentell ermittelte Osmolalität ist gezeigt als Mittelwert ± SD (n = 5).

Durch die Zugabe von hochreinem Wasser werden Medienformulierungen mit einer Osmolalität zwischen 284 und 381 mOsmol/kg erhalten. In der Kultivierung (Abbildung 3-4) kann erneut kein eindeutiger Unterschied zwischen den Medienformulierungen und somit kein Einfluss einer reduzierten Osmolalität festgestellt werden. Die primären Zellen tolerieren einen breiten Osmolalitätsbereich, was auch schon bei dem Vergleich der unterschiedlichen

Basalmedien (siehe Tabelle 3-4) beobachtet werden konnte. Der Regenwurm *Aporrectodea caliginosa* zeigt in Abhängigkeit unterschiedlicher (De-)Hydrierungsbedingungen eine Osmolalität der Körperflüssigkeit zwischen 175 und 684 mOsmol/kg und kann somit einen sehr breiten Bereich an Osmolalität tolerieren (Bayley et al., 2010). Aufgrund der Zugehörigkeit zur identischen Familie der Lumbricidae könnte dies auch für *E. fetida* gelten, zumindest zeigen die Ergebnisse eine hohe Toleranz der primären intestinalen Zellen von *E. fetida*. Für terrestrische Tiere ist eine charakteristische Osmolalität zwischen 285 und 320 mOsm beschrieben (Stankiewicz & Plytycz, 1998). L-15-60% (60% L-15, 20% hochreines Wasser) liegt mit 308 mOsmol/kg sehr gut in diesem Bereich und wird damit als finale Medienformulierung bezüglich der Osmolalität festgelegt.

Im nächsten Schritt wird ein erneutes Zwei-Komponenten Supplement Screening mit WF und FCS mit einem MTT-Assay als analytisches Tool durchgeführt. Dieser erlaubt im Vergleich zu einer Standard Kultivierungsanalytik, bei der die Zelldichte und Viabilität gemessen wird, eine detaillierte Analyse der (mitochondrialen) metabolischen Aktivität der Zellen und kann somit die Vitalität der Zellen im Kultivierungsverlauf beschreiben. Die Ergebnisse über eine Kultivierungsdauer von 96 h sind in Abbildung 3-5 dargestellt.

Bei allen Bedingungen ist die metabolische Aktivität über die Kultivierungsdauer konstant und es ist kein Absinken zu erkennen, was auf eine konstante Vitalität der Zellen über den Kultivierungsverlauf hinweist. Die höchste metabolische Aktivität zeigen Zellen, die in der Medienformulierung supplementiert mit 20% FCS oder mit 10% FCS + 10% WF kultiviert werden, sowohl nach 48 als auch nach 96 h. Diese liegt zwischen 145 und 168%. Der Unterschied zu der Negativkontrolle ist bei beiden Bedingungen zum Zeitpunkt 48 h statistisch signifikant ( $LM_{\text{Bedingung}} F_5 = 4,706$ ;  $p\text{-Wert} < 0,004$ ; Tukey-Post-hoc-Test:  $p\text{-Wert}_{20\% \text{ FCS}} = 0,002$ ;  $p\text{-Wert}_{10\% \text{ FCS} + 10\% \text{ WF}} = 0,027$ ). Da die Medienformulierung mit 10% FCS + 10% WF auch im Kultivierungsvergleich (siehe Abbildung 3-4) gute Ergebnisse zeigt, wird für weitere Experimente das finale Kultivierungsmedium für primäre intestinale Zellen von *E. fetida* festgelegt als L-15-60% (60% L-15, 20% hochreines Wasser) supplementiert mit 10% FCS + 10% WF sowie mit 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und PSTGA.



**Abbildung 3-5:** Metabolische Aktivität primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* in L-15-60% basierten Medienformulierungen mit den angegebenen Konzentrationen FCS und/oder WF.

Alle Medienformulierungen werden mit 4 mM L-Glutamin, 25 mM HEPES und PSTGA supplementiert. Die metabolische Aktivität ist normiert gegen L-15-60% ohne FCS/WF Supplementation (Negativkontrolle) dargestellt ( $n \geq 5$ ). Abbildung nach (Riedl et al., 2021), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

In der Primärzellkultivierung ist die Zelldichte ein kritischer Faktor, sowohl bei der Aussaat als auch im Verlauf der Kultivierung, der spezifisch für die isolierten primären Zellen ist. Um eine geeignete Zelldichte für die Aussaat der intestinalen *E. fetida* Zellen zu bestimmen, werden die Zellen mit unterschiedlichen Animpfzellichten zwischen  $0,053 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$  ( $0,1 \times 10^6 \text{ Z/mL}$ ) und  $0,421 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$  ( $0,8 \times 10^6 \text{ Z/mL}$ ) in 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und die Zelldichte mikroskopisch analysiert. Eine Animpfzellichte zwischen  $0,158 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$  ( $0,3 \times 10^6 \text{ Z/mL}$ ) und  $0,211 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$  ( $0,4 \times 10^6 \text{ Z/mL}$ ) ist für diese Zellen gut geeignet (Abbildung 3-6). Die Zellausbeute pro Isolation und die benötigte Anzahl an experimentellen Wells beeinflussen jedoch auch die Animpfzellichte und Werte von  $0,105 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$  ( $0,2 \times 10^6 \text{ Z/mL}$ ) und  $0,263 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$  ( $0,5 \times 10^6 \text{ Z/mL}$ ) begrenzen den geeigneten Bereich. Diese Ergebnisse stimmen mit den ermittelten Animpfzellichten von primären Epithelzellen von *P. aspergillum* überein (Gong et al., 2014). Geringere Animpfzellichten führen zu großen, unbedeckten Flächen im Well aufgrund einer zu geringen Zelldichte, während höhere Zelldichten die Bildung von großen, schwimmenden Zellaggregaten induzieren, was als negativ bewertet wird.



**Abbildung 3-6:** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* ausgesät mit unterschiedlichen Animpfzellichten nach 48 h Kultivierung.

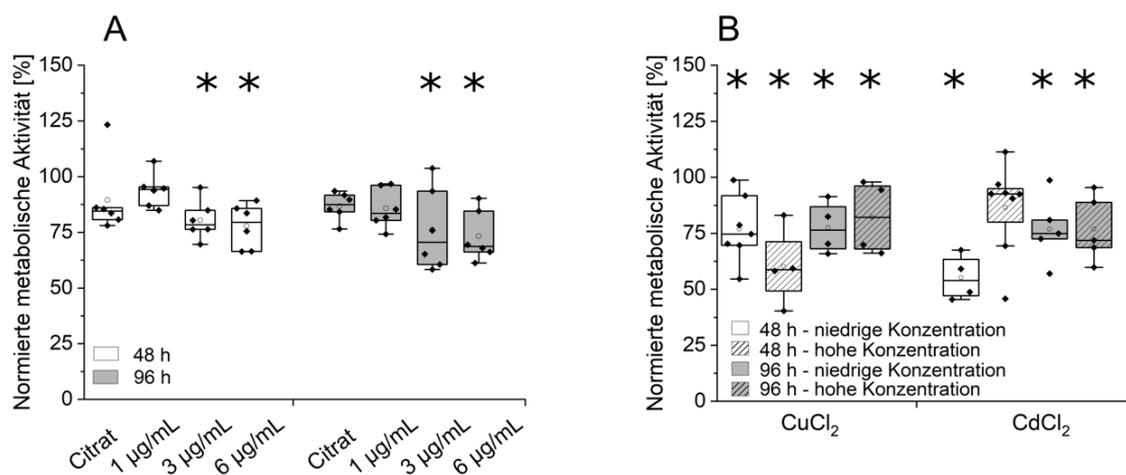
A) Animpfzellichte:  $0,053 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$ . B) Animpfzellichte:  $0,211 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$ . C) Animpfzellichte:  $0,421 \times 10^6 \text{ Z/cm}^2$ . Die Kultivierung findet in 24-Well-Zellkulturplatten statt. Abbildung nach (Riedl et al., 2021), <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

In den durchgeführten Kultivierungen ist erkennbar, dass die Zellen keine Adhärenz an der Oberfläche der Zellkulturplatte erreichen, denn durch äußere Bewegung der Zellkulturplatte oder Pipettieren werden die Zellen neu gemischt. Die Zellen verhalten sich somit wie Suspensionszellen. Da die primären intestinalen Zellen aus einem festen Epithelzellengewebe stammen, ist Adhärenz ein wichtiger Faktor für die Kultivierung bzw. Proliferation der isolierten Zellen. Um die Adhärenz der Zellen zu verbessern und möglicherweise auch zusätzliche Signalmoleküle für eine Proliferation bereitzustellen, werden verschiedene Beschichtungen der Zellkulturplatte analysiert. In diesem Fall werden Poly-L-Lysin, Gelatine (Schwein), Collagen Typ I (Human) und Collagen Typ II (Rind) verwendet, die auch routinemäßig in der Zellkultur genutzt werden (Davidenko et al., 2016; Harnett et al., 2007; Liberio et al., 2014). Keine der Substanzen erreicht nach 48 h eine Adhärenz der Zellen. Der Faktor der fehlenden Adhärenz bzw. von geeigneten Adhärenz-induzierenden Substanzen könnte in direktem Zusammenhang mit der fehlenden Proliferation der primären intestinalen Zellen von *E. fetida* stehen.

### 3.4.3. Ökotoxizitätsassay mit primären intestinalen Zellen von *E. fetida*

Auch wenn keine Proliferation primärer intestinaler Zellen von *E. fetida* erreicht werden konnte, ist es möglich, die Zellen über einen ausreichend langen Zeitraum in Kultur zu halten, um ökotoxikologische Experimente zu ermöglichen. Die primären Zellen zeigen eine sehr hohe Viabilität und eine konstante metabolische Aktivität und bieten somit eine exzellente Basis für die Analyse des Einflusses verschiedener Umwelttoxine auf zellulärer Ebene. In dieser Arbeit

wird der Einfluss von zwei bekannten Umwelttoxinen, Silbernanopartikel (AgNP) und Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$  sowie  $\text{Cd}^{2+}$ ), auf primäre intestinale Zellen von *E. fetida* analysiert. Die Ergebnisse des MTT-Assays zur Messung der metabolischen Aktivität sind in Abbildung 3-7 gezeigt.



**Abbildung 3-7:** Ökotoxizitätsassays mit primären intestinalen Zellen von *E. fetida*.

Einfluss von A) Silbernanopartikeln (AgNP) und B) Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$  sowie  $\text{Cd}^{2+}$ ) auf die metabolische Aktivität der Zellen. Die metabolische Aktivität ist normiert gegen die Negativkontrolle (Zellen inkubiert ohne AgNP/Metallionen) dargestellt.  $\text{CuCl}_2$  niedrige Konzentration: 40 µg/mL, hohe Konzentration: 400 µg/mL.  $\text{CdCl}_2$  niedrige Konzentration: 80 µg/mL, hohe Konzentration: 800 µg/mL.  $n = 6$  für Experimente mit AgNP und  $n \geq 4$  für Experimente mit Metallionen. Abbildung nach (Riedl et al., 2021), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Die Exposition mit AgNP induziert nach 48 und 96 h Inkubationszeit eine geringe, konzentrationsabhängige Reduktion der metabolischen Aktivität primärer intestinaler *E. fetida* Zellen. Bereits die alleinige Exposition der Zellen mit Natriumcitrat-Lösung, welche den AgNP als Lösungsmittel dient (Citrat-Kontrolle), induziert eine reduzierte metabolische Aktivität von ca. 90% im Vergleich zu der Negativkontrolle (Zellen inkubiert ohne AgNP). Somit zeigt das Lösungsmittel einen geringen negativen Effekt auf die Zellen, der vergleichbar ist mit der Zugabe von 1 µg/mL AgNP. Die Zugabe von 3 und 6 µg/mL AgNP bewirken eine konzentrationsabhängige, statistisch signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität im Vergleich zu der Negativkontrolle ( $\text{LM}_{\text{Bedingung}} F_9 = 4,897$ ;  $p < 0,001$ ), unabhängig von der

Inkubationszeit. Auf der Ebene des Organismus induzieren AgNP bei *E. fetida* keine oder nur geringe Effekte (bei hohen Konzentrationen) bezüglich ökotoxikologischer Endpunktmarker wie Mortalität, Wachstum, Reproduktion und Bioakkumulation (Curieses et al., 2017; Kwak et al., 2014; Shoults-Wilson et al., 2011; Swart et al., 2020). Es wird vermutet, dass die Erde die Toxizität der AgNP auf organismischer Ebene abschwächt (Kwak et al., 2014). Trotzdem können Effekte auf niedrigeren Leveln biologischer Komplexität auftreten und konnten bereits nachgewiesen werden. So konnten Einflüsse auf zelluläre Schutzsysteme (auf das Metall-Entgiftungssystem sowie auf antioxidative Enzyme) auf biochemischer bzw. molekularer Ebene festgestellt werden (Curieses et al., 2017). Auch eine Zytotoxizität gegenüber Coelomozyten und eine Reduktion der lysosomalen Stabilität *in vivo* konnte nachgewiesen werden (Curieses et al., 2017; Kwak et al., 2014). Bei isolierten und kultivierten Coelomozyten konnte *in vitro* eine unterschiedlich starke Zytotoxizität nachgewiesen werden, abhängig von dem verwendeten Kulturmedium. So zeigen Coelomozyten kultiviert in RPMI-1640 einen LC<sub>50</sub> Wert von ca. 6 µg/mL, während sie bei einer Kultivierung in L-15 mit einem LC<sub>50</sub> Wert von > 100 µg/mL eine deutlich höhere Resistenz zeigen (Garcia-Velasco et al., 2019). Unterschiede in der Reaktion von Coelomozyten und primären intestinalen Zellen auf AgNP sind aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen und somit unterschiedlichen zellulären Reaktionen erwartbar. Nur intensivere experimentelle Analysen auf einem zellulären Level können die mechanistische Basis der unterschiedlichen Zytotoxizität aufklären. Des Weiteren erschweren die unterschiedlichen Partikelgrößen der verwendeten AgNP die Standardisierbarkeit der Studien. Die hier verwendeten AgNP besitzen eine nominelle Partikelgröße von 40 nm. Die DLS Messung in KCl gibt exakt diese Größe mit sehr geringer Größenverteilung ( $0,04 \pm 0,001 \mu\text{m}$ ) wieder, während die Partikelgröße nach der Inkubation in der verwendeten Medienformulierung fast um den Faktor 4 erhöht ist ( $0,15 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ). Dies zeigt eine Instabilität der AgNP, die von dem verwendeten Kulturmedium abhängen könnte und eine Erklärung für die Unterschiede in den zellulären Effekten bei den verwendeten Kulturmedium bieten könnte. Das Zeta-Potential gemessen in KCl ( $-39,5 \pm 4,7 \text{ mV}$ ) halbiert sich nach der Inkubation in der verwendeten Medienformulierung ( $-19,8 \pm 0,1 \text{ mV}$ ), was auf die Entstehung einer Proteincorona an der Partikeloberfläche hinweist.

Erwähnenswert ist auch die Tatsache, dass die geringen organismischen Effekte bei Exposition von *Eisenia andrei* mit AgNP auf das nanopartikuläre Material zurückzuführen sind, denn

Exposition mit reinen Silberionen zeigt keinen Effekt auf den Organismus (Kwak et al., 2014). Interessanterweise induzieren reine Silberionen bei isolierten Coelomozyten von *E. fetida* eine deutliche stärkere Zytotoxizität als Silbernanopartikel (Hayashi et al., 2012). Dies zeigt, dass in Abhängigkeit des Toxins eine unterschiedliche Zytotoxizität und somit unterschiedliche Wirkungsweisen auf verschiedenen Leveln biologischer Komplexität auftreten.

Im Vergleich zu Partikeln, deren Größe sowie Oberflächenbeschaffenheit einen signifikanten Einfluss auf die Toxizität besitzen (Garcia-Velasco et al., 2016; Ramsperger et al., 2022), bieten Metallionen eine höhere Standardisierbarkeit. Aus diesem Grund wird der Einfluss von Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) und Cadmiumionen ( $\text{Cd}^{2+}$ ) in je zwei unterschiedlichen Konzentrationen analysiert (Abbildung 3-7). Eisenionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) werden ebenfalls evaluiert, allerdings kommt es bei Zugabe in das Kulturmedium zu der Bildung eines Niederschlages, der die spektrophotometrische Analyse im MTT-Assay beeinflusst, sodass die gewählte Analytik nicht geeignet ist und keine Ergebnisse gezeigt werden.

Alle untersuchten Bedingungen, mit Ausnahme 800  $\mu\text{g/mL}$   $\text{CdCl}_2$  nach 48 h, induzieren eine statistisch signifikante Reduktion der metabolischen Aktivität primärer intestinaler *E. fetida* Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle (Zellen inkubiert ohne Metallionen) ( $\text{LM}_{\text{Bedingung}}$   $F_8 = 5,027$ ;  $p < 0,001$ ). Die Zellen zeigen nach 96 h teilweise eine höhere metabolische Aktivität im Vergleich zu der 48 h Exposition bei identischer Konzentration, z.B. Exposition mit  $\text{CuCl}_2$  400  $\mu\text{g/mL}$  und  $\text{CdCl}_2$  80  $\mu\text{g/mL}$ . Es ist möglich, dass hier eine Erholung der Zellen auftritt, jedoch ist die metabolische Aktivität immer noch geringer als bei der Negativkontrolle. Auf organismischer Ebene sind für *E. fetida*  $\text{LC}_{50}$  Werte zwischen 500 und 800 mg/kg Erde für Kupferionen und ein Bereich zwischen 400 und 2000 mg/kg Erde für Cadmiumionen angegeben (Fitzpatrick et al., 1996; Neuhauser et al., 1985; Sivakumar, 2015; Spurgeon et al., 1994). Die hier verwendeten hohen Konzentrationen (400  $\mu\text{g/mL}$   $\text{CuCl}_2$  und 800  $\mu\text{g/mL}$   $\text{CdCl}_2$ ) liegen nahe am bzw. im Bereich der angegebenen  $\text{LC}_{50}$  Werte, bewirken jedoch lediglich eine Reduktion der metabolischen Aktivität auf 60 bis 80%. Dies verdeutlicht, dass die Metallionen unterschiedliche Effekte auf organismischer Ebene und zellulärer Ebene der intestinalen Zellen induzieren. Gong et al. konnte ebenfalls eine höhere Toleranz gegenüber Cadmiumionen auf dem zellulären Level (primäre Epithelzellen) im Vergleich zu dem gesamten Organismus *P. aspergillum* nachweisen (Gong et al., 2014). Isolierten Coelomozyten von *E. fetida* zeigen eine bimodale Reaktion auf eine Exposition mit Kupfer- und Cadmiumionen, die sich bei einer

Zunahme der Metallionen-Konzentration durch eine Abnahme der Viabilität, jedoch bei Erreichen eines Toxizität-Schwellenwertes durch eine transiente Zunahme gefolgt von einer starken Abnahme der Viabilität beschreiben lässt (Irizar, Rivas, et al., 2015). Dies verdeutlicht, dass die zelluläre Reaktion nicht zwingenderweise eine lineare Konzentrationsabhängigkeit von dem Umwelttoxin zeigt (Y. Chen et al., 2020; Irizar, Rivas, et al., 2015; Jiang et al., 2020) und verschiedene Metallionen-spezifische toxikologische Schwellenwerte existieren. Irizar, Rivas, et al. vermutet die Existenz von verschiedenen Toxizität-Mechanismen in *E. fetida* (Irizar, Rivas, et al., 2015), die auch für die hier beobachtete Erholung der Zellen nach 96 h Exposition verantwortlich sein könnten. Jedoch sind bisher keine spezifischen Mechanismen, die auch die transiente Abnahme der Toxizität bei einer spezifischen Metallionen-Konzentration erklären, bekannt.

Der Unterschied in den Effekten auf organismischer Ebene und dem hier analysiertem zellulärem Level zeigt unterschiedliche Wirkungsweisen und unterschiedliche toxikologische Mechanismen auf verschiedenen Leveln biologischer Komplexität auf.

### 3.5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Etablierung eines Primärzellsystems von Modellorganismen für ökotoxikologische Untersuchungen erlaubt die Analyse von Effekten von (potenziellen) Umwelttoxinen auf einem zellulären Level. Dazu wird in dieser Arbeit erfolgreich eine Methodik für die Isolation, Kultivierung und Nutzung der primären Zellen in einem MTT-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität etabliert. Das entwickelte enzymatische Isolationsprotokoll primärer intestinaler *E. fetida* Zellen liefert reproduzierbar eine hohe Zellausbeute mit hoher Zellviabilität ( $\geq 80\%$ ). Die Etablierung der Kultivierungsmethodik erlaubt es, die Zellen für mindestens 144 h mit einer hohen Viabilität ( $\geq 80\%$ ) und metabolisch aktiv in Kultur zu halten. Eine Proliferation der Zellen sowie eine Adhärenz an das Kulturgefäß kann nicht erreicht werden. Hierfür ist die Identifikation geeigneter und essenzieller Wachstumsfaktoren sowie Adhärenzfaktoren für die Zellen notwendig. Die Eignung der Zellen für *in vitro* ökotoxikologische Untersuchungen auf einem zellulären Level wird mittels bekannten Umwelttoxinen, Silbernanopartikel und Metallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ), nachgewiesen. Alle Substanzen induzieren im MTT-Assay eine deutliche Reduktion der metabolischen Aktivität und damit der Zellvitalität. Die entwickelte (Kultivierungs-) Methodik ermöglicht es somit, zelluläre Reaktionen auf Umwelttoxine im Detail zu analysieren. Dies erlaubt die Analyse einer

Vielzahl weiterer potenzieller Umwelttoxine/Substanzen und die Bestimmung spezifischer toxikologischer Schwellenwerte. Zusätzlich kann die Untersuchung auf verschiedene zellphysiologische Level mittels unterschiedlicher Analysemethoden ausgeweitet werden. So können beispielsweise potenzielle Effekte auf Transkriptom- und Metabolomebene, auf zelluläre Entzündungsmarker oder Schutzsysteme, DNA- (*deoxyribonucleic acid*-) Schädigungen (mittels Comet-Assay), oxidativer Stress (durch die Messung von reaktiven Sauerstoffspezies) oder Änderungen der Zellzyklusverteilung (mittels Durchflusszytometrie) analysiert werden. Dies erlaubt eine umfassende Einschätzung der induzierten zellulären Effekte. Der Unterschied in den Effekten von Silbernanopartikeln und Metallionen auf organismischer Ebene und dem hier analysierten zellulären Level zeigt unterschiedliche Wirkungsweisen und unterschiedliche toxikologische Mechanismen auf verschiedenen Leveln biologischer Komplexität auf. Primäre intestinale *E. fetida* Zellen bieten ein geeignetes experimentelles Modellzellsystem, um die Mechanismen auf zellulärer Ebene zu analysieren und besser zu verstehen, wie Effekte von Umwelttoxinen auf die organismische Ebene vermittelt werden.

## 4. Isolation und Charakterisierung primärer humaner B-Lymphozyten aus Tonsillen und Blut

### 4.1. Einleitung

B-Lymphozyten (B-Zellen) sind ein essenzieller Bestandteil des humanen Immunsystems und stellen zusammen mit T-Lymphozyten (T-Zellen) das adaptive Immunsystem dar (Marshall et al., 2018). Sie sind verantwortlich für die kurz- und langfristige Generierung der Antikörper-abhängigen, humoralen Immunantwort mittels Antikörpersekretion (Booth & Toapanta, 2021; Su et al., 2016). Neben Antikörper-abhängigen Funktionen besitzen B-Zellen auch Antikörper-unabhängige Funktionen wie die Antigen-Präsentation und stellen somit auch eine Schnittstelle zwischen der humoralen und der zellvermittelten Immunantwort dar (Booth & Toapanta, 2021; Maddaly et al., 2010; Su et al., 2016). B-Zellen besitzen vielfältige Funktionen und sind verantwortlich für die Erzeugung des immunologischen Gedächtnisses, die Initiation der T-Zell-basierten Immunantwort, die Modulation der T-Zell Differenzierung, die Produktion von regulatorischen und entzündungsfördernden Zytokinen, die Bildung von sekundärem und tertiärem lymphatischem Gewebe und beeinflussen Autoimmunerkrankungen und die Tumorentwicklung (Booth & Toapanta, 2021; LeBien & Tedder, 2008; Sanz et al., 2019; Su et al., 2016).

Aufgrund ihrer großen funktionalen Vielfältigkeit weisen B-Zellen ein bedeutendes Potential für biotechnologische und medizinische/klinische Anwendungen auf. Eine verlässliche und effiziente Isolation und Bereitstellung von B-Zellen legt die notwendige Basis für weiterführende Anwendungen, wie beispielsweise die kontrollierte *in vitro* Aktivierung/Stimulation, Expansion (Proliferation), Differenzierung oder auch spezifische genetische Modifikationen. Dies könnte zukünftig eine Patienten-spezifische *ex vivo* Immunisierung gegen Viren wie z.B. HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) oder das Epstein-Barr Virus, mit nachfolgender Rückführung der autologen Antikörper-produzierenden B-Zellen in den Patienten ermöglichen (Luo et al., 2009; Moffett et al., 2019; Tomimatsu & Shirahata, 2014). Auch die biotechnologische Produktion und Nutzung von (Virus-) neutralisierenden Antikörpern als Biopharmazeutika für einen passiven Schutz gegen (neu auftretende) Pathogene, mit SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) als aktuelles Beispiel, könnte umgesetzt werden (Abraham, 2020; Griffith & McCoy, 2021; Pang et al., 2021). Genetisch modifizierte B-Zellen könnten weiter als neuartige, zellbasierte

Therapeutika oder für die Expression und Sekretion therapeutischer Proteine, z.B. Faktor IV, *in vivo* eingesetzt werden (Hung et al., 2018; Loaharawee et al., 2020).

Die B-Zell Reifung/Entwicklung umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Stadien. Beginnend in den primären lymphatischen Organen (fötale Leber und Knochenmark) durchlaufen lymphoide Stammzellen (*common lymphoid progenitors*) die unterschiedlichen Stadien der B-Zell Reifung und es kommt zur Bildung naiver B-Zellen, welche im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen, z.B. Lymphknoten, Milz und Tonsillen, zirkulieren (LeBien & Tedder, 2008; Maddaly et al., 2010; Sanz et al., 2019). Kommen naive B-Zellen in Kontakt mit exogenen Pathogenen, kommt es zu einer Antigen-abhängigen Aktivierung und funktionalen Differenzierung naiver B-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen (LeBien & Tedder, 2008; J. Lee et al., 2016; Maddaly et al., 2010). Hier kann eine Differenzierung in kurzlebige Plasmazellen, welche Antikörper mit geringer Affinität als Teil der primären humoralen Immunantwort sekretieren, erfolgen, oder es kommt zu der Bildung von Keimzentren (*germinal center (GC) reaction*). Die in den Keimzentren enthaltenen B-Zellen (GC Zellen) durchlaufen einen komplexen Mechanismus der Differenzierung, welcher unter anderem einen Antikörperklassenwechsel (*class switch recombination*) und somatische Hypermutation beinhaltet, und es kommt zu der Bildung von hochaffinen, langlebigen Plasmazellen und Gedächtniszellen (*memory cells*) (LeBien & Tedder, 2008; Maddaly et al., 2010). Diese Differenzierung geht mit einer starken Proliferation einher (J. Lee et al., 2016). Der funktionale Endpunkt ist somit die Antikörperproduktion mittels terminal differenzierten Plasmazellen (Antikörper-sekretierende Zellen) sowie die Generierung der sekundären humoralen Immunantwort (immunologisches Gedächtnis) durch Gedächtniszellen (LeBien & Tedder, 2008; J. Lee et al., 2016).

B-Zellen lassen sich anhand der spezifischen Expression verschiedener Oberflächenproteine/-rezeptoren, der sogenannten CD-Marker (*Cluster of Differentiation, CD*), in verschiedene B-Zell Subtypen klassifizieren (Glass et al., 2020; Kalina et al., 2019). Dabei sind vier Hauptpopulationen von B-Zellen beschrieben: naive Zellen, GC Zellen, Gedächtniszellen und Plasmazellen (Antikörper-sekretierende Zellen), die sich anhand der Expression phänotypischer CD-Marker wie z.B. CD20, CD27 und CD38 unterscheiden, siehe Tabelle 4-1 (Booth & Toapanta, 2021; Sanz et al., 2019). Alle B-Zellen, unabhängig vom Stadium der Reifung/Differenzierung, exprimieren den CD19 Rezeptor, weshalb dieser als ubiquitärer

Marker für die Identifizierung von B-Zellen gilt (LeBien & Tedder, 2008). Die Komposition der B-Zell Subtypen unterscheidet sich in den diversen lymphatischen Organen und ist in der altersabhängigen Entwicklung des Immunsystems Veränderungen unterworfen (Bergler et al., 2001; Giesecke et al., 2014; J. Lee et al., 2016; Morbach et al., 2010). So ist beispielsweise für das Blut von Kindern nur ein äußerst geringer Anteil Gedächtniszellen beschrieben, der sich mit zunehmendem Alter erhöht (Carsetti et al., 2022; Grimsholm et al., 2020; Morbach et al., 2010). Mit Ausnahme von GC Zellen treten alle verschiedenen Subtypen, die in den lymphatischen Organen nachweisbar sind, auch im Blut auf (Booth & Toapanta, 2021).

**Tabelle 4-1:** Klassifizierung von B-Zellen in unterschiedliche Subtypen anhand der Expression phänotypischer CD-Marker.

<b>B-Zell Subtyp</b>	<b>CD19</b>	<b>CD20</b>	<b>CD27</b>	<b>CD38</b>
Naive Zellen <sup>a</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD27 <sup>-</sup>	CD38 <sup>+</sup>
GC Zellen <sup>b</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup>	CD38 <sup>+</sup>
Gedächtniszellen <sup>c</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD20 <sup>+</sup>	CD27 <sup>+</sup>	CD38 <sup>-</sup>
Plasmazellen <sup>d</sup>	CD19 <sup>+</sup>	CD20 <sup>-</sup>	CD27 <sup>++</sup>	CD38 <sup>++</sup>

Das Level der Expression ist klassifiziert als: keine Expression (-), Expression (+) und starke Expression (++)

<sup>a</sup> (Carsetti et al., 2022; Sanz et al., 2019)

<sup>b</sup> (Arpin et al., 1995; J. Jung et al., 2000)

<sup>c</sup> (Arpin et al., 1995; Booth & Toapanta, 2021; Carsetti et al., 2022)

<sup>d</sup> (Carsetti et al., 2022; Sanz et al., 2019)

Für die Gewinnung primärer humaner B-Zellen stehen potenziell die lymphatischen Organe zur Verfügung. Ein entscheidender Faktor für die Isolation primärer B-Zellen ist die Zellausbeute, denn für weiterführende Anwendungen limitiert die zur Verfügung stehende Anzahl Zellen die Zahl der Experimente, die mit identischen Zellen eines Spenders durchführbar sind. Eine Voraussetzung ist auch die praktische Verfügbarkeit der humanen Organe, die nicht in allen Fällen, z.B. für Milzen oder Knochenmark, gewährleistet ist.

Tonsillen befinden sich an der Schnittstelle zwischen den Atemwegen und dem Verdauungstrakt und sind als erste Barriere des Organismus vor potenziellen exogenen Pathogenen einer hohen Zahl eindringender Antigene ausgesetzt (J. Lee et al., 2016; Scadding, 1990). Tonsillen können als geeignete Quelle für die B-Zell Isolation identifiziert werden, denn

es handelt sich um sehr B-Zell reiche Organe. Basierend auf einem B-Zellen Anteil im tonsillären Gewebe zwischen 48 und 75% erlauben sie die Gewinnung von ca.  $6 \times 10^9$  B-Zellen pro Isolation (Bergler et al., 2001; Giesecke et al., 2014; Sesterhenn et al., 1977; Wohlford et al., 2018). Das Gewicht einer Tonsille beträgt typischerweise zwischen 2 und 10 g (Johnston et al., 2009). Die operative Entfernung von Tonsillen wird aufgrund klinischer Indikation routinemäßig durchgeführt, sowohl bei erwachsenen Patienten als auch bei Kindern unterschiedlichen Alters (Geißler & Guntinas-Lichius, 2020; Mitchell et al., 2019; Wong Chung et al., 2018). Das kindliche Immunsystem befindet sich in der Entwicklung und ist noch nicht voll ausgereift (Bergler et al., 2001; J. Lee et al., 2016; Valles-Ayoub et al., 1990). Somit stellen Tonsillen eine Quelle für B-Zellen aus verschiedenen, altersabhängigen Stufen der Entwicklung des menschlichen Immunsystems dar. Dies bietet den Vorteil einer gezielten Ausrichtung nachfolgender *in vitro* Anwendungen, denn altersabhängige Unterschiede in der Intensität oder Art der Immunantwort von Lymphozyten sind beschrieben (Cobleigh et al., 1980).

Aufgrund der einfachen Verfügbarkeit von peripherem Blut oder Blutprodukten stellt dies ein routinemäßig verwendetes Ausgangsmaterial dar und ist der aktuelle Standard für die B-Zell Isolation. Im Fall von Blut ist die erwartete Ausbeute an B-Zellen gering, denn B-Zellen machen zwischen 4 und 15% der Lymphozyten aus, was ca.  $0,06 - 1,6 \times 10^6$  B-Zellen pro mL Blut entspricht (Autissier et al., 2010; Carsetti et al., 2022; Giesecke et al., 2014; Morbach et al., 2010). Weiterhin steht hier typischerweise nur das Blut von erwachsenen Spendern zur Verfügung. Als Alternative zu Vollblut wird oftmals ein sogenannter Buffy Coat verwendet, ein Nebenprodukt der Plasmagewinnung, der durch Zentrifugation von Vollblut erhalten wird. Er enthält die konzentrierte Fraktion der Leukozyten und somit auch Lymphozyten, während das Plasma und die Erythrozyten entfernt bzw. reduziert werden.

Für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Blut oder Buffy Coats stehen eine Vielzahl leicht anwendbarer, kommerziell erhältlicher Kits zur Verfügung. Die genutzten Methoden basieren auf einer Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) zur Aufreinigung mononuklearer Zellen oder auf einer magnetischen Zellsortierung (*magnetically assisted cell sorting*, MACS). Auch eine Kombination beider Methoden wird routinemäßig genutzt. Die MACS Strategie beruht auf einer Markierung der Zellen mittels Antikörper gekoppelten, magnetischen Beads und einer magnetischen Abtrennung der so markierten Zellen (Miltenyi et al., 1990). Die

Antikörper sind spezifisch gegen zelluläre Oberflächenproteine, oftmals die CD-Marker, gerichtet, was eine positive (Markierung der Zielzellen) oder negative (Markierung kontaminierender Zellen) Isolationsstrategie erlaubt. Der aktuelle Goldstandard ist eine MACS basierte, negative Isolationsstrategie, mit der unmarkierte B-Zellen erhalten werden. Die Effektivität und Effizienz der Aufreinigung beruht dabei auf der Stärke und Spezifität der Bindung zwischen den Oberflächenproteinen der kontaminierenden Zellen und den spezifischen Antikörpern. Die Zusammensetzung des Antikörper-Cocktails in den MACS Kits ist dabei nicht bekannt. Die MACS basierte Isolation erreicht typischerweise eine Reinheit der B-Zellen von deutlich über 90% (Ettinger et al., 2005; Moore et al., 2019; Sims & Lipsky, 2006).

Eine Aufreinigung von Lymphozyten, insbesondere von T-Zellen, mittels Nylon Wolle ist eine etablierte Methode und für lymphatische Organe (Tonsillen, Milz, Lymphknoten) und Blut als Ausgangsgewebe beschrieben (Eisen et al., 1972; Handwerger & Schwartz, 1974; Julius et al., 1973; Werner et al., 1977; Wong & Mittal, 1981). Nylon Wolle bietet eine einfache und kostengünstige Methode für die Separation von B- und T-Zellen (Handwerger & Schwartz, 1974; Wohler & Barnum, 2009). B-Zellen adhäreren an der Nylon Wolle und können nachfolgend mittels mechanischer Erschütterung/Bewegung von dieser wieder gelöst und eluiert werden. T-Zellen adhäreren nicht an der Nylon Wolle und werden vorher durch einfaches Ausspülen entfernt (Handwerger & Schwartz, 1974; Trizio & Cudkowicz, 1974; Wong & Mittal, 1981). Die zugrunde liegende mechanistische Basis der selektiven zellulären Retention in der Nylon Wolle ist nicht bekannt (Wohler & Barnum, 2009). Mittels Nylon Wolle kann eine Reinheit der B-Zellen von bis zu ca. 85% erreicht werden, unter Aufrechterhaltung der funktionalen zellulären Aktivität (Handwerger & Schwartz, 1974; Litvin & Rosenstreich, 1984; Werner et al., 1977). Auch eine Kombination verschiedener Methoden, z.B. eine Aufreinigung mittels Nylon Wolle und nachfolgend mittels MACS ist möglich (Gunzer et al., 2001).

#### 4.2. Problemstellung und Zielsetzung

B-Zellen sind eine essenzielle Komponente des humanen Immunsystems mit einem bedeutenden Potential für biotechnologische und medizinische Anwendungen. Diese setzen die verlässliche und effiziente Gewinnung und Bereitstellung primärer humaner B-Zellen, im besten Fall sogar spezifischer B-Zell Subtypen, für *in vitro* Anwendungen voraus. Das Ziel

dieser Arbeiten ist die Entwicklung einer Methode für die Isolation primärer humaner B-Zellen mit einer hohen Zellausbeute und ausreichender Reinheit. Hierfür werden zwei verfügbare und praktikable Quellen für B-Zellen, Tonsillen und Blut, evaluiert. Für die B-Zell Isolation aus Tonsillen von Kindern und Erwachsenen wird ein Zwei-Schritt Protokoll etabliert, mit einer Isolation mononuklearer Zellen mittels einer DGZ und einer nachfolgenden spezifischen Aufreinigung von B-Zellen mittels Nylon Wolle. Die Freisetzung der Zellen aus dem tonsillären Gewebe ist dabei der entscheidende Schritt für eine maximale Zellausbeute der Methode. Somit werden hierfür eine mechanische und eine enzymatische Zellisolation analysiert. Als Referenz wird der aktuelle Goldstandard der B-Zell Isolation, eine MACS basierte, negative Aufreinigung aus Blut (Buffy Coats) mittels Antikörper gekoppelten, magnetischen Beads, verwendet. Für einen Vergleich beider Ausgangsgewebe und Isolationsprotokolle hinsichtlich ihrer Eignung für die B-Zell Gewinnung müssen verschiedenen Faktoren evaluiert werden, insbesondere die Zellausbeute, Viabilität und Reinheit (v.a. Anteil kontaminierender T-Zellen), aber auch die Effektivität (anhand der B-Zell Wiederfindungsrate) und Kosten der Methoden. Des Weiteren werden die unterschiedlichen Ausgangsgewebe bezüglich der enthaltenen B-Zell Subtypen und ihrer Verteilung charakterisiert. Dazu werden die B-Zellen mittels einer Immunfluoreszenzfärbung phänotypisch charakterisiert und basierend auf der Expression von CD-Markern in verschiedene Subtypen klassifiziert. Dies ermöglicht eine Bewertung des Isolationsprotokolls hinsichtlich der Erhaltung der spezifischen Subtypen Komposition in der isolierten B-Zell Fraktion. So ist eine umfassende Charakterisierung der Ausgangsgewebe und Evaluation der Isolationsprotokolle möglich.

### 4.3. Material und Methoden

#### 4.3.1. Erhalt von humanen Tonsillen und Blut (Buffy Coats)

Humane Tonsillen werden von Dr. med. Ulrich Gollner und Dr. med. Katrin Gollner (HNO Operationen, Kulmbach, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Biopsiematerial wird während Routine Operationen, entweder durchgeführt als Tonsillektomie (vollständige Entfernung des tonsillären Gewebes) oder Tonsillotomie (partielle Entfernung des tonsillären Gewebes), erhalten. Die Zustimmung der Ethikkommission der Universität Bayreuth (Bayreuth, Deutschland) für die Durchführung der Studie ist vorhanden (#O 1305/1-GB, 2018). Von jedem Patienten oder dessen gesetzlichen Vertretern wird nach schriftlicher und mündlicher

Aufklärung über die Studie eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Diese beinhaltet auch die Zustimmung zu der Nutzung von persönlichen Daten (Geschlecht und Alter), die die Interpretation der experimentellen Daten unterstützen können. Alle Patienten sind anonym. Humanes Blut in Form von Buffy Coats wird von dem Bayerischen Roten Kreuz (München, Deutschland) bezogen. Auch hier werden die persönlichen Daten Geschlecht und Alter der erwachsenen, gesunden Spender zur Verfügung gestellt. Alle Spender sind anonym.

#### 4.3.2. Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen

Die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen unterteilt sich in zwei Schritte, die Isolation und Aufreinigung mononuklearer Zellen sowie die spezifische Aufreinigung von B-Zellen mittels Nylon Wolle. Das entwickelte experimentelle Protokoll ist in Abbildung 4-1 dargestellt.

##### 4.3.2.1. Isolation mononuklearer Zellen

Nach der operativen Entfernung der Tonsillen wird das erhaltene Gewebe sofort in 20 mL 4 °C kalten Puffer A (HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*)) versetzt mit 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2,5 µg/mL Amphotericin B, 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 0,5% (w/v) BSA (*Bovine Serum Albumin*)) in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Die Probe wird auf Eis gelagert und in das Labor transportiert. Dort wird das Gewebe in eine Zellkulturschale mit 10 mL 4 °C kaltem RPMI-1640 überführt. Mit einem Skalpell und einer Schere wird das Gewebe in kleine Stücke geschnitten.

In manchen Experimenten wird eine zusätzliche enzymatische Vorbehandlung des Gewebes vor der nachfolgenden mechanischen Zellisolation durchgeführt (enzymatische und mechanische Zellisolation) (siehe Abbildung 4-1). Das Protokoll basiert auf einer enzymatischen Zellisolation aus humanen Lymphknoten (Fletcher et al., 2011) und Tonsillen (Bar-Ephraim et al., 2016; Weigel et al., 2015) mittels Collagenase und Dispase. Die Enzym-Lösung für den enzymatischen Verdau besteht aus 2,4 mg/mL Dispase II (entspricht  $\geq 1,2$  U/mL) und 0,6 mg/mL Collagenase IV (entspricht  $> 75$  U/mL) in RPMI-1640. Ein Aliquot des tonsillären Gewebes wird mit 2 mL Enzym-Lösung versetzt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die enzymatische Freisetzung der Zellen zu unterstützen, wird die Probe jede 10 min kurz geschüttelt (1600 rpm). Nach 30 min Inkubationszeit wird der Überstand mit den freigesetzten Zellen (ca. 2 mL) abgenommen, während sich vorhandene Gewebestücke am Boden befinden. Die isolierten Zellen werden in ein Zentrifugenröhrchen

mit 10 mL 4 °C kaltem Puffer A überführt und auf Eis gelagert. Dies minimiert die Inkubationszeit, in der die isolierten Zellen den digestiven Enzymen ausgesetzt sind, und ermöglicht eine sanfte Isolation. Die vorhandenen Gewebestücke werden erneut mit 2 mL Enzym-Lösung versetzt und der Inkubationsprozess wiederholt, um die Zellausbeute zu erhöhen. Danach werden beide erhaltenen Fraktionen (isolierte Zellen und wiederholt behandelte Gewebestücke inklusive Überstand) zusammengeführt und der nachfolgenden mechanischen Zellisolation unterzogen. Für das zweites Aliquot des tonsillären Gewebes wird die enzymatische Vorbehandlung nicht durchgeführt (nur mechanische Zellisolation). Dieses Aliquot dient als Kontrolle für einen Vergleich der Wirksamkeit der enzymatischen Vorbehandlung.

Für die mechanische Zellisolation werden die Gewebestücke (bzw. im Fall der enzymatischen Vorbehandlung die beiden zusammengeführten Fraktionen der isolierten Zellen und Gewebestücke) und auch das verwendete RPMI-1640 in ein 70 µm Zellsieb, aufgesetzt auf ein 50 mL Zentrifugenröhrchen, transferiert. Das Zellsieb wird vor der Auftragung der Probe mit 1 mL HBSS befeuchtet. Das Gewebe wird mittels des Kolbens einer 5 mL Spritze mechanisch durch das Zellsieb gedrückt. Für eine maximale Zellausbeute wird das Zellsieb während der Filtration regelmäßig mit 1 mL 4 °C kaltem Puffer A überspült (insgesamt 7 mL). Nach der Filtration wird das Zellsieb mit 3 mL 4 °C kaltem Puffer A ausgespült.

Die erhaltene Zellsuspension wird zentrifugiert (300 x g, 10 min) und das Zellpellet in 4 mL 4 °C kaltem Puffer A resuspendiert. Die in der Probe enthaltenen Erythrozyten werden durch eine Erythrozyten-Lyse entfernt. Dazu werden 40 mL Erythrozyten-Lyse-Puffer (siehe Tabelle 7-12) zu der Zellsuspension gegeben und durch Invertieren vermischt. Nach 5 min Inkubation werden die Zellen zentrifugiert (300 x g, 5 min) und durch Zugabe von 10 mL 4 °C kaltem Puffer A gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (300 x g, 5 min) werden die Zellen in 16 mL Puffer A aufgenommen. Die mononuklearen Zellen (hauptsächlich Lymphozyten) werden mittels einer DGZ spezifisch aufgereinigt und z.B. Zelltrümmer sowie verbleibende Erythrozyten abgetrennt. Dazu werden jeweils 4 mL LSM 1077 *Lymphocyte Separation Medium* in zwei 15 mL Zentrifugenröhrchen gefüllt. Darauf werden sehr vorsichtig mit einer 10 mL serologischen Pipette 8 mL Zellsuspension pro Zentrifugenröhrchen aufgetragen. Nach der DGZ (400 x g, 35 min) befinden sich die mononuklearen Zellen (v.a. Lymphozyten) in der Interphase (DGZ Fraktion). Die Interphase wird mittels einer langen Pasteur-Pipette geerntet und die Zellen mit 10 mL 4 °C kaltem Puffer A gewaschen. Die Zellen werden durch

Zentrifugation (300 x g, 5 min) pelletiert und in 5 mL Puffer B (HBSS versetzt mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS) aufgenommen.

#### 4.3.2.2. Aufreinigung von B-Zellen mittels Nylon Wolle

1 g Nylon Wolle wird in eine 20 mL Spritze gefüllt und durch Autoklavieren (121 °C, 20 min) sterilisiert. Die Spritze dient als Säule für die Aufreinigung der Zellen und wird aufrecht in einem Stativ fixiert und der Auslass mit einem 2-Wege-Hahn versehen. Die Säule wird vor der Verwendung mit 50 mL 37 °C warmen Puffer B gespült. Danach werden 10 mL 37 °C warmer Puffer B auf die Säule aufgetragen und die Säule für 1 h im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank equilibriert. Die Zellsuspension wird auf eine Zelldichte von 50 bis 100 x 10<sup>6</sup> Z/mL in 37 °C warmen Puffer B eingestellt. Der enthaltene Puffer B wird aus der Säule eluiert. Auf eine Säule wird ein Volumen von 4 mL Zellsuspension aufgetragen, was einer Zellzahl von 200 bis 400 x 10<sup>6</sup> Z entspricht. Die Zellsuspension läuft durch Gravitation in die Nylon Wolle. Als Schutz vor einer Austrocknung der Säule werden 10 mL Puffer B aufgetragen, sodass die Nylon Wolle mit Puffer bedeckt ist. Die Säule wird für 1 h im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert. Abhängig von der erhaltenen Zellzahl werden mehrere Säulen verwendet, um alle isolierten Zellen aus dem tonsillären Gewebe auf die Säule aufzutragen. Nach der Inkubation werden die T-Zellen, welche nicht an die Nylon Wolle binden, durch zweifaches Spülen der Säule mit je zwei Säulenvolumen (ein Säulenvolumen  $\cong$  ca. 14 mL) Puffer B eluiert und dabei in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen aufgefangen (Nylon Wolle T (NW-T) Fraktion). Nachfolgend werden die B-Zellen (Nylon Wolle B (NW-B) Fraktion), welche von der Nylon Wolle zurückgehalten werden, eluiert, indem die Säule mit einem Säulenvolumen Puffer B befüllt wird und die Zellen mechanisch von der Nylon Wolle gelöst werden. Dafür wird die Nylon Wolle mit einem sterilen Spatel gelockert. Durch Klopfen mit einem Metallstab von außen an die Säule werden mechanische Erschütterungen erzeugt, um die Zellen von der Nylon Wolle zu lösen. Abschließend wird der Kolben der Spritze aufgesetzt und heruntergedrückt, dadurch wird die Nylon Wolle maximal komprimiert, die B-Zellen werden eluiert und in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Für eine maximale Elution der B-Zellen wird die Elutionsprozedur insgesamt dreimal durchgeführt. Die NW-T und NW-B Fraktionen werden zentrifugiert (300 x g, 10 min) und die Zellen in je 5 mL 4 °C kaltem IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) aufgenommen. Für die mikroskopische Analyse der Zellen wird ein inverses Lichtmikroskop (CKX41) verwendet

#### 4.3.3. Isolation primärer humaner B-Zellen aus Blut (Buffy Coat)

Humane B-Zellen werden aus Buffy Coats mittels des *MACSxpress Whole Blood B Cell Isolation Kit, human* nach Angaben des Herstellers isoliert. Das Kit beruht auf einer negativen, MACS basierten Isolationsstrategie. Diese erlaubt es, alle kontaminierenden Blutzellen mittels Antikörper gekoppelten, magnetischen Beads zu markieren und abzutrennen. Das erhaltene Volumen Buffy Coat wird in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Pro 1 mL Buffy Coat werden 0,5 mL Isolationsmix hinzugefügt. Der Isolationsmix wird nach Angaben des Herstellers angesetzt. Das Zentrifugenröhrchen wird dreimal invertiert und für 5 min bei 12 rpm im *MACSmix Tube Rotator* gedreht. Für die magnetische Separation der Zellen wird das Zentrifugenröhrchen in den *MACSxpress Separator* gestellt und 15 min inkubiert. Der erhaltene Überstand, der die unmarkierten B-Zellen enthält, wird vorsichtig abgenommen, ohne das Pellet (Erythrozyten) und die magnetisch markierten, am Rand fixierten Blutzellen (Kontaminanten) zu berühren. Um verbleibende Erythrozyten in der Fraktion der aus dem Buffy Coat mittels MACS isolierten B-Zellen (BC<sub>MACS</sub>) zu entfernen, wird eine Erythrozyten-Lyse durchgeführt. Dazu werden die B-Zellen durch Zentrifugation (300 x g, 10 min) pelletiert, in 10 mL Erythrozyten-Lyse Puffer (siehe Tabelle 7-12) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellsuspension wird erneut zentrifugiert (300 x g, 10 min) und das Zellpellet in 10 mL DPBS aufgenommen. Für die mikroskopische Analyse der Zellen wird ein inverses Lichtmikroskop (CKX41) verwendet.

#### 4.3.4. Bestimmung von Zelldichte und Viabilität

Ein automatisches Zellzählgerät wird verwendet, um die Zelldichte, Zellgröße und Viabilität der Zellen zu bestimmen. Dazu wird nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Im Detail werden 18 µL einer Zellsuspension mit 2 µL Färbelösung (Acridinorange-/Propidiumiodid-Lösung) vermischt und 30 sec inkubiert. 11 µL der Suspension werden dann auf den Proben-Slide aufgetragen und eine automatische Zellzählung durchgeführt.

#### 4.3.5. Kryokonservierung

Für eine Kryokonservierung der isolierten B- und T-Zellen wird die Zellsuspension zentrifugiert (300 x g, 5 min) und mit einer Zelldichte von  $10 \times 10^6$  Z/mL in FCS versetzt mit 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Je 1 mL Zellsuspension ( $10^6$  Z) wird in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen werden in einem Einfriercontainer, der eine konstante Abkühlung der Zellen mit 1 °C pro min erlaubt, ÜN auf -80 °C gekühlt. Danach

werden die Kryoröhrchen in die Zellbank transferiert und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei  $\leq -180$  °C gelagert.

#### 4.3.6. Durchflusszytometrische Analyse/ Phänotypisierung

Für eine Phänotypisierung der isolierten B- und T-Zellen werden charakteristische Zelloberflächenmarker für B-Zellen (CD19), für die Subtypen von B-Zellen (CD20, CD27 und CD38) und für T-Zellen (CD3) im Durchflusszytometer Cytomics FC500, ausgestattet mit zwei Lasern (488 nm und 635 nm), analysiert. Dazu werden  $1 \times 10^6$  Z zweimal in je 1 mL DPBS gewaschen (Zentrifugation 300 x g, 5 min) und in 100  $\mu$ L DPBS für die Antikörperfärbung aufgenommen. Es werden anti-humane, murine, CD-spezifische Antikörper (anti-CD3-PE (Phycoerythrin), anti-CD19-APC (Allophycocyanin), anti-CD20-PE, anti-CD27-PE/Cy7 (Cyanin 7), anti-CD38-FITC (Fluoresceinisothiocyanat)) verwendet. Für die Differenzierung zwischen B- und T-Zellen wird mit anti-CD3-PE und anti-CD19-APC eine Zwei-Farben Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Die Phänotypisierung bezüglich der B-Zell Subtypen wird ebenfalls als Zwei-Farben Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, mit anti-CD19-APC gemeinsam mit einem Subpopulation spezifischem Antikörper. Für die Antikörperfärbung wird das benötigte Volumen Antikörper-Lösung nach Angaben des Herstellers mit den Zellen vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis im Dunklen werden die Zellen erneut zweimal in je 1 mL DPBS gewaschen (Zentrifugation 300 x g, 5 min) und für die durchflusszytometrische Analyse in 500  $\mu$ L DPBS aufgenommen. Eine Kontrolle (Zellen, mit denen eine Färbung ohne Zugabe eines Antikörpers durchgeführt wird) wird genutzt, um die Parameter der Messung einzustellen. Für die Messung wird das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) und die Fluoreszenzintensität (PE Emission 575 nm, APC Emission 655 nm, PE/Cy7 Emission 750 nm, FITC Emission 525 nm) aufgezeichnet. Für die Analyse wird anhand der Lichtstreuung eine Population im FSC/SSC definiert, die einzelne, viable, nicht-apoptotische Zellen enthält, während tote Zellen (niedriger FSC und hoher SSC), Zelltrümmer (niedriger FSC und niedriger SSC) und Zellaggregate (hoher FSC) aus der Population und somit aus der Analyse ausgeschlossen werden (Lymphozyten Population). Die Lymphozyten Population wird dann bezüglich der charakteristischen Zelloberflächenmarker für B- und T-Zellen anhand des Histogramms der logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenzintensität analysiert. Innerhalb der Lymphozyten Population werden B-Zell und T-Zell Populationen definiert, welche CD19 positiv markierte (CD19<sup>+</sup>) Zellen (B-Zell Population)

oder CD3 positiv markierte (CD3<sup>+</sup>) Zellen (T-Zell Population) enthalten. CD19<sup>+</sup> Zellen werden im Weiteren als B-Zellen und CD3<sup>+</sup> Zellen als T-Zellen bezeichnet. Für die Analyse bezüglich der B-Zell Subtypen wird innerhalb der B-Zell Population (CD19<sup>+</sup>) der Anteil CD20 positiv markierter (CD20<sup>+</sup>) Zellen, CD27 positiv markierter (CD27<sup>+</sup>) Zellen oder CD38 positiv markierter (CD38<sup>+</sup>) Zellen anhand des Histogramms der logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenzintensität bestimmt. Abbildung 7-1 zeigt die verwendete Auswertestrategie der Durchflusszytometrie und die Klassifizierung der Zellen in die unterschiedlichen Populationen für isolierte Zellen aus den untersuchten Geweben.

#### 4.3.7. Statistische Analyse

Die Anzahl unabhängiger Experimente wird als n angegeben. Es wird der Mittelwert und die SD sowie der Median verwendet. Für die statistische Auswertung der Daten wird ein Zweistichproben-t-Test für ungleiche Varianzen (Welch's t-Test) verwendet, unter der Annahme, dass eine Normalverteilung der Daten gegeben ist. Statistische Signifikanz wird mit \*/# (signifikant,  $p < 0,05$ ), \*\*/## (sehr signifikant,  $p < 0,01$ ) und \*\*\*/### (hoch signifikant,  $p < 0,001$ ) angegeben. In den Box-Whisker-Darstellungen stellt die Box die 25% und 75% Quartile dar, während die Whiskers die minimalen und maximalen Werte repräsentieren. Werte, die über das 1,5-fache der Box (25% und 75% Quartil Schwellenwert) hinausgehen, werden als Ausreißer definiert. Der Median wird durch eine schwarze Linie repräsentiert und der Mittelwert als weißer Kreis dargestellt.

### 4.4. Ergebnisse und Diskussion

#### 4.4.1. Entwicklung einer Methode für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen

Für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen wird zunächst ein sanftes, aber effizientes Protokoll für die Freisetzung der Zellen aus dem tonsillären Gewebe etabliert. Dieser Schritt ist entscheidend für eine maximale Zellausbeute und legt somit die Grundlage für eine hohe Effektivität des gesamten Isolationsprotokolls. Um eine maximale Zellausbeute zu erreichen, wird der Effekt einer zusätzlichen enzymatischen Disaggregation des Gewebes vor der mechanischen Isolation analysiert. Basierend auf der Literatur werden dafür Collagenase und Dispase als proteolytische Enzyme ausgewählt (Bar-Ephraim et al., 2016; Fletcher et al., 2011; Weigel et al., 2015). Das tonsilläre Ausgangsmaterial eines Spenders wird in zwei

Aliquote aufgeteilt und diese der entsprechenden Behandlung (rein mechanische Isolation vs. enzymatische Vorbehandlung (EV) und mechanische Isolation) unterzogen. Im nächsten Schritt wird eine Aufreinigung mononuklearer Zellen (v.a. Lymphozyten) mittels einer DGZ durchgeführt (DGZ Fraktion) (siehe Abbildung 4-1). Die Ergebnisse des Vergleiches der Isolationsmethodik sind in Tabelle 4-2 für tonsilläres Gewebe von Kindern (K) (n = 4) und Erwachsenen (E) (n = 1) hinsichtlich der relativen Zellausbeute und Viabilität dargestellt, die vollständigen Ergebnisse sind in Tabelle 7-3 gezeigt.

**Tabelle 4-2:** Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung hinsichtlich der relativen Zellausbeute und Viabilität in der erhaltenen DGZ Fraktion aus Tonsillen von Kindern und Erwachsenen.

Spender	Relative Ausbeute Zellen [ $\times 10^6$ Z/g]		Viabilität [%]	
	Ohne EV <sup>a</sup>	Mit EV <sup>a</sup>	Ohne EV <sup>a</sup>	Mit EV <sup>a</sup>
K11	253,5	172,7	96,5	92,0
K12	364,7	482,1	91,8	95,4
K13	198,9	79,7	96,6	93,2
K14	268,7	129,8	92,6	95,6
E6	102,3	61,8	95,0	94,0

<sup>a</sup> EV: enzymatische Vorbehandlung

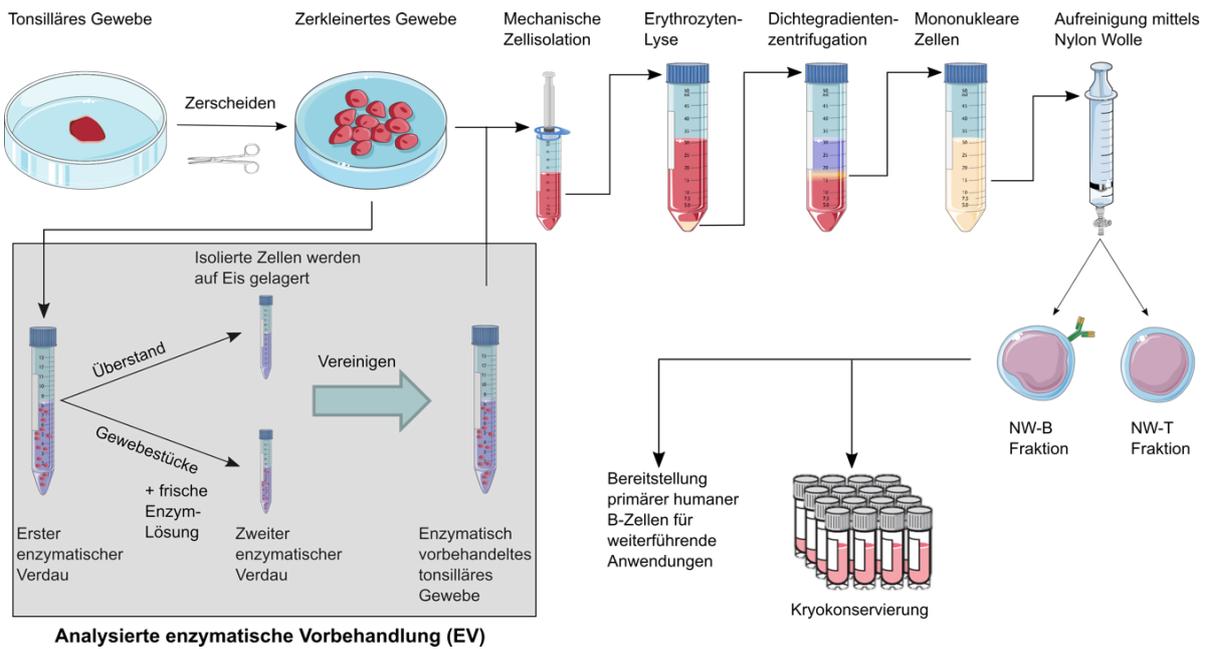
Die EV resultiert in geringeren relativen Zellausbeuten im Vergleich zu der rein mechanischen Isolation, mit Spender K12 als eine Ausnahme, bei dem das Gegenteil der Fall ist. Dies entspricht nicht den Erwartungen, denn es wird erwartet, dass der vorhergehende proteolytische Verdau die Isolation und Freisetzung einzelner Zellen unterstützt und so die Zellausbeute erhöht. So wurde gezeigt, dass B-Zellen durch eine Collagenase/Dispase Behandlung mit einer höheren Ausbeute aus dem Thymus und aus Tonsillen isoliert werden können (Willcox et al., 1983). Jedoch variiert auch hier die Wirksamkeit der Behandlung und dieser Effekt kann nicht in allen Isolationen beobachtet werden. Des Weiteren erschweren kritische Faktoren wie die Identität der verwendeten Enzyme, deren Reinheit (v.a. die Kontamination mit weiteren proteolytischen Enzymen) und auch die spezifischen Parameter der enzymatischen Behandlung eine Vergleichbarkeit und Standardisierbarkeit der Ergebnisse (Reichard & Asosingh, 2019; Wang et al., 2011; Williams et al., 1995). Die EV des Gewebes erfordert zusätzliche experimentelle Schritte (u.a. Zentrifugationsschritte), die vermutlich in jedem Schritt einen

gewissen Zellverlust bewirken. Ein starkes Zellsterben aufgrund der EV kann nicht für die reduzierte relative Zellausbeute verantwortlich sein, denn die Viabilität der isolierten Zellen ist nach beiden Behandlungen exzellent hoch ( $\geq 92\%$ ).

Der Anteil identifizierter B- und T-Zellen variiert leicht zwischen beiden Behandlungen, jedoch ist auch hier kein eindeutiger Effekt zu erkennen (siehe Tabelle 7-3). Spender K13 und K14 zeigen im Vergleich zu den weiteren Spendern (siehe Kapitel 4.4.2 und Tabelle 7-4) sowie zu publizierten Daten (Bergler et al., 2001; Musiatowicz et al., 2001; Rosenmann et al., 1998) eine für Tonsillen von Kindern unübliche zelluläre Zusammensetzung der DGZ Fraktion und somit des tonsillären Gewebes. Mit einem Anteil von ca. 35% B-Zellen und 59% T-Zellen entspricht diese der Zusammensetzung der untersuchten Tonsillen von Erwachsenen (siehe Tabelle 7-5). Bei beiden Spendern wurde das tonsilläre Gewebe mittels einer Tonsillektomie vollständig entfernt, was ebenfalls typisch für erwachsene Patienten ist.

Da die EV des tonsillären Gewebes mit Collagenase und Dispase einen negativen Effekt auf die relative Zellausbeute zeigt, stattdessen aber die Dauer einer Isolation erhöht, wird auf die Durchführung der EV verzichtet. Nach dem Erhalt mononuklearer Zellen (v.a. Lymphozyten) aus Tonsillen wird als nächster Schritt eine spezifische Aufreinigung der B-Zellen mittels Nylon Wolle etabliert. Die für die Etablierung durchgeführten Isolationen werden in dieser Arbeit aufgrund der Variation in der experimentellen Durchführung nicht dargestellt.

Somit wird für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen ein Zwei-Schritt Protokoll etabliert, welches in Abbildung 4-1 gezeigt ist. Im ersten Schritt wird eine mechanische Freisetzung der Zellen aus dem tonsillären Gewebe und eine Aufreinigung mononuklearer Zellen (v.a. Lymphozyten) mittels einer DGZ durchgeführt. In einem zweiten Schritt werden die B-Zellen mittels Nylon Wolle spezifisch aufgereinigt.



**Abbildung 4-1:** Entwickeltes experimentelles Protokoll für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen.

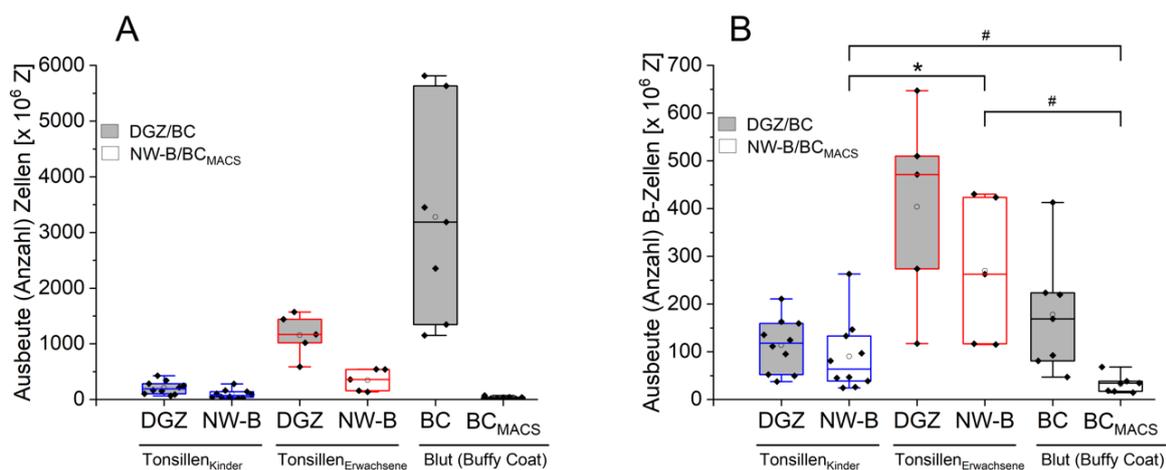
Abbildung nach (Helm et al., 2021), Copyright Elsevier, modifiziert. Die Abbildung wurde mit <https://smart.servier.com/> erstellt und ist lizenziert nach <https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>.

#### 4.4.2. Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen und Blut

Für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen basierend auf der entwickelten Methode wird sowohl das Gewebe von Kindern als auch von erwachsenen Spendern verwendet. Routinemäßig wird die Isolation primärer humaner B-Zellen aufgrund der besseren Verfügbarkeit aus Blut durchgeführt. Da die Aufreinigung mittels Nylon Wolle für diesen Fall nicht der Standard ist, wird der aktuelle Goldstandard, eine MACS basierte, negative Aufreinigung mittels Antikörper gekoppelten, magnetischen Beads, als Vergleich verwendet. Dafür steht Blut in Form von Buffy Coats von erwachsenen Spendern zur Verfügung. Für den Vergleich beider Ausgangsgewebe und Isolationsprotokolle hinsichtlich ihrer Eignung für die B-Zell Gewinnung müssen verschiedenen Faktoren evaluiert werden, besonders die Zellausbeute, Viabilität und Reinheit. Die individuellen Ergebnisse der untersuchten Spender sind in Tabelle 7-2 und Tabelle 7-4 bis Tabelle 7-6 dargestellt.

Die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen wird aus Biopsien von Kindern (Alter: 2 – 5 Jahre) (n = 10) und Erwachsenen (Alter: 20 – 38 Jahre) (n = 5) weiblichen und

männlichen Geschlechts durchgeführt. Bei Kindern wird hauptsächlich eine Tonsillotomie (partielle Entfernung des tonsillären Gewebes) durchgeführt, während bei den erwachsenen Spendern eine Tonsillektomie (vollständige Entfernung der Tonsillen) durchgeführt wird. Dies führt dazu, dass die zur Verfügung stehende Masse an tonsillärem Gewebe bei Erwachsenen ( $4,82 \pm 1,79$  g) im Vergleich zu Kindern ( $1,21 \pm 0,68$  g) um Faktor 4 erhöht ist. Als Referenz wird die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Blut in Form von Buffy Coats (BC) von erwachsenen, gesunden Spendern weiblichen und männlichen Geschlechts (Alter: 39 – 62 Jahre) ( $n = 7$ ) durchgeführt. Hier beträgt das Volumen Ausgangsmaterial im Buffy Coat  $33 \pm 3$  mL. Die Entwicklung der Zell- und B-Zellausbeute (Anzahl Zellen) im Verlauf des Isolationsprotokolls für die untersuchten Gewebe ist in Abbildung 4-2 dargestellt.



**Abbildung 4-2:** Entwicklung der A) Zellausbeute und B) B-Zellausbeute im Verlauf des Isolationsprotokolls in den verschiedenen Fraktionen.

Blau: Tonsillen von Kindern ( $n = 10$ ), rot: Tonsillen von Erwachsenen ( $n = 5$ ), schwarz: Blut (Buffy Coat) ( $n = 7$ ). Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen von Kindern und Tonsillen von Erwachsenen ist mit \* (signifikant) gekennzeichnet. Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen (von Kindern oder Erwachsenen) und Blut (Buffy Coat) ist mit # (signifikant) gekennzeichnet. Abbildung nach (Helm et al., 2021), Copyright Elsevier, modifiziert.

Ausgehend von dem tonsillären Gewebe wird nach der mechanischen Zellisolation zunächst die aufgereinigte Fraktion mononuklearer Zellen (v.a. Lymphozyten) mittels DGZ gewonnen (DGZ Fraktion). Bei Tonsillen von Kindern werden  $210 \pm 111 \times 10^6$  Z erhalten, bei Tonsillen von Erwachsenen  $1158 \pm 345 \times 10^6$  Z. Dieser Unterschied ist hauptsächlich auf die erhöhte

Ausgangsmenge an tonsillärem Gewebe bei erwachsenen Spendern zurückzuführen. Entsprechend dem prozentualen Anteil an B-Zellen beträgt die Anzahl B-Zellen in der DGZ Fraktion bei Tonsillen von Kindern  $114 \pm 53 \times 10^6$  Z und bei Tonsillen von Erwachsenen  $404 \pm 187 \times 10^6$  Z. Als Referenz zu den Daten von Tonsillen enthält ein Buffy Coat  $3277 \pm 1737 \times 10^6$  Z, davon  $178 \pm 115 \times 10^6$  B-Zellen.

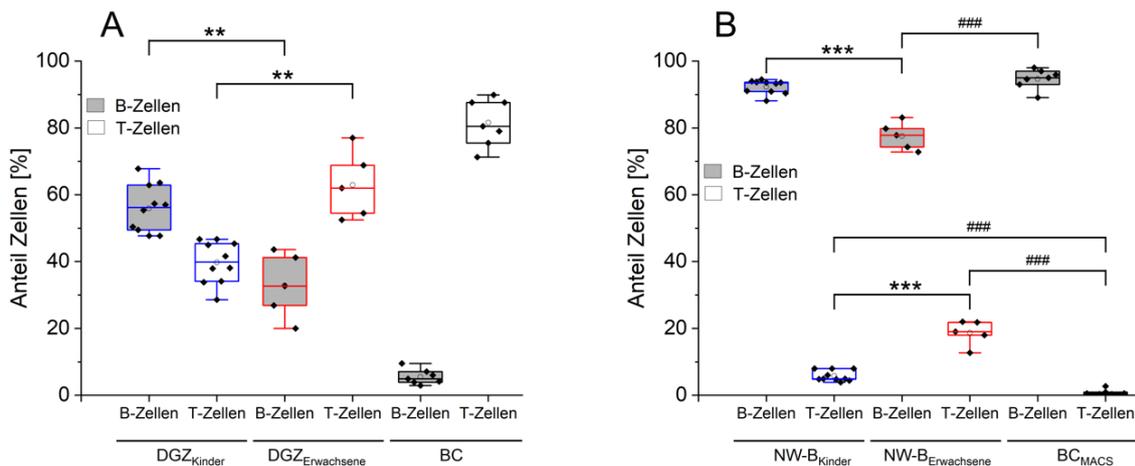
Mittels Nylon Wolle werden die tonsillären B-Zellen im entwickelten Isolationsprotokoll spezifisch aufgereinigt (NW-B Fraktion). Die Zellausbeute in der NW-B Fraktion beträgt bei Tonsillen von Kindern  $97 \pm 76 \times 10^6$  Z (Median  $71 \times 10^6$  Z) und bei tonsillärem Gewebe von Erwachsenen  $348 \pm 177 \times 10^6$  Z (Median  $361 \times 10^6$  Z). Die korrespondierende Zellausbeute bei einer MACS basierten Isolation aus dem Buffy Coat ( $BC_{MACS}$ ) liegt bei  $34 \pm 18 \times 10^6$  Z (Median  $35 \times 10^6$  Z). Da auch nach der Aufreinigung ein Anteil kontaminierender T-Zellen in der B-Zell Fraktion enthalten ist, reduziert sich die Ausbeute reiner B-Zellen in der B-Zell Fraktion unter Berücksichtigung der Reinheit leicht auf  $90 \pm 71 \times 10^6$  Z (Median  $64 \times 10^6$  Z) für Tonsillen von Kindern, deutlich auf  $270 \pm 139 \times 10^6$  Z (Median  $263 \times 10^6$  Z) für Tonsillen von Erwachsenen und sehr leicht auf  $32 \pm 17 \times 10^6$  Z (Median  $34 \times 10^6$  Z) für Buffy Coats. Der Unterschied in der Ausbeute reiner B-Zellen zwischen den drei untersuchten Ausgangsmaterialien ist jeweils statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Ausbeute reiner B-Zellen ist bei Tonsillen von Kindern um den Faktor 3 erniedrigt im Vergleich zu Tonsillen von Erwachsenen. Dieser Unterschied ist durch die vierfach erhöhte Ausgangsmenge an tonsillärem Gewebe bei erwachsenen Spendern zu erklären, wobei die Tatsache, dass Tonsillen von Erwachsenen einen geringeren Anteil B-Zellen enthalten, den Unterschied in der Ausbeute zu einem gewissen Maß ausgleicht. Dieser Effekt wird bei einem Vergleich der relativen B-Zellausbeute, also die gewonnene Anzahl B-Zellen bezogen auf die eingesetzte Ausgangsmenge Gewebe, deutlicher. So können aus tonsillärem Gewebe von Kindern  $72 \pm 41 \times 10^6$  Z/g im Vergleich zu  $57 \pm 21 \times 10^6$  Z/g bei Tonsillen von Erwachsenen isoliert werden. Dieser Unterschied ist auf den höheren Anteil B-Zellen im tonsillären Gewebe von Kindern zurückzuführen. Tonsillen von erwachsenen Spendern erreichen die mit Abstand höchste B-Zell Ausbeute pro Isolation und sind damit am geeignetsten, wohingegen Buffy Coats mit einer um Faktor 3 geringeren Zellausbeute als Tonsillen von Kindern die geringste B-Zell Ausbeute pro Isolation liefern. Die im Vergleich geringe B-Zell Ausbeute aus Blut (Buffy Coats) ist aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung des Gewebes, v.a. wegen

des geringen Anteils an B-Zellen im Blut, erwartbar (Autissier et al., 2010; Cobleigh et al., 1980; Giesecke et al., 2014; Morbach et al., 2010; Perez-Andres et al., 2010).

Wichtig für die Evaluation der Isolationsprotokolle für Tonsillen und Blut ist auch die Wiederfindungsrate der B-Zellen, also das Verhältnis der nach der Isolation erhaltenen B-Zellen (wiedergefundene B-Zellen) zu den eingesetzten B-Zellen aus dem Ausgangsmaterial des Spenders (siehe Tabelle 7-4 bis Tabelle 7-6). Die Wiederfindungsrate der B-Zellen für die Aufreinigung von tonsillärem Gewebe mittels Nylon Wolle ( $74,1 \pm 34,0\%$  für Tonsillen von Kindern und  $69,8 \pm 21,7\%$  für Tonsillen von Erwachsenen) ist statistisch sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) höher und deutlich konsistenter im Vergleich zu der MACS basierten Isolation aus dem Buffy Coat. Hier beträgt die Wiederfindungsrate lediglich  $26,6 \pm 21,5\%$ . Auch wird eine schlechte Reproduzierbarkeit des Isolationsprotokolls deutlich, denn die Wiederfindungsrate variiert mit Werten zwischen 7,8 und 72,7% sehr stark zwischen den Spendern.

Die isolierten B-Zellen weisen sowohl nach dem Nylon Wolle basierten als auch nach dem MACS basierten Isolationsprotokoll mit  $> 90\%$  exzellente Viabilitäten auf (siehe Tabelle 7-4 bis Tabelle 7-6). Auch die Tatsache, dass das Isolationsprotokoll keine Abnahme der Viabilität induziert sowie die hohe Reproduzierbarkeit charakterisiert beide Isolationsmethoden als für die Zellen sanfte Isolationsprotokolle. Die MACS basierte Isolation aus dem Buffy Coat erreicht mit  $96,6 \pm 1,7\%$  statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Viabilitäten im Vergleich zu der Aufreinigung mittels Nylon Wolle. Das MACS basierte Protokoll zeichnet sich durch eine geringe Anzahl experimenteller Schritte und eine leichte Handhabung aus, was eine hohe Zellviabilität begünstigt.

Neben B-Zellen enthalten die hier untersuchten Gewebe charakteristischerweise einen bedeutenden Anteil an T-Zellen (Autissier et al., 2010; Boyaka et al., 2000; Cobleigh et al., 1980; Sesterhenn et al., 1977). Somit kann erwartet werden, dass T-Zellen die zelluläre Hauptkontamination im Ausgangsgewebe und auch in der final aufgereinigten B-Zell Fraktion darstellen. In Abbildung 4-3 ist die Entwicklung des Anteils B- und T-Zellen im Verlauf des Isolationsprotokolls in den verschiedenen Fraktionen dargestellt.



**Abbildung 4-3:** Entwicklung des Anteils B- und T-Zellen im Verlauf des Isolationsprotokolls in den verschiedenen Fraktionen.

B- und T-Zell Verteilung in den Fraktionen der A) mononuklearen Zellen/im Buffy Coat (DGZ/BC) und B) B-Zellen nach Aufreinigung mittels Nylon Wolle/MACS (NW-B/BC<sub>MACS</sub>). Blau: Tonsillen von Kindern (n = 10), rot: Tonsillen von Erwachsenen (n = 5), schwarz: Blut (Buffy Coat) (n = 7). Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen von Kindern und Tonsillen von Erwachsenen ist mit \*\* (sehr signifikant) und \*\*\* (hoch signifikant) gekennzeichnet. Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen (von Kindern oder Erwachsenen) und Blut (Buffy Coat) ist mit ### (hoch signifikant) gekennzeichnet. Abbildung nach (Helm et al., 2021), Copyright Elsevier, modifiziert.

Interessant ist bereits die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung der DGZ Fraktion von Kindern und Erwachsenen, die direkt die Zusammensetzung des tonsillären Gewebes des individuellen Spenders repräsentiert. Tonsillen von Kindern weisen mit  $55,9 \pm 6,8\%$  einen statistisch sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) höheren Anteil B-Zellen im Vergleich zu Tonsillen von Erwachsenen ( $32,9 \pm 8,8\%$ ) auf. Damit korrelierend ist der Anteil an T-Zellen bei Tonsillen von Kindern ( $39,8 \pm 6,0\%$ ) statistisch sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) geringer als bei Tonsillen von Erwachsenen ( $63,0 \pm 9,1\%$ ). Diese Unterschiede sind auf die unterschiedliche Entwicklung des Immunsystems von Kindern und Erwachsenen zurückzuführen und altersabhängige Veränderungen des Immunsystems, beispielsweise bezüglich der B- und T-Zell Zusammensetzung oder von B-Zell Subtypen, sind bekannt (Bergler et al., 2001; Booth & Toapanta, 2021; Cobleigh et al., 1980; J. Lee et al., 2016; Valles-Ayoub et al., 1990). Die Ergebnisse stimmen mit publizierten Daten zu der zellulären Zusammensetzung von Tonsillen überein (Alexopoulos et al., 1976; Bergler et al., 2001; Musiatowicz et al., 2001; Sesterhenn et

al., 1977; Wohlford et al., 2018), auch wenn die Variation aufgrund der Individualität des Immunsystems der Spender hoch ist. Der Anteil an B-Zellen im Buffy Coat von erwachsenen Spendern liegt bei  $5,5 \pm 2,1\%$  und der Anteil T-Zellen bei  $81,6 \pm 6,5\%$ . Dieser Unterschied ist auf das unterschiedliche Gewebe zurückzuführen und entspricht publizierten Referenzwerten (Alexopoulos et al., 1976; Autissier et al., 2010; Cobleigh et al., 1980; Sesterhenn et al., 1977). Tonsillen von Erwachsenen bieten somit einen um Faktor 6 erhöhten relativen Anteil an B-Zellen, bei Tonsillen von Kindern ist dieser sogar um Faktor 10 erhöht. Dies bekräftigt die hohe Eignung von Tonsillen für die Isolation primärer humaner B-Zellen.

Die MACS basierte Aufreinigung aus dem Buffy Coat erreicht mit  $94,7 \pm 2,7\%$  die höchste Reinheit der aufgereinigten B-Zell Fraktion. Der Anteil kontaminierender T-Zellen ist mit  $< 1\%$  marginal, während die mittels Nylon Wolle aufgereinigte B-Zell Fraktion aus Tonsillen mit ca.  $6\%$  bzw.  $19\%$  (Tonsillen von Kindern bzw. Erwachsenen) einen bedeutenden und statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höheren Anteil verbleibender T-Zellen enthält. Auffällig bei der MACS basierten Isolation ist der erhöhte Anteil T-Zellen ( $2,7\%$ ) in der B-Zell Fraktion bei Spender BC5, jedoch liegt auch bei diesem Spender die Reinheit der B-Zell Fraktion in dem erwartbaren Rahmen (Moore et al., 2019; Sims & Lipsky, 2006). Die aus Tonsillen von Kindern aufgereinigte B-Zell Fraktion weist mit  $92,3 \pm 2,0\%$  im Vergleich zu Tonsillen von Erwachsenen ( $77,6 \pm 3,7\%$ ) eine statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) höhere Reinheit auf. Die selektive Aufreinigung von B-Zellen mittels Nylon Wolle scheint in der Effektivität der Separation limitiert, wenn die Zellsuspension eine große Menge T-Zellen enthält, wie es bei Tonsillen von Erwachsenen der Fall ist. Die zugrunde liegende mechanistische Basis der selektiven zellulären Retention in der Nylon Wolle ist nicht bekannt. Jedoch ist beschrieben, dass spezifische T-Zell Subtypen selektiv in der Nylon Wolle zurückgehalten werden (Arala-Chaves et al., 1978; Stout & Herzenberg, 1975). Um für weiterführende Anwendungen hochreine B-Zell Kulturen zu erhalten und direkte oder indirekte Effekte kontaminierender Zellen auszuschließen, ist es notwendig, alle T-Zellen vollständig zu entfernen, unabhängig von dem Ausgangsgewebe oder dem Isolationsprozess (Moore et al., 2019; Sims & Lipsky, 2006). Dies kann durch die Zugabe von Ciclosporin A in das Kulturmedium erreicht werden (Flores et al., 2019; Jenkins et al., 1988). Am Rand ist anzumerken, dass die Aufreinigung mittels Nylon Wolle eine höhere Reinheit in der B-Zell Fraktion erreicht im Vergleich zu der ebenfalls erhaltenen T-Zell Fraktion, deren Reinheit (in diesem Fall der Anteil T-Zellen) bei ca. 60 und

80% liegt (entsprechend für Tonsillen von Kindern und Erwachsenen). Dies zeigt, dass Nylon Wolle eine einfache Methode für die Trennung von B- und T-Zellen darstellt, B-Zellen jedoch mit einer höheren Reinheit aufgereinigt werden können.

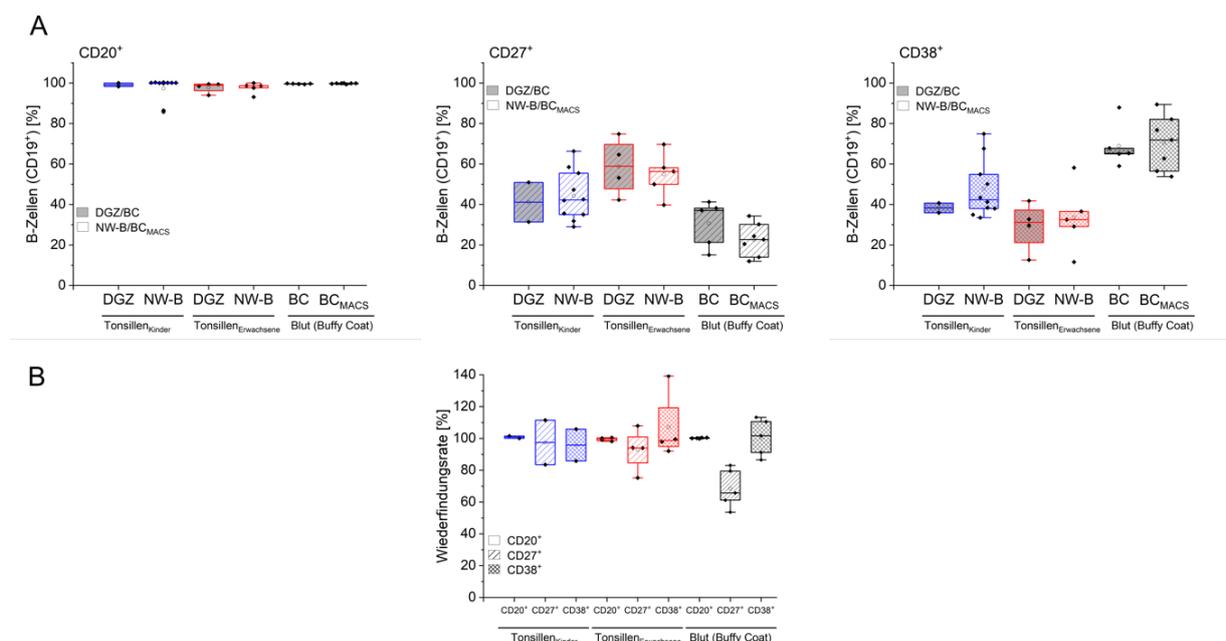
Zusammenfassend zeigen Tonsillen von Kindern den höchsten relativen Anteil B-Zellen im Ausgangsgewebe. Aufgrund der erhöhten Ausgangsmenge tonsillären Materials ist die B-Zell Ausbeute pro Isolation bei erwachsenen Spendern jedoch am höchsten. Blut (Buffy Coats) enthält nur einen geringen Anteil B-Zellen und liefert somit die geringste Zellausbeute. Das MACS basierte Isolationsprotokoll erreicht jedoch die höchste Reinheit der B-Zellen und eine marginale Kontamination mit T-Zellen. Die höhere Wiederfindungsrate und die damit höhere Effektivität der Aufreinigung mittels Nylon Wolle steht somit der geringeren Reinheit der isolierten B-Zellen, zumindest bei erwachsenen Spendern, entgegen.

#### 4.4.3. Charakterisierung primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen und Blut

Neben der Ausbeute, Reinheit und Viabilität der isolierten B-Zellen ist auch die Erhaltung zellulärer Oberflächenproteine und -rezeptoren ein kritischer Faktor. Oberflächenrezeptoren sind essenziell für weiterführende *in vitro* Anwendungen, denn sie sind u.a. verantwortlich für die Signaltransduktion, Reifung, Aktivierung/Stimulation, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen (Auladell et al., 2019; Ettinger et al., 2005; Maddaly et al., 2010; Moens et al., 2016). Des Weiteren erlauben sie eine korrekte Identifizierung und Klassifizierung in verschiedene B-Zell Subtypen anhand der Expression von CD-Markern. Dementsprechend ist für ein Isolationsprotokoll auch die Erhaltung der spezifischen B-Zell Subtypen Komposition ein kritischer Faktor. Daher wird zunächst die Komposition des Ausgangsgewebes hinsichtlich der B-Zell Subtypen anhand der CD20, CD27 und CD38 Expression charakterisiert. Nachfolgend wird der Einfluss des Isolationsprotokolls auf die einzelnen B-Zell Subtypen analysiert. Da der CD38<sup>++</sup> und der CD27<sup>++</sup> Phänotyp, charakteristisch für Plasmazellen, nur marginal (< 3%) in den Geweben vorhanden ist, werden für diese Phänotypen keine Daten gezeigt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-4 dargestellt, Tabelle 7-7 bis Tabelle 7-9 enthalten die individuellen Spenderdaten für die untersuchten Gewebe.

Unabhängig von dem Gewebe weisen nahezu alle Zellen einen CD20<sup>+</sup> Phänotyp auf, übereinstimmend mit publizierten Daten (J. Lee et al., 2016; Perez-Andres et al., 2010). Dies lässt sich durch die ubiquitäre Expression von CD20 in fast allen Stadien der B-Zell

Entwicklung erklären, die nur während der terminalen Differenzierung in Plasmazellen verloren geht (Arpin et al., 1995; Kalina et al., 2019; Pavlasova & Mraz, 2020; Perez-Andres et al., 2010; Withers et al., 2007). Somit können sowohl Tonsillen als auch Blut durch eine äußerst geringe Abundanz von Plasmazellen ( $CD20^-$ ) charakterisiert werden.



**Abbildung 4-4:** Charakterisierung von B-Zellen in verschiedene B-Zell Subtypen anhand der CD20, CD27 und CD38 Expression in den unterschiedlichen Geweben/Fraktionen.

A) Verteilung der B-Zell Subtypen ( $CD20^+$ ,  $CD27^+$  und  $CD38^+$  Zellen) in der Fraktion der B-Zellen ( $CD19^+$ ) im Verlauf des Isolationsprotokolls. B) Wiederfindungsrate der B-Zell Subtypen ( $CD20^+$ ,  $CD27^+$  und  $CD38^+$  Zellen).  $n \geq 2$ . Abbildung nach (Helm et al., 2021), Copyright Elsevier, modifiziert.

Der  $CD27^+$  Subtyp zeigt eine breite Verteilung innerhalb der Ausgangsgewebe auf, die auf die bekannte Spendervariation zurückzuführen ist (Giesecke et al., 2014; J. Lee et al., 2016). Bei  $CD27^+$  Zellen handelt es sich um Antigen-spezifische B-Zellen (Gedächtniszellen oder GC Zellen). Tonsillen von Erwachsenen enthalten einen deutlich höheren Anteil  $CD27^+$  Zellen im Vergleich zu Tonsillen von Kindern, die deutlich mehr  $CD27^-$  Zellen (naive B-Zellen) aufweisen, die noch keinen Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatten, und damit das sich in der Entwicklung befindliche Immunsystem von Kindern repräsentieren. Vergleichbar damit ist für Blut von Kindern in der Literatur nur ein äußerst geringer Anteil  $CD27^+$  Zellen

beschrieben, der sich mit zunehmendem Alter erhöht (Carsetti et al., 2022; Grimsholm et al., 2020; Morbach et al., 2010). Blut (Buffy Coats) der untersuchten erwachsenen Spender enthält mit ca. 63% hauptsächlich CD27<sup>-</sup> Zellen (naive B-Zellen), vergleichbar mit publizierten Daten (Carsetti et al., 2022; Grimsholm et al., 2020; Morbach et al., 2010; Pérez et al., 2014; Perez-Andres et al., 2010). Somit können Blut und Tonsillen von Kindern als geeignete Quelle für die Gewinnung naiver B-Zellen charakterisiert werden, während Tonsillen von Erwachsenen die Isolation einer hohen Anzahl Antigen-spezifischer B-Zellen (CD27<sup>+</sup> Zellen) erlauben.

Der CD38<sup>+</sup> Phänotyp ist charakteristisch für naive und GC Zellen. Auffällig ist die breite Verteilung dieses Phänotyps bei tonsillärem Gewebe von Erwachsenen, die auf der unterschiedlichen, altersabhängigen Entwicklung des Immunsystems beruht könnte. So ist beschrieben, dass der Anteil CD38<sup>+</sup> bzw. GC Zellen in Tonsillen mit zunehmendem Alter abnimmt, wohingegen sich der Anteil Gedächtniszellen (CD38<sup>-</sup>) erhöht (Bergler et al., 2001; J. Lee et al., 2016). Dieser Zusammenhang ist in den individuellen Spenderdaten (siehe Tabelle 7-8) nicht erkennbar, was durch die geringe Anzahl der untersuchten Spender und die Spendervariabilität bedingt sein könnte. Blut (Buffy Coats) zeigt eine um Faktor 2 erhöhte Abundanz von CD38<sup>+</sup> Zellen, die in dem Fall von Blut auf naive B-Zellen zurückzuführen ist und mit den erhaltenen Daten zu dem CD27<sup>+</sup> Phänotyp übereinstimmt.

Der Einfluss des Isolationsprotokolls auf die B-Zell Subtypen Komposition kann anhand der Wiederfindungsrate für den spezifischen Phänotyp analysiert werden (siehe Abbildung 4-4). Die Wiederfindungsrate für den CD20<sup>+</sup> Phänotyp ist sowohl bei der Aufreinigung mittels Nylon Wolle als auch bei der MACS basierten Isolation mit konsistenten Werten sehr nahe 100% und einer sehr geringen Variation optimal. Auch für den CD38<sup>+</sup> Phänotyp erreichen beide Protokolle eine Wiederfindungsrate von ca. 100%, jedoch mit einer breiteren Verteilung. Mit einer Wiederfindungsrate der CD27<sup>+</sup> Zellen von > 90% mittels Nylon Wolle zeigt sich ein minimaler Verlust dieses Phänotyps während der Isolation. Die MACS basierte Aufreinigung zeigt für den CD27<sup>+</sup> Phänotyp nur eine deutlich reduzierte Wiederfindungsrate von ca. 66% mit einem minimalen Wert von 54% bei Spender BC4. Diese geringe Wiederfindungsrate könnte zumindest teilweise zu der geringen Anzahl isolierter B-Zellen aus dem Blut (Buffy Coat) und zu der geringen B-Zell Wiederfindungsrate des negativen, MACS basierten Isolationsprotokolls beitragen. Die spezifische Zusammensetzung der in dem MACS Kit verwendeten Antikörper zur Abtrennung der kontaminierenden Zellen ist nicht bekannt, was

eine weitere Interpretation der Ergebnisse erschwert. Die Aufreinigung mittels Nylon Wolle stellt somit eine Methode dar, die die Isolation aller untersuchten Phänotypen ermöglicht und somit die Komposition der B-Zell Subtypen nicht modifiziert, wohingegen die negative, MACS basierte Methode einen Verlust von CD27<sup>+</sup> B-Zellen zeigt.

#### 4.5. Zusammenfassung und Ausblick

Eine verlässliche und effiziente Isolation primärer humaner B-Zellen legt die Basis für weiterführende Anwendungen, wie beispielsweise die kontrollierte *in vitro* Stimulation, Expansion (Proliferation) und Differenzierung, die ein großes Potential für biotechnologische und medizinische Anwendungen bieten. Dazu wird in dieser Arbeit erfolgreich ein kostengünstiges Zwei-Schritt Protokoll, bestehend aus einer DGZ und einer Aufreinigung mittels Nylon Wolle, für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen etabliert. B-Zellen können mit einer Reinheit von ca. 94 bzw. 78% (Tonsillen von Kindern bzw. Erwachsenen) aufgereinigt werden, unter Erhaltung der spezifischen B-Zell Subtypen Komposition des Ausgangsgewebes. Der Goldstandard der B-Zell Isolation, eine kostenintensive, MACS basierte Aufreinigung aus Blut (Buffy Coat) erreicht eine höhere Reinheit (ca. 95%), geht jedoch mit einem Verlust von Zellen des CD27<sup>+</sup> Subtyps einher, mit einer Wiederfindungsrate von lediglich ca. 66%. Ein entscheidender Faktor für die Isolation primärer humaner B-Zellen ist die Zellausbeute, denn für weiterführende *in vitro* Anwendungen ist die zur Verfügung stehende Anzahl Zellen von einem Spender ein limitierender Faktor. Diese bestimmt die Zahl der nachfolgenden Experimente, die mit identischen Zellen eines Spenders durchführbar sind, was die Vergleichbarkeit und Aussagekraft deutlich erhöht. Tonsillen von Erwachsenen ermöglichen im Vergleich zu Blut eine um Faktor 9 erhöhte Zellausbeute pro Isolation, vor allem aufgrund eines erhöhten Anteils B-Zellen im Ausgangsgewebe und einer höheren Wiederfindungsrate. Somit zeigen Tonsillen eine hohe Eignung für die Isolation primärer humaner B-Zellen und können als alternative oder komplementäre Quelle zu Blut verwendet werden. Tonsillen werden zudem häufig bei sehr jungen Patienten (Kinder < 5 Jahre) entfernt, deren Immunsystem nicht voll ausgereift ist. Damit ermöglichen Tonsillen eine Isolation von B-Zellen aus verschiedenen, altersabhängigen Stufen der Entwicklung des humanen Immunsystems, was sich auch in einer unterschiedlichen B-Zell Subtypen Komposition zeigt. So können Tonsillen von Kindern und Blut in dieser Arbeit als geeignet für die Gewinnung naiver B-Zellen charakterisiert werden, während Tonsillen von

Erwachsenen die Isolation einer hohen Anzahl Antigen-spezifischer B-Zellen (CD27<sup>+</sup> Zellen) erlauben.

Die verlässliche und effiziente Bereitstellung von B-Zellen aus unterschiedlichen Quellen ermöglicht eine tiefergehende Forschung. Wichtige Fragestellungen sind hier die Aufklärung der komplexen zugrunde liegenden zellulären Mechanismen der B-Zell Entwicklung und Funktionalität, was folglich auch ein besseres Verständnis dieser Vorgänge *in vivo* erreicht. Dies würde nachfolgend eine Etablierung geeigneter biotechnologischer Methoden für eine zielgerichtete und kontrolliert *in vitro* Aktivierung/Stimulation, Expansion (Proliferation) und Differenzierung primärer humaner B-Zellen erlauben. Auch die spezifische genetische Modifikation von B-Zellen (z.B. zur Steuerung der Differenzierung oder zur rekombinanten Proteinproduktion) ist ein weiterer vielversprechender Ansatz für künftige Anwendungen.

Die spezifische Bereitstellung verschiedener B-Zell Subtypen ermöglicht eine gezielte Ausrichtung nachfolgender *in vitro* Anwendungen für biotechnologische und medizinische/klinische Zwecke, beispielsweise für die Produktion rekombinanter Antikörper als Biopharmazeutika, oder für die Nutzung von *in vitro* genetisch modifizierten B-Zellen als langlebige, zellbasierte Therapeutika.

## 5. Transiente Transfektion primärer humaner T-Lymphozyten

### 5.1. Einleitung

T-Lymphozyten (T-Zellen) sind ein essenzieller Bestandteil des humanen Immunsystems und stellen zusammen mit B-Zellen die wesentlichen zellulären Komponenten des adaptiven Immunsystems dar (Marshall et al., 2018). Auf ihrer Oberfläche tragen T-Zellen hochvariable, spezifische T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor*, TCR), die spezifische Antigene aus der Umwelt, von (potenziellen) Pathogenen oder von Tumorzellen erkennen und eine Eliminierung der präsentierenden Zellen einleiten (Kumar et al., 2018; Marshall et al., 2018; Shah et al., 2021). Damit sind sie verantwortlich für die Erkennung und Bekämpfung von Infektionen und Tumoren (Olden et al., 2018). Humane T-Zellen entstehen im Knochenmark und migrieren in den Thymus für die Reifung, Selektion und Differenzierung in unterschiedliche Subtypen mit vielfältigen Funktionen (Kumar et al., 2018). So sind T-Zellen weiter verantwortlich für die Produktion von Zytokinen, die Erzeugung des immunologischen Gedächtnisses und sie erfüllen regulatorische Funktionen in der Immunantwort (Selbsttoleranz) (Kumar et al., 2018; Shah et al., 2021). T-Zellen spielen eine kritische Rolle in allergischen Erkrankungen, chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (Kumar et al., 2018).

Aufgrund ihrer großen funktionalen Vielfältigkeit werden T-Zellen routinemäßig in der Forschung verwendet und besitzen ein bedeutendes Potential für biotechnologische und medizinische Anwendungen. Ein vielversprechendes Beispiel ist die CAR-T-Zell Immuntherapie für die Behandlung von hämatologischen und soliden Tumoren (C. Zhang et al., 2017). Die hohe Effizienz und damit einhergehend der starke klinischen Erfolg der anti-CD19 CAR-T-Zell Therapie gegen B-Zell Leukämien (z.B. akute lymphatische Leukämie, chronische lymphatische Leukämie, Non-Hodgkins-Lymphom) führte bereits zu einer Zulassung durch die regulatorischen Behörden FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) und EMA (*European Medicines Agency*) (Harris et al., 2021; Hay & Turtle, 2017; Sterner & Sterner, 2021). In dieser autologen, *ex vivo* Zelltherapie werden T-Zellen aus einem Patienten isoliert und genetisch modifiziert, sodass sie chimäre Antigenrezeptoren (*chimeric antigen receptor*, CAR) exprimieren. CARs sind synthetische, optimierte Rezeptoren, die gegen spezifische Oberflächenproteine auf Tumorzellen gerichtet sind (Harris et al., 2021; Hay & Turtle, 2017). Nach der Rückführung der CAR-T-Zellen in den Patienten bindet der CAR der genetisch modifizierten T-Zellen das spezifische Ziel-Antigen auf der Zelloberfläche der Tumorzellen.

Dies führt zu einer T-Zell Aktivierung und Eliminierung der Tumorzellen und induziert somit eine starke anti-tumorale Immunantwort (Harris et al., 2021; Sterner & Sterner, 2021).

Der Einsatz von T-Zellen in medizinischen Anwendungen, beispielsweise in der CAR-T-Zell Therapie, setzt eine effiziente genetische Modifikation primärer humaner T-Zellen voraus. Eine hocheffiziente Transfektion (Transfer von genetischem Material in eukaryotische Zellen) von T-Zellen wird durch virale Vektoren erreicht. So wird der Gentransfer zur Herstellung der in den klinischen Behandlungen genutzten CAR-T-Zellen durch eine Transduktion mittels Gammaretroviren oder Lentiviren erreicht (Bulcha et al., 2021; Harris et al., 2021; C. Zhang et al., 2017). Jedoch besitzen virale Vektoren kritische Limitierungen wie eine Zytotoxizität, Immunogenität, Genotoxizität beispielsweise durch Insertion in funktionale Gene, Insertions-Mutationen oder Aktivierung von Onkogenen, eine Limitierung in der DNA-Transportkapazität und eine große Variation in der Transduktionseffizienz zwischen individuellen Patienten (Bulcha et al., 2021; David & Doherty, 2017; Harris et al., 2021; Kavanagh et al., 2021; Olden et al., 2018; C. Zhang et al., 2017). Weiter ist für die Herstellung viraler Vektoren für klinische Anwendungen ein aufwendiger (zeit- und kostenintensiver) Herstellungsprozess mit erhöhten regulatorischen Anforderungen (z.B. aufwendige Qualitätskontrollen) notwendig, der zudem eine hohe Variabilität aufweisen kann (Kavanagh et al., 2021; Olden et al., 2018; Rafiq et al., 2020; C. Zhang et al., 2017).

Die Nachteile viraler Vektoren rücken die Methoden des nicht-viralen Gentransfers in den Vordergrund. Diese zeichnen sich durch ein hohes Sicherheitsprofil, eine geringe Immunogenität, geringe Kosten, eine unlimitierte DNA-Transportkapazität und eine hohe Flexibilität und einfache Anpassung an unterschiedliche Zelltypen und an das genetische Material (z.B. Typ und Größe) aus (Hardee et al., 2017; Kavanagh et al., 2021; Olden et al., 2018). In T-Zellen, die als schwer zu transfizierende Primärzellen angesehen werden, erreicht der nicht-virale Gentransfer jedoch oftmals nur geringe Transfektionseffizienzen (Harris et al., 2021; Olden et al., 2018; Rahimmanesh et al., 2020). Nicht-virale Transfektionsmethoden können in physikalische/mechanische und chemische Methoden unterteilt werden.

In der Gruppe der physikalischen/mechanischen Methoden eignet sich besonders die Elektroporation für primäre T-Zellen aufgrund hoher erreichbarer Transfektionseffizienzen im Bereich von 50 – 80% (L. Liu et al., 2011; Z. Zhang et al., 2018). Diese Methode ist einfach in der Handhabung, schnell und günstig, auf der anderen Seite jedoch schwierig in der

Maßstabsvergrößerung (Scale-up), besitzt eine hohe Zytotoxizität (Überlebensrate der Zellen zwischen 5 und 50%) und benötigt deshalb hohe Zellzahlen (Harris et al., 2021; L. Liu et al., 2011; Z. Zhang et al., 2018). Ein weiterer kritischer Faktor ist der Einfluss der Elektroporation auf wichtige zelluläre Eigenschaften und Funktionen. So sind für Immunzellen Veränderungen in dem Genexpressionsprofil und der Effektorfunktion (z.B. bezüglich des Aktivierungsstatus und der Sekretion von Zytokinen), eine reduzierte Proliferationsrate und eine reduzierte Wirksamkeit *in vivo* beschrieben (Beane et al., 2015; DiTommaso et al., 2018; M. Zhang et al., 2014). Auch weitere Methoden wie z.B. Sonoporation, Magnetofektion und Mikroinjektion weisen neben hohe Kosten keine praktische Eignung für funktionale Gentransfer-Anwendungen und die Herstellung von zellbasierten Therapeutika auf (Bono et al., 2020; Kavanagh et al., 2021).

Die Gruppe der chemischen Methoden beinhaltet kationische Lipide/Liposomen (Lipofektion), kationische Polymere (Polyfektion) und anorganische (Lipid-) Nanopartikel (Bono et al., 2020; Kavanagh et al., 2021). Die chemische Transfektion mittels der unterschiedlichen Reagenzien beruht auf einer Komplexbildung der negativ geladenen Nukleinsäuren mit einem Überschuss des positiv geladenen chemischen Reagenz. Die positive Nettoladung der entstehenden Komplexe (Lipoplexe oder Polyplexe) erlaubt eine attraktive elektrostatische Interaktion mit der negativ geladenen Zellmembran, was zu einer Internalisierung in die Zelle über Endozytose oder Phagozytose führt (Blackstock et al., 2020; O'Flaherty et al., 2020; Olden et al., 2018). Lipofektion und Polyfektion werden routinemäßig mit hohem Erfolg für den Gentransfer in verschiedene Zelllinien verwendet (Bono et al., 2020; Olden et al., 2018). Im Fall von primären T-Zellen erreichen sie nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz, oftmals einhergehend mit einer hohen Zytotoxizität (Harris et al., 2021; Kavanagh et al., 2021). So zeigen T-Zellen eine sehr geringe Transfizierbarkeit (< 10% Transfektionseffizienz) durch Lipofektion, da die Lipoplexe nicht in die T-Zellen eindringen können (Harris et al., 2021; Rahimmanesh et al., 2020; N. Zhao et al., 2012).

Polyethylenimin (PEI), der Goldstandard in der chemischen Transfektion mittels Polykationen (Bono et al., 2020; Delafosse et al., 2016; Gutiérrez-Granados et al., 2018), induziert bei primären T-Zellen nur eine minimale Transfektionseffizienz von < 5% (Olden et al., 2018; O'Neill et al., 2001; Schallon et al., 2012). PDMAEMA (Poly(2-dimethylamino) ethyl methacrylate) ist ein weiteres, weit verbreitetes und effizientes Transfektionsagens in der Gruppe der kationischen Polymere (Cherng et al., 1996; Olden et al., 2018; Synatschke et al.,

2011). Auf PDMAEMA basierende Nanosterne zeigen ein großes Potential für die Transfektion primärer T-Zellen. So konnte in Jurkat-Zellen (humane T-Zelllinie aus einem akuten T-Zell Leukämie Patienten (U. Schneider et al., 1977), eine routinemäßig verwendete Modell-Zelllinie für primäre T-Zellen) eine deutlich erhöhte Transfektionseffizienz (bis zu 50%) im Vergleich zu linearem PEI (l-PEI) erreicht werden (Schallon et al., 2012). In primären T-Zellen konnte ein unterschiedlicher Nanostern eine Transfektionseffizienz von ca. 13% erreichen (Raup et al., 2016).

## 5.2. Problemstellung und Zielsetzung

Die Nutzung genetisch modifizierter T-Zellen in biotechnologischen und medizinischen Anwendungen setzt einen effizienten Gentransfer in diese schwierig zu transfizierenden Primärzellen voraus. Das Ziel dieser Arbeiten ist ein Nachweis der prinzipiellen Durchführbarkeit/Machbarkeit (*proof-of-concept*) einer genetischen Modifikation primärer humaner T-Zellen mittels chemischer Transfektion unter Nutzung eines sternförmigen, 24-armigen Polymer basierend auf PDMAEMA („Nanostern“). Ein vorausgehendes, erfolgreiches *proof-of-concept* erlaubt darauf aufbauend eine weitere Anpassung und Optimierung der Polyfektion mittels des Nanosterns. Ähnliche, auf PDMAEMA basierende Nanosterne zeigen sowohl für Jurkat-Zellen als auch für primäre humane T-Zellen vielversprechende Ergebnisse und erreichen eine hohe Transfektionseffizienz (Raup et al., 2016; Schallon et al., 2012). Für den hier verwendeten Nanostern wurde bereits für Jurkat-Zellen, eine Modellzelllinie für T-Zellen, ein effizientes Transfektionsprotokoll etabliert (Riedl et al., 2018). In dieser Arbeit wird das Protokoll auf primäre humane T-Zellen, isoliert aus drei individuellen Spendern, übertragen und hinsichtlich der Eignung evaluiert.

Als pDNA wird das Plasmid pEGFP-N1 für einen einfachen Nachweis der Transfektion verwendet. Dieses Plasmid codiert für die transiente, intrazelluläre Expression von EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*), welche schnell und einfach durchflusszytometrisch detektiert und quantifiziert werden kann.

Für die Übertragung des Protokolls auf primäre humane T-Zellen wird zum einen die weit verbreitete Standard Polyplex-Transfektion (Gutiérrez-Granados et al., 2018) durchgeführt. In dieser Methode wird die pDNA zusammen mit einem Überschuss des Nanosterns inkubiert und es kommt zur Bildung positiv geladenen Polyplexe. Diese werden in einem nachfolgenden Schritt zu den Zellen gegeben und unter statischen Bedingungen mit diesen inkubiert. Nach der

Transfektion werden die Polyplexe/der Transfektions-Cocktail aufgrund der Zytotoxizität des Polymers durch Zentrifugation entfernt und die Zellen unter geeigneten Bedingungen kultiviert (Gutiérrez-Granados et al., 2018). Als Alternative zu dem Polyplex-Transfektionsprotokoll wird zusätzlich eine Hochzelldichte-Transfektion (HZD-Transfektion) evaluiert (Backliwal, Hildinger, Hasija, et al., 2008). Diese direkte Transfektionsmethode basiert auf einer sequenziellen Zugabe der pDNA und nachfolgend dem Polykation zu einer konzentrierten Zellsuspension. Nach einer Inkubation mit kontinuierlicher Durchmischung wird die Zellsuspension und damit auch das zytotoxische Polymer durch Zugabe von frischem Medium verdünnt (und somit nicht entfernt) und die Zellen werden unter geeigneten Bedingungen kultiviert. Dieses Transfektionsprotokoll könnte besonders für primäre T-Zellen geeignet sein, denn die Transfektion wird unter Hochzelldichte-Bedingungen ( $20 \times 10^6$  Z/mL) durchgeführt. Dies ist besonders bemerkenswert, denn die Elektroporation und speziell die Nukleofektion nutzen ebenfalls eine hoch konzentrierte Zellsuspension (10 bis  $200 \times 10^6$  Z/mL) (Huls et al., 2013; Thuille et al., 2020; M. Zhang et al., 2014) und beide sind gegenwärtig die effizientesten nicht-viralen Methoden der genetischen Modifikation primärer T-Zellen.

### 5.3. Material und Methoden

#### 5.3.1. Plasmid-DNA und Transfektionsagenz

Das Plasmid pEGFP-N1 (4,7 kb) codiert für die intrazelluläre Expression von EGFP unter der Kontrolle des CMV (*human cytomegalovirus (CMV) immediate-early*) Promotors (siehe Abbildung 6-1).

Das Plasmid wird in *Escherichia coli (E. coli) DH5 $\alpha$*  mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden amplifiziert und aufgereinigt (siehe Kapitel 6.3.11 bis Kapitel 6.3.15). Die isolierte pDNA wird in hochreinem Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit der pDNA wird spektrophotometrisch bestimmt ( $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ ) und die Qualität wird mittels Agarosegelelektrophorese ( $> 80\%$  *supercoiled* Topologie) überprüft (siehe Kapitel 6.3.16 und Kapitel 6.3.17).

Als Transfektionsagenz wird ein sternförmiges PDMAEMA (Poly(2-dimethylamino) ethyl methacrylate) mit 24 Armen („Nanostern“) verwendet (B. Chen et al., 2018). Das Molekulargewicht des kationischen Nanosterns beträgt 755 kDa. Es wird eine Stammlösung in hochreinem Wasser mit einer Konzentration von 1,82 mg/mL hergestellt.

### 5.3.2. Isolation und Kultivierung primärer humaner T-Zellen

Humanes Blut in Form von Buffy Coats von gesunden, erwachsenen Spendern wird von dem Bayerischen Roten Kreuz (München, Deutschland) bezogen. Alle Spender sind anonym. Das erhaltene Volumen Buffy Coat wird in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die mononuklearen Zellen (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) (hauptsächlich Lymphozyten) werden mittels einer DGZ spezifisch aus dem Buffy Coat aufgereinigt. Dazu werden jeweils 10 mL LSM 1077 *Lymphocyte Separation Medium* in drei 50 mL Zentrifugenröhrchen gefüllt. Darauf werden sehr vorsichtig mit einer 10 mL serologischen Pipette 10 mL Buffy Coat pro Zentrifugenröhrchen aufgetragen. Nach der DGZ (1200 x g, 20 min) befinden sich die PBMCs in der Interphase. Diese wird mittels einer langen Pasteur-Pipette geerntet, dabei werden die Zellen in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen vereinigt. Die Zellen werden mit 45 mL DPBS gewaschen und durch Zentrifugation (400 x g, 5 min) pelletiert. Die in der Probe enthaltenen Erythrozyten werden durch eine Erythrozyten-Lyse entfernt. Dazu werden die Zellen in 20 mL Erythrozyten-Lyse-Puffer (siehe Tabelle 7-12) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation auf Eis werden die Zellen durch Zugabe von 30 mL DPBS gewaschen und zentrifugiert (300 x g, 4 °C, 10 min). Das erhaltene Zellpellet wird in 10 mL 4 °C kaltem DPBS resuspendiert und die Zelldichte und Viabilität bestimmt (siehe Kapitel 5.3.5). Nach einer erneuten Zentrifugation (300 x g, 4 °C, 10 min) werden die Zellen mit einer Zelldichte von  $2,5 \times 10^6$  Z/mL in vorequilibriumiertem ( $\geq 1$  h Inkubation im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit) LymphoGrow (LG) Medium aufgenommen und in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit einem Kulturvolumen von 15 mL ausgesät. Die Kultivierung findet im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank statt. Für die mikroskopische Analyse der Zellen wird ein inverses Lichtmikroskop (CKX41) verwendet. LG stimuliert das Wachstum peripherer Blutlymphozyten und enthält neben dem Basalmedium die Supplemente FCS, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin als Antibiotika und Phytohämagglutinin als Mitogen in nicht bekannten Konzentrationen. Nach 24 h Kultivierung werden die in Suspension wachsenden PBMCs in neue Zellkulturflaschen überführt, um adhärent wachsende (Immun-) Zellen zu entfernen. Die PBMCs werden für weitere 24 h kultiviert. Nach insgesamt 48 h Kultivierung wird die Zellsuspension in 50 mL Zentrifugenröhrchen geerntet und zentrifugiert (200 x g, 5 min). Das Zellpellet wird in 30 mL 4 °C kaltem DPBS resuspendiert und die

Zelldichte und Viabilität (siehe Kapitel 5.3.5) sowie der Anteil T-Zellen durchflusszytometrisch mittels einer Immunfluoreszenzfärbung (siehe Kapitel 5.3.7) bestimmt.

### 5.3.3. Polyplex-Transfektion

Für die Polyplex-Transfektion wird die Zellsuspension mittels Zentrifugation (200 x g, 5 min) geerntet, zweimal in je 10 mL DPBS gewaschen (Zentrifugation 200 x g, 5 min) und die Zellen mit einer Zelldichte von  $0,2 \times 10^6$  Z/mL in vorequilibriumiertem Opti-MEM aufgenommen. Jeweils 1 mL Zellsuspension ( $0,2 \times 10^6$  Z) wird in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellen auf Eis gelagert, um die metabolische Aktivität der Zellen während der Herstellung der Polyplexe zu reduzieren. Die Herstellung der Polyplexe erfolgt nach den Bedingungen in Tabelle 5-1 mit einem N/P Verhältnis (Verhältnis des Polymers N zu der pDNA P) von 10. Das Gesamtvolumen der initialen Polyplex-Herstellung beträgt 50  $\mu$ L. Das entsprechende Volumen HBG (*HEPES-buffered glucose solution*) (20 mM HEPES, 278 mM Glucose, pH-Wert 5,5, mittels Sterilfiltration (0,2  $\mu$ m, Celluloseacetat) sterilisiert) wird in einem 2 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Das benötigte Volumen pDNA wird hinzugefügt und das Reaktionsgefäß kurz geschüttelt (2200 rpm). Danach wird das benötigte Volumen Polymer (Nanostern) in einem einzigen Tropfen hinzugegeben. Der Ansatz wird sofort für 10 sec geschüttelt (2200 rpm) und für die Bildung der Polyplexe 20 min inkubiert. Die Polyplexe werden dann durch Zugabe von 450  $\mu$ L Opti-MEM verdünnt, kurz geschüttelt (2200 rpm) und für weitere 10 min inkubiert.

**Tabelle 5-1:** Bedingungen der Polyplex-Bildung zur transienten Transfektion primärer humaner T-Zellen.

pDNA [ $\mu$ g]	Polymer [ $\mu$ g]	Anzahl Zellen [ $\times 10^6$ Z]	Polymerdichte [ $\mu$ g/( $1 \times 10^6$ Z)]	Polymer- konzentration [ $\mu$ g/mL]	N/P Verhältnis
0,28	1,2	0,2	6	2,4	10
0,23	1,0	0,2	5	2,0	10
0,18	0,8	0,2	4	1,6	10

Volumen der initialen Polyplex-Herstellung: 50  $\mu$ L. Volumen der Transfektion (Inkubation der Zellen mit den Polyplexen): 500  $\mu$ L.

Die auf Eis gelagerten Zellen werden zentrifugiert (200 x g, 5 min). Die Polyplex-Suspension wird in einem einzigen Tropfen zu den Zellen hinzugefügt und durch leichtes Schnipsen des Reaktionsgefäßes mit den Zellen vermischt. Für die Transfektion (Inkubation der Zellen mit den Polyplexen) werden die Reaktionsgefäße aufrecht und statisch für 90 min im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen durch Zentrifugation (200 x g, 5 min) pelletiert, in 2 mL vorequilibriertem LG supplementiert mit 11 ng/mL rekombinanten humanen Interleukin-2 (rhIL-2) zur Unterstützung der T-Zell Proliferation (Bajnok et al., 2017; Jérôme, Werner, et al., 2017) resuspendiert und in 6-Well-Zellkulturplatten im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank kultiviert.

#### 5.3.4. HZD-Transfektion

Die HZD-Transfektion primärer humaner T-Zellen wird in leicht modifizierter Form nach dem Protokoll von Backliwal, Hildinger, Hasija, et al. durchgeführt (Backliwal, Hildinger, Hasija, et al., 2008). Für die HZD-Transfektion wird die Zellsuspension mittels Zentrifugation (200 x g, 5 min) geerntet, zweimal in je 10 mL DPBS gewaschen (Zentrifugation 200 x g, 5 min) und die Zellen mit einer Zelldichte von  $20 \times 10^6$  Z/mL in vorequilibriertem Opti-MEM aufgenommen. Jeweils 250 µL Zellsuspension ( $5 \times 10^6$  Z) werden in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Für die Transfektion erfolgt die Zugabe von 3,1 µg pDNA und zehnmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes sowie nachfolgend die Zugabe von 15 µg Polymer (Nanostern) und wieder zehnmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Dies entspricht einer Polymerdichte von  $3 \mu\text{g}/(1 \times 10^6 \text{ Z})$  und einem N/P Verhältnis von 10. Das Reaktionsgefäß wird auf einem Rotator befestigt und bei 37 °C mit 20 rpm für 4 h kontinuierlich invertiert. Nach der Inkubation werden die Zellen 1:80 in vorequilibriertem LG supplementiert mit 11 ng/mL rhIL-2 verdünnt (entspricht einer Zelldichte von  $0,25 \times 10^6$  Z/mL) und in Zellkulturschalen mit einem Kulturvolumen von 10 mL im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank kultiviert.

#### 5.3.5. Bestimmung von Zelldichte und Viabilität

Ein automatisches Zellzählgerät wird verwendet, um die Zelldichte, Zellgröße und Viabilität der Zellen zu bestimmen. Dazu wird nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Im Detail werden 18 µL einer Zellsuspension mit 2 µL Färbelösung (Acridinorange-/Propidiumiodid-Lösung) vermischt und 30 sec inkubiert. 11 µL der Suspension werden dann auf den Proben-Slide aufgetragen und eine automatische Zellzählung durchgeführt.

### 5.3.6. Kryokonservierung

Für eine Kryokonservierung der isolierten und kultivierten T-Zellen wird die Zellsuspension zentrifugiert (200 x g, 5 min) und mit einer Zelldichte von  $10 \times 10^6$  Z/mL in LG versetzt mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Je 1 mL Zellsuspension ( $10^6$  Z) wird in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen werden in einem Einfriercontainer, der eine konstante Abkühlung der Zellen mit  $1^\circ\text{C}$  pro min erlaubt, ÜN auf  $-80^\circ\text{C}$  gekühlt. Danach werden die Kryoröhrchen in die Zellbank transferiert und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei  $\leq -180^\circ\text{C}$  gelagert.

### 5.3.7. Durchflusszytometrische Analyse/Phänotypisierung

Für eine Phänotypisierung der isolierten und kultivierten T-Zellen vor der Transfektion werden charakteristische Zelloberflächenmarker für T-Zellen (CD3 und CD25) im Durchflusszytometer analysiert. Dazu werden  $1 \times 10^6$  Z zweimal in je 1 mL DPBS gewaschen (Zentrifugation 200 x g, 5 min) und in 100  $\mu\text{L}$  DPBS für die Antikörperfärbung aufgenommen. Es werden anti-humane, murine, CD-spezifische Antikörper (anti-CD3-PE, anti-CD25-PE-Cy5) verwendet. Für die Zwei-Farben Immunfluoreszenzfärbung wird das benötigte Volumen Antikörper-Lösung nach Angaben des Herstellers mit den Zellen vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis im Dunklen werden die Zellen erneut zweimal in je 1 mL DPBS gewaschen (Zentrifugation 200 x g, 5 min) und für die durchflusszytometrische Analyse in 500  $\mu\text{L}$  DPBS aufgenommen. Eine Kontrolle (Zellen, mit denen eine Färbung ohne Zugabe eines Antikörpers durchgeführt wird) wird genutzt, um die Parameter der Messung einzustellen.

Die Analyse der Transfektionseffizienz (TE) anhand des Anteils EGFP positiver (transfizierter) Zellen sowie der Viabilität anhand einer Propidiumiodidfärbung wird für die Polyplex- und HZD-Transfektion nach 48 h Kultivierung (48 h *post-transfection*, pt) im Durchflusszytometer durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) durchdringt nur die perforierte Zellmembran toter Zellen, sodass diese eine rote Färbung aufweisen. Eine intakte Zellmembran verhindert die Aufnahme von PI, sodass viable Zellen nicht angefärbt werden. Für die Färbung mit PI werden 500  $\mu\text{L}$  Zellsuspension zentrifugiert (200 x g, 5 min) und in 500  $\mu\text{L}$  DPBS versetzt mit 1  $\mu\text{g/mL}$  PI resuspendiert. Eine Kontrolle (Zellen, mit denen eine Transfektion durch Zugabe von DPBS anstelle von pDNA/Polymer durchgeführt wird) wird genutzt, um die Parameter der Messung einzustellen.

Für die durchflusszytometrische Messung wird das Signal im FSC, SSC und die Fluoreszenzintensität (PE Emission 575 nm, PE-Cy5 Emission 655 nm, EGFP Emission

510 nm, PI Emission 620 nm) aufgezeichnet. Für die Analyse wird anhand der Lichtstreuung eine Population im FSC/SSC definiert, die einzelne, viable, nicht-apoptotische Zellen enthält, während tote Zellen (niedriger FSC und hoher SSC), Zelltrümmer (niedriger FSC und niedriger SSC) und Zellaggregate (hoher FSC) aus der Population und somit aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Für die Phänotypisierung der Zellen wird die Population bezüglich der charakteristischen Zelloberflächenmarker für T-Zellen analysiert. Der Anteil CD3 und CD25 positiv markierter (CD3<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>) Zellen wird anhand des Histogramms der logarithmisch aufgetragenen Fluoreszenzintensität bestimmt.

Für die Analyse der transienten Transfektion wird der Anteil EGFP positiver (transfizierter) Zellen in der Population anhand des Histogramms der logarithmisch aufgetragenen EGFP Fluoreszenzintensität ermittelt und als Transfektionseffizienz (TE) bezeichnet. Das Histogramm der logarithmisch aufgetragenen PI Fluoreszenzintensität der gesamt analysierten Zellen (ohne vorhergehende Definition einer Population) dient zur Bestimmung des Anteils toter Zellen und erlaubt somit die Bestimmung der Viabilität der Zellen.

#### 5.4. Ergebnisse und Diskussion

Nach 48 h Kultivierung der isolierten PBMCs in LG mit rhIL-2 besteht die Zellsuspension hauptsächlich aus aktivierten T-Zellen (CD3<sup>+</sup> und CD25<sup>+</sup>) mit vergrößerter Morphologie. Der Anteil aktivierter T-Zellen variiert jedoch zwischen den individuellen Spendern, der bei Spender 1 (86,0%) und Spender 2 (84,2%) deutlich geringer ist als bei Spender 3 (98,0%).

Für die transiente Transfektion primärer T-Zellen wird das Polyplex- und HZD-Protokoll unter Verwendung des Nanosterns durchgeführt und die TE sowie die Viabilität der Zellen 48 h pt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5-2 dargestellt. Beide Transfektionsprotokolle erreichen mit primären humanen T-Zellen eine TE (Anteil EGFP exprimierender, d.h. transfizierter Zellen) zwischen 1 und 20%. Dies ist nicht unerwartet, denn T-Zellen werden als schwierig zu transfizierende Primärzellen angesehen, aufgrund der niedrigen TE nicht-viraler Gentransfer-Methoden bei diesen Zellen (Harris et al., 2021; Kavanagh et al., 2021; Rahimmanesh et al., 2020; Y. Zhao et al., 2006). PEI, der Goldstandard der nicht-viralen chemischen Transfektion mittels Polykationen, bewirkt bei T-Zellen nur einen minimalen Effekt und erreicht nur eine äußerst geringe TE von < 5% (Olden et al., 2018; O'Neill et al., 2001; Schallon et al., 2012). Die durchgeführten initialen Transfektionen mit dem Nanostern

erreichen somit bereits deutlich bessere Ergebnisse als PEI. Dies zeigt das Potential des Nanosterns für die Transfektion primärer T-Zellen, auch wenn Optimierungen des Protokolls notwendig sind, um eine ausreichend hohe TE für nachfolgende Anwendungen zu erreichen.

**Tabelle 5-2:** Polyplex- und HZD-Transfektion primärer humaner T-Zellen mit dem Nanostern.

Polymerdichte [ $\mu\text{g}/(1 \times 10^6 \text{ Z})$ ]	Spender 1		Spender 2		Spender 3	
	TE [%]	Viabilität [%]	TE [%]	Viabilität [%]	TE [%]	Viabilität [%]
<b>Polyplex-Transfektion<sup>a</sup></b>						
0 (Kontrolle)	0,8 / 0,9	75,8 / 78,2	1,1 / 0,8	84,5 / 85,3	0,8 / 0,7	93,3 / 91,3
6	19,4 / 13,6	35,1 / 39,6	4,0 / 10,5	64,9 / 43,1	2,0 / 6,1	78,9 / 80,1
5	7,8 / 15,0	48,4 / 38,1	3,2 / 2,5	72,8 / 72,2	0,9 / 1,8	86,1 / 88,5
4	3,7 / 8,2	56,8 / 44,7	1,9 / 1,8	80,1 / 73,6	0,7 / 2,4	89,9 / 89,3
<b>HZD-Transfektion</b>						
0 (Kontrolle)	0,5	68,9	1,1	86,3	0,8	87,6
3	3,2	37,5	9,1	68,3	14,8	65,3

<sup>a</sup> Gezeigt sind die Daten von zwei experimentellen Replikaten. Die Polyplexe werden dafür parallel hergestellt, jedoch zeitversetzt für die Transfektion zu den Zellen gegeben.

Die experimentellen Replikate in der Polyplex-Transfektion zeigen deutlich Variationen in der TE um bis zu Faktor 3. Ein Unterschied zwischen beiden Replikaten liegt in dem Zeitverlauf der Transfektion. Die benötigten Polyplexe wurden parallel für beide Replikate hergestellt, jedoch zeitversetzt (15 bis 20 min) für die Transfektion zu den Zellen gegeben. Dies erhöht für das zweite Replikat sowohl die Dauer der Lagerung der Zellen auf Eis als auch die Dauer der Inkubation der Polyplexe bei RT. Während die Lagerung der Zellen keinen Unterschied induzieren sollte, könnte eine verlängerte Inkubation der Polyplexe die physio-chemischen Eigenschaften, z.B. Ladung oder Größe (hydrodynamischer Radius), dieser verändern. Es kann an dieser Stelle jedoch nicht nachgewiesen werden, ob der Unterschied in der Inkubationszeit für die Variation in der TE verantwortlich ist. Auffällig ist jedoch, dass in dem zweiten Replikat die TE oftmals, wenn auch nicht in allen Fällen, erhöht ist.

Für das Polyplex-Protokoll erscheint eine Polymerdichte von  $6 \mu\text{g}/(1 \times 10^6 \text{ Z})$  aufgrund der höchsten TE (19%) geeignet, während mit abnehmender Polymerdichte die TE reduziert wird. Auffällig ist auch, dass unabhängig vom Spender, eine hohe TE mit einer niedrigen Viabilität

(ca. 40%) einhergeht, eine effiziente Transfektion also eine hohe Zellmortalität induziert. Der Zusammenhang zwischen Effizienz und Zytotoxizität eines Polymers in der nicht-viralen Transfektion ist ein bekannter Effekt (Bono et al., 2020; Breunig et al., 2007; Synatschke et al., 2011).

Die erreichte TE in der HZD-Transfektion zeigt Unterschiede um bis zu Faktor 5 zwischen den individuellen Spendern. Während Spender 3 im HZD-Protokoll die besten Ergebnisse erzielt (15%), zeigt dieser in der Polyplex-Transfektion eine schlechte Transfizierbarkeit (< 6%), wohingegen bei Spender 1 das Gegenteil der Fall ist. Bemerkenswert ist die hohe Viabilität der Zellen von Spender 3 (65%), die eine hohe Resistenz gegen die Zytotoxizität des Polymers bzw. der Transfektionsprozedur zeigen. Ein Unterschied zwischen den Spendern ist der Aktivierungszustand der T-Zellen, der die Transfizierbarkeit beeinflussen könnte. Anhand der Daten ist jedoch kein Trend erkennbar. Die sehr unterschiedliche Reaktion der Zellen der individuellen Spender auf die verschiedenen Transfektionsbedingungen verdeutlicht die Spendervariation bei Primärzellen, zeigt aber auch einen Ausgangspunkt für weitere Protokolloptimierungen auf.

### 5.5. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wird erfolgreich ein *proof-of-concept* einer genetischen Modifikation primärer humaner T-Zellen mittels eines sternförmigen, 24-armigen Polymer basierend auf PDMAEMA (Nanostern) nachgewiesen. Beide untersuchten, initialen Transfektionsprotokolle (Polyplex- und HZD-Transfektion) erreichen vergleichbare Transfektionseffizienzen, liegen jedoch in einem Bereich < 20%. Diese Ergebnisse sind nicht ausreichend für nachfolgende, praktische Anwendungen, sind jedoch deutlich erhöht im Vergleich zu dem Goldstandard unter den Polykationen, PEI. Dies zeigt das Potential des Nanosterns für die Transfektion primärer T-Zellen, auch wenn Optimierungen des Protokolls notwendig sind, um eine ausreichend hohe TE und Viabilität zu erreichen. Interessant ist die unterschiedliche zelluläre Reaktion der T-Zellen, isoliert aus drei individuellen Spendern, auf die verschiedenen Transfektionsbedingungen im Polyplex- und HZD-Protokoll. So zeigen die Zellen von Spender 1 im Polyplex-Protokoll die höchste Transfizierbarkeit, während das HZD-Protokoll bei Spender 3 die besten Ergebnisse erzielt. Dies zeigt die Notwendigkeit einer detaillierten und tiefgründigen Analyse der zellulären Reaktionen auf die Transfektion. Auf der anderen Seite bietet es einen Ausgangspunkt für eine systematische Evaluation und Optimierung der

Transfektionsbedingungen. Dazu muss zunächst das Transfektionsprotokoll (Polyplex- vs. HZD-Protokoll) festgelegt werden. Für routinemäßige Anwendungen des Gentransfers in primäre humane T-Zellen werden voraussichtlich höhere Zellzahlen benötigt, sodass das HZD-Protokoll aufgrund der Einfachheit und des hohen Scale-up Potentials besser geeignet sein könnte. Kritische Parameter für das Ergebnis der Transfektion in Bezug auf die TE und Viabilität sind die Menge pDNA pro Zelle, Menge Polymer pro Zelle, Polymerkonzentration, Zellzahl sowie Zelldichte und die Inkubationszeit und -bedingungen der Zellen mit den Transfektionsagenzien. Des Weiteren ist es entscheidend, den Einfluss zusätzlicher Parameter auf die T-Zellen und damit auch auf die Transfektion zu berücksichtigen. So können die Bedingungen der Kultivierung vor und nach der Transfektion, z.B. die Dauer, Temperatur und Supplementation mit Zytokinen/Mitogenen (hier wiederum die Dauer, Konzentration und Art der Stimulation) die Expansion und Aktivierung der T-Zellen beeinflussen, sodass der Zusammenhang zwischen Aktivierungsstatus/T-Zell Subtyp (Phänotyp) und den Transfektionsergebnissen detailliert untersucht werden sollte (Ghaffari et al., 2021; Keim et al., 2021; Mace et al., 2011; Olden et al., 2018). Die Komplexität und Heterogenität der isolierten und expandierten T-Zellen ist somit ein kritischer Faktor für die Entwicklung eines Transfektionsprotokolls. Nach der Etablierung eines geeigneten Kultivierungs- und Transfektionsprotokolls kann dieses als Grundlage für einen effizienten, nicht-viralen Gentransfer in primäre humane T-Zellen basierend auf der Polyfektion mit dem Nanostern genutzt werden.

## 6. Prozessintensivierung der rekombinanten Produktion von BMP2 in Säugetierzellen mittels transienten Genexpression

### 6.1. Einleitung

Knochenmorphogenetische Proteine (*bone morphogenetic proteins*, BMPs) gehören zu der TGF- $\beta$ -Superfamilie (*transforming growth factor- $\beta$* ). BMPs sind sekretierte, multifunktionale Zytokine und spielen eine grundlegende Rolle in vielfältigen biologischen Funktionen, sowohl bei der Entwicklung als auch bei der Homöostase vieler Zelltypen in verschiedenen Geweben (Carreira et al., 2014; Katagiri & Watabe, 2016). So erfüllen sie regulatorische Funktionen in der Zell-/Gewebe-Morphogenese, Proliferation, Differenzierung/*lineage commitment* und Apoptose (Carreira et al., 2014, 2015; Katagiri & Watabe, 2016). Vor allem die Fähigkeit einiger Proteine der BMP Familie, die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Knochen- und Knorpelzellen zu induzieren (Beederman et al., 2013; Carreira et al., 2014), eröffnete die Möglichkeit ihrer Nutzung in therapeutischen Anwendungen für die Einleitung der Ossifikation. Rekombinantes humanes BMP2 (rhBMP2, im Weiteren kurz als BMP2 bezeichnet) und rhBMP7 sind als Therapeutika für die humane Anwendung klinisch zugelassen und werden im Zusammenhang der Knochen(bruch)heilung, der Spondylodese und in der Zahnheilkunde (z.B. für das Einwachsen und Stabilität von Implantaten) angewandt (Carreira et al., 2014, 2015; Krishnakumar et al., 2017; Lissenberg-Thunnissen et al., 2011; Park et al., 2019; Schmidt-Bleek et al., 2016). Des Weiteren wird die Nutzung von BMPs im Kontext von Gefäßerkrankungen, Krebserkrankungen (aufgrund ihres starken Einflusses auf das Wachstum, Differenzierung und Apoptose von Tumorzellen und Krebsstammzellen), neurodegenerativen Erkrankungen sowie im Bereich des Tissue Engineering und der regenerativen Medizin diskutiert (Bach et al., 2018; Carreira et al., 2015; Goulding et al., 2020; Katagiri & Watabe, 2016). Humane BMPs besitzen somit ein bedeutendes Potential für biotechnologische und medizinische/klinische Anwendungen, was die Notwendigkeit einer effizienten rekombinanten Herstellung betont.

Humanes BMP2 wird *in vivo* als großes, inaktives Prä-Pro-Protein (396 Aminosäuren (AS)) synthetisiert und besteht aus einem 23 AS langem N-terminalen Signalpeptid, einem 259 AS langem Pro-Peptid und einem 114 AS langem reifen Peptid am Carboxy-Terminus (Carreira et al., 2014; Hang et al., 2014; Katagiri & Watabe, 2016). Das reife BMP2 Protein (18 kDa) wird durch eine proteolytische Spaltung, vermittelt durch Proteasen der Furin-Familie (Pro-

Proteinkonvertasen), freigesetzt und enthält sieben Cysteine, von denen sechs intramolekulare Disulfidbrücken (Cystin-Knoten) formen. Das verbleibende siebte Cystein ist durch die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke für die Dimerisierung zweier BMP2 Monomere zu einem biologisch aktiven Homodimer (36 kDa) verantwortlich (Carreira et al., 2014; Katagiri & Watabe, 2016). Sowohl der komplexe, Disulfidbrücken basierte Cystin-Knoten als auch die Ausbildung des Homodimers sind essenzielle Voraussetzungen für die biologische Aktivität von BMP2. Das BMP2 Prä-Pro-Protein enthält sechs N-Glykosylierungsstellen, fünf davon in dem Pro-Peptid und eine in dem reifen Peptid. Die Glykosylierung ist entscheidend für die Faltung, Sekretion und auch für biologische *in vitro* Funktionen von BMP2, konkret für die Differenzierung von Osteoblasten (Hang et al., 2014). Die komplexe Struktur und Faltung sowie die N-Glykosylierung prädestiniert BMP2 für die rekombinante Expression in Säugetierzellen, um eine korrekte Proteinfaltung und damit eine biologische Aktivität sicherzustellen und eine Immunogenität zu verhindern.

Klinisch durch die medizinischen Regulierungsbehörden (FDA und EMA) zugelassenes BMP2 (Infuse® und InductOS®) wird rekombinant in stabil transfizierten CHO (*Chinese Hamster Ovary*) Zelllinien produziert (Carreira et al., 2015; Heinks et al., 2021). Die Produkttiter der industriellen Produktionsprozesse sind nicht bekannt und obwohl die Verwendung von CHO Zellen dem aktuellen Stand der Technik entspricht, ist die rekombinante Produktion und das Erreichen hoher BMP2 Titer in CHO Zellen weiterhin herausfordernd und BMP2 wird allgemein als ein schwierig zu exprimierendes Protein in Säugetierzellen angesehen (Heinks et al., 2021; Jérôme, Thoring, et al., 2017; M. G. Kim et al., 2021; Zhou et al., 2012). Ein möglicher Grund kann eine Proteininstabilität von BMP2 unter Zellkultur-/Produktionsbedingungen sein. Während in *E. coli* und CHO Zellen produziertes BMP2 unter diesen Bedingungen kein stabiles Protein ist und eine geringe Wiederfindungsrate zeigt, weist BMP2, produziert in HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) Zellen, keine Instabilität auf (Inkubation in Standard Zellkulturmedium (DMEM mit 10% (v/v) FCS) bei 37 °C ohne Zellen) (Fung et al., 2019). Ein weiterer erschwerender Faktor ist die Tatsache, dass sekretiertes BMP2 sowohl mit CHO als auch mit HEK293 Zellen interagiert (Jérôme, Thoring, et al., 2017; M. G. Kim et al., 2021). In CHO Zellen erfolgt eine Internalisierung von extrazellulärem BMP2 durch Endozytose, jedoch nicht über den BMP2 Rezeptor, sondern hauptsächlich durch HSPGs (*heparan sulfate proteoglycan*) auf der Zelloberfläche, was eine drastische Abnahme der

extrazellulären BMP2 Konzentration zur Folge hat (M. G. Kim et al., 2021). Die mechanistische Basis der Interaktion von BMP2 mit HEK293 Zellen (Adsorption und/oder Internalisierung) ist nicht im Detail bekannt. HEK293 Zellen exprimieren ebenfalls HSPGs auf der Zelloberfläche, wenn auch in einer geringeren Anzahl als CHO Zellen (S. Lee et al., 2016), und die Expression eines BMP2 Rezeptors ist für 293FT Zellen, ein HEK293 Zellen Derivat, beschrieben (Kudo et al., 2010). Weiterhin stellten Israel et al. bereits 1992 die Hypothese auf, dass die Interaktion von BMP2 mit den Produktionszellen einen physiologischen Regulationsmechanismus aktivieren könnte, der die BMP2 Biosynthese kontrolliert bzw. herunterreguliert (Israel et al., 1992). Auch Limitationen in der Codon-Nutzung bei der Expression eines humanen Proteins in CHO Zellen (*Cricetulus griseus*) können zu einem geringen Produkttiter beitragen. Codon-Nutzung (die Präferenz für bestimmte synonyme Codons in einem Organismus) kann die Genexpression anhand der Transkription, mRNA-Stabilität, Translation (z.B. Effizienz und Genauigkeit), co-translationale Proteinfaltung und Proteinsekretion regulieren (Komar, 2016, 2019; Y. Liu, 2020).

Die aktuelle Technik für die Produktion klinisch zugelassener Biopharmazeutika (therapeutische Substanzen, die aus biologischen Quellen gewonnen werden) beruht auf stabil transfizierten Zelllinien, vorwiegend CHO Zelllinien (Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020; Puetz & Wurm, 2019). Die Erzeugung einer stabil transfizierten Produktionszelllinie basiert auf einer (stabilen) Transfektion der Zellen mit dem genetischen Material (u.a. das Transgen), welches integriert in einen Expressionsvektor (pDNA) von den Zellen aufgenommen und in den Zellkern transportiert wird. Entscheidend ist die Integration des genetischen Materials in das Genom der Zelle nach der Transfektion. Neben der Expressionskassette, welche für das gewünschte Transgen codiert und strukturelle Elemente für die Regulation der Transkription enthält, wird auch ein Selektionsmarker in das Genom integriert. Dieser erlaubt eine Selektion auf erfolgreiche genomische Integration in dem transfizierten Zellpool bzw. zusätzlich eine Genamplifikation. Danach erfolgt eine Einzelzell-Selektion zur Generierung monoklonaler Zellklone sowie deren Charakterisierung und Validierung (Büssow, 2015; Elgundi et al., 2017; Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020; Zhu et al., 2017). Aufgrund der genomischen Integration des Transgens ist sichergestellt, dass die Zellen während der Zellteilung das Transgen an die Tochterzellen weitergeben, sodass im Produktionsprozess eine konstante und zeitlich unlimitierte Expression des Transgens erfolgt (Büssow, 2015; Cervera et al., 2015). Eine Proteinproduktion in stabil transfizierten

Zellklonen ist somit durch eine hohe Reproduzierbarkeit des Produktionsprozesses bezüglich der Ausbeute und eine konsistente Produktqualität charakterisiert, entscheidende Faktoren für die Zulassung durch die regulatorischen Behörden, sowie durch ein einfache Scale-up des Produktionsvolumens (Büssow, 2015; O’Flaherty et al., 2020; Zhu et al., 2017). Diesen Vorteilen steht der sehr zeit-, kosten- und arbeitsintensive Prozess der Generierung und Charakterisierung/Validierung einer stabilen rekombinanten Produktionszelllinie gegenüber (J. Y. Kim et al., 2012; Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020).

Transiente Genexpression (TGE) kann eine geeignete und vielversprechende Alternative für die Proteinproduktion in stabil transfizierten Zelllinien darstellen (Baldi et al., 2007; Geisse, 2009; Gutiérrez-Granados et al., 2018; Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020). TGE basiert ebenfalls auf einer Transfektion der pDNA in den Zellkern der Zellen, mit einer hohen Kopienzahl des Transgens. In dem Fall der transienten Transfektion erfolgt jedoch keine genomische Integration des Transgens/der Expressionskassette, sondern die pDNA liegt episomal im Zellkern vor (Gutiérrez-Granados et al., 2018; Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020). Daraus resultierend induziert die transiente Transfektion eine starke, aber zeitlich limitierte Transgen-Expression. Die Zellteilung führt zu einer Verdünnung der pDNA über die Zeit oder es kommt zu einem Verlust der pDNA oder zu einem Abbau durch Nukleasen (Cervera et al., 2015; Gutiérrez-Granados et al., 2018; Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020). Dies limitiert die Produktionsdauer auf maximal einige Tage, typischerweise findet die Produkternte zwei bis drei Tage nach der Transfektion statt (Cervera et al., 2015). TGE ermöglicht eine schnelle und kosteneffiziente Produktion von Proteinen mit Ausbeuten bis in den Gramm-Bereich (O’Flaherty et al., 2020) und stellt somit eine einfache und effiziente Möglichkeit der rekombinanten Proteinproduktion dar.

Diese Vorteile prädestinieren die TGE neben der routinemäßigen Nutzung in der Forschung auch für weitere Anwendungsfelder. So erlaubt die TGE ein einfaches und schnelles Screening einer großen Anzahl von Proteinen oder Varianten eines Proteins, um aussichtsreiche Kandidaten hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials zu identifizieren (Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020), besonders relevant beispielsweise für die Protein basierte Impfstoffentwicklung gegen (neu auftretende) Pathogene, z.B. SARS-CoV-2 (Dong et al., 2020; Krammer, 2020). In diesem Kontext werden für die Impfstoffproduktion präzise, schnelle und flexible Produktionstechniken benötigt, und TGE erfüllt diese Anforderungen

(Gutiérrez-Granados et al., 2018). Auch in frühen Phasen der Entwicklung klinischer Biopharmazeutika und für die frühe Produktcharakterisierung findet die TGE Anwendung (Blackstock et al., 2020; Lalonde & Durocher, 2017; Wright, 2009). Allerdings ist die TGE nicht für die Produktion von Biopharmazeutika für die klinische Anwendung zugelassen, mit Ausnahme der Herstellung von viralen Vektoren für die Gentherapie (Ding et al., 2017; Lalonde & Durocher, 2017), was aber die prinzipielle Eignung der TGE auch für diese Anwendung aufzeigt. Die Reproduzierbarkeit des Produktionsprozesses (v.a. des Gentransfers und folglich der Proteinexpression) sowie die Konsistenz der Produktqualität sind die Hauptnachteile der TGE und limitieren die Anwendung in diesem Bereich (Ding et al., 2017).

Während für die industrielle Produktion von Biopharmazeutika in stabil transfizierten Zellklonen typischerweise CHO Zellen Verwendung finden, sind für die TGE oftmals HEK293 Zellen die Zelllinie der Wahl, aufgrund ihrer hohen Transfizierbarkeit und hohen Produktivität (Geisse, 2009; Gutiérrez-Granados et al., 2018; Tan et al., 2021).

Für die TGE in Säugetierzellen zur rekombinanten Proteinproduktion wird routinemäßig die Polyfektion (siehe auch Kapitel 5.1) mittels PEI als kationisches Polymer genutzt (Delafosse et al., 2016; Gutiérrez-Granados et al., 2018). PEI zeichnet sich durch geringe Kosten und eine geringe bis moderate Zytotoxizität aus, vor allem jedoch durch hohe Transfektionseffizienzen und ein hohes Scale-up Potential (Blackstock et al., 2020; Gutiérrez-Granados et al., 2018; O’Flaherty et al., 2020).

In der weit verbreiteten Standard Polyplex-Transfektion (Gutiérrez-Granados et al., 2018) findet zunächst eine Inkubation der pDNA mit l-PEI als Polykation statt, für die Bildung der positiv geladenen Polyplexe. Erst in einem nachfolgendem Schritt werden die Polyplexe für die Transfektion zusammen mit den Zellen inkubiert. Aufgrund der Zytotoxizität des Polymers werden die Polyplexe/der Transfektions-Cocktail nach einer definierten Zeitspanne von den Zellen getrennt und die Zellen unter geeigneten Bedingungen für die TGE kultiviert (Gutiérrez-Granados et al., 2018). Basierend auf der Standard Polyplex-Transfektion mittels l-PEI entwickelten Cervera et al. den Prozess der „*extended gene expression*“, in dem ein Zellbatch von HEK293 Zellen mehrfach nacheinander transient transfiziert wird, um die Produktionsphase zu verlängern und die Ausbeute zu erhöhen. Bis zu fünf Durchführungen der Transfektionsprozedur erreichen eine 4- bis 12-fache Erhöhung des Produktionslevels für die exprimierten Modellproteine (GFP und ein GFP-Fusionsprotein) und eine Verlängerung der

Produktionsdauer auf 192 bis 240 h, wobei die ersten Wiederholungen den stärksten Effekt bewirken (Cervera et al., 2015). Kürzlich wurde, ebenfalls basierend auf der Standard Polyplex-Transfektion mittels l-PEI, ein *proof-of-concept* einer kontinuierlichen Transfektion von HEK293 Zellen in einer Microcarrier basierten Kultivierung zur Produktion viraler Vektoren vorgestellt (Ladd et al., 2022). Auch wenn die Polyplex-Transfektion eine hohe Effizienz erreicht, ist die Reproduzierbarkeit der Polyplex-Bildung und folglich des Gentransfers ebenso wie das Scale-up Potential dieser Verfahren gering.

Eine Alternative stellt die Hochzelldichte-Transfektion (HZD-Transfektion) dar, ursprünglich entwickelt für die transiente Transfektion von HEK293 Zellen (Backliwal, Hildinger, Hasija, et al., 2008), die Eignung für CHO Zellen ist gleichwohl auch beschrieben (Rajendra et al., 2011). Diese direkte Transfektionsmethode basiert auf einer sequenziellen Zugabe der pDNA und nachfolgend l-PEI zu einer konzentrierten Zellsuspension, ohne den vorhergehenden Schritt der Vor-Komplexierung beider Transfektionsagenzien. Stattdessen kommt es zu einer spontanen Bildung der Polyplexe in der Zellsuspension (*in situ* Transfektion) (Backliwal, Hildinger, Hasija, et al., 2008; Elshereef et al., 2019). Ein Charakteristikum der HZD-Transfektion ist die Verdünnung des Transfektionsansatzes (Zellen und Transfektions-Cocktail) nach einer definierten Inkubationsdauer für die nachfolgende Kultivierung, im Vergleich zu einer Trennung in der Polyplex-Transfektion. Die 20-fache Verdünnung mit frischem Medium ist als ausreichend beschrieben, um die Zellen vor der Zytotoxizität des Polymers zu schützen (Backliwal, Hildinger, Hasija, et al., 2008; Rajendra et al., 2011). Die HZD-Transfektion zeichnet sich durch ein einfaches Upscaling aus und der Prozess ist direkt von der Multi-Well-Zellkulturplatte (Mikro-Scale) bis in den Bioreaktor (Large-Scale) skalierbar (Backliwal, Hildinger, Chenuet, et al., 2008; Backliwal, Hildinger, Hasija, et al., 2008; Baldi et al., 2012; Hacker et al., 2013; Rajendra et al., 2011; Rajendra, Hougland, et al., 2015; Raymond et al., 2011). Dies erlaubt ein einfaches Scale-up des Produktionsvolumens, besonders für die industrielle Proteinproduktion ein entscheidender Faktor. Weiter reduziert die direkte Transfektion auch die Variabilität in der Handhabung großer Volumina, die mit dem Einsatz von Bioreaktoren verbunden sind (Gutiérrez-Granados et al., 2018).

Besonders für Produktionsprozesse im großen Maßstab ist die zeitliche Limitation der Transgen-Expression (maximal einige Tage) ein Hauptnachteil der TGE, sowohl basierend auf der Polyplex- als auch auf der HZD-Transfektion. Ein Produktionsprozess im großen Maßstab mittels TGE ist folglich durch einen langandauernden Seed Train zum Erreichen der nötigen

Zellzahl gefolgt von einer verhältnismäßig kurzen Produktionsphase und somit durch eine limitierte Gesamtausbeute des Prozesses charakterisiert. Die Einfachheit und Reproduzierbarkeit der HZD-Transfektion sowie das einfache Upscaling des Protokolls zeigen jedoch die Vorteile der HZD-Transfektion für die rekombinante Proteinproduktion auch im größeren Maßstab.

## 6.2. Problemstellung und Zielsetzung

Humanes BMP2 als Vertreter der Gruppe der knochenmorphogenetischen Proteine besitzt ein bedeutendes Potential für biotechnologische und medizinische/klinische Anwendungen aufgrund der grundlegenden Rolle in vielfältigen biologischen Funktionen, vor allem in der Ossifikation. Ungeachtet der hohen Notwendigkeit einer effizienten rekombinanten Produktion von BMP2 sind die Produktionsprozesse, typischerweise basierend auf stabil transfizierten CHO Zelllinien, ineffizient und resultieren in geringen Produkttitern. Dies könnte auch die klinische Anwendung von BMP2 einschränken (Zhou et al., 2012). Das Ziel dieser Arbeit ist die Verbesserung der rekombinanten BMP2 Produktion in Säugetierzellen mittels transienter Genexpression. BMP2, ein Beispiel für ein schwierig zu exprimierendes Protein, welches des Weiteren eine Proteininstabilität und Interaktionen mit den Produktionszellen zeigt, ist ein geeigneter Kandidat für die Produktion mittels TGE. TGE ist ein einfaches und effektives Tool für die rekombinante Proteinproduktion, die Transgen-Expression und somit die Gesamtausbeute ist in diesem Fall jedoch (zeitlich) limitiert. Zunächst wird eine geeignete Transfektionsmethode der Polyfektion (Polyplex- vs. Hochzelldichte-Transfektion) ausgewählt und die Eignung zweier kationischer Polymere (Nanostern (siehe Kapitel 5.2) vs. 1-PEI) für die transiente Transfektion analysiert, um die Transfektionsmethode und das Polymer zu definieren. Geringe Produkttiter in der rekombinanten Proteinproduktion können sowohl in zellbasierten als auch in prozessbedingten Effekten begründet sein. Daher werden verschiedene Plasmide (v.a. BMP2 Expressionskassetten) für die transiente BMP2 Produktion in CHO-K1 und HEK293 basierten Suspensionszellen (CHO<sub>sus</sub> und HEK<sub>sus</sub>) verwendet: eine EGFP codierende pDNA als Referenz, eine bicistronische pDNA für die Co-Expression von BMP2 und EGFP, ein monocistronisches Konstrukt codierend für BMP2 und ein gleichartiges monocistronisches Plasmid mit einer Codon-optimierten Sequenz des BMP2 Gens für die Expression in CHO Zellen. Für eine Prozessintensivierung der rekombinanten BMP2 Produktion mittels TGE wird die Methode einer wiederholten transienten Transfektion

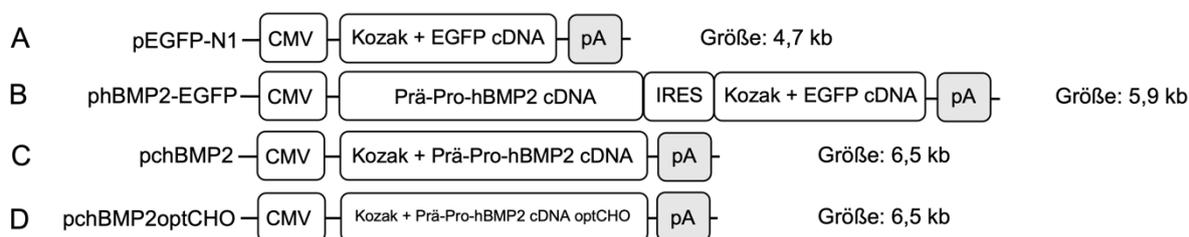
(*repeated transient transfection*, RTT), in der ein initial transfizierter Zellbatch mehreren konsekutiven HZD-Transfektionen unterzogen wird, entwickelt. Die RTT wird zunächst mit der Produktion von EGFP als Reporterprotein etabliert und dann auf die BMP2 Produktion übertragen und angepasst. Die RTT erhöht sowohl die Dauer, in der ein hoher Anteil transfizierter Zellen mit hohem Expressionslevel in der Kultur vorhanden ist, als auch die Gesamtdauer der BMP2 Produktionsphase und kann somit eine Steigerung der Gesamtausbeute des Prozesses erreichen. Auch wird ein Scale-up der RTT mit einer Integration in die späte Phase des Seed Trains durchgeführt, um die Eignung der RTT für einen potenziellen BMP2 Produktionsprozess im größeren Maßstab zu zeigen. Durch den Prozess der RTT könnte das intrinsische Problem einer zeitlich limitierten Transgen-Expression in der TGE überwunden werden.

### 6.3. Material und Methoden

#### 6.3.1. Plasmid-DNA und Transfektionsagenz

Die Expressionskassetten der verwendeten Plasmide sind in Abbildung 6-1 dargestellt. In allen Plasmiden steht die Transgen-Expression unter der Kontrolle des CMV Promotors und auf das Transgen folgt ein Polyadenylierungssignal (pA). Das Plasmid pEGFP-N1 (4,7 kb) enthält die EGFP cDNA (*complementary DNA*) mit vorhergehender Kozak-Sequenz und ermöglicht die intrazelluläre Expression von EGFP. Die Kozak-Sequenz vor der cDNA des Transgens induziert eine effiziente Translation (Kozak, 1987). pEGFP-N1 wird für die Bestimmung der Transfektionseffizienz (TE) verwendet. Das bicistronische Plasmid phBMP2-EGFP (5,9 kb) codiert für die Co-Expression von humanen BMP2 (als Prä-Pro-Protein, UniProtKB – P12643) und EGFP (Jérôme, Thoring, et al., 2017). Die EGFP cDNA enthält dabei eine vorhergehende Kozak-Sequenz. Die Translation von BMP2 wird von einer 5'-Cap-Struktur und die von EGFP von einer IRES (*internal ribosomal entry site*) initiiert. Die Plasmide pchBMP2 und pchBMP2optCHO (jeweils 6,5 kb) werden im Rahmen dieser Arbeit spezifisch für die BMP2 Expression in Säugetierzellen entwickelt. Dafür wird die hBMP2 cDNA mit vorhergehender Kozak-Sequenz in einen Standard Säugetier-Expressionsvektor, pcDNA3.1(-), integriert. Die Plasmide werden nach den vorgegebenen DNA-Sequenzen und Spezifikationen von Eurofins Genomics hergestellt. pchBMP2 wird für die Expression von BMP2 in CHO<sub>SUS</sub> und HEK<sub>SUS</sub> Zellen verwendet. pchBMP2optCHO enthält eine Codon-optimierte Sequenz der hBMP2 cDNA für die Expression in *Cricetulus griseus*. Die Codon-Optimierung wird mittels der

Software GENEius (Eurofins Genomics) durchgeführt. Die Codon Nutzung wird mittels der *Kazusa codon database* (<https://www.kazusa.or.jp/codon/>) analysiert (Parvathy et al., 2022). Alle Plasmide werden in *E. coli* DH5 $\alpha$  mittels mikrobiologischer und molekularbiologischer Methoden amplifiziert und aufgereinigt (siehe Kapitel 6.3.11 bis Kapitel 6.3.15). Die isolierte pDNA wird in hochreinem Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit der pDNA wird spektrophotometrisch bestimmt ( $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$ ) und die Qualität wird mittels Agarosegelelektrophorese ( $> 80\%$  *supercoiled* Topologie) überprüft (siehe Kapitel 6.3.16 und Kapitel 6.3.17).



**Abbildung 6-1:** Expressionskassetten der verwendeten Plasmide zur transienten Produktion von BMP2 und EGFP als Reporterprotein.

A) pEGFP-N1. B) phBMP2-EGFP. C) pchBMP2. D) pchBMP2optCHO. Abbildung nach (Riedl et al., 2022), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Als Transfektionsagensatz wird neben dem Nanostern (siehe Kapitel 5.3.1) lineares Polyethylenimin (l-PEI) mit einem Molekulargewicht von 25 kDa verwendet. Es wird eine Stammlösung in hochreinem Wasser mit einer Konzentration von 100 mg/mL hergestellt und durch Zugabe von HCl angesäuert. Nach einer Inkubation für 24 h bei 4 °C wird die Stammlösung mit DPBS auf eine Konzentration von 1 mg/mL verdünnt, mittels Sterilfiltration (0,2  $\mu$ m, hydrophiles Polyethersulfon) sterilisiert und bei -20 °C gelagert.

### 6.3.2. Stammhaltung von HEK<sub>sus</sub> und CHO<sub>sus</sub> Zellen

An ein Wachstum in Suspension adaptierte HEK Zellen (HEK<sub>sus</sub>), basierend auf HEK293 Zellen (CRL-1573.3, *American Type Culture Collection* (ATCC)), werden in serumfreiem EX-CELL 293 Medium, supplementiert mit 6 mM L-Glutamin, kultiviert. CHO<sub>sus</sub> Zellen, an ein Wachstum in Suspension adaptierte CHO Zellen basierend auf CHO-K1 Zellen (CCL-61,

ATCC), werden in ProCHO-5, supplementiert mit 4 mM L-Glutamin, kultiviert. Alle Medien werden zusätzlich mit 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin supplementiert. Die Kultivierung der Zellen findet routinemäßig in Zellkulturschalen mit einem Kulturvolumen von 10 mL oder in 250 mL Spinner-Flaschen (Kulturvolumen 50 bis 100 mL), kontinuierlich gerührt bei 75 rpm, statt. Die Zellen werden alle 3 – 4 d passagiert, da die immortalisierten Zellen eine kontinuierliche Proliferation zeigen. Die Startzelldichte nach einer Passage beträgt für die HEK<sub>sus</sub> Zellen  $0,2 \times 10^6$  Z/mL und für die CHO<sub>sus</sub> Zellen  $0,5 \times 10^6$  Z/mL. Dafür wird das entsprechende Volumen Zellsuspension für die benötigte Zellzahl entnommen, in einem Kulturgefäß vorgelegt und mit frischem Medium auf das entsprechende Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Zellsuspension wird durch Pipettieren vermischt. Die Zellen werden im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank kultiviert. Für die mikroskopische Analyse der Zellen wird ein inverses Lichtmikroskop (CKX41) verwendet.

### 6.3.3. Bestimmung der Zelldichte und Viabilität

Die Bestimmung der Zelldichte und Viabilität der HEK<sub>sus</sub> und CHO<sub>sus</sub> Zellen wird mittels einer Trypanblaufärbung durchgeführt (Tennant, 1964). Trypanblau durchdringt nur die perforierte Zellmembran toter Zellen, sodass diese eine dunkelblaue Färbung aufweisen. Eine intakte Zellmembran verhindert die Aufnahme von Trypanblau, sodass viable Zellen nicht angefärbt werden. Für die Trypanblaufärbung werden 10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblau-Lösung vermischt. Von dieser Suspension werden  $2 \times 10^4$  µL auf ein Hämocytometer (Neubauer Zählkammer) aufgetragen und die Anzahl lebender und toter Zellen unter dem Lichtmikroskop (CKX41) ausgezählt. Bei einer zu hohen Anzahl Zellen ( $> 150$  Z pro Großquadrat) wird die Zellsuspension entsprechend mit DPBS verdünnt und die Probe erneut ausgezählt. Die Zelldichte errechnet sich basierend auf einer Zählkammergrundfläche von  $1 \text{ mm}^2$  und einer Kammertiefe von 0,1 mm nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte} = \text{Anzahl lebender Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{10^4}{\text{mL}} \quad (1)$$

Die Viabilität [%] ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl lebender Zellen zu der Gesamtzellzahl (Summe Anzahl lebender und toter Zellen) multipliziert mit dem Faktor 100.

#### 6.3.4. Kryokonservierung und Inkulturnahme

Für die Kryokonservierung von HEK<sub>sus</sub> und CHO<sub>sus</sub> Zellen wird die Zellsuspension zentrifugiert (200 x g, 5 min) und mit einer Zelldichte von  $10 \times 10^6$  Z/mL im entsprechenden Medium versetzt mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert. Je 1 mL Zellsuspension ( $10^6$  Z) wird in ein Kryoröhrchen pipettiert. Die Kryoröhrchen werden in einem Einfriercontainer, der eine konstante Abkühlung der Zellen mit 1 °C pro min erlaubt, ÜN auf -80 °C gekühlt. Danach werden die Kryoröhrchen in die Zellbank transferiert und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei  $\leq -180$  °C gelagert.

Für die Inkulturnahme der Zellen wird ein Kryoröhrchen aus der Zellbank entnommen, im Wasserbad bei 37 °C zügig aufgetaut und die Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit 9 mL DPBS, überführt. Das nach einer Zentrifugation (200 x g, 5 min) erhaltene Zellpellet wird in 10 mL entsprechendem Medium resuspendiert und die Zellsuspension in einer Zellkulturschale im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank kultiviert.

#### 6.3.5. Polyplex-Transfektion von HEK<sub>sus</sub> Zellen

Für die Polyplex-Transfektion von HEK<sub>sus</sub> Zellen wird die Zellsuspension mittels Zentrifugation (200 x g, 5 min) geerntet, zweimal in je 10 mL DPBS gewaschen (Zentrifugation 200 x g, 5 min) und die Zellen mit einer Zelldichte von  $0,2 \times 10^6$  Z/mL in vorequiliбриertem Opti-MEM aufgenommen. Jeweils 1 mL Zellsuspension ( $0,2 \times 10^6$  Z) wird in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellen auf Eis gelagert, um die metabolische Aktivität der Zellen während der Herstellung der Polyplexe zu reduzieren. Die Herstellung der Polyplexe erfolgt nach den Bedingungen in Tabelle 6-1 mit einem N/P Verhältnis von 20 für l-PEI und 10 für den Nanostern. Das Gesamtvolumen der initialen Polyplex-Herstellung beträgt 50 µL. Das entsprechende Volumen HBG (siehe Tabelle 7-12) wird in einem 2 mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Das benötigte Volumen pDNA wird hinzugefügt und das Reaktionsgefäß kurz geschüttelt (2200 rpm). Danach wird das benötigte Volumen Polymer (l-PEI oder Nanostern) in einem einzigen Tropfen hinzugegeben. Der Ansatz wird sofort für 10 sec geschüttelt (2200 rpm) und für die Bildung der Polyplexe 20 min inkubiert. Die Polyplexe werden dann durch Zugabe von 450 µL Opti-MEM verdünnt, kurz geschüttelt (2200 rpm) und für weitere 10 min inkubiert.

**Tabelle 6-1:** Bedingungen der Polyplex-Bildung zur transienten Transfektion von HEK<sub>sus</sub> Zellen.

pDNA [ $\mu\text{g}$ ]	Polymer [ $\mu\text{g}$ ]	Anzahl Zellen [ $\times 10^6$ Z]	Polymerdichte [ $\mu\text{g}/(1 \times 10^6$ Z)]	Polymer- konzentration [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]	N/P Verhältnis
<b>I-PEI</b>					
2,13	5	0,2	25	10	20
1,28	3	0,2	15	6	20
0,43	1	0,2	5	2	20
0,34	0,8	0,2	4	1,6	20
0,26	0,6	0,2	3	1,2	20
<b>Nanostern</b>					
1,15	5	0,2	25	10	10
0,69	3	0,2	15	6	10
0,23	1	0,2	5	2	10
0,18	0,8	0,2	4	1,6	10
0,14	0,6	0,2	3	1,2	10

Volumen der initialen Polyplex-Herstellung: 50  $\mu\text{L}$ . Volumen der Transfektion (Inkubation der Zellen mit den Polyplexen): 500  $\mu\text{L}$ .

Die auf Eis gelagerten Zellen werden zentrifugiert (200 x g, 5 min). Die Polyplex-Suspension wird in einem einzigen Tropfen zu den Zellen hinzugefügt und durch leichtes Schnipsen des Reaktionsgefäßes mit den Zellen vermischt. Für die Transfektion (Inkubation der Zellen mit den Polyplexen) werden die Reaktionsgefäße aufrecht und statisch für 120 min im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen durch Zentrifugation (200 x g, 5 min) pelletiert, in 1,5 mL vorequiliertem Medium resuspendiert und in 6-Well-Zellkulturplatten im CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank kultiviert.

#### 6.3.6. Hochzelldichte-Transfektion von HEK<sub>sus</sub> und CHO<sub>sus</sub> Zellen

Die HZD-Transfektion von HEK<sub>sus</sub> und CHO<sub>sus</sub> Zellen wird basierend auf einem Protokoll von Backliwal, Hildinger, Hasija et al. für HEK293 Zellen und von Balasubramanian et al. für CHO-DG44 Zellen durchgeführt (Backliwal, Hildinger, Hasija, et al., 2008; Balasubramanian et al., 2016). Das Protokoll für die HEK<sub>sus</sub> Zellen wird ohne Modifikation angewendet. Das Protokoll für die CHO<sub>sus</sub> Zellen wird modifiziert, indem eine andere Zellzahl (5 x 10<sup>6</sup> Z anstatt

$15 \times 10^6$  Z) und eine höher konzentrierte Zellsuspension ( $20 \times 10^6$  Z/mL im Vergleich zu  $3 \times 10^6$  Z/mL) verwendet wird, identisch zu dem Protokoll für die HEK<sub>sus</sub> Zellen. Des Weiteren wird das Protokoll bezüglich der Menge pDNA und l-PEI für die in dieser Arbeit verwendeten CHO<sub>sus</sub> Zellen optimiert. Basierend auf den Ergebnissen (siehe Kapitel 6.4.2) wird die für die Transfektion verwendete Menge l-PEI leicht auf  $12,5 \mu\text{g}/(5 \times 10^6 \text{ Z})$  reduziert (im Vergleich zu  $15 \mu\text{g}/(5 \times 10^6 \text{ Z})$ ). Einen Tag vor der Transfektion werden die Zellen in frischem Medium mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Z/mL aufgenommen, um optimale Bedingungen für die Transfektion sicherzustellen (Zellen befinden sich am Tag der Transfektion in der exponentiellen Wachstumsphase und weisen eine hohe Viabilität ( $\geq 90\%$ ) auf). Für die Transfektion werden die Zellen zentrifugiert ( $200 \times g$ , 5 min) und mit einer Zelldichte von  $20 \times 10^6$  Z/mL in vorequilibriertem Medium aufgenommen. Die Bedingungen der HZD-Transfektion (Zellzahl, Menge pDNA und l-PEI) in verschiedenen Maßstäben sind in Tabelle 6-2 detailliert aufgeführt. Die Transfektion in Reaktionsgefäßen/Zentrifugenröhrchen erfolgt durch die Zugabe der entsprechenden Menge pDNA zu der konzentrierten Zellsuspension und zehnmaliges Invertieren gefolgt von der Zugabe der entsprechenden Menge l-PEI und erneutem zehnmaligen Invertieren. Das Reaktionsgefäß/Zentrifugenröhrchen wird auf einem Rotator, platziert in einem  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  Raum, befestigt ( $50^\circ$  Winkel) und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  und 20 rpm kontinuierlich für eine Dauer von 4 h rotiert. Die Large-Scale Transfektion wird in einer Spinner-Flasche (Gefäßvolumen 250 mL, Kulturvolumen 50 bis 100 mL) mit 50 mL Zellsuspension durchgeführt. pDNA und l-PEI werden ebenfalls sequenziell zugegeben und die Suspension nach jeder Zugabe mittels einer 10 mL serologischen Pipette gemischt. Die Spinner-Flasche wird mit geschlossenen Deckeln im  $\text{CO}_2$ -Begasungsbrutschrank ( $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchtigkeit) kontinuierlich mit 75 rpm für 4 h gerührt. Zellen, die nach dem identischen Protokoll behandelt werden, jedoch DPBS anstelle von pDNA und l-PEI zugegeben wird, werden als Negativkontrolle verwendet. Nach der vierstündigen Inkubation (*post-incubation*) wird die Zellsuspension 1:20 im entsprechenden Medium verdünnt, was einer theoretischen Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Z/mL entspricht. Die Zellsuspension wird in die angegebenen Kulturgefäße transferiert, von einer 6-Well-Zellkulturplatte (statische Kultivierung) bis hin zu einer dynamischen Kultivierung in gerührten Spinner-Flaschen, und im  $\text{CO}_2$ -Begasungsbrutschrank kultiviert.

**Tabelle 6-2:** HZD-Transfektion von HEK<sub>sus</sub> und CHO<sub>sus</sub> Zellen in verschiedenen Maßstäben.

Maßstab	Micro-Scale	Small-Scale	Medium-Scale	Large-Scale
Zellzahl	5 x 10 <sup>6</sup> Zellen	100 x 10 <sup>6</sup> Zellen	500 x 10 <sup>6</sup> Zellen	1000 x 10 <sup>6</sup> Zellen
Transfektionsvolumen	0,25 mL	5 mL	25 mL	50 mL
Gefäß	2 mL Reaktionsgefäß	50 mL Zentrifugen- röhrchen	50 mL Zentrifugen- röhrchen	250 mL Spinner-Flasche
Rotationsgeschwindigkeit	20 rpm	20 rpm	20 rpm	75 rpm
<b>Transfektion von HEK<sub>sus</sub> Zellen</b>				
pDNA	12,5 µg	250 µg	1250 µg	2500 µg
I-PEI	25 µg	500 µg	2500 µg	5000 µg
<b>Transfektion von CHO<sub>sus</sub> Zellen</b>				
pDNA	7,5 µg	150 µg	750 µg	1500 µg
I-PEI	12,5 µg	250 µg	1250 µg	2500 µg
<b>Kultivierungsbedingungen <i>post-transfection</i></b>				
Kulturvolumen	10 mL <sup>a</sup> / 2 mL <sup>b</sup>	100 mL	500 mL	1 L/ 50 mL <sup>3</sup>
Kulturgefäß	10 mL Zellkulturschale <sup>a</sup> / 2 mL 6-Well- Zellkulturplatte <sup>b</sup>	250 mL Spinner-Flasche	1 L Spinner-Flasche	2,2 L Bioreaktor/ 250 mL Spinner-Flasche
Verdünnungsfaktor <i>post-incubation</i>	20	20	20	20
Theoretische Zelldichte nach Inokulation	1 x 10 <sup>6</sup> Z/mL <sup>a b</sup>	1 x 10 <sup>6</sup> Z/mL	1 x 10 <sup>6</sup> Z/mL	1 x 10 <sup>6</sup> Z/mL

<sup>a</sup> Zwei Micro-Scale Transfektionen werden für die Kultivierung vereinigt und in 10 mL Medium in einer Zellkulturschale kultiviert (entspricht einer 1:20 Verdünnung der vereinigten transfizierten Zellsuspension).

<sup>b</sup> Ein Aliquot (100 µL) der transfizierten Zellsuspension wird in 2 mL Medium in einer 6-Well-Zellkulturplatte kultiviert (entspricht einer 1:20 Verdünnung des Aliquots).

<sup>c</sup> Für die Kultivierung nach der Large-Scale Transfektion in dem in Kapitel 6.3.8 beschriebenen Scale-up Experiment wird nur ein Aliquot (2,5 mL) der transfizierten Zellsuspension in 50 mL Medium in einer 250 mL Spinner-Flasche kultiviert (entspricht einer 1:20 Verdünnung des Aliquots).

### 6.3.7. Wiederholte transiente Transfektion von HEK<sub>sus</sub> Zellen

Für die Etablierung einer wiederholten transienten Transfektion (*repeated transient transfection*, RTT) von HEK<sub>sus</sub> Zellen aufbauend auf dem HZD-Protokoll wird das Plasmid pEGFP-N1 verwendet, welches für eine intrazelluläre Produktion von EGFP codiert und eine

schnelle Bestimmung der TE mittels Durchflusszytometrie erlaubt. Die initiale Transfektion erfolgt nach dem HZD-Protokoll im Micro-Scale (siehe Kapitel 6.3.6). Für die nachfolgende Kultivierung werden zwei Micro-Scale Transfektionen vereinigt (siehe Tabelle 6-2 Variante a), um ein ausreichendes Volumen (10 mL) für die Kultivierung unter Beibehaltung einer 1:20 Verdünnung der transfizierten Zellsuspension *post-incubation* zu gewährleisten. In den nachfolgenden Wiederholungen der Transfektion wird die vorbereitende Aufnahme der Zellen in frischem Medium 24 h vor der Transfektion nicht durchgeführt. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen wiederholten Transfektionen beträgt 48 h. Für eine wiederholte Transfektion wird die Zelldichte bestimmt (siehe Kapitel 6.3.3) und das benötigte Kulturvolumen für eine Zellzahl von  $10 \times 10^6$  Z (typischerweise zwei Micro-Scale Transfektionen mit je  $5 \times 10^6$  Z) geerntet. Die Zellen werden mittels Zentrifugation (200 x g, 5 min) pelletiert und in vorequiliбриertem Medium für die Transfektion resuspendiert. In den Fällen, in denen die ausreichende Zellzahl nicht zur Verfügung steht, werden alle Zellen geerntet und eine entsprechend geringere Zelldichte bei gleichem Volumen eingestellt. Die zu verwendende Menge pDNA und l-PEI wird dabei an die Zellzahl angepasst, um das Verhältnis pro Zelle für beide Transfektionsagenzien konstant zu halten. Die Transfektion und nachfolgende Kultivierung werden wie oben beschrieben durchgeführt (siehe Kapitel 6.3.6). Es wird eine initiale Transfektion gefolgt von bis zu drei wiederholten Transfektionen durchgeführt.

Die RTT von HEK<sub>sus</sub> Zellen zur transienten Produktion von BMP2 wird in einer leicht angepassten Weise durchgeführt. Für diese Anwendung wird das Plasmid pchBMP2 mit 1% (w/w) pEGFP-N1 vermischt, um eine Einschätzung der TE anhand der EGFP Expression mittels Durchflusszytometrie zu ermöglichen. Des Weiteren wird das Zeitintervall zwischen jeder wiederholten Transfektion auf 96 h erhöht, um eine maximale BMP2 Konzentration am Tag der Produkt-/Zellernte zu gewährleisten (basierend auf vorhergehenden Ergebnissen gezeigt in Kapitel 6.4.5).

Jede RTT wird in zwei unabhängigen biologischen Replikaten (n = 2, bezeichnet als A und B) durchgeführt. Die Transfektionen innerhalb eines Replikates werden parallel zueinander durchgeführt. Für die initiale Transfektion wird eine identische Vorkultur der Zellen verwendet.

### 6.3.8. Scale-up der RTT von HEK<sub>sus</sub> Zellen von Medium- zu Large-Scale

Für einen Scale-up des RTT Prozesses wird eine initiale Transfektion im Medium-Scale gefolgt von einer wiederholten Transfektion im Large-Scale durchgeführt, die nachfolgende

Kultivierung wird jedoch nur für ein Aliquot der transfizierten Zellen durchgeführt. Auch hier wird das Plasmid pchBMP2, vermischt mit 1% (w/w) pEGFP-N1, verwendet, um eine schnelle Bestimmung der TE mittels Durchflusszytometrie zu ermöglichen. Die initiale Transfektion im Medium-Scale von  $500 \times 10^6$  Z wird nach dem HZD-Protokoll (siehe Kapitel 6.3.6) durchgeführt. Nach 96 h Kultivierung wird die Zelldichte bestimmt (siehe Kapitel 6.3.3) und das benötigte Kulturvolumen für eine Zellzahl von  $1000 \times 10^6$  Z für eine Large-Scale Transfektion geerntet. Die Zellen werden mittels Zentrifugation ( $200 \times g$ , 5 min) pelletiert und in vorequiliбриertem Medium für die Transfektion resuspendiert. Eine wiederholte Transfektion im Large-Scale wird nach dem HZD-Protokoll (siehe Kapitel 6.3.6) durchgeführt. Die nachfolgende Kultivierung wird nur für ein Aliquot (2,5 mL) der transfizierten Zellsuspension in 50 mL Medium (1:20 Verdünnung *post-incubation*) in einer 250 mL Spinner-Flasche durchgeführt (siehe Tabelle 6-2 Variante c).

#### 6.3.9. Durchflusszytometrische Analyse

Die Analyse der TE anhand des Anteils EGFP positiver (transfizierter) Zellen wird typischerweise 48 h pt im Durchflusszytometer durchgeführt. Dazu werden 500  $\mu$ L Zellsuspension zentrifugiert ( $200 \times g$ , 5 min) und in 500  $\mu$ L DPBS resuspendiert. Eine Kontrolle (Zellen, die dem Transfektionsprotokoll unterzogen werden, jedoch mit Zugabe von DPBS anstelle von pDNA/Polymer) wird genutzt, um die Parameter der Messung einzustellen. Für die durchflusszytometrische Messung wird das Signal im FSC, SSC und die Fluoreszenzintensität (EGFP Emission 510 nm) aufgezeichnet. Für die Analyse wird anhand der Lichtstreuung eine Population im FSC/SSC definiert, die einzelne, viable, nicht-apoptotische Zellen enthält, während tote Zellen (niedriger FSC und hoher SSC), Zelltrümmer (niedriger FSC und niedriger SSC) und Zellaggregate (hoher FSC) aus der Population und somit aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Für die Bestimmung der TE (EGFP Expression) wird der Anteil EGFP positiver (transfizierter) Zellen in der Population anhand des Histogramms der logarithmisch aufgetragenen EGFP Fluoreszenzintensität ermittelt. Die Expressionsstärke der transfizierten Zellen innerhalb der Population wird anhand der Intensität des EGFP Fluoreszenzsignals bestimmt mit folgender Unterteilung: *low producer* ( $1 - 10^1$  a.u. (*arbitrary unit*)), *middle producer* ( $10^1 - 10^2$  a.u.), *high producer* ( $> 10^2$  a.u.). Zusätzlich wird der MFI (*Median Fluorescence Intensity*) des EGFP Fluoreszenzsignals in der Population bestimmt. Eine repräsentative Auswertung der

durchflusszytometrischen Bestimmung der TE und des EGFP Expressionslevel für die transiente Transfektion von CHO<sub>sus</sub> und HEK<sub>sus</sub> Zellen (mit pEGFP-N1 und pchBMP2 versetzt mit 1% (w/w) pEGFP-N1) ist in Abbildung 7-2 dargestellt.

Für die in Kapitel 6.4.1 und Kapitel 6.4.2 durchgeführte Analyse der Viabilität anhand einer Propidiumiodidfärbung werden die Zellen nach der Zentrifugation in 500 µL DPBS versetzt mit 1 µg/mL PI resuspendiert. In der durchflusszytometrische Messung wird zusätzlich die Fluoreszenzintensität der PI Emission bei 620 nm aufgezeichnet. Das Histogramm der logarithmisch aufgetragenen PI Fluoreszenzintensität der gesamt analysierten Zellen (ohne vorhergehende Definition einer Population) dient zur Bestimmung des Anteils toter Zellen und erlaubt somit die Bestimmung der Viabilität der Zellen. Die in den weiteren Kapiteln gezeigten Daten der Viabilität werden mittels einer Trypanblaufärbung bestimmt (siehe Kapitel 6.3.3).

#### 6.3.10. Bestimmung der BMP2 Konzentration mittels ELISA

Die BMP2 Konzentration im zellfreien Kulturüberstand wird mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) bestimmt. Dazu werden die Kits *Human BMP-2 DuoSet ELISA* und *DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2* in Kombination nach Angaben des Herstellers verwendet. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wird zunächst mit dem *Capture*-Antikörper beschichtet, indem in jedes Well 100 µL Antikörper-Lösung (1 µg/mL in *ELISA Plate Coating Buffer*) pipettiert wird. Nach einer Inkubation ÜN wird die Mikrotiterplatte dreimal mit jeweils 300 µL Waschpuffer pro Well gewaschen. Durch Zugabe von 300 µL *Reagent Diluent* pro Well und Inkubation für 90 min wird die Platte abgesättigt, um unspezifische Bindungen der Probe zu vermeiden. Für die Auftragung des Standards (rekombinantes humanes BMP2, exprimiert in CHO Zellen) und der zu analysierenden Proben werden in jedes Well 100 µL *Reagent Diluent* vorgelegt. Der Standard wird in Doppelbestimmung auf die Platte aufgetragen. Innerhalb einer Spalte wird eine Verdünnungsreihe erstellt, indem in das erste Well 100 µL Standard (6 ng/mL BMP2 in *Reagent Diluent*) pipettiert wird, durch Pipettieren gemischt wird und 100 µL aus dem Well in das nächste Well der Spalte pipettiert werden. Die 100 µL aus dem letzten Well der Spalte werden verworfen. So wird eine Verdünnungsreihe des Standards (1:2 Verdünnung von Well zu Well) mit definierten Konzentrationen (0,05 bis 3 ng/mL) erstellt. In Abhängigkeit der zu erwartenden BMP2 Konzentration der Proben wird eine Vorverdünnung der Proben mit *Reagent Diluent* vor der Auftragung auf die Mikrotiterplatte durchgeführt, damit die gemessenen Konzentrationen innerhalb der Standardkurve liegen. Die

Proben werden nach dem identischen Schema mit fünf aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen pro Probe auf die Mikrotiterplatte aufgetragen, sodass die BMP2 Konzentration als Mittelwert mit SD basierend auf den fünf technischen Replikaten angegeben werden kann. Der Blank wird als Doppelbestimmung mit je 100  $\mu\text{L}$  *Reagent Diluent* pro Well erstellt. Zusätzlich wird eine interne Kontrolle (rekombinantes humanes BMP2, exprimiert in CHO Zellen) mit einer Endkonzentration im Well von 0,17 ng/mL und 0,34 ng/mL für jeden ELISA durchgeführt. Nach einer Inkubation ÜN bei 4 °C wird die Mikrotiterplatte fünfmal mit jeweils 300  $\mu\text{L}$  Waschpuffer pro Well gewaschen. Nach dem Auftragen von 100  $\mu\text{L}$  *Detection-Antikörper* (0,25  $\mu\text{g/mL}$  in *Reagent Diluent*) pro Well wird die Mikrotiterplatte für 2 h inkubiert. Im Anschluss wird die Mikrotiterplatte fünfmal mit jeweils 300  $\mu\text{L}$  Waschpuffer pro Well gewaschen, 100  $\mu\text{L}$  Enzymlösung (Streptavidin-*horseradish-peroxidase*, 1:40 verdünnt in *Reagent Diluent*) pro Well aufgetragen und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Die Mikrotiterplatte wird erneut fünfmal mit jeweils 300  $\mu\text{L}$  Waschpuffer pro Well gewaschen und nachfolgend werden 100  $\mu\text{L}$  Substratlösung (1:1 Mischung aus *Color Reagent A* und *Color Reagent B*) pro Well aufgetragen, wodurch die enzymatische Reaktion gestartet wird. Die Mikrotiterplatte wird 12 bis 15 min im Dunkeln inkubiert. Dann wird die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{L}$  Stopp-Lösung pro Well beendet und die Mikrotiterplatte für 5 min bei 500 rpm geschüttelt. Die Absorption wird im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 580 nm gemessen. Für die Auswertung der Messdaten wird der Mittelwert der Blanks von allen gemessenen Absorptionswerten subtrahiert. Eine Standardkurve wird erstellt, indem die logarithmierten Absorptionswerte für jede Standardkonzentration (Mittelwert der Duplikate) gegen die logarithmierten BMP2 Konzentrationen aufgetragen werden und eine Regressionsanalyse durchgeführt wird. Anhand der Standardkurve wird dann unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und der möglichen Vorverdünnung der Probe die BMP2 Konzentration für jede Probe berechnet.

#### 6.3.11. Kultivierung und Stammhaltung von *E. coli*

*E. coli* DH5 $\alpha$  (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)) wird routinemäßig in LB- (Luria-Bertani-) Medium in Schüttelkolben mit Schikanen bei 37 °C und 225 rpm kultiviert. LB-Medium wird hergestellt, indem 25 g/L LB-Medium in Wasser gelöst werden und die Lösung autoklaviert wird (121 °C, 20 min). LB-Agar-Platten werden

hergestellt, indem zusätzlich zu dem LB-Medium 15 g/L Agar-Agar gelöst werden und die Lösung nach dem Autoklavieren in Platten gegossen wird. Für die Kryokonservierung von *E. coli* werden 500 µL einer *E. coli* ÜN Kultur mit 500 µL 50% (v/v) Glycerin in Wasser vermischt, je 1 mL wird in ein Kryoröhrchen pipettiert und diese werden bei -80 °C für die Stammhaltung gelagert. Für die Inkulturnahme von *E. coli* wird ein Kryoröhrchen durch Aufwärmen in der Hand aufgetaut und mit der Kultur ein Schüttelkolben mit 100 mL LB-Medium inokuliert (1:100 Verdünnung der Kultur). Für die Herstellung einer Reinkultur wird ein Verdünnungsausstrich auf einer LB-Agar-Platte durchgeführt, diese ÜN bei 37 °C inkubiert und durch das Picken einzelner Kolonien eine Reinkultur generiert. Die optische Dichte (OD) der *E. coli* Kultur wird am Spektralphotometer (BioPhotometer plus) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) gegen eine Referenz (LB-Medium) bestimmt, wobei die Messwerte einen maximalen Wert von 0,4 nicht überschreiten dürfen. Ist dies der Fall, wird eine geeignete Verdünnung der Kultur in LB-Medium hergestellt und vermessen.

#### 6.3.12. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* und Transformation

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5α Bakterien erfolgt nach der Calciumchlorid-Methode und die Transformation mittels Hitzeschock. Beide Methoden werden nach dem Protokoll von Sambrook & Russell durchgeführt (Sambrook & Russell, 2001). Für die Transformation der Plasmide pchBMP2 und pchBMP2optCHO in *E. coli* DH5α werden je 200 µL kompetente Bakterien mit unterschiedlichen Mengen des zu transformierenden Plasmids (0,001; 0,01; 0,1; 1 und 10 ng in einem Volumen von jeweils 10 µL) vermischt. Die Bakterien werden für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock findet durch Inkubation für 90 sec bei 42 °C im Wasserbad statt. Danach werden die Bakterien 2 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 800 µL SOC-Medium (siehe Tabelle 7-13) zu den transformierten Bakterien werden diese für 60 min bei 37 °C und 150 rpm inkubiert, bevor 100 µL Bakteriensuspension auf einer LB-Agar-Platte versetzt mit 100 µg/mL Ampicillin ausgestrichen werden. Die Wahl des Antibiotikums basiert auf dem enthaltenen Antibiotika-Resistenzgen der Plasmide. Die Anzucht findet bei 37 °C ÜN statt. Dadurch werden zwei transformierte *E. coli* DH5α Stämme hergestellt und kryokonserviert, die das Plasmid pchBMP2 oder pchBMP2optCHO tragen. Die Kultivierung dieser Stämme findet immer unter Zusatz von 100 µg/mL Ampicillin in LB-Medium statt. Mit dem Stamm *E. coli* DH5α (pchBMP2) wird die Produktion und Aufreinigung der entsprechenden pDNA durchgeführt.

### 6.3.13. Kultivierung von *E. coli* zur Produktion von Plasmid-DNA

Die Produktion des Plasmids pchBMP2 wird mittels *E. coli* DH5 $\alpha$  (pchBMP2) durchgeführt. Die Kultivierung findet in Schüttelkolben mit Schikanen mit einem Kulturvolumen von 1 L in LB-Medium versetzt mit 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Ampicillin statt. Durch Zugabe von 10 mL einer *E. coli* DH5 $\alpha$  (pchBMP2) ÜN Kultur ( $\text{OD}_{600}$  ca. 4; 1:100 Verdünnung der Kultur) wird die Kultivierung gestartet. Nach 12 bis 16 h bei 37 °C und 225 rpm wird die Kultur zentrifugiert (6000 x g, 4 °C, 15 min) und das erhaltene Pellet direkt für die Plasmidaufreinigung verwendet (siehe Kapitel 6.3.15) oder bei -20 °C gelagert.

### 6.3.14. Plasmidaufreinigung (Minipräparation)

Für eine schnelle Isolation von pDNA im kleinen Maßstab wird eine Minipräparation einer ÜN Kultur durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 7-12 beschrieben. Für die Minipräparation wird 1 mL einer ÜN Kultur ( $\text{OD}_{600}$  ca. 4) in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (16060 x g, 5 min). Das Zellpellet wird in 300  $\mu\text{L}$  4 °C kaltem Puffer 1 resuspendiert, 300  $\mu\text{L}$  Puffer 2 hinzugefügt und das Reaktionsgefäß sofort fünfmal invertiert. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis werden 300  $\mu\text{L}$  Puffer 3 hinzugefügt, sofort fünfmal invertiert und erneut für 5 min aus Eis inkubiert. Die Probe wird zentrifugiert (16060 x g, 5 min), der Überstand in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt, 900  $\mu\text{L}$  Isopropanol hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Nach einer Zentrifugation (16060 x g, 5 min) wird das Pellet in 900  $\mu\text{L}$  70% (v/v) Ethanol in Wasser gewaschen und die Probe erneut zentrifugiert (16060 x g, 5 min). Das erhaltene Pellet wird im Heizblock bei 37 °C getrocknet, final in 30  $\mu\text{L}$  hochreinem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

### 6.3.15. Plasmidaufreinigung (Gigapräparation)

Die Aufreinigung von für die Transfektion geeigneter pDNA im großen Maßstab wird mittels einer Gigapräparation mit dem QIAGEN Plasmid Giga Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 7-12 beschrieben. Das erhaltene Pellet (siehe Kapitel 6.3.13) aus ca. 2,5 L Bakterienkultur (ca. 7,5 g) wird in 125 mL 4 °C kaltem Puffer 1 resuspendiert. Danach werden 125 mL Puffer 2 hinzugefügt, 5 min leicht geschwenkt und vier- bis sechsmal invertiert. Nach einer Inkubation für 5 min werden 125 mL 4 °C kalter Puffer 3 hinzugefügt, sofort vier- bis sechsmal invertiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15000 x g, 4 °C, 30 min) wird der Überstand sofort geerntet und über einen Faltenfilter gefiltert. Die zu verwendende QIAGEN Säule wird

mit 75 mL Puffer QBT equilibriert. Der erhaltene Durchfluss der Filtration wird auf die Säule aufgetragen und die Säule mit 600 mL Puffer QC gewaschen. Die pDNA wird durch Zugabe von 100 mL Puffer QF von der Säule eluiert und durch Zugabe von 70 mL Isopropanol nach kurzem, leichten Schwenken präzipitiert. Nach einer Zentrifugation (20000 x g, 4 °C, 30 min) wird das erhaltene pDNA Pellet mit 10 mL 70% (v/v) Ethanol in Wasser gewaschen, die Probe erneut zentrifugiert (20000 x g, 10 min) und das erhaltene Pellet an der Luft für 10 bis 20 min getrocknet. Die pDNA wird in 0,5 bis 1 mL hochreinem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

#### 6.3.16. Plasmid Quantifizierung

Die Konzentration und Reinheit der aufgereinigten pDNA werden im Spektralphotometer (NanoDrop 2000) bestimmt. Die Konzentration wird mittels Messung der Absorption (A) bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ) ermittelt, bei dieser Wellenlänge absorbieren Nukleinsäuren. Für die Bestimmung der Reinheit wird zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $A_{280}$ ) ermittelt, hier absorbieren Proteine oder Phenol. Eine reine DNA-Probe ist durch ein  $A_{260}/A_{280}$  Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 gekennzeichnet.

#### 6.3.17. Plasmid Qualifizierung mittels Agarosegelelektrophorese

Zusätzlich zu der spektrophotometrischen Analyse der isolierten pDNA wird eine Qualitätskontrolle mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Mittels Restriktionsenzymen wird dafür eine Linearisierung (Enzym SpeI, eine Schnittstelle) und ein Doppelverdau (Enzym SpeI und Hind III, je eine Schnittstelle) der pDNA vorgenommen. Für die Linearisierung werden 300 ng pDNA mit 1  $\mu$ L SpeI und 2  $\mu$ L *CutSmart* Puffer versetzt. Für den Doppelverdau werden 1  $\mu$ g pDNA mit 1  $\mu$ L SpeI und 1  $\mu$ L Hind III sowie 2  $\mu$ L *CutSmart* Puffer verwendet. Zur Analyse der unbehandelten pDNA werden 100 ng pDNA eingesetzt. Die Proben werden auf ein Gesamtvolumen von je 20  $\mu$ L mit hochreinem Wasser aufgefüllt. Der enzymatische Verdau wird bei 37 °C für 1 h durchgeführt. Die unbehandelte bzw. enzymatisch geschnittene pDNA wird mit 2  $\mu$ L Gel-Ladepuffer (siehe Tabelle 7-12) vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Als Agarosegel wird 1% (w/v) Agarose in TAE-Puffer (TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) Acetat EDTA-Puffer) unter Zusatz von peqGREEN in einer 1:20000 Verdünnung (zur Färbung der pDNA) verwendet. Zusätzliche werden 6  $\mu$ L Größenstandard (HyperLadder) auf das Agarosegel aufgetragen. Der Gellauf findet bei einer Spannung von 90 V für ein kleines Gel oder 110 V für ein großes Gel für ca. 45 bis 60 min statt. Die isolierte pDNA sollte zu mindestens 80% eine *supercoiled* Topologie aufweisen.

### 6.3.18. Statistik

Die Anzahl unabhängiger biologischer Replikate wird als n angegeben. Es wird der Mittelwert und die SD verwendet. Für die statistische Auswertung der Daten wird eine *One-way ANOVA* (*Analysis of Variance*) mit einem Tukey-Post-hoc-Test mittels der Software Origin in der Version 2020 (OriginLab 2020) durchgeführt. Statistische Signifikanz wird mit \* (signifikant,  $p < 0,05$ ), \*\* (sehr signifikant,  $p < 0,01$ ) und \*\*\* (hoch signifikant,  $p < 0,001$ ) angegeben.

## 6.4. Ergebnisse und Diskussion

### 6.4.1. Transfektion von HEK<sub>sus</sub> Zellen mit l-PEI und dem Nanostern nach dem Polyplex- und HZD-Protokoll

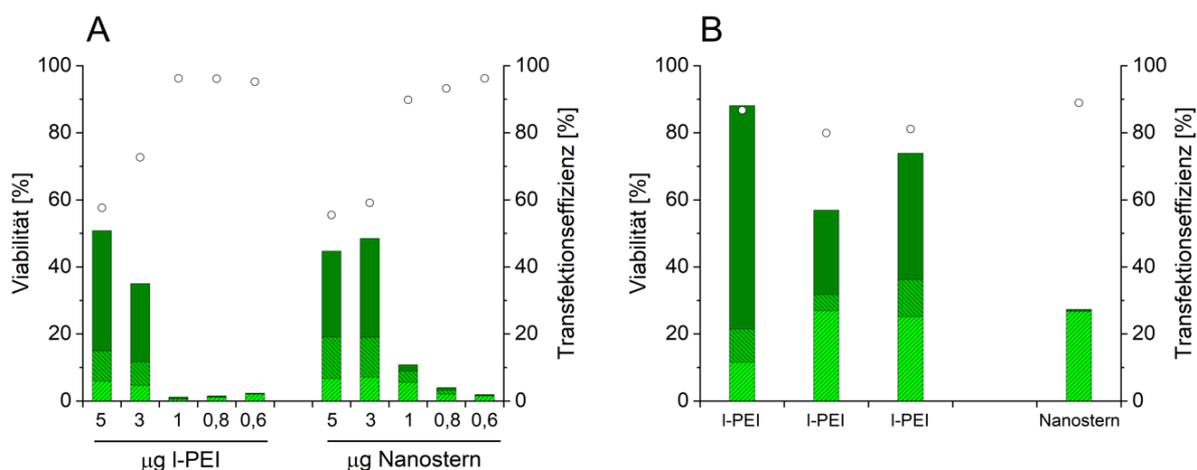
Für eine schnelle Evaluation des neuartigen Nanosterns für die TGE in HEK<sub>sus</sub> Zellen wird ein Vergleich mit dem etablierten Goldstandard der kationischen Polymere, l-PEI, durchgeführt. Dazu wird das Protokoll der Polyplex- und HZD-Transfektion im Mikro-Scale mit l-PEI und in identischer Form mit dem Nanostern durchgeführt. Als Plasmid wird pEGFP-N1 verwendet, das für die intrazelluläre Expression von EGFP codiert, welche mittels Durchflusszytometrie schnell und einfach detektiert und quantifiziert werden kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-2 für die Polyplex- und HZD-Transfektion gezeigt.

Das Polyplex-Protokoll erreicht 48 h pt eine maximale TE (Anteil EGFP exprimierender, d.h. transfizierter Zellen) von ca. 50% für beide Polymere, wobei der Anteil *high producer* im Fall von l-PEI leicht erhöht ist. Während die maximale TE für l-PEI durch die Nutzung von 5 µg (25 µg/(1 x 10<sup>6</sup> Z)) erreicht wird, ist für den Nanostern zwischen 5 und 3 µg (15 µg/(1 x 10<sup>6</sup> Z)) nur ein geringer Unterschied erkennbar. Beide Polymere induzieren in diesen Konzentrationen eine hohe Zellmortalität, erkennbar an einer Viabilität von ca. 60%. Polymermengen ≤ 1 µg bewirken nur eine TE ≤ 10%, vermutlich sind diese Menge für eine effiziente Transfektion zu gering, was sich in diesen Fällen in einer hohen Viabilität ≥ 90% der Zellen widerspiegelt.

Die verwendete Polymermenge zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen der Polyplex- und HZD-Transfektion auf. So wird bei der HZD-Transfektion mit l-PEI routinemäßig eine um Faktor 5 reduzierte Menge verwendet (5 µg/(1 x 10<sup>6</sup> Z) bzw. 25 µg/(5 x 10<sup>6</sup> Z)). Mit dem HZD-Protokoll wird für l-PEI eine deutlich höhere TE von 72,8 ± 12,8% (n = 3) erreicht, was die höhere Effektivität der HZD-Transfektion zeigt. Die geringere Zellmortalität in der Transfektion (Viabilität = 82,6 ± 3,0%, n = 3) korreliert dabei mit der geringeren

Polymermenge. Im Vergleich dazu ist die erreichte TE unter Verwendung des Nanosterns um einen Faktor von ca. 3 reduziert (26,8%). Auffällig ist hier das geringe Expressionslevel des Transgens, denn alle transfizierten Zellen werden als *low-producer* charakterisiert, was auf eine schlechte pDNA Aufnahme hinweist.

Somit ist eine direkte Übertragung des Protokolls auf den Nanostern unter Aufrechterhaltung identischer Ergebnisse für das HZD-Protokoll nicht gegeben. Das HZD-Protokoll zeichnet sich im Vergleich zu dem Polyplex-Protokoll durch eine höhere Effektivität unter Aufrechterhaltung einer hohen Viabilität und einer einfachen experimentellen Ausführung aus. Für eine TGE zur rekombinanten Proteinproduktion bewirken eine höhere TE und eine höhere Expressionsstärke einem deutlichen Vorteil im Produkttiter. Neben diesen Faktoren ist die Reproduzierbarkeit der Polyplex-Bildung sowie das Scale-up Potential (z.B. Erhöhung der Zellzahl) im Polyplex-Protokoll gering. Aus diesem Gründen wird in weiterführenden Anwendungen für die TGE das HZD-Protokoll mit dem kationischen Polymer l-PEI verwendet.

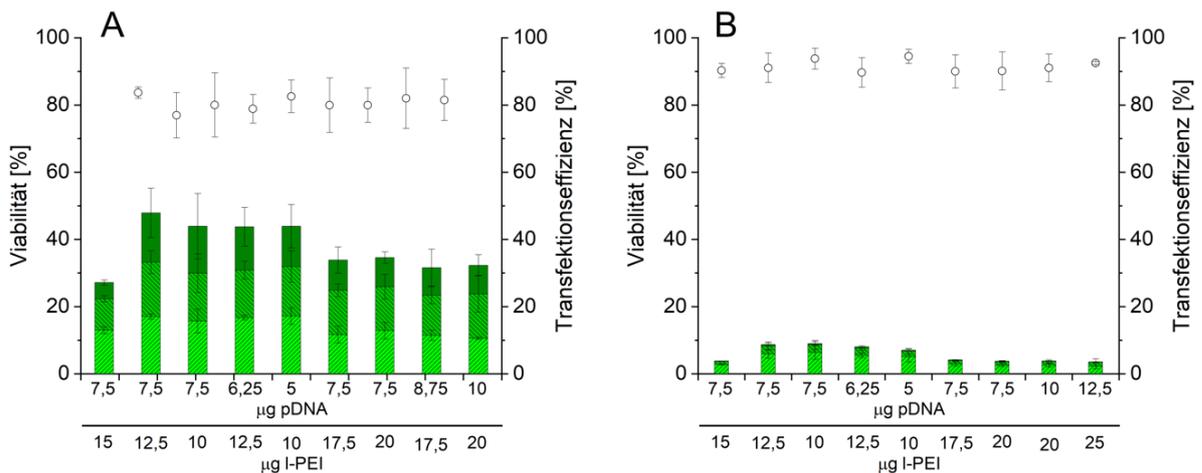


**Abbildung 6-2:** A) Polyplex-Transfektion und B) HZD-Transfektion im Mikro-Scale von HEK<sub>sus</sub> Zellen mit pEGFP-N1 und l-PEI sowie des Nanosterns.

Die eingesetzten Mengen beider Agenzien sind für das Polyplex-Protokoll in Tabelle 6-1 und für das HZD-Protokoll in Tabelle 6-2 angegeben. Gezeigt ist die Viabilität (○) und TE (grüne Säule) 48 h pt bestimmt mittels Durchflusszytometrie. Hellgrün repräsentiert die Fraktion der *low producer*, grün die der *middle producer* und dunkelgrün die der *high producer*. n = 1. Die drei biologischen Replikate (n = 3) der l-PEI basierten HZD-Transfektion sind individuell dargestellt.

#### 6.4.2. Optimierung der HZD-Transfektion von CHO<sub>sus</sub> Zellen

Für die TGE in CHO<sub>sus</sub> Zellen mittels HZD-Transfektion werden die verwendeten Mengen pDNA und I-PEI pro Zelle zunächst aus der Literatur übernommen (Balasubramanian et al., 2016). Durch die Modifikation der Zellzahl und Zelldichte verändert sich jedoch das Transfektionsvolumen im Vergleich zu dem Ausgangsprotokoll, was wiederum die TE beeinflussen könnte, sodass sich hier ein Optimierungspotential zeigt. Für eine Optimierung werden die verwendeten Mengen pDNA und I-PEI im Mikro-Scale systematisch variiert. Als Plasmid wird sowohl pEGFP-N1 als auch phBMP2-EGFP genutzt, da die unterschiedliche Plasmidgröße (4,7 kb vs. 5,9 kb) die optimalen Mengen pDNA und Polymer beeinflussen könnte. Die Analyse erfolgt durch eine Bestimmung der EGFP Expression (TE) und Viabilität 48 h pt am Durchflusszytometer. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-3 dargestellt.



**Abbildung 6-3:** Optimierung der HZD-Transfektion von CHO<sub>sus</sub> Zellen im Mikro-Scale mit A) pEGFP-N1 und B) phBMP2-EGFP.

Gezeigt ist die Viabilität (○) und TE (grüne Säule) 48 h pt bestimmt mittels Durchflusszytometrie in Abhängigkeit der verwendeten Mengen pDNA und I-PEI. Hellgrün repräsentiert die Fraktion der *low producer*, grün die der *middle producer* und dunkelgrün die der *high producer*. n = 3. Die Daten wurden von Frau Rostanie Ducrelle Fouejio Dongue im Rahmen ihrer Bachelorarbeit im Jahr 2018 produziert.

Für die Optimierungen wird zum einen die Menge Polymer variiert und dabei die pDNA Menge konstant gehalten, sodass sich das N/P Verhältnis leicht verändert, als auch eine Variation beider Agenzien unter Aufrechterhaltung eines identischen Verhältnisses durchgeführt, sodass

hier das N/P Verhältnis konstant bleibt. Die basierend auf der Literatur übernommenen Mengen von 7,5 µg pDNA pro  $5 \times 10^6$  Z und 15 µg l-PEI pro  $5 \times 10^6$  Z erreichen für pEGFP-N1 (siehe Abbildung 6-3) im Vergleich zu allen analysierten Bedingungen die geringste TE ( $27,1 \pm 2,7\%$ ,  $n = 3$ ). Eine Reduktion der Polymermenge bzw. beider Agenzien bewirkt die größte Steigerung der TE, während eine Erhöhung nur eine geringe Verbesserung induziert. Dies zeigt einen negativen Einfluss einer zu hohen Menge Polymer auf die TE, vergleichbar mit Beobachtungen in der Literatur (Rajendra et al., 2011). Zwischen den analysierten Bedingungen ist kein deutlicher Unterschied in der Zellviabilität 48 h pt (77 bis 83%) erkennbar. Eine leichte Reduktion der Menge l-PEI auf 12,5 µg erreicht fast eine Verdopplung der TE auf  $47,8 \pm 10,2\%$  ( $n = 3$ ) sowie eine leichte Erhöhung des Anteils *high producer*, sodass diese Menge zusammen mit 7,5 µg pDNA für die Transfektion mit pEGFP-N1 optimal ist.

Für das Plasmid phBMP2-EGFP (siehe Abbildung 6-3) liegt die erreichte TE bei den Ausgangsbedingungen bei lediglich  $3,8 \pm 0,2\%$  ( $n = 3$ ) und ist damit um Faktor 10 reduziert im Vergleich zu pEGFP-N1. Diese äußerst geringe TE könnte auf einer reduzierten zellulären Aufnahme des Plasmids, möglicherweise aufgrund der erhöhten Plasmidgröße, basieren. Auf der anderen Seite könnte die zelluläre Proteinsynthese-Maschinerie mit der zeitgleichen Expression zweier rekombinanter Proteine (EGFP und BMP2) überlastet sein. Die Variation der Transfektionsbedingungen zeigt vergleichbare Beobachtungen wie bei pEGFP-N1. So zeigt eine Erhöhung der Polymermenge bzw. beider Agenzien keinen Einfluss, während eine Reduktion die TE um Faktor 2 verbessert. Da die Bedingungen 7,5 µg pDNA zusammen mit 10 oder 12,5 µg l-PEI ein identisches Ergebnis liefern, werden in weiteren Anwendungen für CHO<sub>sus</sub> Zellen immer 7,5 µg pDNA und 12,5 µg l-PEI verwendet. Dies zeigt, dass die optimalen Mengen pDNA und Polymer nicht von dem Plasmid abhängen, verschiedene Plasmide jedoch Unterschiede in der Transfektion und infolge in der zellulären Expression bewirken.

Ein Grund für die leicht veränderte Menge Polymer im Vergleich zu dem Ausgangsprotokoll von Balasubramanian et al. könnte zum einen in dem reduzierten Volumen der Transfektion liegen, zum anderen aber auch an Unterschieden in der Zelllinie (CHO-DG44 vs. CHO<sub>sus</sub> basierend auf CHO-K1 in dieser Arbeit) (Balasubramanian et al., 2016). Beide Zelllinien stammen von den ursprünglichen CHO Zellen ab, es handelt sich jedoch um zwei verschiedene Subzelllinien (Wurm & Wurm, 2017), die somit auch unterschiedliche Reaktionen auf die Transfektion zeigen können.

### 6.4.3. Transiente BMP2 Produktion in CHO<sub>sus</sub> Zellen mittels HZD-Transfektion im Mikro-Scale

CHO Zellen sind die Säugetierzelllinie der Wahl für die Herstellung rekombinanter Biopharmazeutika (Mauro, 2018; O'Flaherty et al., 2020; Puetz & Wurm, 2019). Nach der Optimierung der HZD-Transfektionsbedingungen wird die Eignung dieser Zelllinie für die TGE zur rekombinanten Produktion von BMP2 untersucht. Dazu werden HZD-Transfektionen im Mikro-Scale mit verschiedenen Plasmiden (siehe Abbildung 6-1) durchgeführt. Das potenzielle Problem der Codon Nutzung, ein kritischer Faktor aufgrund der Expression des humanen BMP2 Gens in CHO Zellen, wird durch die Verwendung einer Codon optimierten BMP2 Sequenz (Plasmid pchBMP2optCHO) für die Expression in *Cricetulus griseus* adressiert. Die Ergebnisse der transienten Transfektionen nach 48 h Kultivierung sind in Tabelle 6-3 gezeigt.

Die Viabilität der Zellen 48 h pt, bestimmt mittels Trypanblaufärbung, beträgt  $\geq 92\%$  und bietet damit eine optimale Grundlage für eine effiziente rekombinante Proteinexpression. Mit dem Plasmid pEGFP-N1 wird eine TE von  $39,8 \pm 3,1\%$  ( $n = 3$ ) erreicht, leicht reduziert im Vergleich zu den vorherigen Mikro-Scale Transfektionen (siehe Kapitel 6.4.2). Die Ergebnisse sind nahezu identisch zu der Arbeit von Elshereef et al., in der das gleiche Plasmid und ebenfalls Suspensions-adaptierte CHO-K1 Zellen verwendet wurden (Elshereef et al., 2019), und liegen im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse nach HZD-Transfektion (Rajendra et al., 2011, 2012; Rajendra, Houglund, et al., 2015). Das Expressionslevel, angegeben durch die Unterteilung der transfizierten Zellen in *low*, *middle* und *high producer* sowie durch den MFI, korreliert mit der gemessenen TE.

Für das Plasmid phBMP2-EGFP, welches für die zeitgleiche Expression von EGFP und BMP2 codiert, liegt die TE bei  $10,2 \pm 1,0\%$  ( $n = 3$ ) und ist damit statistisch hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert im Vergleich zu pEGFP-N1, während eine BMP2 Konzentration von  $1,6 \pm 0,2$  ng/mL ( $n = 3$ ) 48 h pt erreicht wird. Die um Faktor 4 reduzierte TE könnte auf eine reduzierte zelluläre Aufnahme des Plasmids, möglicherweise aufgrund der erhöhten Plasmidgröße, und/oder auf einer Überlastung der zellulären Proteinsynthese-Maschinerie aufgrund der zeitgleichen Expression beider rekombinanter Proteine zurückzuführen sein. Zusätzlich ist die IRES abhängige Initiation der Translation des zweiten Gens in einem bicistronischen Expressionsvektor, in diesem Fall des EGFP Gens, weniger effizient als die 5'-Cap-Struktur

abhängige Expression des erstens Gens (Al-Allaf et al., 2019). In der Tat ist die Fraktion der *low producer* am größten, während nur ca. 1% aller Zellen als *high producer* identifiziert werden, was eine sehr geringe Expressionsstärke von EGFP nachweist. Auch der MFI, ein weiterer Indikator für die Expressionsstärke, ist um ca. Faktor 3 geringer im Vergleich zu pEGFP-N1.

**Tabelle 6-3:** TGE in CHO<sub>sus</sub> Zellen nach HZD-Transfektion im Mikro-Scale mit verschiedenen Plasmiden.

pDNA #Experiment	TE [%]	Anteil <i>low / middle / high</i> <i>producer</i> [%]	MFI <sub>EGFP</sub> [a.u.]	BMP2 Konzentration [ng/mL]	BMP2 Ausbeute [ng/(1 x 10 <sup>6</sup> Z)]
<b>pEGFP-N1</b>					
#1	36,6	12,9 / 13,4 / 10,1	20,7	-	-
#2	38,9	13,7 / 14,8 / 9,6	18,5	-	-
#3	44,0	13,1 / 17,3 / 13,1	25,4	-	-
<b>phBMP2-EGFP</b>					
#1	9,5	4,9 / 3,4 / 1,0	8,4	1,5 ± 0,7	0,8
#2	9,6	5,2 / 3,5 / 0,7	7,3	1,4 ± 0,2	0,5
#3	11,6	6,1 / 4,2 / 1,2	8,1	1,8 ± 0,7	1,0
<b>pchBMP2</b>					
#1	-	-	-	5,1 ± 0,6	2,5
#2	-	-	-	6,7 ± 1,0	2,2
#3	-	-	-	11,4 ± 1,0	6,0
<b>pchBMP2optCHO</b>					
#1	-	-	-	11,9 ± 0,8	6,3
#2	-	-	-	9,7 ± 0,3	3,7
#3	-	-	-	13,4 ± 2,3	6,8

Die EGFP Expression wird mittels Durchflusszytometrie und die BMP2 Konzentration mittels ELISA (Mittelwert ± SD aus fünf technischen Replikaten) bestimmt. MFI<sub>Kontrolle</sub> = 0,51 ± 0,09 a.u. (n = 3). Plasmidgrößen: pEGFP-N1: 4,7 kb; phBMP2-EGFP: 5,9 kb; pchBMP2 und pchBMP2optCHO: 6,5 kb.

Für eine effiziente Produktion von BMP2 wird das Plasmid pchBMP2 entwickelt, welches für die alleinige Expression von BMP2 codiert. Die Nutzung dieses Plasmids erlaubt eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung des BMP2 Titers um Faktor 5 auf  $7,7 \pm 2,7$  ng/mL

(n = 3) im Vergleich zu phBMP2-EGFP. Die erhöhte Plasmidgröße von pchBMP2 (6,5 kb) verdeutlicht dabei, dass dieser Faktor nicht entscheidend für die geringe Genexpression des bicistronischen Plasmids (5,9 kb) ist. So steht bei dem bicistronischen Plasmid phBMP2-EGFP der Vorteil einer leichten Bestimmung der TE aufgrund der Co-Expression von EGFP dem entscheidenden Faktor einer geringen Proteinexpression gegenüber, sodass dieses Plasmid für die rekombinante Proteinproduktion eine deutliche Limitation aufweist.

Ungeachtet der Verbesserung durch die Nutzung des monocistronischen Plasmids ist ein potenziell limitierender Faktor der BMP2 Produktion in CHO Zellen die Codon Nutzung, denn es wird ein humanes Protein in CHO Zellen exprimiert. Die Sequenz des humanen BMP2 weist 23 sehr seltene Codons ( $\leq 6,9$  pro 1000), davon fünf in direkter Abfolge, und 74 seltene Codons (7 bis 11,9 pro 1000) für die Expression in *Cricetulus griseus* auf. Codon Optimierung resultiert in einer cDNA Sequenz mit sieben sehr seltenen Codons und 68 seltenen Codons. Durch die Nutzung des Codon optimierten Plasmids pchBMP2optCHO kann der Produkttiter nochmals um Faktor 1,5 auf  $11,7 \pm 1,5$  ng/mL (n = 3) gesteigert werden, mit einer maximalen Ausbeute von  $6,8$  ng/( $1 \times 10^6$  Z). Codon Optimierung ist eine oftmals in der rekombinanten Proteinproduktion verwendete Methode mit dem Ziel, eine Erhöhung des Produkttiter zu erreichen (Gustafsson et al., 2004; Mauro, 2018; Parret et al., 2016). Positive Effekte sind jedoch nicht *per se* garantiert und die Effektstärke ist schwerlich vorhersagbar, denn oftmals werden auch nur sehr geringe oder keine Effekte der Codon Optimierung beschrieben, was die Komplexität der zugrunde liegenden biologischen und molekularen Mechanismen verdeutlicht (Gustafsson et al., 2004; Kimchi-Sarfaty et al., 2013; Mauro, 2018). Codon Optimierung für die Expression von humanem BMP2 in CHO Zellen bewirkt in diesem Fall eine Erhöhung des Produkttiters um einen Faktor von 1,5, vergleichbar mit Studien zu anderen Zytokinen (Kimchi-Sarfaty et al., 2013), was darauf hinweist, dass die Sequenzoptimierung nicht der entscheidendste Faktor für eine effiziente Produktion von BMP2 in CHO Zellen ist.

In den Ergebnissen der durchgeführten Experimente ist z.T. die Schwierigkeit einer Reproduzierbarkeit des Produkttiters erkennbar, ein kritischer Faktor für eine industrielle Proteinproduktion mittels TGE. Stabil transfizierte Zelllinien bieten den Vorteil einer höheren Standardisierbarkeit des Produktionsprozesses, basierend auf der Annahme einer konstanten Produktion. Jedoch kann die Generierung eines stabil transfizierten Zellklons drastische Unterschiede in der zellspezifischen Produktivität induzieren. So weist der maximale BMP2 Produkttiter zwischen zwei stabil transfizierten CHO Zellklonen einen Unterschied um einen

Faktor von ca. 3300 auf (0,15 ng/mL vs. 500 ng/mL) (Jérôme, Thoring, et al., 2017; M. G. Kim et al., 2021). Die erreichten BMP2 Titer in der TGE liegen damit in einem mittleren bis höheren Bereich dieser deutlich unterschiedlichen Ergebnisse. Dies verdeutlicht den enormen Einfluss des Prozesses der Generierung und Selektion stabiler Zellklone auf die Produktivität, während für die TGE dieser zeit- und kostenintensive Prozess nicht notwendig ist.

#### 6.4.4. Transiente BMP2 Produktion in HEK<sub>sus</sub> Zellen mittels HZD-Transfektion im Mikro-Scale

Um den Einfluss der Produktionszelllinie auf die BMP2 Produktion zu evaluieren, wird im nächsten Schritt ein humanes Expressionssystem in Form von HEK<sub>sus</sub> Zellen verwendet. HEK293 Zellen werden routinemäßig für die TGE eingesetzt (Gutiérrez-Granados et al., 2018; Tan et al., 2021). Zusätzlich bieten humane Zellen den Vorteil einer vollständig humanen post-translationalen N-Glykosylierung des zu produzierenden Proteins (Dumont et al., 2016; O’Flaherty et al., 2020; Schwarz et al., 2020; Tan et al., 2021), ein kritischer Faktor für BMP2, welches eine N-Glykosylierung aufweist. Des Weiteren könnten humane Zelllinien für die Expression schwer zu produzierender Proteine besser geeignet sein als andere Säugetierzelllinien, z.B. CHO Zellen (Schwarz et al., 2020). Analog zu den Experimenten mit den CHO<sub>sus</sub> Zellen werden HZD-Transfektionen im Mikro-Scale mit den identischen Plasmiden durchgeführt. Für einen Vergleich der Produktivität beider Zelllinien in der TGE wird erneut die Expression von BMP2 und EGFP 48 h pt analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6-4 dargestellt.

Auch die HEK<sub>sus</sub> Zellen weisen 48 h pt mit  $\geq 88\%$  eine sehr hohe Viabilität (bestimmt mittels Trypanblaufärbung) auf. HZD-Transfektionen mit dem Plasmid pEGFP-N1 resultieren in einer TE von  $59,1 \pm 6,7\%$  ( $n = 2$ ), leicht reduziert zu den Ergebnissen vorhergehender Transfektionen (siehe Kapitel 6.4.1) und geringer als in der Literatur beschriebene Ergebnisse nach HZD-Transfektion, in der Werte bis 90% erreicht werden (Rajendra et al., 2012; Rajendra, Kiseljak, et al., 2015; Raymond et al., 2011). Unterschiede in den exakten Transfektionsbedingungen (z.B. Zellzahl, Zelldichte, Transfektionsvolumen, pDNA und I-PEI Mengen), in dem Transfektions-/Kulturmedium und in der nachfolgenden Kultivierung (z.B. Supplementation des Kulturmediums) erschweren jedoch eine direkte Vergleichbarkeit. Mehr als die Hälfte der transfizierten Zellen werden als *high producer* eingestuft und der MFI zeigt bezogen auf die Negativkontrolle (nicht transfizierte Zellen) eine Erhöhung um den Faktor 275,

was auf ein sehr hohes zelluläres Expressionslevel hinweist. Im Vergleich zu entsprechenden Daten der CHO<sub>sus</sub> Zellen zeigt dies eine deutlich höhere zellspezifische Produktivität der HEK<sub>sus</sub> Zellen auf. Eine höhere TE von HEK293 Zellen ist auch in der Literatur beschrieben (Rajendra et al., 2012) und eine erhöhte Ausbeute bzw. Produktivität von HEK293 Zellen in der TGE verglichen mit CHO Zellen (z.B. zur Produktion monoklonaler Antikörper) ist ein bekannter Effekt (Bollin et al., 2011; Delafosse et al., 2016; Geisse, 2009; Hacker et al., 2013), welcher eine höhere Eignung des humanen Expressionssystems für die TGE verdeutlicht.

**Tabelle 6-4:** TGE in HEK<sub>sus</sub> Zellen nach HZD-Transfektion im Mikro-Scale mit verschiedenen Plasmiden.

<b>pDNA</b>	<b>TE [%]</b>	<b>Anteil</b>	<b>MFI<sub>EGFP</sub></b>	<b>BMP2</b>	<b>BMP2 Ausbeute</b>
#Experiment		<i>low / middle / high</i>	[a.u.]	<b>Konzentration</b>	<b>[ng/(1 x 10<sup>6</sup> Z)]</b>
		<i>producer [%]</i>		<b>[ng/mL]</b>	
<b>pEGFP-N1</b>					
#1	52,4	14,7 / 11,1 / 26,8	105	-	-
#2	65,7	18,6 / 11,8 / 35,6	132	-	-
<b>phBMP2-EGFP</b>					
#1	8,0	7,5 / 0,5 / 0,0	2,7	38 ± 7	28
#2	18,7	18,0 / 1,0 / 0,0	2,7	132 ± 16	86
<b>pchBMP2</b>					
#1	-	-	-	794 ± 65	470
#2	-	-	-	820 ± 81	412

Die EGFP Expression wird mittels Durchflusszytometrie und die BMP2 Konzentration mittels ELISA (Mittelwert ± SD fünf technischen Replikaten) bestimmt. MFI<sub>Kontrolle</sub> = 0,43 ± 0,01 a.u. (n = 2). Plasmidgrößen: pEGFP-N1: 4,7 kb; phBMP2-EGFP: 5,9 kb; pchBMP2: 6,5 kb.

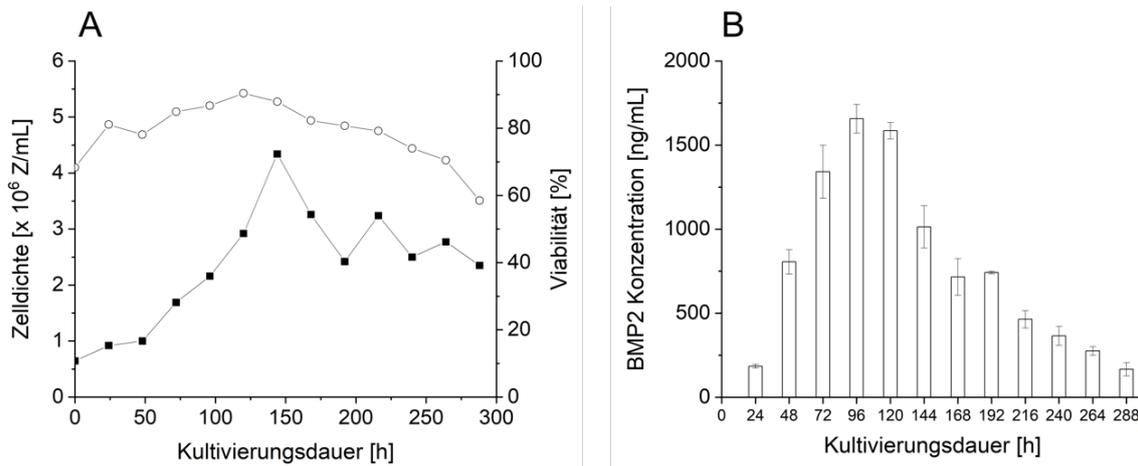
Im Fall von phBMP2-EGFP zeigt die TE eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion um Faktor 4 auf  $13,4 \pm 5,4\%$  (n = 2) im Vergleich zu pEGFP-N1, nahezu identisch mit den Ergebnissen bei den CHO<sub>sus</sub> Zellen. Der MFI der HEK<sub>sus</sub> Zellen ist jedoch um Faktor 3 reduziert verglichen mit den CHO<sub>sus</sub> Zellen und es sind annähernd nur *low producer* vorhanden, was ein sehr geringes Expressionslevel der HEK<sub>sus</sub> Zellen für die EGFP Expression bei dem bicistronischen Plasmid aufzeigt. Der erreichte BMP2 Titer 48 h pt liegt bei  $85 \pm 47$  ng/mL mit einer großen Abweichung zwischen beiden Replikaten, ein Hinweis auf eine schlechte

Reproduzierbarkeit des Produkttiters. Verglichen mit den CHO<sub>sus</sub> Zellen ist die BMP2 Konzentration 53-fach erhöht, während die BMP2 Ausbeute (ng/(1 x 10<sup>6</sup> Z)) um den Faktor 16 erhöht ist, was eine deutlich höhere zellspezifische Produktivität der HEK<sub>sus</sub> Zellen nachweist.

Durch die Nutzung des monocistronischen Plasmids pchBMP2 kann der Produkttiter weiter um Faktor 10 auf 807 ± 13 ng/mL (n = 2) gesteigert werden. Die durchschnittliche BMP2 Ausbeute ist in HEK<sub>sus</sub> Zellen mit 441 ng/(1 x 10<sup>6</sup> Z) im Vergleich zu CHO<sub>sus</sub> Zellen (3,6 ng/(1 x 10<sup>6</sup> Z)) um einen Faktor von 123 erhöht. Diese Daten zeigen zum einen die höhere zellspezifische Produktivität der humanen Zelllinie, verdeutlichen zum anderen aber auch erneut die Limitation des bicistronischen Plasmids für die TGE und bestätigen eine effizientere BMP2 Produktion basierend auf dem Plasmid pchBMP2. Aus diesen Gründen werden in den weiterführenden Anwendungen HEK<sub>sus</sub> Zellen als geeignetes Expressionssystem gewählt, in Kombination mit pchBMP2 als Expressionsvektor, als effizienteste Möglichkeit der TGE zur Produktion von rekombinantem humanen BMP2.

#### 6.4.5. Transiente BMP2 Produktion in HEK<sub>sus</sub> Zellen mittels HZD-Transfektion im Small-Scale

Für eine Maßstabsvergrößerung der HZD-Transfektion in den Small-Scale wird die Zellzahl von 5 auf 100 x 10<sup>6</sup> Z und das Transfektionsvolumen auf mehrere mL erhöht. Auch der Maßstab der BMP2 Produktion wird entsprechend vergrößert, die nachfolgende Kultivierung der HEK<sub>sus</sub> Zellen findet in einer Spinner-Flasche mit einem Kulturvolumen von 100 mL statt. Die Ergebnisse über eine Dauer von 288 h Kultivierung sind in Abbildung 6-4 gezeigt. Für eine schnelle Analyse der TE (EGFP Expression) mittels Durchflusszytometrie wird das Plasmid pchBMP2 mit 1% (w/w) pEGFP-N1 versetzt, nach Pick et al. (Pick et al., 2002). Basierend auf der EGFP Expression wird 48 h pt eine TE von ca. 60% erreicht. Das Expressionslevel der Zellen liegt in einem mittleren Bereich (15,7% *low producer*, 33,7% *middle producer*, 9,3% *high producer*; MFI<sub>EGFP</sub> = 23,0 a.u. vs. MFI<sub>Kontrolle</sub> = 0,23 a.u.). Dies zeigt einen hohen Anteil transfizierter Zellen, identisch zu Transfektionen alleinig mit pEGFP-N1, die Stärke der zellulären Expression ist aufgrund der geringen Menge verwendeter EGFP pDNA jedoch klar reduziert.



**Abbildung 6-4:** Transiente BMP2 Produktion in HEK<sub>sus</sub> Zellen mittels Small-Scale Transfektion und nachfolgender Kultivierung in einer Spinner-Flasche.

A) Zelldichte (■) und Viabilität (○), bestimmt mittels Trypanblaufärbung. B) BMP2 Konzentration, bestimmt mittels ELISA (Mittelwert  $\pm$  SD fünf technischen Replikaten). n = 1. Abbildung nach (Riedl et al., 2022), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Die Daten wurden von Frau Maria John im Rahmen ihrer Masterarbeit im Jahr 2021 produziert.

Bemerkenswert ist die mit 68% geringe Viabilität der Zellen direkt nach der Inokulation (1:20 Verdünnung *post-incubation*), vermutlich aufgrund der Zytotoxizität des Polymers l-PEI, welches als Transfektionsagenz im Überschuss während der vierstündigen Inkubation eingesetzt wird. Folglich resultiert diese in einer geringeren (Lebend-) Zelldichte als theoretisch eingestellt ( $0,6 \times 10^6$  anstatt  $1 \times 10^6$  Z/mL). Die 20-fache Verdünnung des Transfektionsansatzes nach der vierstündigen Inkubation im HZD-Protokoll ist ausreichend, um während der Kultivierung eine Schädigung der Zellen durch noch vorhandenes zytotoxisches Polymer zu verhindern, denn die Viabilität verbessert sich in den ersten 120 h der Kultivierung und erreicht ein Maximum von 90% (120 h pt, siehe Abbildung 6-4). Auch die Zelldichte nimmt im Verlauf der Kultivierung zu und erreicht einen maximalen Wert von  $4,3 \times 10^6$  Z/mL nach 144 h, mit einer exponentiellen Wachstumsphase zwischen 48 und 144 h, charakterisiert durch eine maximale spezifische Wachstumsrate ( $\mu_{\max}$ ) von  $0,37 \text{ d}^{-1}$ .

Die BMP2 Konzentration 48 h pt ist mit  $806 \pm 72 \text{ ng/mL}$  identisch zu dem erreichten Produkttiter im Mikro-Scale (siehe Kapitel 6.4.4), jedoch ist die Ausbeute in der Small-Scale Kultivierung mit  $806 \text{ ng}/(1 \times 10^6 \text{ Z})$  48 h pt um den Faktor 2 erhöht, was auf einer höheren zellspezifischen Produktivität ( $q$ , definiert als produzierte Menge BMP2/( $1 \times 10^6$  Z und Tag))

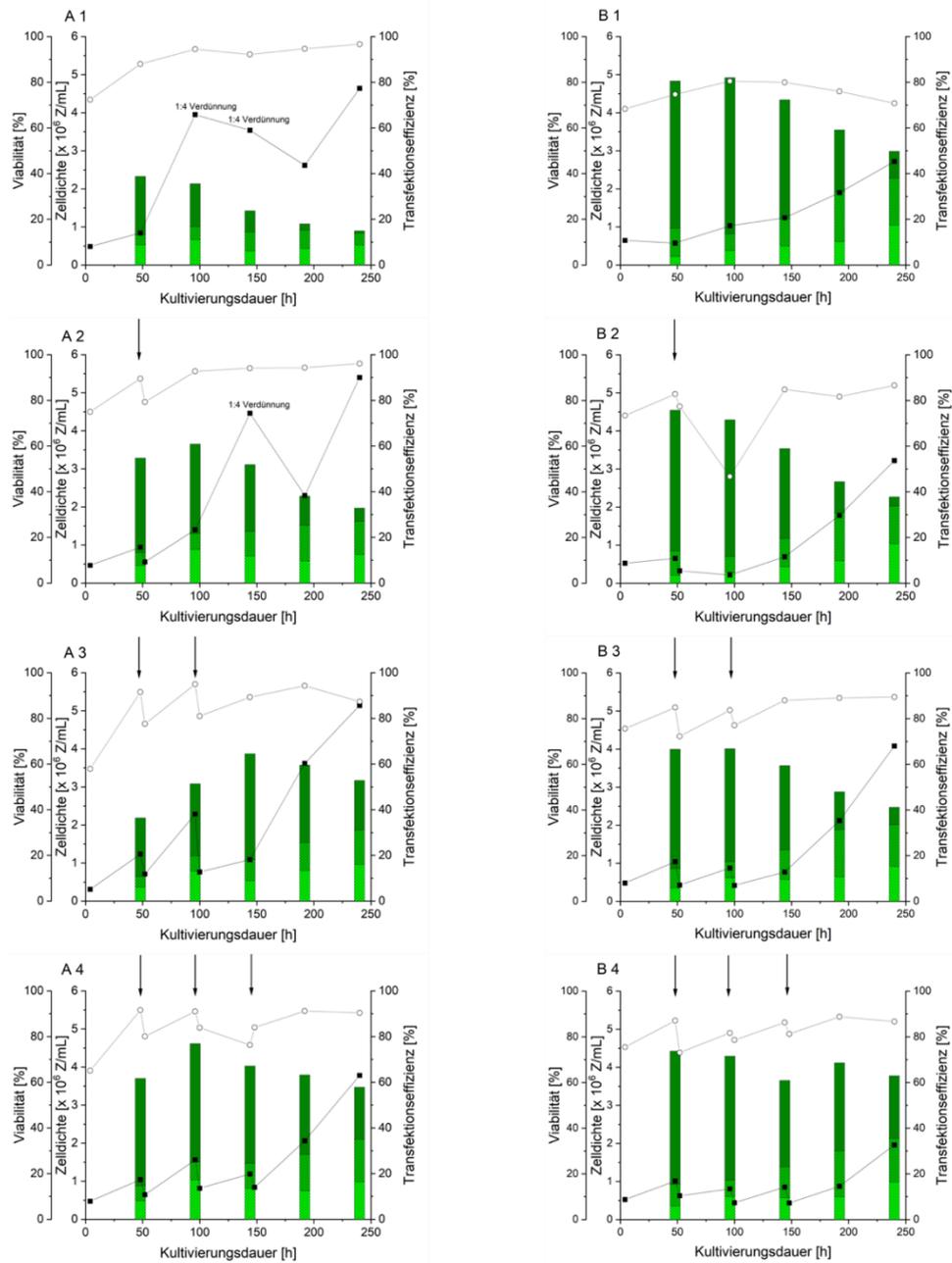
basiert. Dies ist vermutlich auf bessere Kultivierungsbedingungen in dem dynamischen System der Spinner-Flaschen (z.B. verbesserte Versorgung mit Sauerstoff) im Gegensatz zu der Kultivierung in statischen Zellkulturplatten zurückzuführen. Zwischen 48 und 96 h pt verdoppelt sich der BMP2 Produkttiter und erreicht eine maximale Konzentration von  $1657 \pm 86$  ng/mL (Ausbeute  $767$  ng/( $1 \times 10^6$  Z)) 96 h pt (siehe Abbildung 6-4). Verglichen mit einem identischen Experiment zur BMP2 Produktion, in dem das bicistronische Plasmid phBMP2-EGFP verwendet wurde (Jérôme, Thoring, et al., 2017), wird hier durch die Nutzung von pchBMP2 eine 83-fache Steigerung des maximalen Produkttiters und eine Erhöhung der BMP2 Ausbeute um einen Faktor von ca. 150 erreicht. Dies zeigt erneut die enorm effizientere BMP2 Produktion basierend auf dem Plasmid pchBMP2.

Zwischen einer Kultivierungsdauer von 96 und 120 h zeigt der BMP2 Titer ein Plateau, während im weiteren Verlauf eine klare Abnahme beobachtet werden kann, ein Effekt, der auch in der Literatur für die rekombinante Expression verschiedener humaner BMPs in CHO und HEK293 Zellen beschrieben ist (Jérôme, Thoring, et al., 2017; C. L. Kim et al., 2016, 2018; M. G. Kim et al., 2021; Sathyamurthy et al., 2013). Die zugrunde liegenden Mechanismen für diesen immer wieder beobachtbaren Effekt sind nicht im Detail bekannt. In der durchgeführten Small-Scale Kultivierung beginnt die Reduktion der BMP2 Konzentration fast zeitgleich mit der Abnahme der Viabilität, sodass ein proteolytischer Abbau durch freigesetzte Proteasen von sterbenden Zellen stattfinden könnte. Zusätzlich ist BMP2 kein stabiles Protein unter Zellkultur-/Produktionsbedingungen, die Stabilität scheint jedoch abhängig von dem Produktionsorganismus zu sein (Fung et al., 2019; Jérôme, Thoring, et al., 2017). Für BMP2 produziert in *E. coli* und CHO Zellen ist ein Verlust von 40% der anfänglichen BMP2 Menge nach einer Inkubation für 168 h in konditioniertem EX-CELL Medium bei 37 °C und ohne Zellen beschrieben (Jérôme, Thoring, et al., 2017). Auch in frischem Standard Zellkulturmedium (DMEM mit 10% (v/v) FCS) zeigt sich ein deutlicher Verlust, was auf einen (bio-) chemischen Abbau aufgrund einer Proteininstabilität hindeutet, während in HEK293 Zellen produziertes BMP2 keine Instabilität zeigt (Fung et al., 2019). Des Weiteren könnte eine Interaktion des sekretierten BMP2 mit den Produktionszellen zu dem beobachtbaren Effekt beitragen. Nach einer Inkubation von BMP2 zusammen mit den HEK<sub>sus</sub> Zellen in frischem EX-CELL Medium beträgt die Wiederfindungsrate nach 10 min weniger als 20% (Jérôme, Thoring, et al., 2017), ein deutlicher Hinweis auf eine Zell-Produkt-Interaktion. Für CHO Zellen konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass HSPGs auf der Zelloberfläche für die Bindung und

Endozytose von extrazellulärem BMP2 verantwortlich sind (M. G. Kim et al., 2021). Auch HEK293 Zellen exprimieren HSPGs auf der Zelloberfläche, wenn auch in einer geringeren Anzahl als CHO Zellen (S. Lee et al., 2016). Für die humane HeLa Zelllinie ist eine kontinuierliche Zunahme der BMP2 Internalisierung über die Zeit beschrieben (Alborzinia et al., 2013). Diese Beobachtungen führen zu der Hypothese, dass eine zelluläre Interaktion (Adsorption und/oder Internalisierung in die Produktionszellen) der Hauptgrund für den beobachteten Rückgang des BMP2 Titers ist. Dessen ungeachtet sind proteolytischer Abbau, Bindung an die Zelloberfläche sowie (aktive) zelluläre Internalisierung des sekretierten BMP2 potenzielle Gründe, die zu dem beobachtbaren BMP2 Verlust beitragen können. Israel et al. stellten bereits die Hypothese auf, dass die Interaktion von BMP2 mit den Produktionszellen einen physiologischen Regulationsmechanismus aktivieren könnte, der die BMP2 Biosynthese kontrolliert bzw. herunterreguliert (Israel et al., 1992).

#### 6.4.6. Etablierung einer RTT von HEK<sub>sus</sub> Zellen mit pEGFP-N1

Ein limitierender Faktor der Proteinproduktion mittels TGE, vor allem im großen Maßstab, ist der langandauernde Seed Trains für den Aufbau der notwendigen Zellzahl gefolgt von einer verhältnismäßig kurzen Dauer der Proteinexpression. Das Konzept einer wiederholten transienten Transfektion (*repeated transient transfection*, RTT), in der ein initial transfizierter Zellbatch mehreren konsekutiven HZD-Transfektionen unterzogen wird, kann die Länge der Produktionsphase erhöhen. Die RTT wird in dieser Arbeit entwickelt und genutzt, mit der Hypothese, durch die RTT eine Steigerung der BMP2 Ausbeute zu erzielen. Das entwickelte Konzept besitzt eine Ähnlichkeit zu dem Prozess der „*extended gene expression*“, beschrieben von Cervera et al., welches jedoch auf Polyplex-Transfektionen basiert (Cervera et al., 2015). In diesem Fall wird die RTT mit der HZD-Transfektion kombiniert, das heißt die Transfektionsagenzien werden direkt und aufeinanderfolgend zu einer hoch konzentrierten Zellsuspension gegeben. Für eine schnelle Realisierung des RTT Konzeptes wird zunächst der Mikro-Scale Maßstab und EGFP als Reporterprotein verwendet, welches eine schnelle und einfache durchflusszytometrische Detektion und Quantifizierung erlaubt. Die RTT mit pEGFP-N1 wird in zwei biologischen Replikaten (gekennzeichnet als A und B) durchgeführt, mit einer alleinigen initialen Transfektion (A1 und B1) und einer initialen Transfektion gefolgt von einer (A2 und B2), zwei (A3 und B3) sowie drei (A4 und B4) wiederholten Transfektionen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-5 wiedergegeben.



**Abbildung 6-5:** RTT von HEK<sub>SUS</sub> Zellen im Mikro-Scale mit pEGFP-N1.

Die RTT wird in zwei biologischen Replikaten (n = 2), gekennzeichnet als A und B, durchgeführt. Gezeigt ist die Zelldichte (■) und Viabilität (○), bestimmt mittels Trypanblaufärbung. Die TE (grüne Säule) wird mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hellgrün repräsentiert die Fraktion der *low producer*, grün die der *middle producer* und dunkelgrün die der *high producer*. Die Zeitpunkte der wiederholten Transfektionen sind mittels Pfeilen markiert. Um eine extensive Nährstofflimitation und Akkumulation von Stoffwechselprodukten zu vermeiden, wird bei einer Zelldichte > 3,5 x 10<sup>6</sup> Z/mL in den ersten 144 h eine 1:4 Verdünnung durchgeführt. Abbildung nach (Riedl et al., 2022), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Die Daten wurden von Frau Maria John im Rahmen ihrer Masterarbeit im Jahr 2021 produziert.

Auch wenn in beiden durchgeführten biologischen Replikaten identische Trends erkennbar sind, fallen deutliche Unterschiede bei Betrachtung der TE und des zellulären Proliferationsverhaltens auf. So erreicht beispielsweise B1 mit 81% eine doppelt so hohe initiale TE im Vergleich zu 39% bei A1 48 h pt. In allen initialen Transfektionen ist die Fraktion der *high producer* am größten, was auf ein hohes zelluläres Expressionslevel hinweist, in Übereinstimmung mit den vorherigen Experimenten mit HEK<sub>sus</sub> Zellen. Mit nur der initialen Transfektion (A1 und B1) ist die EGFP Expression (TE) zwischen 48 und 96 h pt maximal und sinkt im weiteren Verlauf der Kultivierung wie erwartet konstant ab. Die Zellteilung führt zu einer Verdünnung und somit zu einem Verlust der episomalen pDNA (Cervera et al., 2015; Gutiérrez-Granados et al., 2018; Lalonde & Durocher, 2017; O’Flaherty et al., 2020), was zu einer Reduktion der Anzahl transfizierter Zellen führt. Außerdem resultiert dies in einer Vergrößerung der Fraktion der *low* und *middle producer* und folglich in einer Abnahme der Fraktion der *high producer*.

Mit steigender Anzahl der wiederholten Transfektionsrunden (A2 zu A4/B2 zu B4) ist ein Trend hinsichtlich einer Zunahme und/oder Stabilisierung der TE erkennbar. Des Weiteren kann ein zunehmender Anteil der Zellen als *high producer* charakterisiert werden, was für eine starke und konstante Expression des Transgens spricht. Diese Trends sind vor allem im Fall einer relativ niedrigen TE der vorhergehenden Transfektion, beispielsweise in A3, am deutlichsten beobachtbar. In den Fällen, in denen durch die initiale Transfektion eine hohe TE erreicht wird, tendieren die wiederholten Transfektionen dazu, die TE konstant zu halten, anstatt sie weiter zu erhöhen, z.B. B2 oder B4. Für das Experiment A4 kann durch die erste wiederholte Transfektion eine Erhöhung der TE von 62 auf 77% erreicht werden, was zeigt, dass auch eine weitere Steigerung der TE ausgehend von einem hohen initial erreichten Wert möglich ist. Mit bis zu vier aufeinander folgenden Transfektionen (A4 und B4) beträgt die TE zwischen 60 und 70% 48 h nach der dritten und finalen Wiederholung und weiterhin ca. 60% nochmals 48 h später (96 h nach der dritten Wiederholung), dabei stellen die *high producer* die größte Fraktion dar (23% bei A4 und 27% bei B4). Folglich kann durch die RTT eine TE  $\geq 60\%$  über den gesamten Produktionszeitraum von 240 h aufrechterhalten werden.

Interessanterweise scheint eine hohe TE mit einer reduzierten Zellproliferation zu korrelieren, z.B. erkennbar bei einem Vergleich von A1 und B1, besonders, wenn der Anteil *high producer* durch die nachfolgenden Transfektionsrunden erhöht wird. So sinkt bei A3 die spezifische Wachstumsrate in den Intervallen zwischen den wiederholten Transfektionen von  $0,75 \text{ d}^{-1}$  über

0,64 d<sup>-1</sup> auf 0,19 d<sup>-1</sup>, während die TE und der Anteil *high producer* zunehmen. Eine hohe metabolische Belastung der Zellen durch die starke Transgen-Expression sowie eine intrazelluläre Akkumulation von EGFP können mögliche Gründe für eine Verlangsamung der Zellproliferation darstellen. Die Viabilität der Zellen beträgt in den meisten Fällen > 70%, wobei alle durchgeführten Transfektionen eine klare Reduktion der Viabilität induzieren. Auch mehrere aufeinanderfolgende Transfektionsrunden zeigen somit keinen verstärkt negativen Einfluss auf die Zellviabilität. Tatsächlich scheint die Erniedrigung der Viabilität nach der initialen Transfektion und der ersten Wiederholung am ausgeprägtesten, wohingegen dieser Effekt bei den nachfolgenden Transfektionen nur in einer abgeschwächten Form erkennbar ist. Hier könnte, mit einer zunehmenden Anzahl durchgeführter Transfektionen, eine biologische Adaption bzw. Selektion auftreten, wodurch die Zellen, die eine hohe Resistenz gegenüber den Transfektionsbedingungen/-agenzien und/oder eine hohe Transfizierbarkeit aufweisen, sich durchsetzen und vorherrschend werden könnten.

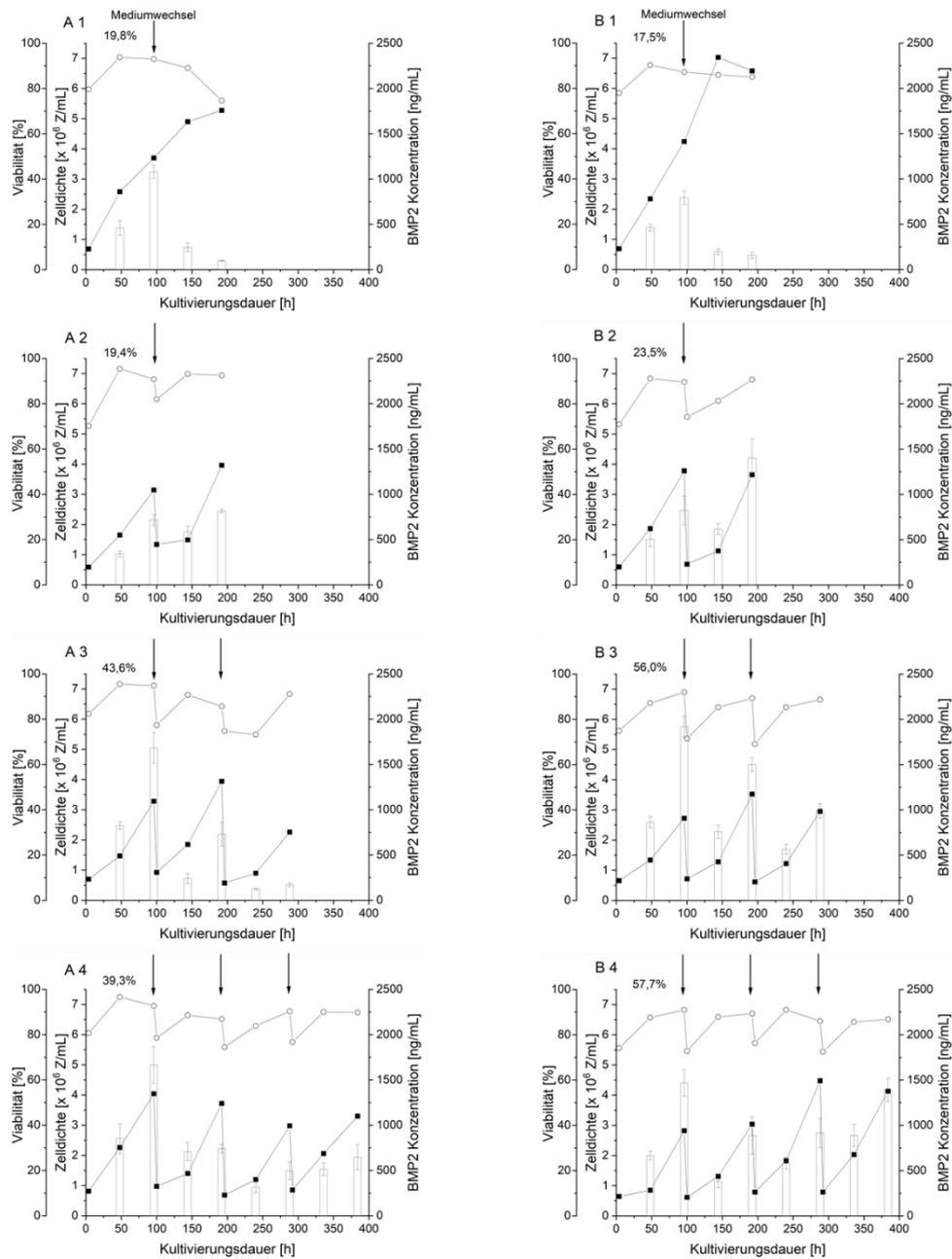
Im Vergleich zu dem von Cervera et al. beschriebenen Prozess der „*extended gene expression*“ (Cervera et al., 2015) bietet die hier entwickelte RTT aufgrund der HZD-Transfektion einen einfachen (keine Notwendigkeit der Polyplex-Bildung von pDNA und Polymer) und leicht skalierbaren (Vergrößerung des Maßstabes) Prozess zur TGE. Die entwickelte RTT erreicht eine hohe Transfektionseffizienz mit einem beständig hohen Expressionslevel des Transgens über einen Produktionszeitraum von 240 h.

#### 6.4.7. Anwendung der RTT für die transiente BMP2 Produktion in HEK<sub>SUS</sub> Zellen im Mikro-Scale

Für die Anwendung der RTT zur rekombinanten BMP2 Produktion wird das Plasmid pchBMP2, erneut versetzt mit 1% (w/w) pEGFP-N1 für eine schnelle Einschätzung der initialen TE, genutzt. In diesem Experiment werden die Zellen nach jeder Transfektionsrunde für 96 h kultiviert, da zu diesem Zeitpunkt eine maximale BMP2 Konzentration erreicht wird, basierend auf den Ergebnissen der Small-Scale Kultivierung (siehe Kapitel 6.4.5). Darauf folgend wird die benötigte Anzahl Zellen für die Wiederholung der Transfektion eingesetzt, während die BMP2 Konzentration im geernteten Kulturüberstand mittels ELISA bestimmt wird. Besonders für ein Protein wie BMP2, welches unter Zellkultur-/Produktionsbedingungen eine Instabilität zeigt und zusätzlich zu einer Bindung und/oder Aufnahme in die Produktionszellen tendiert, bewirkt eine Produkternte zu dem Zeitpunkt des maximalen BMP2 Titers eine Steigerung der

Gesamtausbeute des TGE Prozesses. Die RTT ermöglicht es, die Kultivierungsdauer bis zu der Produkternte nach der Transfektion zu optimieren. Außerdem resultiert die Tatsache, dass dieselben Zellen den wiederholten Transfektionen unterzogen werden, in einer Verlängerung der Dauer der (maximalen) Produktionsphase und könnte auch eine Steigerung der zellspezifischen Produktivität induzieren. Die Ergebnisse der RTT für die BMP2 Produktion sind in Abbildung 6-6 dargestellt. Es werden erneut zwei biologische Replikate (A und B) mit einer alleinigen initialen Transfektion (A1 und B1) und einer initialen Transfektion gefolgt von einer (A2 und B2), zwei (A3 und B3) sowie drei (A4 und B4) wiederholten Transfektionen durchgeführt.

Analog zu den Ergebnissen der Etablierung des RTT Prozesses mit pEGFP-N1 sind erneut deutliche Unterschiede zwischen den beiden durchgeführten biologischen Replikaten (A und B) und den individuellen Experimenten erkennbar. So liegt die BMP2 Konzentration 96 h nach initialer Transfektion in einem Bereich zwischen ca. 700 (A2) und 1900 ng/mL (A3). Jede wiederholte Transfektion ist einhergehend mit einem Mediumwechsel und somit mit einer Produkternte. Um zwischen dem Einfluss der wiederholten Transfektion und dem des Mediumwechsels/der Produkternte auf den BMP2 Titer differenzieren zu können, wird in Experiment A1 und B1 (nur initiale Transfektion) 96 h pt ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen werden für weitere 96 h kultiviert. Der Verlauf der BMP2 Konzentration bei einer Kultivierung ohne Medienwechsel zeigt eine Abnahme der BMP2 Konzentration (Small-Scale Kultivierung, siehe Abbildung 6-4). Wie erwartbar, fördert ein einfacher Mediumwechsel nicht die BMP2 Produktion. Die finalen BMP2 Titer am Ende der Kultivierung (192 h) sind äußerst gering ( $98 \pm 6$  ng/mL in A1 und  $156 \pm 35$  ng/mL in B1) und auch die zellspezifische Produktivität ist in den 96 h nach dem Mediumwechsel deutlich erniedrigt. Diese Effekte sind erneut auf die Verdünnung der episomalen pDNA während der Zellteilung zurückzuführen.



**Abbildung 6-6:** RTT für die transiente BMP2 Produktion in HEK<sub>SUS</sub> Zellen im Mikro-Scale.

Die RTT wird in zwei biologischen Replikaten (n = 2), gekennzeichnet als A und B, mit dem Plasmid pchBMP2 versetzt mit 1% (w/w) pEGFP-N1 durchgeführt. Die TE 48 h nach initialer Transfektion ist oben links angegeben. Die wiederholten Transfektionen werden mit einem Zeitintervall von 96 h durchgeführt, markiert mittels Pfeilen. In einem Intervall von 48 h wird die Zellichte (■) und Viabilität (○) mittels Trypanblaufärbung sowie die BMP2 Konzentration (weiße Säulen) mittels ELISA (Mittelwert ± SD fünf technischen Replikaten) bestimmt. Für A1 und B1 wird 96 h nach der initialen Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt. Abbildung nach (Riedl et al., 2022), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Die Daten wurden von Frau Maria John im Rahmen ihrer Masterarbeit im Jahr 2021 produziert.

Die zellspezifische Produktivität ( $\text{ng}/(1 \times 10^6 \text{ Z} \times \text{d})$ ) ist in den ersten 48 h nach der jeweiligen Transfektion in allen Experimenten am höchsten und sinkt in dem Zeitraum 48 bis 96 h pt ab. Die spezifische Wachstumsrate zeigt im Allgemeinen einen gegenteiligen Trend (Erhöhung in dem Zeitraum 48 bis 96 h pt), was erneut auf eine Korrelation zwischen Proteinexpression und Proliferation hinweist. Die Daten der individuellen Experimente sind in Tabelle 7-10 dargestellt. Im Detail wird zum einen deutlich, dass die Zellen bereits nach 48 h pt eine Abnahme der zellspezifischen Produktivität zeigen, vermutlich aufgrund der Verdünnung der pDNA während der Zellteilung oder aufgrund möglicher BMP2 Feedback Regulationsmechanismen. Zum anderen kommt es nach 48 h pt zu einer Zunahme der spezifischen Wachstumsrate, vermutlich aufgrund einer geringeren metabolischen Belastung durch eine reduzierte Stärke der Transgen-Expression. Gesamtbetrachtet sind beide Effekte jedoch einhergehend mit einer Zunahme der BMP2 Konzentration zwischen 0 und 96 h nach der jeweiligen Transfektion und einem maximalen BMP2 Produkttiter zum Zeitpunkt 96 h pt, wobei in einigen Fällen der Anstieg in den zweiten 48 h (zwischen 48 und 96 h pt) sehr ausgeprägt ist, beispielsweise in B3. In allen Experimenten induziert die wiederholte Transfektion eine deutliche BMP2 Expression, jedoch mit Unterschieden in den erzielten Produkttitern. So erreicht die erste Wiederholung der Transfektion in A2 und B2 sogar einen höheren BMP2 Titer im Vergleich zu der initialen Transfektion, mit einer Erhöhung um Faktor 1,7 für B2. Auch in A3/B3 und A4/B4 kommt zu einer erneuten Initiation der BMP2 Expression nach der ersten und zweiten Wiederholung der Transfektion, wenn auch mit einer reduzierten Effizienz und folglich mit geringeren Produkttitern im Vergleich zu der initialen Transfektion. Indessen zeigt sich nach der dritten Wiederholung der Transfektion, vor allem in Experiment B4, der Trend zu einem erneuten Anstieg der BMP2 Produktion. In diesem Experiment erlaubt die RTT einen BMP2 Titer zwischen 887 und 1468 ng/mL (jeweils 96 h nach der Transfektion) über einen Produktionszeitraum von 384 h aufrechtzuerhalten. In Tabelle 6-5 ist zusätzlich die BMP2 Ausbeute in jedem Experiment der RTT dargestellt.

**Tabelle 6-5:** BMP2 Ausbeute in der RTT für die transiente BMP2 Produktion in HEK<sub>sus</sub> Zellen im Mikro-Scale.

Kultivierungs- dauer [h] <sup>a</sup>	BMP2 Ausbeute [ng/(1 x 10 <sup>6</sup> Z)]								
	Experiment	A1 <sup>b</sup>	B1 <sup>b</sup>	A2	B2	A3	B3	A4	B4
96		292	187	288	218	513	705	412	520
192		19	24	206	384	186	426	200	292
288		-	-	-	-	77	335	166	205
384		-	-	-	-	-	-	196	336

<sup>a</sup> Die angegebenen Zeitpunkte entsprechen jeweils 96 h nach der Transfektion, zu diesem Zeitpunkt wird auch die Produkternte durchgeführt.

<sup>b</sup> Für Experiment A1 und B1 wird 96 h nach der initialen Transfektion ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen werden für weitere 96 h kultiviert.

Die BMP2 Produktion mittels RTT zeigt sehr ähnliche Trends zu der EGFP Produktion und ermöglicht analog eine Verlängerung der Produktionsdauer. Dennoch ist die BMP2 Produktion in nahezu allen Experimenten nach der initialen Transfektion am stärksten (siehe Abbildung 6-6 und Tabelle 6-5). Ob dies auf eine geringere pDNA Aufnahme während der wiederholten Transfektion oder auf eine reduzierte BMP2 Produktion aufgrund von zellulären Faktoren nach der wiederholten Transfektion zurückzuführen ist, ist nicht klar. Sowohl der intrazelluläre BMP2 Turnover (z.B. Ubiquitin-vermittelter proteasomaler Abbau von BMP2) als auch eine Limitierung in dem Schritt der proteolytischen Spaltung zur Freisetzung des reifen BMP2 durch Pro-Proteinkonvertasen sind zellbasierte Faktoren, die hier einen direkten Effekt auf die BMP2 Expression und Sekretion zeigen können (Heinks et al., 2021; Khattar et al., 2019; Sathyamurthy et al., 2015). In Experiment A4 und B4 scheint jedoch ein erneuter Anstieg der BMP2 Produktion stattzufinden, möglicherweise aufgrund einer Adaption bzw. Selektion der Zellen während des RTT Prozesses als Reaktion auf die wiederholten Transfektionen, analog zu der EGFP Produktion. Bemerkenswerterweise zeigen diese Daten keine Entwicklung einer höheren Toleranz der Zellen gegenüber den wiederholten Transfektionsrunden, welche bei Betrachtung der Viabilität bei der EGFP Produktion erkennbar ist. Dies erfordert eine tiefgründige Analyse der zellulären Reaktionen auf die (wiederholten) Transfektionen und den Produktionsprozess. Besonders die Gründe für eine mögliche höhere Toleranz der Zellen gegenüber der Transfektionsprozedur mit zunehmender Anzahl an Transfektionsrunden und für

die Tatsache, dass dieser Effekt nur in der RTT zu der EGFP Produktion und nicht bei der BMP2 Produktion beobachtbar ist, sind wichtige nachfolgende Fragestellungen. Auch die schlechte Reproduzierbarkeit der TGE in Bezug auf den Produkttiter/die Produktivität ist ein Faktor, welcher eine tiefgehende Analyse erfordert. Eine reproduzierbare zellspezifische Produktivität und Ausbeute des Gesamtprozesses sind kritische Faktoren für eine Standardisierung eines Produktionsprozesses.

Zwischen der TE und der entsprechenden BMP2 Konzentration, beide bestimmt 48 h nach der initialen Transfektion, ist eine Korrelation erkennbar (siehe Abbildung 6-6), was darauf hinweist, dass die zelluläre pDNA Aufnahme der entscheidende Faktor für die transiente Transgen-Expression ist. Beide Parameter, TE und BMP2 Konzentration, zeigen klare Variationen zwischen den individuellen Experimenten, ein Hinweis auf die Problematik der Reproduzierbarkeit in der TGE.

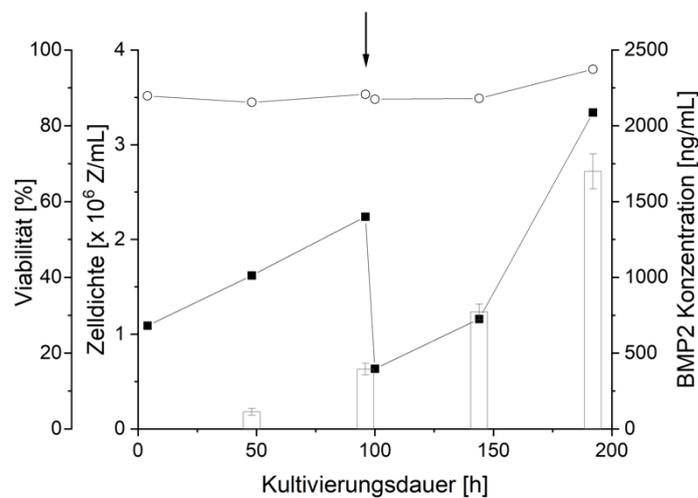
Jede wiederholte Transfektion ist mit einer Produkternte verbunden, sodass basierend auf der Anzahl der durchgeführten (wiederholten) Transfektionen (und somit des erhaltenen Volumens Kulturüberstand) und der entsprechend erreichten BMP2 Konzentration 96 h nach jeder Transfektion die insgesamt produzierte Menge BMP2 in dem Produktionsprozess berechnet werden kann. Mit dieser Berechnung erreicht Experiment B4 einen durchschnittlichen BMP2 Titer von 1165 ng/mL in eine Gesamtvolumen von 40 mL, was einer Produktausbeute des Gesamtprozesses von 46,6 µg BMP2 entspricht. Dies zeigt die Produktivitätssteigerung in der BMP2 Produktion durch die entwickelte RTT, denn mit nur der initialen Transfektion liegt die Ausbeute bei 10,8 bzw. 7,9 µg BMP2 für A1 bzw. B1. Im direkten Vergleich dazu erreicht A4 mit einer identischen Anzahl an Transfektionsrunden eine Produktausbeute von 35,5 µg BMP2 (durchschnittlich 887 ng/mL BMP2 in einem Gesamtvolumen von 40 mL). Interessanterweise zeigt Experiment B3 den höchsten durchschnittlichen Produkttiter (1469 ng/mL), was den signifikanten Einfluss der Effizienz der individuellen Transfektionen herausstellt. Mit insgesamt drei durchgeführten Transfektionen (Gesamtvolumen 30 ml) beträgt die Gesamtausbeute des Prozesses hier 44,1 µg.

Der RTT Prozess zur BMP2 Produktion optimiert sowohl das Problem der Produktinstabilität als auch das der Zell-Produkt-Interaktionen, kritische Faktoren, die die rekombinante BMP2 Produktion sowohl mit stabil transfizierten Zelllinien als auch mittels konventioneller transienter Transfektion erschweren. Während die Generierung stabiler Zelllinien einen langwierigen und kostenintensiven Prozess darstellt, ist die TGE durch einen langandauernden

Seed Trains gefolgt von einer verhältnismäßig kurzen Produktionsphase und somit durch eine limitierte Gesamtausbeute des Prozesses charakterisiert. Der Prozess der RTT, in dem ein initial transfizierter Zellbatch mehreren konsekutiven HZD-Transfektionen unterzogen wird, ermöglicht eine Verlängerung der Produktionsphase und führt zu einer Steigerung der Gesamtausbeute des TGE Prozesses.

#### 6.4.8. Scale-up der RTT von Medium- zu Large-Scale zur transienten BMP2 Produktion in HEK<sub>sus</sub> Zellen

Um die Eignung der RTT für einen potenziellen BMP2 Produktionsprozess im großen Maßstab zu zeigen, wird ein Scale-up der RTT bis zu einer Large-Scale Transfektion durchgeführt. Im Vergleich zu den oben beschriebenen RTT Experimenten im Mikro-Scale ist die Dauer des Seed Trains zum Erreichen der nötigen Zellzahl für eine Large-Scale Transfektion (beginnend mit  $10 \times 10^6$  Z in 10 mL zu  $1000 \times 10^6$  Z in 500 mL Kulturvolumen) in diesem Fall nicht zu unterschätzen ( $\geq$  ca. 7 d). Um die Effizienz des Gesamtprozesses zu maximieren und die mögliche biologische Adaption der Zellen an die Transfektionsprozedur zu nutzen, wird die initiale Transfektion bereits während des Seed Trains durchgeführt. Nach der initialen Medium-Scale Transfektion ( $500 \times 10^6$  Z) folgt eine zweite Transfektionsrunde im Large-Scale ( $1000 \times 10^6$  Z, erste wiederholte Transfektion). Während die Kultivierung nach der Medium-Scale Transfektion in einer Spinner-Flasche durchgeführt wird (Kulturvolumen 500 mL), sieht das Protokoll nach der Large-Scale Transfektion eine Kultivierung der Zellen in einem Kulturvolumen von 1 L vor. Eine Kultivierung in dieser Größenordnung erfolgt optimalerweise unter kontrollierten Bedingungen im einem Bioreaktor. In diesem Fall würde dies jedoch eine zeitgleiche Modifikation mehrerer Kultivierungsparameter des BMP2 Produktionsprozesses implizieren, was einen Vergleich mit dem vorhergehenden Medium-Scale Prozess (sowie der Small-Scale Kultivierung, siehe Kapitel 6.4.5) erschweren würde. Daher wird für dieses Experiment ein Aliquot (2,5 mL) der transfizierten Zellsuspension in 50 mL Medium (1:20 Verdünnung *post-incubation*) in einer Spinner-Flasche kultiviert. Für die Transfektion wird erneut das Plasmid pchBMP2 versetzt mit 1% (w/w) pEGFP-N1 verwendet. Die Ergebnisse des Scale-up der RTT sind in Abbildung 6-7 gezeigt.



**Abbildung 6-7:** Scale-up der RTT von Medium- zu Large-Scale für die transiente BMP2 Produktion in HEK<sub>sus</sub> Zellen.

Gezeigt ist die Zelldichte (■) und Viabilität (○), bestimmt mittels Trypanblaufärbung, sowie die BMP2 Konzentration (weiße Säulen), bestimmt mittels ELISA (Mittelwert ± SD fünf technischen Replikaten). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der wiederholten Transfektion. n = 1. Abbildung nach (Riedl et al., 2022), modifiziert, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Die Daten wurden von Frau Maria John im Rahmen ihrer Masterarbeit im Jahr 2021 produziert.

Die Zelldichte und Viabilität nach der Medium-Scale Transfektion zeigen einen erwartbaren Verlauf und erreichen eine Zelldichte von  $2,2 \times 10^6$  Z/mL 96 h pt, identisch zu der Small-Scale Transfektion (siehe Abbildung 6-4), mit einer hohen Viabilität der Zellen von 88%. Nach der wiederholten Transfektion im Large-Scale zeigen die Zellen eine verstärkte Zunahme der Zelldichte auf  $3,3 \times 10^6$  Z/mL und eine mit 96% sehr hohe Viabilität. Beide durchgeführten Transfektionen im größeren Maßstab induzieren nur eine geringe Abnahme der Zellviabilität auf 87% direkt nach der Transfektion (*post-incubation*). Die spezifische Wachstumsrate nach der Large-Scale Transfektion ist um Faktor 2 erhöht im Vergleich zu der Kultivierung nach der Medium-Scale Transfektion ( $0,19 \text{ d}^{-1}$  vs.  $0,43 \text{ d}^{-1}$ ) und zeigt eine deutliche Steigerung in dem Zeitraum 48 bis 96 h pt, analog zu den Mikro-Scale Experimenten. Die erreichte TE 48 h nach der initialen Medium-Scale Transfektion liegt bei lediglich 13% und ist damit klar reduziert zu den Ergebnissen im Mikro- oder Small-Scale. Die Maßstabsvergrößerung der Transfektionsprozedur erhöht die experimentell notwendige Bearbeitungsdauer und erschwert eine gründliche und gleichzeitig sanfte Vermischung der Zellen mit den Transfektionsagenzien

(pDNA und Polymer). Beide Faktoren können mögliche Gründe für die beobachtete geringe TE sein. Allerdings bewirkt die RTT im Large-Scale eine Verdoppelung der TE auf 28% 48 h pt. Die geringe TE korreliert klar mit der niedrigen BMP2 Konzentration von  $394 \pm 38$  ng/mL 96 h nach der initialen Medium-Scale Transfektion (Ausbeute  $176$  ng/( $1 \times 10^6$  Z)), deutlich geringer als die erreichten BMP2 Titer im Mikro-Scale (716 bis 1918 ng/mL nach initialer Transfektion) und im Small-Scale (1657 ng/mL). Die RTT im Large-Scale erreicht eine finale BMP2 Konzentration 96 h pt von  $1699 \pm 115$  ng/mL, was einer Erhöhung um Faktor 4,3 entspricht, mit einer einhergehenden Steigerung der BMP2 Ausbeute auf  $509$  ng/( $1 \times 10^6$  Z), welche zu den höchsten erreichten Werten gehören. Dies beweist das Scale-up Potential der RTT basierend auf HZD-Transfektionen und zeigt die Eignung für die transiente BMP2 Produktion im größeren Maßstab.

#### 6.5. Zusammenfassung und Ausblick

TGE ist ein einfaches und effektives Tool für die rekombinante Proteinproduktion mit zunehmender Relevanz und Anwendungsmöglichkeiten für die biopharmazeutische Industrie, vorteilhaft beispielsweise für die Produktion schwer zu exprimierender Proteine, konkret BMP2. Die HZD-Transfektion mit dem kationischen Polymer l-PEI erweist sich in dieser Arbeit als geeignete Methode der TGE. Ein bicistronisches Plasmid für die Co-Expression von BMP2 und EGFP erlaubt eine Bestimmung der TE anhand der EGFP Expression, erreicht jedoch nur sehr geringe BMP2 Titer. Die Nutzung eines monocistronischen Konstruktes für die BMP2 Expression erreicht eine deutliche Steigerung des Produkttiter in beiden Zelllinien, während die Codon-Optimierung für die Expression in CHO Zellen nur einen geringen Effekt zeigt. Die BMP2 Produktion ist in HEK<sub>sus</sub> Zellen deutlich effizienter als in CHO<sub>sus</sub> Zellen (um Faktor 104 erhöhter Produkttiter, um Faktor 123 erhöhte Ausbeute) und erreicht Werte von bis zu 1660 ng/mL 96 h pt. Um das intrinsische Problem einer zeitlich limitierten Transgen-Expression in der TGE zu überwinden, wird eine wiederholte transiente Transfektion (RTT), in der ein initial transfizierter Zellbatch bis zu drei konsekutiven HZD-Transfektionen unterzogen wird, entwickelt. Die Etablierung mit EGFP als Reporterprotein demonstriert einen Anteil  $\geq 60\%$  transfizierter (EGFP exprimierender) Zellen mit einem hohen Anteil *high producer* über einen Produktionszeitraum von 240 h. Der RTT Prozess zur BMP2 Produktion optimiert die Zeit bis zu der Produkternte nach jeder Transfektion und ermöglicht so eine maximale BMP2 Ausbeute, während folglich das Problem der Produktinstabilität sowie Zell-Produkt-

Interaktionen minimiert werden. Auf der anderen Seite wird sowohl die Dauer, in der ein hoher Anteil transfizierter Zellen mit hohem Expressionslevel in der Kultur vorhanden ist, als auch die Gesamtdauer der BMP2 Produktion verlängert. Vier konsekutive Transfektionsrunden im Mikro-Scale erreichen eine Gesamtausbeute von 46,6 µg BMP2 in einem Produktionszeitraum von 384 h. RTT ist kompatibel mit einem Upscaling in den Liter-Maßstab und kann in den Seed Train integriert werden, was die Effizienz eines Produktionsprozesses weiter steigern könnte. Dies demonstriert die Eignung der RTT für die transiente BMP2 Produktion im größeren Maßstab.

Für eine umfassende Evaluation der RTT ist zusätzlich eine Charakterisierung des produzierten BMP2, z.B. eine Analyse der Glykosylierung, notwendig, um eine konsistente Produktqualität nachweisen zu können. In diesem Kontext ist auch ein Nachweis der biologischen Aktivität von BMP2 *in vitro*, beispielsweise durch die Differenzierung der Myoblasten Zelllinie C2C12 in Osteoblasten, ein essenzieller Faktor (Fung et al., 2019). Auch ist eine tiefgründige Analyse der zellulären Reaktionen auf die (wiederholten) Transfektionen und den Prozess der RTT notwendig, um die aktuellen Limitationen der schlechten Reproduzierbarkeit der zellspezifischen Produktivität und des Produkttiters überwinden zu können. So sind zum einen eine Analyse der Transfektion, also der pDNA Aufnahme in die Zelle, als auch eine Analyse der zellulären Aktivität, konkret der Transkription der pDNA, Translation und Stabilität der mRNA, Faltung und Reifung, Sekretion, intrazellulärer Turnover und Abbau von BMP2, wichtige Fragestellungen, sowie in diesem Zusammenhang ebenfalls die Interaktion des sekretierten BMP2 mit den HEK<sub>sus</sub> Zellen.

Für eine weitere Steigerung der BMP2 Ausbeute können verschiedene Strategien angewendet werden. Eine Modifikation der Kultivierungsparameter stellt einen einfachen Ansatz dar. Eine reduzierte Kultivierungstemperatur oder die Zugabe von Valproinsäure kann die Proteinexpression in HEK293 Zellen nach transients Transfektion erhöhen (Arena et al., 2018; Hacker et al., 2013; Lin et al., 2015). Auch die proteolytischen Spaltung zur Freisetzung des reifen BMP2 durch Pro-Proteinkonvertasen könnte eine zellbasierte Limitierung darstellen (Heinks et al., 2021; Sathyamurthy et al., 2015). Eine stabile oder transiente Überexpression des entsprechenden Gens würde es erlauben, den Einfluss zu analysieren und gegebenenfalls den Produkttiter zu steigern. Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Reduktion der Interaktion des sekretierten BMP2 mit den HEK<sub>sus</sub> Zellen. Nach der Aufklärung der zugrundeliegenden

Mechanismen und der verantwortlichen zellulären Rezeptoren könnten diese durch Zugabe von Strukturanaloga geblockt und so die Bindung von BMP2 an diese verhindert werden. Eine Alternative dazu stellt ein Zelllinien Engineering, also eine genetische Modifikation der Zelllinie mittels Gen Knockout (z.B. vermittelt über CRISPR-Cas9) oder Gen Silencing (z.B. vermittelt über RNA- (*ribonucleic acid*-) Interferenz) dar.

Die entwickelte Methode der RTT kann die Eignung der TGE als Produktionstechnologie in der biopharmazeutischen Industrie weiter erhöhen. Der Erfolg der Gentherapie, der Weg in Richtung personalisierte Medizin und Präzisionsmedizin sowie neue Anforderungen in der Impfstoffentwicklung- und -produktion stellen neue Anwendungsfelder dar, die eine höhere Anzahl therapeutischer Wirkstoffe (folglich auch ein deutlich intensiveres Screening von Proteinkandidaten), geringere Produktionsvolumina (Scale-down) und eine reduzierte Dauer des Entwicklungsprozesses von der genetischen Sequenz bis zur klinischen Anwendung fordern. TGE zeigt hier ein deutliches Potential für diese neu aufkommenden Anwendungen (Gutiérrez-Granados et al., 2018) und die RTT könnte die Anwendbarkeit weiter verbessern.

## 7. Anhang

### 7.1. Anhang zu Kapitel 3

Die folgende Tabelle bietet eine Gegenüberstellung von L-15 Medium und Schneider's Drosophila Medium bezüglich der Eigenschaften und ausgewählter Bestandteile beider Basalmedien.

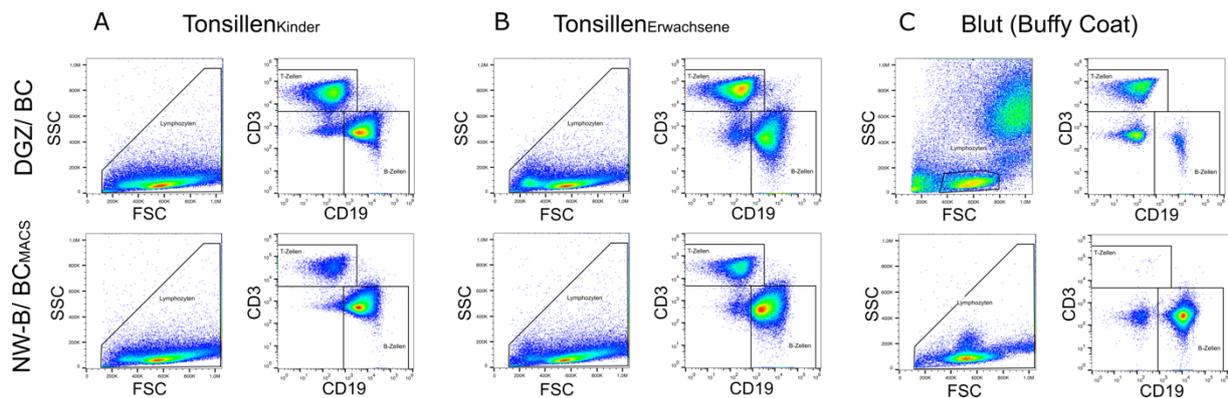
**Tabelle 7-1:** Eigenschaften und ausgewählte Bestandteile von L-15 Medium (Leibovitz, 1963) und Schneider's Drosophila Medium (I. Schneider, 1964).

Eigenschaft/Komponente	L-15	Schneider's Drosophila Medium
pH-Wert [-]	7,4 – 7,9	6,2 – 6,8
Osmolalität [mOsmol/kg]	300 - 340	320 – 340
Kohlenstoffquelle	0,9 g/L Galactose	2 g/L Glucose
L-Glutamin [mM]	-	12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [g/L]	0,06	0,45
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> [g/L]	0,19	0,70
NaHCO <sub>3</sub> [g/L]	-	0,40

### 7.2. Anhang zu Kapitel 4

Abbildung 7-1 zeigt die verwendete Auswertestrategie der Analyse von B-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Tabelle 7-2 bietet eine Übersicht über die bekannten Informationen der untersuchten Spender der Tonsillen und des Blutes (Buffy Coat). Der Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung auf die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen im Rahmen der Entwicklung des Isolationsprotokolls ist in Tabelle 7-3 dargestellt. Die individuellen Daten der analysierten Spender für die Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Kindern, Erwachsenen und Blut (Buffy Coat) sind jeweils in Tabelle 7-4, Tabelle 7-5 und Tabelle 7-6 dargestellt. Tabelle 7-7 bis Tabelle 7-9 enthalten die Daten der Charakterisierung der B-Zellen bezüglich der Expression der Oberflächenmarker CD20, CD27 und CD38 bei der Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Kindern, Erwachsenen und Blut (Buffy Coat).



**Abbildung 7-1:** Auswertestrategie der Analyse von B-Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Repräsentative Analyse und Klassifizierung der isolierten humanen Zellen in die unterschiedlichen Populationen für Zellen aus A) Tonsillen von Kindern, B) Tonsillen von Erwachsenen und C) Blut (Buffy Coat). Abbildung nach (Helm et al., 2021), Copyright Elsevier, modifiziert.

**Tabelle 7-2:** Informationen zu den untersuchten humanen Spendern des tonsillären Gewebes und des Blutes (Buffy Coat).

Gewebe/ Alterskategorie der Spender	Spender	Geschlecht	Alter [a]	Durchgeführte Operation	Klinische Diagnose
Tonsillen/Kinder	K1	Männlich	2	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K2	Männlich	4	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K3	Weiblich	2	Tonsillotomie	Chronische Tonsillitis
	K4	Weiblich	4	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K5	Männlich	3	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K6	Weiblich	3	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K7	Männlich	4	Tonsillotomie	Chronische Tonsillitis
	K8	Männlich	4	Tonsillotomie	Chronische Tonsillitis
	K9	Weiblich	3	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K10	Männlich	3	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K11	Männlich	5	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K12	Männlich	4	Tonsillotomie	Tonsillenhypertrophie
	K13	Weiblich	5	Tonsillektomie	Chronische Tonsillitis
	K14	Weiblich	5	Tonsillektomie	Chronische Tonsillitis
Tonsillen/Erwachsene	E1	Männlich	34	Tonsillektomie	Chronische Tonsillitis
	E2	Weiblich	38	Tonsillektomie	Tonsillenhypertrophie
	E3	Weiblich	20	Tonsillektomie	Chronische Tonsillitis
	E4	Weiblich	28	Tonsillektomie	Chronische Tonsillitis
	E5	Weiblich	22	Tonsillektomie	Chronische Tonsillitis
	E6	Weiblich	23	Tonsillektomie	Chronische Tonsillitis
Buffy Coat/Erwachsene	BC1	Männlich	44	-	-
	BC2	Weiblich	53	-	-
	BC3	Männlich	62	-	-
	BC4	Männlich	50	-	-
	BC5	Weiblich	39	-	-
	BC6	Weiblich	52	-	-
	BC7	Männlich	51	-	-

**Tabelle 7-3:** Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung (EV) auf die isolierten Zellen in der DGZ Fraktion bei der Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen von Kindern und Erwachsenen.

Spender	Feuchtgewicht Gewebe [g]		Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]		Relative Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/g]		Viabilität [%]		B-Zellen [%]		T-Zellen [%]	
	Ohne EV	Mit EV	Ohne EV	Mit EV	Ohne EV	Mit EV	Ohne EV	Mit EV	Ohne EV	Mit EV	Ohne EV	Mit EV
K11	1,01	0,42	255,5	72,0	253,5	172,7	96,5	92,0	63,8	65,8	30,9	27,7
K12	1,56	1,54	569,0	743,0	364,7	482,1	91,8	95,4	49,1	46,7	46,0	47,8
K13	1,18	1,06	234,5	84,5	198,9	79,7	96,6	93,2	30,4	27,7	63,5	65,7
K14	2,94	2,85	790,0	370,0	268,7	129,8	92,6	95,6	38,9	43,9	55,9	50,7
E6	0,43	0,60	43,5	37,1	102,3	61,8	95,0	94,0	37,1	40,0	58,0	54,0

**Tabelle 7-4:** Individuelle Daten der analysierten Spender für die Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Kindern.

Spender	Feuchtgewicht Gewebe [g]	DGZ Fraktion					NW-B Fraktion							
		Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/g]	Viabilität [%]	B-Zellen [%]	T-Zellen [%]	Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/g]	Viabilität [%]	B-Zellen [%]	T-Zellen [%]	Ausbeute reiner B-Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute reiner B-Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/g]	Wiederfindungsrate reiner B-Zellen [%]
K1	1,49	341,5	229,5	90,7	47,7	46,7	281,0	188,9	94,9	93,6	4,8	263,0	176,8	161,4
K2	1,23	151,5	123,4	93,0	62,9	34,1	53,0	43,2	92,8	88,1	8,0	46,7	38,0	49,0
K3	0,70	65,7	93,9	97,3	57,3	37,9	26,0	37,1	95,4	94,5	3,9	24,6	35,1	65,4
K4	3,03	426,2	140,7	95,2	49,5	45,0	161,5	53,3	92,4	90,9	6,0	146,8	48,5	69,6
K5	0,54	89,5	165,7	96,3	55,4	41,6	27,9	51,7	95,1	93,7	4,9	26,1	48,4	52,6
K6	0,71	164,5	231,7	94,2	67,8	28,6	48,2	67,9	96,7	93,3	4,9	45,0	63,4	40,3
K7	1,21	218,0	180,2	93,0	57,0	38,1	141,5	116,9	97,0	94,0	4,4	133,0	109,9	107,0
K8	1,27	284,0	223,8	94,5	47,7	46,7	103,5	81,5	94,3	93,6	4,8	96,9	76,3	71,5
K9	1,18	250,7	213,0	92,8	63,6	33,8	89,0	75,6	88,1	91,1	8,0	81,1	68,9	50,9
K10	0,70	104,0	147,9	96,4	50,4	45,4	42,7	60,7	96,9	90,4	8,0	38,5	54,8	73,6
Mittelwert ±	1,21 ±	209,6 ±	175,0 ±	94,3 ±	55,9 ±	39,8 ±	97,4 ±	77,7 ±	94,4 ±	92,3 ±	5,8 ±	90,2 ±	72,0 ±	74,1 ±
SD	0,68	111,0	46,1	1,9	6,8	6,0	75,6	42,9	2,6	2,0	1,5	70,7	40,6	34,0
Signifikanz				**	**				#	***	***	*	#	##
Median	1,19	191,3	173,0	94,4	56,2	39,9	71,0	64,3	95,0	93,5	4,9	63,9	59,1	67,5

Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen von Kindern und Tonsillen von Erwachsenen ist mit \* (signifikant,  $p < 0,05$ ), \*\* (sehr signifikant,  $p < 0,01$ ) und \*\*\* (hoch signifikant,  $p < 0,001$ ) gekennzeichnet und wird für folgende Parameter analysiert: DGZ Fraktion: Anteil B-Zellen, Anteil T-Zellen; NW-B Fraktion: Viabilität, Anteil B-Zellen, Anteil T-Zellen, Ausbeute reiner B-Zellen, Wiederfindungsrate.

Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen von Kindern und Blut (Buffy Coat) ist mit # (signifikant,  $p < 0,05$ ), ## (sehr signifikant,  $p < 0,01$ ) und ### (hoch signifikant,  $p < 0,001$ ) gekennzeichnet und wird für folgende Parameter analysiert: NW-B Fraktion: Viabilität, Anteil B-Zellen, Anteil T-Zellen, Ausbeute reiner B-Zellen, Wiederfindungsrate.

**Tabelle 7-5:** Individuelle Daten der analysierten Spender für die Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Erwachsenen.

Spender	Feuchtgewicht Gewebe [g]	DGZ Fraktion					NW-B Fraktion							
		Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/g]	Viabilität [%]	B-Zellen [%]	T-Zellen [%]	Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/g]	Viabilität [%]	B-Zellen [%]	T-Zellen [%]	Ausbeute reiner B-Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute reiner B-Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/g]	Wiederfindungsrate reiner B-Zellen [%]
E1	2,45	587,0	239,7	93,3	20,0	77,0	138,5	56,6	93,8	83,1	12,7	115,1	47,0	98,0
E2	5,27	1018,5	193,3	95,5	26,9	68,8	157,2	29,8	91,7	74,3	21,8	116,9	22,2	42,7
E3	7,39	1571,0	212,6	89,5	41,2	54,5	544,4	73,6	91,5	77,8	19,0	423,6	57,4	65,4
E4	3,19	1170,0	366,8	91,6	43,6	52,5	360,6	113,0	83,0	72,8	22,0	262,5	82,3	51,5
E5	5,80	1441,5	248,5	85,1	32,7	62,0	539,5	93,0	96,8	79,8	18,0	430,5	74,2	91,3
Mittelwert ± SD	4,82 ± 1,79	1157,6 ± 345,4	252,2 ± 60,6	91,0 ± 3,5	32,9 ± 8,8	63,0 ± 9,1	348,1 ± 176,5	73,2 ± 28,8	91,4 ± 4,6	77,6 ± 3,7	18,7 ± 3,4	269,7 ± 139,2	56,6 ± 21,2	69,8 ± 21,7
Signifikanz					**	**	*		#	***	***	*		##
Median	5,27	1170,0	239,7	91,6	32,7	62,0	360,6	73,6	91,7	77,8	19,0	262,5	57,4	65,4

Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen von Kindern und Tonsillen von Erwachsenen ist mit \* (signifikant,  $p < 0,05$ ), \*\* (sehr signifikant,  $p < 0,01$ ) und \*\*\* (hoch signifikant,  $p < 0,001$ ) gekennzeichnet und wird für folgende Parameter analysiert: DGZ Fraktion: Anteil B-Zellen, Anteil T-Zellen; NW-B Fraktion: Viabilität, Anteil B-Zellen, Anteil T-Zellen, Ausbeute reiner B-Zellen, Wiederfindungsrate.

Statistische Signifikanz zwischen Tonsillen von Erwachsenen und Blut (Buffy Coat) ist mit # (signifikant,  $p < 0,05$ ), ## (sehr signifikant,  $p < 0,01$ ) und ### (hoch signifikant,  $p < 0,001$ ) gekennzeichnet und wird für folgende Parameter analysiert: NW-B Fraktion: Viabilität, Anteil B-Zellen, Anteil T-Zellen, Ausbeute reiner B-Zellen, Wiederfindungsrate.

**Tabelle 7-6:** Individuelle Daten der analysierten Spender für die Isolation von B-Zellen aus humanem Blut (Buffy Coat) von Erwachsenen.

Spender	Volumen Blut (Buffy Coat) [mL]	BC					BCM <sub>ACS</sub>							
		Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/ mL]	Viabilität [%]	B-Zellen [%]	T-Zellen [%]	Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/ mL]	Viabilität [%]	B-Zellen [%]	T-Zellen [%]	Ausbeute reiner B-Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z]	Relative Ausbeute reiner B-Zellen [x 10 <sup>6</sup> Z/ mL]	Wiederfindungsrate reiner B-Zellen [%]
BC1	33	3188	96,6	99,6	2,9	89,9	35,3	1,1	98,5	97,0	0,9	34,2	1,0	37,0
BC2	32	5632	175,7	96,2	3,9	80,5	17,5	0,5	93,7	98,0	0,3	17,2	0,5	7,8
BC3	38	5814	153,0	96,7	7,1	75,5	40,5	1,1	96,6	95,0	0,3	38,5	1,0	9,3
BC4	30	3450	115,0	94,6	4,9	71,3	19,4	0,6	98,4	94,6	0,1	18,4	0,6	10,9
BC5	30	1347	44,9	87,8	6,0	87,6	16,2	0,5	96,7	89,1	2,7	14,4	0,5	17,9
BC6	32	2355	73,6	92,8	9,5	79,0	71,1	2,2	98,0	95,9	0,5	68,2	2,1	30,5
BC7	35	1152	32,9	92,6	4,1	87,6	36,9	1,1	94,6	93,0	0,5	34,3	1,0	72,7
Mittelwert ± SD	33 ± 3	3277 ± 1737	98,8 ± 49,3	94,3 ± 3,5	5,5 ± 2,1	81,6 ± 6,5	33,8 ± 17,9	1,0 ± 0,6	96,6 ± 1,7	94,7 ± 2,7	0,8 ± 0,8	32,2 ± 17,2	1,0 ± 0,5	26,6 ± 21,5
Median	32	3188	96,6	94,6	4,9	80,5	35,3	1,1	96,7	95,0	0,5	34,2	1,0	17,9

**Tabelle 7-7:** Expression der Oberflächenmarker CD20, CD27 und CD38 in der B-Zell Population (CD19<sup>+</sup>) vor und nach der Aufreinigung mittels Nylon Wolle sowie die Wiederfindungsrate bei der Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Kindern.

Spender	DGZ Fraktion			NW-B Fraktion			Wiederfindungsrate		
	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]
K1	-	-	-	100,4	47,3	50,1	-	-	-
K2	-	-	-	100,0	55,5	54,9	-	-	-
K3	-	-	-	85,7	31,8	38,4	-	-	-
K4	-	-	-	86,5	35,6	33,5	-	-	-
K5	-	-	-	100,1	58,5	67,6	-	-	-
K6	-	-	-	100,3	29,0	41,3	-	-	-
K7	-	-	-	100,1	66,3	74,9	-	-	-
K8	-	-	-	100,1	42,0	43,4	-	-	-
K9	100,0	31,4	35,9	100,1	35,0	38,0	100,1	111,5	105,8
K10	98,3	50,9	40,7	99,8	42,5	34,9	101,5	83,5	85,8
Mittelwert ± SD	99,2 ± 0,8	41,2 ± 9,7	38,3 ± 2,4	97,3 ± 5,6	44,4 ± 11,8	47,7 ± 13,4	100,8 ± 0,7	97,5 ± 14,0	95,8 ± 10,0
Median	99,2	41,2	38,3	100,1	42,3	42,4	100,8	97,5	95,8

**Tabelle 7-8:** Expression der Oberflächenmarker CD20, CD27 und CD38 in der B-Zell Population (CD19<sup>+</sup>) vor und nach der Aufreinigung mittels Nylon Wolle sowie die Wiederfindungsrate bei der Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Erwachsenen.

Spender	DGZ Fraktion			NW-B Fraktion			Wiederfindungsrate		
	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]
E1	-	-	-	98,6	58,2	36,6	-	-	-
E2	99,5	53,2	12,6	100,0	50,0	11,6	100,5	94,0	92,1
E3	98,5	42,3	29,7	98,7	39,8	29,1	100,2	94,1	98,0
E4	99,4	64,6	41,8	97,6	69,7	58,2	98,2	107,9	139,2
E5	94,0	74,8	32,7	93,1	56,3	32,5	99,0	75,3	99,4
Mittelwert ± SD	97,9 ± 2,3	58,7 ± 12,2	29,2 ± 10,6	97,4 ± 2,6	54,0 ± 10,8	32,9 ± 16,6	99,5 ± 0,9	92,8 ± 11,6	107,2 ± 18,7
Median	99,0	58,9	31,2	98,2	53,2	30,8	99,6	94,0	98,7

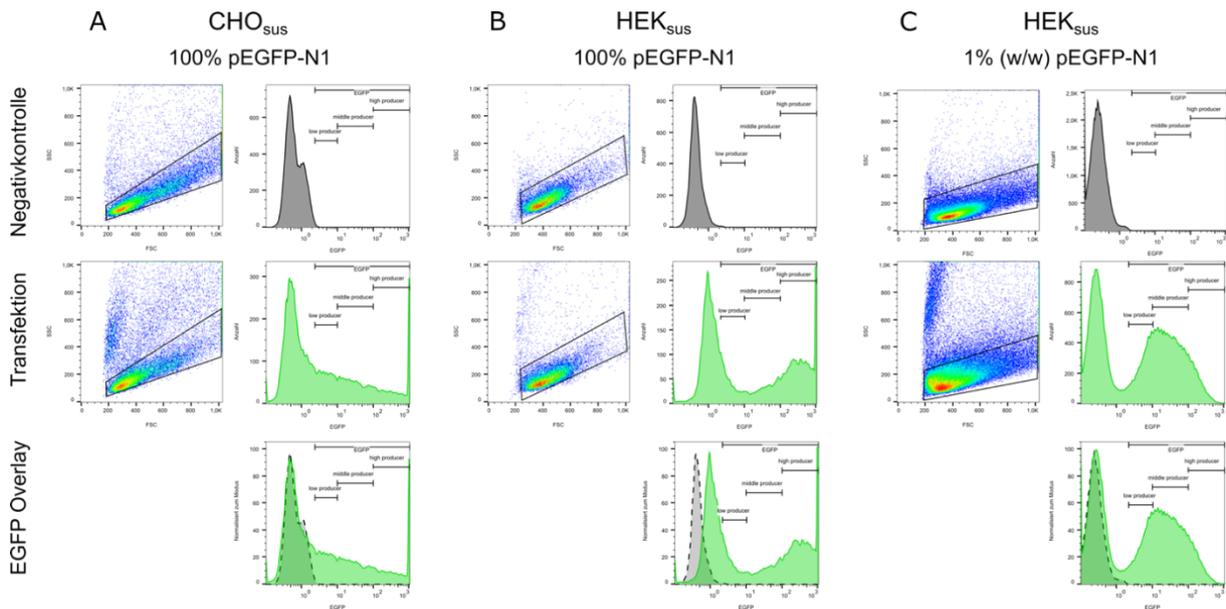
**Tabelle 7-9:** Expression der Oberflächenmarker CD20, CD27 und CD38 in der B-Zell Population (CD19<sup>+</sup>) vor und nach der Aufreinigung mittels MACS sowie die Wiederfindungsrate bei der Isolation von B-Zellen aus humanem Blut (Buffy Coat).

Spender	BC			BC <sub>MACS</sub>			Wiederfindungsrate		
	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]	CD20 <sup>+</sup> [%]	CD27 <sup>+</sup> [%]	CD38 <sup>+</sup> [%]
BC1	-	-	-	99,3	24,4	82,1	-	-	-
BC2	-	-	-	99,9	30,2	62,7	-	-	-
BC3	99,5	21,3	87,9	100,0	14,0	89,4	100,5	65,7	101,7
BC4	99,7	38,2	65,0	99,9	20,5	71,9	100,2	53,7	110,6
BC5	99,4	37,1	67,8	99,9	22,7	76,8	100,5	61,2	113,3
BC6	99,8	15,1	59,0	99,9	12,0	53,8	100,1	79,5	91,2
BC7	99,7	41,3	65,3	99,6	34,3	56,5	99,9	83,1	86,5
Mittelwert ± SD	99,6 ± 0,1	30,6 ± 10,4	69,0 ± 9,9	99,8 ± 0,2	22,6 ± 7,5	70,5 ± 12,4	100,2 ± 0,2	68,6 ± 11,1	100,7 ± 10,5
Median	99,7	37,1	65,3	99,9	22,7	71,9	100,2	65,7	101,7

### 7.3. Anhang zu Kapitel 6

Die folgende Abbildung zeigt die verwendete Auswertestrategie zur Bestimmung der TE und des EGFP Expressionslevels für die Analyse der transienten Transfektion mittels Durchflusszytometrie.

Tabelle 7-10 zeigt die detaillierten Daten der zellspezifischen Produktivität ( $q$ ) und Wachstumsrate ( $\mu$ ) der HEK<sub>sus</sub> Zellen in der RTT für die transiente BMP2 Produktion.



**Abbildung 7-2:** Repräsentative Auswertung der Bestimmung der TE und des EGFP Expressionslevels mittels Durchflusszytometrie 48 h nach der transienten Transfektion.

A) CHO<sub>sus</sub> Zellen transfiziert mit pEGFP-N1. B) HEK<sub>sus</sub> Zellen transfiziert mit pEGFP-N1. C) HEK<sub>sus</sub> Zellen transfiziert mit pchBMP2 versetzt mit 1% (w/w) pEGFP-N1. EGFP Overlay: grau mit gestrichelter Linie: EGFP Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle. Grün: EGFP Fluoreszenzintensität der transfizierten Zellen.

**Tabelle 7-10:** Zellspezifische Produktivität (q) und Wachstumsrate ( $\mu$ ) der HEK<sub>SUS</sub> Zellen in der RTT für die transiente BMP2 Produktion im Mikro-Scale.

Kultivierungs- dauer [h] <sup>a</sup>	q <sup>b</sup>	$\mu^c$						
Experiment	A1		A2		A3		A4	
4 - 48	153	0,72	166	0,56	414	0,40	302	0,56
48 - <b>96</b>	99	0,18	78	0,32	180	0,40	129	0,29
100 - 144	-	-	226	0,06	95	0,38	325	0,20
144 - <b>192</b>	-	-	42	0,49	85	0,38	7	0,49
196 - 240	-	-	-	-	92	0,24	183	0,31
240 - <b>288</b>	-	-	-	-	16	0,46	43	0,45
292 - 336	-	-	-	-	-	-	192	0,48
336 - <b>384</b>	-	-	-	-	-	-	24	0,24
Experiment	B1		B2		B3		B4	
4 - 48	167	0,67	224	0,62	471	0,39	486	0,15
48 - <b>96</b>	50	0,30	56	0,35	260	0,35	218	0,60
100 - 144	-	-	369	0,27	414	0,32	216	0,41
144 - <b>192</b>	-	-	164	0,59	155	0,51	116	0,42
196 - 240	-	-	-	-	336	0,37	242	0,46
240 - <b>288</b>	-	-	-	-	102	0,44	53	0,45
292 - 336	-	-	-	-	-	-	344	0,51
336 - <b>384</b>	-	-	-	-	-	-	81	0,36

<sup>a</sup> Die Zelldichte und BMP2 Konzentration wird alle 48 h bestimmt. Die wiederholten Transfektionen werden in einem Zeitintervall von 96 h durchgeführt, nach einer Kultivierungsdauer von 96, 192 und 288 h. Zu diesen Zeitpunkten sowie nach 384 h wird auch die Produktermte durchgeführt.

<sup>b</sup> q: zellspezifische Produktivität [ng/(1 x 10<sup>6</sup> Z x d)].

<sup>c</sup>  $\mu$ : spezifische Wachstumsrate [d<sup>-1</sup>].

#### 7.4. Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen, Kits

Folgende Chemikalien, Reagenzien, Puffer, Lösungen und Kits werden in dieser Arbeit genutzt. Reinstwasser (Typ I) wird mittels einer Millipore Anlage hergestellt und als Wasser bezeichnet. Für spezifische Anwendungen wird, wenn angegeben, hochreines Wasser verwendet.

**Tabelle 7-11:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen, Kits.

Material	Modell/ Spezifikation	Artikel- nummer	Hersteller	Ort, Land
Acridin Orange/ Propidium Iodide Stain Cell Viability Kit	-	F23001	Logos Biosystems	Gyeonggi-do, Südkorea
Agarose	-	BIO-41029	Meridian Bioscience	Memphis, Tennessee, USA
Anti-human CD3-PE Antikörper	Maus, Klon HIT3a	555340	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Anti-human CD3-PE Antikörper	Maus, Klon OKT3	317308	Biolegend	San Diego, Kalifornien, USA

Anti-human CD19-APC Antikörper	Maus, Klon HIB19	302212	Biolegend	San Diego, Kalifornien, USA
Anti-human CD20-PE Antikörper	Maus, Klon 2H7	302306	Biolegend	San Diego, Kalifornien, USA
Anti-human CD25-PE-Cy5 Antikörper	Maus, Klon M-A251	555433	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Anti-human CD27-PE/Cy7 Antikörper	Maus, Klon M-T271	356412	Biolegend	San Diego, Kalifornien, USA
Anti-human CD38-FITC Antikörper	Maus, Klon HB-7	356610	Biolegend	San Diego, Kalifornien, USA
Bromphenolblau	Natriumsalz	403160100	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
BSA	≥ 98%, biotinfrei, Lot Nummer 02892831	0163.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
CdCl <sub>2</sub>	-	20899	Fluka/ Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub>	-	120011000U	Grüssing GmbH	Filsum, Deutschland
Collagen Typ I, human	2,5 – 3,5 mg/mL in 10 mM HCl, rekombinant	C7624-5ML	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Collagen Typ II, Rind	Aus trachealem Rinder-Knorpelgewebe	C1188-5MG	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Collagenase Typ II	Von <i>Clostridium histolyticum</i> , Lot Nummer 47N17872A, 280 U/mg	C 2-28	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Collagenase Typ IV	Aus <i>Clostridium histolyticum</i> , Lot Nummer SLB6045V, > 125 CDU/mg	C9263-1G	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Coulter Clenz	-	8448222	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
CuCl <sub>2</sub>	-	307-483	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Dispase II	Lot Nummer BCB4904V, ≥ 0,5 Units/mg	D4693-1G	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
DMSO	Steril-filtriert	D2438-50ML	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
DPBS	ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	L 1825	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
DPBS	ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	BE17-512Q	Lonza Group Ltd	Basel, Schweiz
DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	5 Plates	DY008	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt
EDTA	-	10305	Grüssing GmbH	Filsum, Deutschland
Essigsäure	-	A/0400/PB15	Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA

Ethanol	-	20821.310	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Gelatine, Schwein	Aus der Schweinehaut, Typ A	G1890-100G	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Glycerin	-	G/0650/17	Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
HBSS	ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> , ohne Phenolrot	L 2045	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Hind III HF	High Fidelity (HF)	R3104S	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, Deutschland
Human BMP-2 DuoSet ELISA	5 Plates 15 Plates	DY355-05 DY355	Bio-Techne GmbH	Wiesbaden-Nordenstadt
HyperLadder™	1 kb	BIO-33026	Meridian Bioscience	Memphis, Tennessee, USA
Isopropanol	-	33539-1L-M	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Isoton II Diluent	-	8448011	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
KHCO <sub>3</sub>	-	120291000U	Grüssing GmbH	Filsum, Deutschland
1-PEI	25 kDa	23966-2	Polyscience Europe GmbH	Eppelheim, Deutschland
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	-	J15-004	PAA Laboratories GmbH	Pasching, Österreich
MACSxpress Whole Blood B Cell Isolation Kit, human	-	130-098-190	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
MTT	-	L11939.06	Alfa Aesar	Ward Hill, Massachusetts, USA
MOPS	-	6979.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
NaCl	-	27810.295	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	-	HN01.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
NaOH	-	CN30.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
NH <sub>4</sub> Cl	-	1.01145.1000	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
pcDNA3.1(-)	-	V79020	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
pchBMP2	-	-	Eurofins Genomics	Ebersberg, Deutschland
pchBMP2optCHO	-	-	Eurofins Genomics	Ebersberg, Deutschland
pEGFP-N1	-	-	Clontech Laboratories, Inc.	Mountain View, Kalifornien, USA
phBMP2-EGFP	-	-	Prof. Dr. Ruth Freitag, Lehrstuhl Bioprozesstechnik, Universität Bayreuth	Bayreuth, Deutschland

peqGREEN	DNA/RNA-Farbstoff, 20000 X	732-3196	Peqlab (VWR International GmbH)	Darmstadt, Deutschland
Poly-L-Lysin	0,01% (w/v) $\pm$ 5 mg/mL in H <sub>2</sub> O, steril, 150 – 300 kDa	P4832	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Propidiumiodid	1,0 mg/mL in H <sub>2</sub> O	P4864-10ML	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
QIAGEN Plasmid Giga Kit	5 Columns	12191	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
Ribonuklease A	-	7156.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
RNase A	100 mg/mL	1072591	QIAGEN GmbH	Hilden, Deutschland
SDS	Pellets	CN30.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Silbernanopartikel	40 nm, 0,02 mg/mL, in 2 mM Natriumcitrat-Lösung	J67090	Alfa Aesar	Ward Hill, Massachusetts, USA
SpeI HF	High Fidelity (HF)	R3133S	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main, Deutschland
TRIS	-	2449.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
TRIS-HCl	-	2449.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	-	1.08603.1000	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Trypanblau-Lösung	0,4% (v/v)	K940-100ML	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Wasser, hochrein	Steril-filtrierte, BioReagent	W3500-100mL	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland

## 7.5. Puffer

Die Zusammensetzung selbst hergestellter Puffer ist in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 7-12:** Hergestellte Puffer und ihre Zusammensetzung.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Erythrozyten-Lyse-Puffer	15,5 mM NH <sub>4</sub> Cl; 1 mM KHCO <sub>3</sub> ; 0,01 mM EDTA
Gel-Ladepuffer	0,416% (w/v) Bromphenolblau; 39% (v/v) Glycerin; 61% (v/v) H <sub>2</sub> O
HBG	20 mM HEPES; 278 mM Glucose; pH-Wert 5,5
LBSS	Siehe Tabelle 3-1
M-HBSS	Siehe Tabelle 3-1
Puffer 1	50 mM TRIS-HCl; pH-Wert 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNaseA
Puffer 2	200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS
Puffer 3	3 M C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> ; pH-Wert 5,5
Puffer A	HBSS; 100 U/mL Penicillin; 100 µg/mL Streptomycin; 2,5 µg/mL Amphotericin B; 2 mM EDTA; 0,5% (w/v) BSA
Puffer B	HBSS; 10% (v/v) hitzeinaktiviertes FCS
Puffer QBT	750 mM NaCl; 50 mM MOPS; pH-Wert 7,0; 15% (v/v) Isopropanol; 0,15% (v/v) Triton X-100

Puffer QC	1 M NaCl; 50 mM MOPS; pH-Wert 7,0; 15% (v/v) Isopropanol
Puffer QF	1,25 M NaCl; 50 mM TRIS-HCl; pH-Wert 8,5; 15% (v/v) Isopropanol
TAE-Puffer	40 mM TRIS; 5,71% (v/v) Essigsäure; 1 mM EDTA; pH-Wert 8,3

## 7.6. Kulturmedien und Zusätze

Folgende Kulturmedien und Zusätze werden in dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 7-13:** Verwendete Kulturmedien und Zusätze.

Material	Spezifikation	Artikelnummer	Hersteller	Ort, Land
<b>Für zellbiologische Arbeiten</b>				
Amphotericin B	250 µg/mL Lösung	A 2612	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Amphotericin B	250 µg/mL Lösung	30-003-CF	Corning Incorporated	Corning, New York, USA
EX-CELL 293	EX-CELL 293 Serumfreies Medium	14571C-1000ML	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
FCS	Nicht USA Herkunft, steril-filtriert	F7524-500ML	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
FCS	Südamerika, sehr niedriger Endotoxin-Gehalt, steril-filtriert	S1860-500	Biowest SAS	Nuaillé, Frankreich
Galactose	-	G0750-5G	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Gentamicin	50 mg/mL	L0012-100	Biowest SAS	Nuaillé, Frankreich
HEPES	1 M, 50 X	L 1613	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
HEPES	1 M in 0,85% NaCl Lösung	17-737E	Lonza Group Ltd	Basel, Schweiz
IMDM	Steril-filtriert, mit Natriumbicarbonat, ohne L-Glutamin	I3390-500ML	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
L-15	Leibovitz Medium ohne L-Glutamin	BE12-700F	Lonza Group Ltd	Basel, Schweiz
Lactalbumin-Hydrolysat	-	61302-100G-F	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	200 mM	K 0283	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
L-Glutamin	200 mM in 0,85% NaCl Lösung	BE17-605E	Lonza Group Ltd	Basel, Schweiz
LymphoGrow Medium	Special Medium for Lymphocyte Cells	LGM-100	Cytogen GmbH	Greven, Deutschland
Opti-MEM	Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	31985070	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/mL / 10.000 µg/mL	A 2213	Biochrom GmbH	Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/mL / 10.000 U/mL	DE17-602E	Lonza Group Ltd	Basel, Schweiz
ProCHO-5	Protein-freies CHO Medium	BELN12-766Q	Lonza Group Ltd	Basel, Schweiz

rhIL-2	200 µg/mL, Lot Nummer 5090703	554603	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
RPMI-1640	Ohne L-Glutamin	BE12-167F	Lonza Group Ltd	Basel, Schweiz
Schneider's Drosophila Medium	Mit L-Glutamin, ohne HEPES, Phenolrot und Natriumpyruvat	21720024	Thermo Fisher Scientific	Waltham, Massachusetts, USA
Tetracyclin	Hydrochlorid	T7660-5G	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Wasser, hochrein	Steril-filtriert, BioReagent, geeignet für Zellkulturen	W3500-100mL	Sigma-Aldrich (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
<b>Für mikrobielle Arbeiten</b>				
Agar-Agar	Bakteriologisch	2266.2	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Natriumsalz	K029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Für die Molekularbiologie	X968.3	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
SOC-Medium	2% (w/v) Pepton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 20 mM Glucose; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub>			

### 7.7. Verwendete Zelllinien, Zellen und Mikroorganismen

Die nachfolgende Tabelle enthält die Zelllinien, Zellen und Mikroorganismen, die in dieser Arbeit verwendet werden.

**Tabelle 7-14:** Verwendete Zelllinien, Zellen und Mikroorganismen.

Zellen/ Mikroorganismus	Anmerkung	Referenz und Bezug
B-Zellen	Primäre humane B-Zellen isoliert aus Tonsillen <sup>a</sup> oder Blut	Spender
CHO <sub>sus</sub>	Basierend auf CHO-K1, Zellen sind an ein Wachstum in Suspension adaptiert	CHO-K1: ATCC, CCL-61
<i>E. coli</i> DH5α	-	DSMZ, DSM 6897
HEK <sub>sus</sub>	Basierend auf HEK293, Zellen sind an ein Wachstum in Suspension adaptiert	HEK293: ATCC, CRL-1573.3
Intestinale Zellen von <i>E. fetida</i>	Primäre intestinale Zellen von <i>E. fetida</i> <sup>b</sup>	Spender
T-Zellen	Primäre humane T-Zellen isoliert aus Blut	Spender

<sup>a</sup> Tonsillen werden von Dr. med. Ulrich Gollner und Dr. med. Katrin Gollner (HNO Operationen, Kulmbach, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

<sup>b</sup> Präparierte Därme von *E. fetida* werden von Mitarbeitenden des Lehrstuhls Tierökologie I, Prof. Dr. Heike Feldhaar, Universität Bayreuth (Bayreuth, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

### 7.8. Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien werden im Rahmen dieser Arbeit genutzt.

**Tabelle 7-15:** Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Material	Modell	Artikelnummer	Hersteller	Ort, Land
2-Wege-Hahn	Durchfluss-Hahn	2-6350	neoLab Migge GmbH	Heidelberg, Deutschland
Einmal-Küvetten	1,5 mL halbmikro PS	7590 15	Brand GmbH + Co KG	Wertheim, Deutschland
Einwegspritze (Inject Solo, Luer-Ansatz)	2 mL 5 mL 10 mL 20 mL	4606027V 4606051V 4606108V 4606205V	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Einmalspritze (Omnifix, Luer-Lock-Ansatz)	5 mL 50 mL	4617053V 4617509F	B. Braun SE	Melsungen, Deutschland
Faltenfilter	Rotilabo Typ 113P Ø 240 mm	CA12.1	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Kryoröhrchen	1,2 mL, mit Stehrand	479-1254	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Menzel-Gläser	-	AAAA00000 1##02E	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
Mikrotiterplatte	96-Well	655101	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Nylon Wolle	-	18369-50	Polyscience, Inc.	Warrington, Pennsylvania, USA
Pipettenspitzen	0,5 – 20 µL 2 – 200 µL 50 – 1000 µL	732024 732028 732012	Brand GmbH + Co KG	Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäß	1,5 mL	72.690.001	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß	2 mL	0030 120.094	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Serologische Einmalpipetten	1 mL 5 mL 10 mL 25 mL	604181 606180 607180 760180	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter (Spritzen- vorsatzfilter)	0,2 µm, Celluloseacetat	514-0061	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Sterilfilter (Spritzen- vorsatzfilter)	0,2 µm, hydrophiles Polyethersulfon	4602	Pall GmbH	Dreieich, Deutschland
Zellkulturflaschen (T-Flaschen)	75 cm <sup>2</sup>	658175	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten	6-Well 12-Well 24-Well 48-Well	657160 665180 662160 677180	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen	100/20 mm	664160	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellsiebe	Easy Strainer, 70 µm	542070	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellsiebe	pluriStrainer Mini, 20 µm	43-10020-60	pluriSelect Life Science UG & Co.KG	Leipzig, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15 mL 50 mL	188271 227270	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland

## 7.9. Geräte und Laborausstattung

Folgende Geräte und Laborausstattung werden im Rahmen dieser Arbeit genutzt.

**Tabelle 7-16:** Verwendete Geräte und Laborausstattung.

Gerät	Modell	Hersteller	Ort, Land
Autoklav (Tischautoklav)	3850 EL	Systec GmbH	Linden, Deutschland
Autoklav (Standautoklav)	V150	Systec GmbH	Linden, Deutschland
Automatisches Zellzählgerät mit Reusable Slide	LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter	Logos Biosystems	Gyeonggi-do, Südkorea
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	BBD 6220	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Thermo Forma Direct Heat CO <sub>2</sub> Incubator Model 311	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschrank	Thermo Forma Steri-Cult CO <sub>2</sub> Incubator Model 3308	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer	Cytomics FC500	Beckmann Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Einfriercontainer für Kryokulturen	Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
Gefrierpunktsometer	Osmomat 030	Gonotec GmbH	Berlin, Deutschland
Geldokumentationssystem	Quantum CX5	Vilber Lourmat Deutschland GmbH	Eberhardzell, Deutschland
Gelelektrophoresekammer	40-1214	Peqlab (VWR International GmbH)	Darmstadt, Deutschland
Gelelektrophorese-Spannungsgeber	E835	Consort bvba	Turnhout, Belgien
Glasflaschen	100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL	Fisher Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
Heiz- /Schüttelblock	ThermoMixer F1.5	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Hämozytometer (Neubauer Zählkammer)	Neubauer Improved	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Kolbenhubpipetten	Research plus 0,5 – 10 µL, 2 – 20 µL, 10 - 100 µL, 20 – 200 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Kolbenhubpipette (Mehrkanalpipette)	Transferpette S-12 20-200 µL	Brand GmbH + Co KG	Wertheim, Deutschland
Laborwaage (Analysenwaage)	E01140	Ohaus	Nänikon, Schweiz
Laborwaage	E0B120	Ohaus	Nänikon, Schweiz
Laborwaage	BP 2100 S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
MACSmix Tube Rotator	130-090-753	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSxpress Separator	130-098-308	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG	Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnetrührer	RCT basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland

Membran-Vakuumpumpe	AP 04	Hettich Benelux B.V.	Geldermalsen, Niederlande
Mikroskop (Inverses Lichtmikroskop mit Kamera)	Primovert mit Axiocam 105 color	Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH	Oberkochen, Deutschland
Mikroskop (Inverses Lichtmikroskop)	CKX41	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikroskop (Fluoreszenzmikroskop) (mit Quecksilberbrenner Vorschaltgerät)	BX51 mit U-RFL-T	Olympus	Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Plate Reader)	GENios Pro	Tecan Group AG	Männedorf, Schweiz
Millipore Anlage	Synergy Water Purification System	Merck Millipore (Merck KGaA)	Darmstadt, Deutschland
Minishaker	MS2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG	Staufen, Deutschland
Orbitalschüttler	Noctua K30	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
pH-Meter	SevenCompact	Mettler-Toledo	Columbus, Ohio, USA
Rotator	SB2	Stuart	Stone, England
Schüttelkolben (mit Schikanen)	100 mL, 250 mL, 500 mL, 1 LL, 2 L	Schott	Mainz, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Mobilien W90 Variolab Typ SWB	Waldner	Wangen im Allgäu, Deutschland
Spektralphotometer	BioPhotometer plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
Spinner System (Motoreinheit und Spinner-Flaschen)	Cellspin (Spinner-Flaschen 50 - 100 mL, 250 mL, 500 mL Arbeitsvolumen)	Integra Bioscience AG	Biebertal, Deutschland
Spülmaschine	Professional G 7883	Miele & Cie. KG	Gütersloh, Deutschland
Stickstofftank für die Zellbank	CS 200 SK	Cryo Anlagenbau gmbH	Wilnsdorf, Deutschland
Vakuumkonzentrator	Concentrator 5301	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Wasserbad mit Einhängethermostat	LAUDA 020T mit A100	Lauda Dr. R. Wobser GmbH & CO. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad	WB20	P-D Industriegesellschaft GmbH	Wilsdruff, Deutschland
Wärmeschrank	BD240	Binder GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Zellbank	Cryo 200	Thermo Electron Corporation	
Zentrifuge	Sorvall LYNX6000 Centrifuge	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, Massachusetts, USA
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heracus	Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Biofuge pico	Heracus	Hanau, Deutschland

## 8. Literaturverzeichnis

- Abraham, J. (2020). Passive antibody therapy in COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 20(7), 401–403. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0365-7>
- Aira, M., Pérez-Losada, M., & Domínguez, J. (2018). Diversity, structure and sources of bacterial communities in earthworm cocoons. *Scientific Reports*, 8(1), 6632. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25081-9>
- Al-Allaf, F. A., Abduljaleel, Z., Athar, M., Taher, M. M., Khan, W., Mehmet, H., Colakogullari, M., Apostolidou, S., Bigger, B., Waddington, S., Coutelle, C., Themis, M., Al-Ahdal, M. N., Al-Mohanna, F. A., Al-Hassnan, Z. N., & Bouazzaoui, A. (2019). Modifying inter-cistronic sequence significantly enhances IRES dependent second gene expression in bicistronic vector: Construction of optimised cassette for gene therapy of familial hypercholesterolemia. *Non-Coding RNA Research*, 4(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.11.005>
- Alborzina, H., Schmidt-Glenewinkel, H., Ilkavets, I., Breitkopf-Heinlein, K., Cheng, X., Hortschansky, P., Dooley, S., & Wölfl, S. (2013). Quantitative kinetics analysis of BMP2 uptake into cells and its modulation by BMP antagonists. *Journal of Cell Science*, 126(1), 117–127. <https://doi.org/10.1242/jcs.109777>
- Alexopoulos, C., Papayannis, A. G., & Gardikas, C. (1976). Increased proportion of B lymphocytes in human tonsils and appendices. *Acta Haematologica*, 55(2), 95–98. <https://doi.org/10.1159/000208000>
- Arala-Chaves, M. P., Hope, L., Korn, J. H., & Fudenberg, H. (1978). Role of adherent cells in immune responses to phytohemagglutinin and concanavalin A. *European Journal of Immunology*, 8(2), 77–81. <https://doi.org/10.1002/eji.1830080202>
- Arena, T. A., Harms, P. D., & Wong, A. W. (2018). High Throughput Transfection of HEK293 Cells for Transient Protein Production. In D. L. Hacker (Ed.), *Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells Methods and Protocols* (1st ed., Vol. 1850, pp. 179–187). Humana Press. New York, New York, USA.
- Arpin, C., Déchanet, J., Van Kooten, C., Merville, P., Grouard, G., Brière, F., Banchereau, J., & Liu, Y. J. (1995). Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science*, 268(5211), 720–722. <https://doi.org/10.1126/science.7537388>

- ATCC. (2012). *ATCC® Primary Cell Culture Guide*. ATCC. Manassas, Virginia, USA.
- Auladell, M., Nguyen, T. H., Garcillán, B., Mackay, F., Kedzierska, K., & Fox, A. (2019). Distinguishing naive- from memory-derived human B cells during acute responses. *Clinical & Translational Immunology*, 8(11), e01090. <https://doi.org/10.1002/cti2.1090>
- Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T. H., & Williams, K. C. (2010). Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry Part A*, 77(5), 410–419. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20859>
- Bach, D.-H., Park, H. J., & Lee, S. K. (2018). The Dual Role of Bone Morphogenetic Proteins in Cancer. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2017.10.002>
- Backliwal, G., Hildinger, M., Chenuet, S., Wulhfard, S., De Jesus, M., & Wurm, F. M. (2008). Rational vector design and multi-pathway modulation of HEK 293E cells yield recombinant antibody titers exceeding 1 g/l by transient transfection under serum-free conditions. *Nucleic Acids Research*, 36(15), e96–e96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn423>
- Backliwal, G., Hildinger, M., Hasija, V., & Wurm, F. M. (2008). High-density transfection with HEK-293 cells allows doubling of transient titers and removes need for a priori DNA complex formation with PEI. *Biotechnology and Bioengineering*, 99(3), 721–727. <https://doi.org/10.1002/bit.21596>
- Bajnok, A., Ivanova, M., Rigó, J., & Toldi, G. (2017). The Distribution of Activation Markers and Selectins on Peripheral T Lymphocytes in Preeclampsia. *Mediators of Inflammation*, 2017, 804516. <https://doi.org/10.1155/2017/804516>
- Balasubramanian, S., Rajendra, Y., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2016). Comparison of three transposons for the generation of highly productive recombinant CHO cell pools and cell lines: Comparison of Three Transposons. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(6), 1234–1243. <https://doi.org/10.1002/bit.25888>
- Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M., & Wurm, F. M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters*, 29(5), 677–684.

<https://doi.org/10.1007/s10529-006-9297-y>

Baldi, L., Hacker, D. L., Meerschman, C., & Wurm, F. M. (2012). Large-Scale Transfection of Mammalian Cells. In J. L. Hartley (Ed.), *Protein Expression in Mammalian Cells. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (1st ed., Vol. 801, pp. 13–26). Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-352-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-352-3_2)

Bar-Ephraim, Y. E., Konijn, T., Gönültas, M., Mebius, R. E., & Reijmers, R. M. (2016). A Reproducible Method for Isolation and In Vitro Culture of Functional Human Lymphoid Stromal Cells from Tonsils. *PLOS ONE*, *11*(12), e0167555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167555>

Battaglia, M., & Davoli, C. (1997). Long-term tissue culture of the earthworm *Eisenia foetida* (Annelida, Oligochaeta). In K. Maramorosch & J. Mitusuhashi (Eds.), *Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications* (pp. 261–268). Science Publishers. Enfield, New Hampshire, USA.

Bayley, M., Overgaard, J., Høj, A. S., Malmendal, A., Nielsen, N. C., Holmstrup, M., & Wang, T. (2010). Metabolic Changes during Estivation in the Common Earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Physiological and Biochemical Zoology*, *83*(3), 541–550. <https://doi.org/10.1086/651459>

Beane, J. D., Lee, G., Zheng, Z., Mendel, M., Abate-Daga, D., Bharathan, M., Black, M., Gandhi, N., Yu, Z., Chandran, S., Giedlin, M., Ando, D., Miller, J., Paschon, D., Guschin, D., Rebar, E. J., Reik, A., Holmes, M. C., Gregory, P. D., ... Feldman, S. A. (2015). Clinical Scale Zinc Finger Nuclease-mediated Gene Editing of PD-1 in Tumor Infiltrating Lymphocytes for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Molecular Therapy*, *23*(8), 1380–1390. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.71>

Beederman, M., Lamplot, J. D., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S. H., Zhang, W., Zhang, J., Kong, Y., Denduluri, S., Rogers, M. R., Pratt, A., Haydon, R. C., Luu, H. H., Angeles, J., ... He, T.-C. (2013). BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, *6*(8(A)), 32–52. <https://doi.org/10.4236/jbise.2013.68A1004>

Bergler, W., Adam, S., Gross, H.-J., Hörmann, K., & Schwartz-Albiez, R. (2001). Age-

dependent altered proportions in subpopulations of tonsillar lymphocytes. *Clinical and Experimental Immunology*, 116(1), 9–18. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00850.x>

Bernard, F., Brulle, F., Dumez, S., Lemiere, S., Platel, A., Nesslany, F., Cuny, D., Deram, A., & Vandebulcke, F. (2015). Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 273–303. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.024>

Bilej, M., Tuckova, L., Rejnek, J., & Vetvicka, V. (1990). In vitro antigen-binding properties of coelomocytes of *Eisenia foetida* (Annelida). *Immunology Letters*, 26(2), 183–187. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(90\)90143-E](https://doi.org/10.1016/0165-2478(90)90143-E)

Blackstock, D. J., Goh, A., Shetty, S., Fabozzi, G., Yang, R., Ivleva, V. B., Schwartz, R., & Horwitz, J. (2020). Comprehensive Flow Cytometry Analysis of PEI-Based Transfections for Virus-Like Particle Production. *Research*, 2020, 1387402. <https://doi.org/10.34133/2020/1387402>

Bollin, F., Dechavanne, V., & Chevalet, L. (2011). Design of Experiment in CHO and HEK transient transfection condition optimization. *Protein Expression and Purification*, 78(1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.02.008>

Bono, N., Ponti, F., Mantovani, D., & Candiani, G. (2020). Non-Viral in Vitro Gene Delivery: It is Now Time to Set the Bar! *Pharmaceutics*, 12(2), 183. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020183>

Booth, J. S., & Toapanta, F. R. (2021). B and T Cell Immunity in Tissues and Across the Ages. *Vaccines*, 9(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010024>

Boyaka, P. N., Wright, P. F., Marinaro, M., Kiyono, H., Johnson, J. E., Gonzales, R. A., Ikizler, M. R., Werkhaven, J. A., Jackson, R. J., Fujihashi, K., Di Fabio, S., Staats, H. F., & McGhee, J. R. (2000). Human Nasopharyngeal-Associated Lymphoreticular Tissues. *The American Journal of Pathology*, 157(6), 2023–2035. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64841-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64841-9)

Breunig, M., Lungwitz, U., Liebl, R., & Goepferich, A. (2007). Breaking up the correlation between efficacy and toxicity for nonviral gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14454–14459. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703882104>

Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>

Büssow, K. (2015). Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Current Opinion in Structural Biology*, 32, 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.03.002>

Carreira, A. C. O., Lojudice, F. H., Halcsik, E., Navarro, R. D., Sogayar, M. C., & Granjeiro, J. M. (2014). Bone Morphogenetic Proteins: Facts, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of Dental Research*, 93(4), 335–345. <https://doi.org/10.1177/0022034513518561>

Carreira, A. C. O., Zambuzzi, W. F., Rossi, M. C., Astorino Filho, R., Sogayar, M. C., & Granjeiro, J. M. (2015). Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. *Vitamins and Hormones*, 99, 293–322. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2015.06.002>

Carsetti, R., Terreri, S., Conti, M. G., Fernandez Salinas, A., Corrente, F., Capponi, C., Albano, C., & Piano Mortari, E. (2022). Comprehensive phenotyping of human peripheral blood B lymphocytes in healthy conditions. *Cytometry Part A*, 101(2), 131–139. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24507>

Cervera, L., Gutiérrez-Granados, S., Berrow, N. S., Segura, M. M., & Gòdia, F. (2015). Extended gene expression by medium exchange and repeated transient transfection for recombinant protein production enhancement: Extended Gene Expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(5), 934–946. <https://doi.org/10.1002/bit.25503>

Chen, B., Synatschke, C. V., Jérôme, V., Müller, A. H. E., Freitag, R., & Wu, C. (2018). Co-transfection of star-shaped PDMAEMAs enhance transfection efficiency of protamine/pDNA complexes in the presence of serum. *European Polymer Journal*, 103, 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.04.022>

Chen, Y., Liu, X., Leng, Y., & Wang, J. (2020). Defense responses in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to low-density polyethylene microplastics in soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 187, 109788. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109788>

Cherng, J. Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J., & Hennink, W. E. (1996).

Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 13(7), 1038–1042. <https://doi.org/10.1023/a:1016054623543>

Cobleigh, M. A., Braun, D. P., & Harris, J. E. (1980). Age-dependent changes in human peripheral blood B cells and T-cell subsets: Correlation with mitogen responsiveness. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 15(2), 162–174. [https://doi.org/10.1016/0090-1229\(80\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0090-1229(80)90028-8)

Cooper, E. L., Kauschke, E., & Cossarizza, A. (2002). Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff. *BioEssays*, 24(4), 319–333. <https://doi.org/10.1002/bies.10077>

Curieses, S. P., García-Velasco, N., Urionabarrenetxea, E., Sáenz, M. E., Bilbao, E., Di Marzio, W. D., & Soto, M. (2017). Responses to silver nanoparticles and silver nitrate in a battery of biomarkers measured in coelomocytes and in target tissues of *Eisenia fetida* earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.008>

David, R. M., & Doherty, A. T. (2017). Viral Vectors: The Road to Reducing Genotoxicity. *Toxicological Sciences*, 155(2), 315–325. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw220>

Davidenko, N., Schuster, C. F., Bax, D. V., Farndale, R. W., Hamaia, S., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2016). Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: A study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(10), 148. <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5763-9>

Delafosse, L., Xu, P., & Durocher, Y. (2016). Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 227, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.04.028>

Ding, K., Han, L., Zong, H., Chen, J., Zhang, B., & Zhu, J. (2017). Production process reproducibility and product quality consistency of transient gene expression in HEK293 cells with anti-PD1 antibody as the model protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(5), 1889–1898. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7973-y>

Dinno, A. (2017). *Package ‘dunn.test’: Dunn’s Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums*

(1.3.5) [Computer software].

Diogéne, J., Dufour, M., Poirier, G. G., & Nadeau, D. (1997). Extrusion of earthworm coelomocytes: Comparison of the cell populations recovered from the species *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* and *Octolasion tyrtaeum*. *Laboratory Animals*, 31(4), 326–336. <https://doi.org/10.1258/002367797780596068>

DiTommaso, T., Cole, J. M., Cassereau, L., Buggé, J. A., Hanson, J. L. S., Bridgen, D. T., Stokes, B. D., Loughhead, S. M., Beutel, B. A., Gilbert, J. B., Nussbaum, K., Sorrentino, A., Toggweiler, J., Schmidt, T., Gyuelveszi, G., Bernstein, H., & Sharei, A. (2018). Cell engineering with microfluidic squeezing preserves functionality of primary immune cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(46). <https://doi.org/10.1073/pnas.1809671115>

Dong, Y., Dai, T., Wei, Y., Zhang, L., Zheng, M., & Zhou, F. (2020). A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 237. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00352-y>

Dubey, P., Matai, I., Kumar, S. U., Sachdev, A., Bhushan, B., & Gopinath, P. (2015). Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials. *Advances in Colloid and Interface Science*, 221, 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.02.007>

Dumont, J., Eewart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. (2016). Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: History, status, and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 1110–1122. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1084266>

Eisen, S. A., Wedner, H. J., & Parker, C. W. (1972). Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunological Communications*, 1(6), 571–577. <https://doi.org/10.3109/08820137209022965>

Elgundi, Z., Reslan, M., Cruz, E., Sifniotis, V., & Kayser, V. (2017). The state-of-play and future of antibody therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 122, 2–19. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.11.004>

Elshereef, A. A., Jochums, A., Lavrentieva, A., Stuckenberg, L., Scheper, T., & Solle, D.

(2019). High cell density transient transfection of CHO cells for TGF- $\beta$ 1 expression. *Engineering in Life Sciences*, 19(11), 730–740. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800174>

Engelmann, P., Kiss, J., Csöngéi, V., Cooper, E. L., & Németh, P. (2004). Earthworm leukocytes kill HeLa, HEP-2, PC-12 and PA317 cells in vitro. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61(1–2), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2004.04.004>

Ettinger, R., Sims, G. P., Fairhurst, A.-M., Robbins, R., da Silva, Y. S., Spolski, R., Leonard, W. J., & Lipsky, P. E. (2005). IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *The Journal of Immunology*, 175(12), 7867–7879. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7867>

Eyambe, G. S., Goven, A. J., Fitzpatrick, L. C., Venables, B. J., & Cooper, E. L. (1991). A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animals*, 25(1), 61–67. <https://doi.org/10.1258/002367791780808095>

Fitzpatrick, L. C., Muratti-Ortiz, J. F., Venables, B. J., & Goven, A. J. (1996). Comparative Toxicity in Earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* Exposed to Cadmium Nitrate Using Artificial Soil and Filter Paper Protocols. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(1), 63–68. <https://doi.org/10.1007/s001289900156>

Fletcher, A. L., Malhotra, D., Acton, S. E., Lukacs-Kornek, V., Bellemare-Pelletier, A., Curry, M., Armant, M., & Turley, S. J. (2011). Reproducible Isolation of Lymph Node Stromal Cells Reveals Site-Dependent Differences in Fibroblastic Reticular Cells. *Frontiers in Immunology*, 2(35), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00035>

Flores, C., Fouquet, G., Moura, I. C., Maciel, T. T., & Hermine, O. (2019). Lessons to Learn From Low-Dose Cyclosporin-A: A New Approach for Unexpected Clinical Applications. *Frontiers in Immunology*, 10(588), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00588>

Freshney, R. I. (2010). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (6th ed.). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey, USA.

Fuller-Espie, S. L., Harris, D. R., Daly, J. H., & Jakeman, J. M. (2015). Optimization of Cell Culture Conditions for the Earthworm *Eisenia hortensis*: A Study Investigating the Effects of

Media, Carbon Dioxide, Temperature, Serum, and Anti-Fungal Agents. *Journal of the Pennsylvania Academy of Science*, 89(2), 57–68. <http://www.jstor.org/stable/10.5325/jpennacadscie.89.2.0057>

Fung, S. L., Wu, X., Maceren, J. P., Mao, Y., & Kohn, J. (2019). In Vitro Evaluation of Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2 Bioactivity for Regenerative Medicine. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 25(9), 553–559. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2019.0156>

Garcia-Velasco, N., Gandariasbeitia, M., Irizar, A., & Soto, M. (2016). Uptake route and resulting toxicity of silver nanoparticles in *Eisenia fetida* earthworm exposed through Standard OECD Tests. *Ecotoxicology*, 25(8), 1543–1555. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1710-2>

Garcia-Velasco, N., Irizar, A., Urionabarrenetxea, E., Scott-Fordsmand, J. J., & Soto, M. (2019). Selection of an optimal culture medium and the most responsive viability assay to assess AgNPs toxicity with primary cultures of *Eisenia fetida* coelomocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 183, 109545. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109545>

Geisse, S. (2009). Reflections on more than 10 years of TGE approaches. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.10.017>

Geißler, K., & Guntinas-Lichius, O. (2020). Current Consideration of Tonsillectomy and Tonsillotomy. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 99(8), 568–582. <https://doi.org/10.1055/a-1148-2494>

Ghaffari, S., Torabi-Rahvar, M., Aghayan, S., Jabbarpour, Z., Moradzadeh, K., Omidkhoda, A., & Ahmadbeigi, N. (2021). Optimizing interleukin-2 concentration, seeding density and bead-to-cell ratio of T-cell expansion for adoptive immunotherapy. *BMC Immunology*, 22(1), 43. <https://doi.org/10.1186/s12865-021-00435-7>

Giesecke, C., Frölich, D., Reiter, K., Mei, H. E., Wirries, I., Kuhly, R., Killig, M., Glatzer, T., Stölzel, K., Perka, C., Lipsky, P. E., & Dörner, T. (2014). Tissue Distribution and Dependence of Responsiveness of Human Antigen-Specific Memory B Cells. *The Journal of Immunology*, 192(7), 3091–3100. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302783>

Gillooly, J. F., Hayward, A., Hou, C., & Burleigh, J. G. (2012). Explaining differences in the lifespan and replicative capacity of cells: A general model and comparative analysis of vertebrates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1744), 3976–3980.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1129>

Glass, D. R., Tsai, A. G., Oliveria, J. P., Hartmann, F. J., Kimmey, S. C., Calderon, A. A., Borges, L., Glass, M. C., Wagar, L. E., Davis, M. M., & Bendall, S. C. (2020). An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity. *Immunity*, *53*(1), 217-232.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.013>

Gong, L., Lin, X., Lu, R., Yu, L., Hou, X., & Li, W. (2014). Establishment of an in vitro culture system for intestinal epithelial cells from *Pheretima aspergillum* (E. Perrier). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, *50*(1), 16–21. <https://doi.org/10.1007/s11626-013-9679-0>

Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B. (2009). Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. *Environmental Science & Technology*, *43*(24), 9216–9222. <https://doi.org/10.1021/es9015553>

Goulding, S., Sullivan, A., O’Keeffe, G., & Collins, L. (2020). The potential of bone morphogenetic protein 2 as a neurotrophic factor for Parkinson’s disease. *Neural Regeneration Research*, *15*(8), 1432–1436. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.274327>

Griffith, S. A., & McCoy, L. E. (2021). To bnAb or Not to bnAb: Defining Broadly Neutralising Antibodies Against HIV-1. *Frontiers in Immunology*, *12*, 708227. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708227>

Grimsholm, O., Piano Mortari, E., Davydov, A. N., Shugay, M., Obraztsova, A. S., Bocci, C., Marasco, E., Marcellini, V., Aranburu, A., Farroni, C., Silvestris, D. A., Cristofolletti, C., Giorda, E., Scarsella, M., Cascioli, S., Barresi, S., Lougaris, V., Plebani, A., Cancrini, C., ... Carsetti, R. (2020). The Interplay between CD27<sup>dull</sup> and CD27<sup>bright</sup> B Cells Ensures the Flexibility, Stability, and Resilience of Human B Cell Memory. *Cell Reports*, *30*(9), 2963-2977.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.022>

Gunzer, M., Weishaupt, C., Planelles, L., & Grabbe, S. (2001). Two-step negative enrichment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from murine spleen via nylon wool adherence and an optimized antibody cocktail. *Journal of Immunological Methods*, *258*(1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00466-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00466-5)

Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>

Gutiérrez-Granados, S., Cervera, L., Kamen, A. A., & Gòdia, F. (2018). Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 918–940. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1419459>

Hacker, D. L., Kiseljak, D., Rajendra, Y., Thurnheer, S., Baldi, L., & Wurm, F. M. (2013). Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells. *Protein Expression and Purification*, 92(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.09.001>

Halper, J., & Kjaer, M. (2014). Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. In J. Halper (Ed.), *Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 802, pp. 31–47). Springer. Dordrecht, Niederlande. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-007-7893-1_3)

Handwerger, B. S., & Schwartz, R. H. (1974). Separation of murine lymphoid cells using nylon wool columns. Recovery of the B cell-enriched population. *Transplantation*, 18(6), 544–548. <https://doi.org/10.1097/00007890-197412000-00013>

Hang, Q., Zhou, Y., Hou, S., Zhang, D., Yang, X., Chen, J., Ben, Z., Cheng, C., & Shen, A. (2014). Asparagine-linked glycosylation of bone morphogenetic protein-2 is required for secretion and osteoblast differentiation. *Glycobiology*, 24(3), 292–304. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt110>

Hardee, C., Arévalo-Soliz, L., Hornstein, B., & Zechiedrich, L. (2017). Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes*, 8(2), 65. <https://doi.org/10.3390/genes8020065>

Harnett, E. M., Alderman, J., & Wood, T. (2007). The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55(1), 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.11.021>

Harris, E., Zimmerman, D., Warga, E., Bamezai, A., & Elmer, J. (2021). Nonviral gene delivery to T cells with Lipofectamine LTX. *Biotechnology and Bioengineering*, *118*(4), 1674–1687. <https://doi.org/10.1002/bit.27686>

Hay, K. A., & Turtle, C. J. (2017). Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells: Lessons Learned from Targeting of CD19 in B-Cell Malignancies. *Drugs*, *77*(3), 237–245. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0690-8>

Hayashi, Y., Engelmann, P., Foldbjerg, R., Szabó, M., Somogyi, I., Pollák, E., Molnár, L., Autrup, H., Sutherland, D. S., Scott-Fordsmand, J., & Heckmann, L.-H. (2012). Earthworms and Humans in Vitro: Characterizing Evolutionarily Conserved Stress and Immune Responses to Silver Nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, *46*(7), 4166–4173. <https://doi.org/10.1021/es3000905>

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, *25*(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)

Heinks, T., Hettwer, A., Hiepen, C., Weise, C., Gorka, M., Knaus, P., Mueller, T. D., & Loidl-Stahlhofen, A. (2021). Optimized expression and purification of a soluble BMP2 variant based on in-silico design. *Protein Expression and Purification*, *186*, 105918. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105918>

Helm, M., Riedl, S. A. B., Gollner, K., Gollner, U., Jérôme, V., & Freitag, R. (2021). Isolation of primary human B lymphocytes from tonsils compared to blood as alternative source for ex vivo application. *Journal of Chromatography B*, *1179*, 122853. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122853>

Hothorn, T., Bretz, Frank, & Westfall, P. (2008). *Simultaneous Inference in General Parametric Models*.

Huls, M. H., Figliola, M. J., Dawson, M. J., Olivares, S., Kebriaei, P., Shpall, E. J., Champlin, R. E., Singh, H., & Cooper, L. J. N. (2013). Clinical Application of Sleeping Beauty and Artificial Antigen Presenting Cells to Genetically Modify T Cells from Peripheral and Umbilical Cord Blood. *Journal of Visualized Experiments*, *72*, 50070. <https://doi.org/10.3791/50070>

Hung, K. L., Meitlis, I., Hale, M., Chen, C.-Y., Singh, S., Jackson, S. W., Miao, C. H., Khan, I. F., Rawlings, D. J., & James, R. G. (2018). Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Molecular Therapy*, 26(2), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.012>

Irizar, A., Duarte, D., Guilhermino, L., Marigómez, I., & Soto, M. (2014). Optimization of NRU assay in primary cultures of *Eisenia fetida* for metal toxicity assessment. *Ecotoxicology*, 23(7), 1326–1335. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1275-x>

Irizar, A., Rivas, C., García-Velasco, N., de Cerio, F. G., Etxebarria, J., Marigómez, I., & Soto, M. (2015). Establishment of toxicity thresholds in subpopulations of coelomocytes (amoebocytes vs. eleocytes) of *Eisenia fetida* exposed in vitro to a variety of metals: Implications for biomarker measurements. *Ecotoxicology*, 24(5), 1004–1013. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1441-9>

Irizar, A., Rodríguez, M. P., Izquierdo, A., Cancio, I., Marigómez, I., & Soto, M. (2015). Effects of Soil Organic Matter Content on Cadmium Toxicity in *Eisenia Fetida*: Implications for the Use of Biomarkers and Standard Toxicity Tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 68(1), 181–192. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0060-4>

Israel, D. I., Nove, J., Kerns, K. M., Moutsatsos, I. K., & Kaufman, R. J. (1992). Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors*, 7(2), 139–150. <https://doi.org/10.3109/08977199209046403>

Jenkins, M. K., Schwartz, R. H., & Pardoll, D. M. (1988). Effects of cyclosporine A on T cell development and clonal deletion. *Science*, 241(4873), 1655–1658. <https://doi.org/10.1126/science.241.4873.1655>

Jérôme, V., Thoring, L., Salzig, D., Kubick, S., & Freitag, R. (2017). Comparison of cell-based versus cell-free mammalian systems for the production of a recombinant human bone morphogenic growth factor. *Engineering in Life Sciences*, 17(10), 1097–1107. <https://doi.org/10.1002/elsc.201700005>

Jérôme, V., Werner, M., Kaiser, P., & Freitag, R. (2017). Creating a Biomimetic Microenvironment for the Ex Vivo Expansion of Primary Human T Lymphocytes. *Macromolecular Bioscience*, 17(9), 1700091. <https://doi.org/10.1002/mabi.201700091>

- Jiang, X., Chang, Y., Zhang, T., Qiao, Y., Klobučar, G., & Li, M. (2020). Toxicological effects of polystyrene microplastics on earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 259, 113896. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113896>
- Johnston, A., Sigurdardottir, S. L., & Ryon, J. J. (2009). Isolation of Mononuclear Cells from Tonsillar Tissue. *Current Protocols in Immunology*, 86, 7.8.1-7.8.4. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0708s86>
- Jones, C. G., Lawton, J. H., & Shachak, M. (1994). Organisms as Ecosystem Engineers. *Oikos*, 69(3), 373–386. <https://doi.org/10.2307/3545850>
- Julius, M. H., Simpson, E., & Herzenberg, L. A. (1973). A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 3(10), 645–649. <https://doi.org/10.1002/eji.1830031011>
- Jung, C.-M., Matsushita, O., Katayama, S., Minami, J., Sakurai, J., & Okabe, A. (1999). Identification of Metal Ligands in the *Clostridium histolyticum* ColH Collagenase. *Journal of Bacteriology*, 181(9), 2816–2822. <https://doi.org/10.1128/JB.181.9.2816-2822.1999>
- Jung, J., Choe, J., Li, L., & Choi, Y. S. (2000). Regulation of CD27 expression in the course of germinal center B cell differentiation: The pivotal role of IL-10. *European Journal of Immunology*, 30(8), 2437–2443. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2000\)30:8<2437::AID-IMMU2437>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2000)30:8<2437::AID-IMMU2437>3.0.CO;2-M)
- Kalina, T., Fišer, K., Pérez-Andrés, M., Kuzílková, D., Cuenca, M., Bartol, S. J. W., Blanco, E., Engel, P., & van Zelm, M. C. (2019). CD Maps—Dynamic Profiling of CD1–CD100 Surface Expression on Human Leukocyte and Lymphocyte Subsets. *Frontiers in Immunology*, 10, 2434. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02434>
- Katagiri, T., & Watabe, T. (2016). Bone Morphogenetic Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(6), a021899. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021899>
- Kavanagh, H., Dunne, S., Martin, D. S., McFadden, E., Gallagher, L., Schwaber, J., Leonard, S., & O’Dea, S. (2021). A novel non-viral delivery method that enables efficient engineering of primary human T cells for ex vivo cell therapy applications. *Cytotherapy*, 23(9), 852–860. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.03.002>

- Keim, D., Gollner, K., Gollner, U., Jérôme, V., & Freitag, R. (2021). Generation of Recombinant Primary Human B Lymphocytes Using Non-Viral Vectors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8239. <https://doi.org/10.3390/ijms22158239>
- Kengla, C., Kidiyoor, A., & Murphy, S. V. (2017). Bioprinting Complex 3D Tissue and Organs. In G. Orlando, G. Remuzzi, & D. F. Williams (Eds.), *Kidney Transplantation, Bioengineering and Regeneration* (pp. 957–971). Academic Press. London, Vereinigtes Königreich. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801734-0.00068-0>
- Khattar, V., Lee, J. H., Wang, H., Bastola, S., & Ponnazhagan, S. (2019). Structural determinants and genetic modifications enhance BMP2 stability and extracellular secretion. *FASEB BioAdvances*, 1(3), 180–190. <https://doi.org/10.1096/fba.2018-00023>
- Kim, C. L., Bang, Y. L., Kim, Y. S., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2016). Alleviation of proteolytic degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-4 by repeated batch culture of Chinese hamster ovary cells. *Process Biochemistry*, 51(8), 1078–1084. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.007>
- Kim, C. L., Jung, M. Y., Kim, Y. S., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2018). Improving the production of recombinant human bone morphogenetic protein-4 in Chinese hamster ovary cell cultures by inhibition of undesirable endocytosis. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(10), 2565–2575. <https://doi.org/10.1002/bit.26798>
- Kim, J. Y., Kim, Y.-G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- Kim, M. G., Kim, C. L., Kim, Y. S., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2021). Selective endocytosis of recombinant human BMPs through cell surface heparan sulfate proteoglycans in CHO cells: BMP-2 and BMP-7. *Scientific Reports*, 11(1), 3378. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82955-1>
- Kimchi-Sarfaty, C., Schiller, T., Hamasaki-Katagiri, N., Khan, M. A., Yanover, C., & Sauna, Z. E. (2013). Building better drugs: Developing and regulating engineered therapeutic proteins. *Trends in Pharmacological Sciences*, 34(10), 534–548. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.08.005>

Komar, A. A. (2016). The Yin and Yang of codon usage. *Human Molecular Genetics*, 25(R2), R77–R85. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw207>

Komar, A. A. (2019). Synonymous Codon Usage—A Guide for Co-Translational Protein Folding in the Cell. *Molecular Biology*, 53(6), 883–898. <https://doi.org/10.1134/S0026893319060098>

Kozak, M. (1987). At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *Journal of Molecular Biology*, 196(4), 947–950. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90418-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90418-9)

Krammer, F. (2020). SARS-CoV-2 vaccines in development. *Nature*, 586(7830), 516–527. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3>

Krishnakumar, G. S., Roffi, A., Reale, D., Kon, E., & Filardo, G. (2017). Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: A systematic review. *International Orthopaedics*, 41(6), 1073–1083. <https://doi.org/10.1007/s00264-017-3471-9>

Kudo, T., Kanetaka, H., Watanabe, A., Okumoto, A., Asano, M., Zhang, Y., Zhao, F., Kano, M., Shimizu, Y., Tamura, S., & Hayashi, H. (2010). Investigating Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling in a Newly Established Human Cell Line Expressing BMP Receptor Type II. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 222(2), 121–129. <https://doi.org/10.1620/tjem.222.121>

Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>

Kurek, A., Homa, J., Kauschke, E., & Plytycz, B. (2007). Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.). *European Journal of Soil Biology*, 43, S121–S126. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.051>

Kwak, J. I., Lee, W.-M., Kim, S. W., & An, Y.-J. (2014). Interaction of citrate-coated silver nanoparticles with earthworm coelomic fluid and related cytotoxicity in *Eisenia andrei*: Interaction of citrate-coated AgNPs with earthworm coelomic fluid. *Journal of Applied Toxicology*, 34(11), 1145–1154. <https://doi.org/10.1002/jat.2993>

- Ladd, B., Bowes, K., Lundgren, M., Gräslund, T., & Chotteau, V. (2022). Proof-of-Concept of Continuous Transfection for Adeno-Associated Virus Production in Microcarrier-Based Culture. *Processes*, *10*(3), 515. <https://doi.org/10.3390/pr10030515>
- Lalonde, M.-E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *Journal of Biotechnology*, *251*, 128–140. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>
- Lauffenburger, D., & Cozens, C. (1989). Regulation of mammalian cell growth by autocrine growth factors: Analysis of consequences for inoculum cell density effects. *Biotechnology and Bioengineering*, *33*(11), 1365–1378. <https://doi.org/10.1002/bit.260331102>
- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*, *112*(5), 1570–1580. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071>
- Lee, J., Chang, D.-Y., Kim, S.-W., Choi, Y. S., Jeon, S.-Y., Racanelli, V., Kim, D. W., & Shin, E.-C. (2016). Age-related differences in human palatine tonsillar B cell subsets and immunoglobulin isotypes. *Clinical and Experimental Medicine*, *16*(1), 81–87. <https://doi.org/10.1007/s10238-015-0338-5>
- Lee, S., Kim, M. G., Kim, N., Heo, W. D., & Lee, G. M. (2016). Heparan sulfate proteoglycan synthesis in CHO DG44 and HEK293 cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *21*(3), 439–445. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0688-6>
- Legazpi, L., Laca, A., & Díaz, M. (2009). Kinetic analysis of hybridoma cells viability under mechanical shear stress with and without serum protection. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *32*(6), 717–722. <https://doi.org/10.1007/s00449-008-0295-4>
- Leibovitz, A. (1963). The Growth And Maintenance Of Tissue–Cell Cultures In Free Gas Exchange With The Atmosphere. *American Journal of Epidemiology*, *78*(2), 173–180. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120336>
- Li, Z. (2019). In Vitro Micro Tissue and Organ Models for Toxicity Testing. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (3rd ed., pp. 535–549). Pergamon. Amsterdam, Niederlande. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00307-4>
- Liberio, M. S., Sadowski, M. C., Soekmadji, C., Davis, R. A., & Nelson, C. C. (2014). Differential Effects of Tissue Culture Coating Substrates on Prostate Cancer Cell Adherence,

Morphology and Behavior. *PLoS ONE*, 9(11), e112122.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112122>

Lin, C.-Y., Huang, Z., Wen, W., Wu, A., Wang, C., & Niu, L. (2015). Enhancing Protein Expression in HEK-293 Cells by Lowering Culture Temperature. *PLOS ONE*, 10(4), e0123562.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123562>

Lissenberg-Thunnissen, S. N., de Gorter, D. J. J., Sier, C. F. M., & Schipper, I. B. (2011). Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *International Orthopaedics*, 35(9), 1271–1280. <https://doi.org/10.1007/s00264-011-1301-z>

Litvin, D. A., & Rosenstreich, D. L. (1984). Separation of lymphoid cells on nylon wool columns. *Methods in Enzymology*, 108, 298–302. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(84\)08095-2](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(84)08095-2)

Liu, L., Johnson, C., Fujimura, S., Teque, F., & Levy, J. A. (2011). Transfection optimization for primary human CD8<sup>+</sup> cells. *Journal of Immunological Methods*, 372(1–2), 22–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.06.026>

Liu, Y. (2020). A code within the genetic code: Codon usage regulates co-translational protein folding. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00642-6>

Loaharawee, K., Johnson, M. J., Lahr, W. S., Peterson, J. S., Webber, B. R., & Moriarity, B. S. (2020). Genome Engineering Primary Human B Cells Using CRISPR/Cas9. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 165, 10.3791/61855. <https://doi.org/10.3791/61855>

Luo, X. M., Maarschalk, E., O'Connell, R. M., Wang, P., Yang, L., & Baltimore, D. (2009). Engineering human hematopoietic stem/progenitor cells to produce a broadly neutralizing anti-HIV antibody after in vitro maturation to human B lymphocytes. *Blood*, 113(7), 1422–1431.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-177139>

Mace, T. A., Zhong, L., Kilpatrick, C., Zynda, E., Lee, C.-T., Capitano, M., Minderman, H., & Repasky, E. A. (2011). Differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells into effector cells is enhanced by physiological range hyperthermia. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(5), 951–962.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.0511229>

- Maddaly, R., Pai, G., Balaji, S., Sivaramakrishnan, P., Srinivasan, L., Sunder, S. S., & Paul, S. F. D. (2010). Receptors and signaling mechanisms for B-lymphocyte activation, proliferation and differentiation—Insights from both in vivo and in vitro approaches. *FEBS Letters*, *584*(24), 4883–4894. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.08.022>
- Mandl, I., MacLennan, J. D., Howes, E. L., DeBellis, R. H., & Sohler, A. (1953). Isolation And Characterization Of Proteinase And Collagenase From *Cl. Histolyticum*. *Journal of Clinical Investigation*, *32*(12), 1323–1329. <https://doi.org/10.1172/JCI102861>
- Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W., & Kim, H. L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma, and Clinical Immunology: Official Journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology*, *14*(Suppl 2), 49. <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>
- Mauro, V. P. (2018). Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations. *BioDrugs*, *32*(1), 69–81. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0261-x>
- Miles, H. B. (1963). Heat-death Temperature in *Allolobophora terrestris* (Sav.) forma longa (Ude) and *Eisenia foetida* (Sav.). *Nature*, *199*(4895), 826–826. <https://doi.org/10.1038/199826a0>
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., & Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, *11*(2), 231–238. <https://doi.org/10.1002/cyto.990110203>
- Mitchell, R. B., Archer, S. M., Ishman, S. L., Rosenfeld, R. M., Coles, S., Finestone, S. A., Friedman, N. R., Giordano, T., Hildrew, D. M., Kim, T. W., Lloyd, R. M., Parikh, S. R., Shulman, S. T., Walner, D. L., Walsh, S. A., & Nnacheta, L. C. (2019). Clinical Practice Guideline: Tonsillectomy in Children (Update). *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, *160*(1\_suppl), S1–S42. <https://doi.org/10.1177/0194599818801757>
- Moens, L., Kane, A., & Tangye, S. G. (2016). Naïve and memory B cells exhibit distinct biochemical responses following BCR engagement. *Immunology & Cell Biology*, *94*(8), 774–786. <https://doi.org/10.1038/icb.2016.41>
- Moffett, H. F., Harms, C. K., Fitzpatrick, K. S., Tooley, M. R., Boonyaratankornkit, J., &

- Taylor, J. J. (2019). B cells engineered to express pathogen-specific antibodies protect against infection. *Science Immunology*, *4*(35), eaax0644. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aax0644>
- Moore, D. K., Motaung, B., du Plessis, N., Shabangu, A. N., Loxton, A. G., & SU-IRG Consortium. (2019). Isolation of B-cells using Miltenyi MACS bead isolation kits. *PLOS ONE*, *14*(3), e0213832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213832>
- Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G., & Girschick, H. J. (2010). Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical and Experimental Immunology*, *162*(2), 271–279. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04206.x>
- Musiatowicz, M., Wysocka, J., Kasprzycka, E., & Hassmann, E. (2001). Lymphocyte subpopulations in hypertrophied adenoid in children. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, *59*(1), 7–13. [https://doi.org/10.1016/S0165-5876\(01\)00422-0](https://doi.org/10.1016/S0165-5876(01)00422-0)
- Nahmani, J., Hodson, M. E., & Black, S. (2007). A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution*, *145*(2), 402–424. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.04.009>
- Neuhauser, E. F., Loehr, R. C., Milligan, D. L., & Malecki, M. R. (1985). Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, *1*(3), 149–152. <https://doi.org/10.1007/BF00301782>
- Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environmental Science & Technology*, *45*(4), 1177–1183. <https://doi.org/10.1021/es103316q>
- OECD. (1984). *Test no.207 Earthworm, Acute Toxicity Tests, OECD Guideline For Testing Of Chemicals*. OECD. Paris, Frankreich.
- O’Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L. M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., & Butler, M. (2020). Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, *43*, 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
- Olden, B. R., Cheng, Y., Yu, J. L., & Pun, S. H. (2018). Cationic polymers for non-viral gene delivery to human T cells. *Journal of Controlled Release*, *282*, 140–147.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.043>

O'Neill, M., Kennedy, C., Barton, R., & Tataka, R. (2001). Receptor-mediated gene delivery to human peripheral blood mononuclear cells using anti-CD3 antibody coupled to polyethylenimine. *Gene Therapy*, *8*(5), 362–368. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301407>

Oskarsson, T. (2013). Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *The Breast*, *22 Suppl 2*, S66–S72. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.012>

Pang, N. Y.-L., Pang, A. S.-R., Chow, V. T., & Wang, D.-Y. (2021). Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Military Medical Research*, *8*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00342-3>

Park, S.-Y., Kim, K.-H., Kim, S., Lee, Y.-M., & Seol, Y.-J. (2019). BMP-2 Gene Delivery-Based Bone Regeneration in Dentistry. *Pharmaceutics*, *11*(8), 393. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080393>

Parret, A. H., Besir, H., & Meijers, R. (2016). Critical reflections on synthetic gene design for recombinant protein expression. *Current Opinion in Structural Biology*, *38*, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.07.004>

Parvathy, S. T., Udayasuriyan, V., & Bhadana, V. (2022). Codon usage bias. *Molecular Biology Reports*, *49*(1), 539–565. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06749-4>

Pass, D. A., Morgan, A. J., Read, D. S., Field, D., Weightman, A. J., & Kille, P. (2015). The effect of anthropogenic arsenic contamination on the earthworm microbiome: The earthworm microbiome. *Environmental Microbiology*, *17*(6), 1884–1896. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12712>

Pavel, M., Renna, M., Park, S. J., Menzies, F. M., Ricketts, T., Füllgrabe, J., Ashkenazi, A., Frake, R. A., Lombarte, A. C., Bento, C. F., Franze, K., & Rubinsztein, D. C. (2018). Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nature Communications*, *9*(1), 2961. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05388-x>

Pavlasova, G., & Mraz, M. (2020). The regulation and function of CD20: An “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, *105*(6), 1494–1506. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.243543>

- Pérez, M. E., Billordo, L. A., Baz, P., Fainboim, L., & Arana, E. (2014). Human memory B cells isolated from blood and tonsils are functionally distinctive. *Immunology & Cell Biology*, 92(10), 882–887. <https://doi.org/10.1038/icb.2014.59>
- Perez-Andres, M., Paiva, B., Nieto, W. G., Caraux, A., Schmitz, A., Almeida, J., Vogt, R. F., Marti, G. E., Rawstron, A. C., Van Zelm, M. C., Van Dongen, J. J. M., Johnsen, H. E., Klein, B., Orfao, A., & and the Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. (2010). Human peripheral blood B-cell compartments: A crossroad in B-cell traffic. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 78(Suppl 1), S47–S60. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20547>
- Pérez-Pérez, J. A., Espinosa-Victoria, D., Silva-Rojas, H. V., & López-Reyes, L. (2018). Diversity Of Culturable Bacterial Microbiota Of The Eisenia foetida Digestive Tract. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 41(3), 255–264. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.3.255-264>
- Pick, H. M., Meissner, P., Preuss, A. K., Tromba, P., Vogel, H., & Wurm, F. M. (2002). Balancing GFP reporter plasmid quantity in large-scale transient transfections for recombinant anti-human Rhesus-D IgG1 synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(6), 595–601. <https://doi.org/10.1002/bit.10309>
- Presley, M. L., McElroy, T. C., & Diehl, W. J. (1996). Soil moisture and temperature interact to affect growth, survivorship, fecundity, and fitness in the earthworm Eisenia fetida. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 114(4), 319–326. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(96\)00017-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(96)00017-5)
- Puetz, J., & Wurm, F. M. (2019). Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*, 7(8), 476. <https://doi.org/10.3390/pr7080476>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Rafiq, S., Hackett, C. S., & Brentjens, R. J. (2020). Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 17(3), 147–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0297-y>
- Rahimmanesh, I., Totonchi, M., & Khanahmad, H. (2020). The challenging nature of primary

T lymphocytes for transfection: Effect of protamine sulfate on the transfection efficiency of chemical transfection reagents. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 15(5), 437. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.297846>

Rahman, M. (2019). Collagen of Extracellular Matrix from Marine Invertebrates and Its Medical Applications. *Marine Drugs*, 17(2), 118. <https://doi.org/10.3390/md17020118>

Rajendra, Y., Hougland, M. D., Alam, R., Morehead, T. A., & Barnard, G. C. (2015). A high cell density transient transfection system for therapeutic protein expression based on a CHO GS-knockout cell line: Process development and product quality assessment. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(5), 977–986. <https://doi.org/10.1002/bit.25514>

Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2011). A simple high-yielding process for transient gene expression in CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 153(1–2), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.03.001>

Rajendra, Y., Kiseljak, D., Baldi, L., Wurm, F. M., & Hacker, D. L. (2015). Transcriptional and post-transcriptional limitations of high-yielding, PEI-mediated transient transfection with CHO and HEK-293E cells. *Biotechnology Progress*, 31(2), 541–549. <https://doi.org/10.1002/btpr.2064>

Rajendra, Y., Kiseljak, D., Manoli, S., Baldi, L., Hacker, D. L., & Wurm, F. M. (2012). Role of non-specific DNA in reducing coding DNA requirement for transient gene expression with CHO and HEK-293E cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(9), 2271–2278. <https://doi.org/10.1002/bit.24494>

Ramsperger, A. F. R. M., Jasinski, J., Völkl, M., Witzmann, T., Meinhart, M., Jérôme, V., Kretschmer, W. P., Freitag, R., Senker, J., Fery, A., Kress, H., Scheibel, T., & Laforsch, C. (2022). Supposedly identical microplastic particles substantially differ in their material properties influencing particle-cell interactions and cellular responses. *Journal of Hazardous Materials*, 425, 127961. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127961>

Raup, A., Stahlschmidt, U., Jérôme, V., Synatschke, C., Müller, A., & Freitag, R. (2016). Influence of Polyplex Formation on the Performance of Star-Shaped Polycationic Transfection Agents for Mammalian Cells. *Polymers*, 8(6), 224. <https://doi.org/10.3390/polym8060224>

- Raymond, C., Tom, R., Perret, S., Moussouami, P., L'Abbé, D., St-Laurent, G., & Durocher, Y. (2011). A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. *Methods*, 55(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.04.002>
- Reichard, A., & Asosingh, K. (2019). Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for Flow Cytometry. *Cytometry Part A*, 95(2), 219–226. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23690>
- Revel, M., Roman, C., & Châtel, A. (2021). Is cell culture a suitable tool for the evaluation of micro- and nanoplastics ecotoxicity? *Ecotoxicology*, 30(3), 421–430. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02355-z>
- Ricard-Blum, S. (2011). The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Richter, M., Piwocka, O., Musielak, M., Piotrowski, I., Suchorska, W. M., & Trzeciak, T. (2021). From Donor to the Lab: A Fascinating Journey of Primary Cell Lines. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 711381. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711381>
- Riedl, S. A. B., Jérôme, V., & Freitag, R. (2022). Repeated Transient Transfection: An Alternative for the Recombinant Production of Difficult-to-Express Proteins Like BMP2. *Processes*, 10(6), 1064. <https://doi.org/10.3390/pr10061064>
- Riedl, S. A. B., Kaiser, P., Raup, A., Synatschke, C., Jérôme, V., & Freitag, R. (2018). Non-Viral Transfection of Human T Lymphocytes. *Processes*, 6(10), 188. <https://doi.org/10.3390/pr6100188>
- Riedl, S. A. B., Völkl, M., Holzinger, A., Jasinski, J., Jérôme, V., Scheibel, T., Feldhaar, H., & Freitag, R. (2021). In vitro cultivation of primary intestinal cells from *Eisenia fetida* as basis for ecotoxicological studies. *Ecotoxicology*, 31(2), 221–233. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02495-2>
- Robards, K., & Worsfold, P. (1991). Cadmium: Toxicology and analysis. A review. *The Analyst*, 116(6), 549. <https://doi.org/10.1039/an9911600549>
- Roch, Ph., Valembois, P., & Du Pasquier, L. (1975). Response of Earthworm Leukocytes to

Concanavalin a and Transplantation Antigens. In W. H. Hildemann & A. A. Benedict (Eds.), *Immunologic Phylogeny* (Vol. 64, pp. 45–54). Springer. Boston, Massachusetts, USA. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3261-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3261-9_6)

Rosenmann, E., Rabinowitz, R., & Schlesinger, M. (1998). Lymphocyte subsets in human tonsils: The effect of age and infection. *Pediatric Allergy and Immunology*, *9*(3), 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.1998.tb00364.x>

Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed., Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, New York, USA.

Sanz, I., Wei, C., Jenks, S. A., Cashman, K. S., Tipton, C., Woodruff, M. C., Hom, J., & Lee, F. E.-H. (2019). Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02458>

Sathyamurthy, M., Kim, C. L., Bang, Y. L., Kim, Y. S., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2015). Characterization and expression of proprotein convertases in CHO cells: Efficient proteolytic maturation of human bone morphogenetic protein-7: Expression of Proprotein Convertase in CHO Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(3), 560–568. <https://doi.org/10.1002/bit.25458>

Sathyamurthy, M., Lee, J. S., Park, J. H., Kim, Y. J., Jeong, J. Y., Jang, J. W., & Lee, G. M. (2013). Overexpression of PACEsol improves BMP-7 processing in recombinant CHO cells. *Journal of Biotechnology*, *164*(2), 336–339. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.01.012>

Scadding, G. K. (1990). Immunology of the Tonsil: A Review. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *83*(2), 104–107. <https://doi.org/10.1177/014107689008300216>

Schallon, A., Synatschke, C. V., Jérôme, V., Müller, A. H. E., & Freitag, R. (2012). Nanoparticulate Nonviral Agent for the Effective Delivery of pDNA and siRNA to Differentiated Cells and Primary Human T Lymphocytes. *Biomacromolecules*, *13*(11), 3463–3474. <https://doi.org/10.1021/bm3012055>

Schmidt-Bleek, K., Willie, B. M., Schwabe, P., Seemann, P., & Duda, G. N. (2016). BMPs in bone regeneration: Less is more effective, a paradigm-shift. *Cytokine & Growth Factor*

*Reviews*, 27, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.11.006>

Schneider, I. (1964). Differentiation of larval drosophila eye-antennal Discsin Vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 156(1), 91–103. <https://doi.org/10.1002/jez.1401560107>

Schneider, U., Schwenk, H.-U., & Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*, 19(5), 621–626. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910190505>

Schwarz, H., Zhang, Y., Zhan, C., Malm, M., Field, R., Turner, R., Sellick, C., Varley, P., Rockberg, J., & Chotteau, V. (2020). Small-scale bioreactor supports high density HEK293 cell perfusion culture for the production of recombinant Erythropoietin. *Journal of Biotechnology*, 309, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.12.017>

Sesterhenn, K., Krueger, G. R., & Uhlmann, C. (1977). Percent distribution of T- and B-cells in tonsils of children, juveniles and adults. *Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 218(1–2), 37–44. <https://doi.org/10.1007/BF00469732>

Shah, K., Al-Haidari, A., Sun, J., & Kazi, J. U. (2021). T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 412. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00823-w>

Shoults-Wilson, W. A., Reinsch, B. C., Tsyusko, O. V., Bertsch, P. M., Lowry, G. V., & Unrine, J. M. (2011). Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms ( *Eisenia fetida* ). *Nanotoxicology*, 5(3), 432–444. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.537382>

Sims, G. P., & Lipsky, P. E. (2006). Isolation of human B cell populations. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 7(7.5), 7.5.1-7.5.11. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0705s75>

Sivakumar, S. (2015). Effects of metals on earthworm life cycles: A review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187(8), 530. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4742-9>

Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P., & Jones, D. T. (1994). Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems.

*Environmental Pollution*, 84(2), 123–130. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(94)90094-9)

Spurgeon, D. J., Weeks, J. M., & Van Gestel, C. A. M. (2003). A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*, 47(5–6), 588–606. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00234>

Stankiewicz, A., & Plytycz, B. (1998). Effects of in vitro conditions and in vivo thermal adaptation on viability of the earthworm (*Eisenia fetida*) coelomocytes. *Folia Biologica*, 46, 183–188.

Stein, E., & Cooper, E. L. (1981). The Role of Opsonins in Phagocytosis by Coelomocytes of the Earthworm, *Lumbricus Terrestris*. *Developmental & Comparative Immunology*, 5(3), 415–425. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(81\)80054-7](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(81)80054-7)

Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: Current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*, 11(4), 69. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>

Stout, R. D., & Herzenberg, L. A. (1975). The Fc receptor on thymus-derived lymphocytes: II. Mitogen responsiveness of T lymphocytes bearing the Fc receptor. *The Journal of Experimental Medicine*, 142(5), 1041–1051. <https://doi.org/10.1084/jem.142.5.1041>

Su, K.-Y., Watanabe, A., Yeh, C.-H., Kelsoe, G., & Kuraoka, M. (2016). Efficient Culture of Human Naive and Memory B Cells for Use as APCs. *The Journal of Immunology*, 197(10), 4163–4176. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502193>

Swart, E., Goodall, T., Kille, P., Spurgeon, D. J., & Svendsen, C. (2020). The earthworm microbiome is resilient to exposure to biocidal metal nanoparticles. *Environmental Pollution*, 267, 115633. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115633>

Synatschke, C. V., Schallon, A., Jérôme, V., Freitag, R., & Müller, A. H. E. (2011). Influence of Polymer Architecture and Molecular Weight of Poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate) Polycations on Transfection Efficiency and Cell Viability in Gene Delivery. *Biomacromolecules*, 12(12), 4247–4255. <https://doi.org/10.1021/bm201111d>

Tahseen, Q. (2009). Coelomocytes: Biology and Possible Immune Functions in Invertebrates with Special Remarks on Nematodes. *International Journal of Zoology*, 2009, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2009/218197>

Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>

Tennant, J. R. (1964). Evaluation Of The Trypan Blue Technique Fof Determination of Cell Viability. *Transplantation*, 2, 685–694. <https://doi.org/10.1097/00007890-196411000-00001>

Thuille, N., Sajinovic, T., Siegmund, K., & Baier, G. (2020). Chemically modified mRNA nucleofection of primary human T cells. *Journal of Immunological Methods*, 487, 112878. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112878>

Tomimatsu, K., & Shirahata, S. (2014). Antigen-Specific In Vitro Immunization: A Source for Human Monoclonal Antibodies. In M. Steinitz (Ed.), *Human Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (1st ed., Vol. 1060, pp. 297–307). Humana. Totowa, New Jersey, USA. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-586-6_15)

Toupin, J., Marks, D. H., Cooper, E. L., & Lamoureux, G. (1977). Earthworm coelomocytes in vitro. *In Vitro*, 13(4), 218–222. <https://doi.org/10.1007/BF02615078>

Tourinho, P. S., van Gestel, C. A. M., Lofts, S., Svendsen, C., Soares, A. M. V. M., & Loureiro, S. (2012). Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(8), 1679–1692. <https://doi.org/10.1002/etc.1880>

Tripathi, G., & Bhardwaj, P. (2004). Comparative studies on biomass production, life cycles and composting efficiency of *Eisenia fetida* (Savigny) and *Lampito mauritii* (Kinberg). *Bioresource Technology*, 92(3), 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.09.005>

Trizio, D., & Cudkowicz, G. (1974). Separation of T and B lymphocytes by nylon wool columns: Evaluation of efficacy by functional assays in vivo. *Journal of Immunology*, 113(4), 1093–1097.

Valles-Ayoub, Y., Govan, H., & Braun, J. (1990). Evolving abundance and clonal pattern of human germinal center B cells during childhood. *Blood*, 76(1), 17–23. <https://doi.org/10.1182/blood.V76.1.17.17>

van Gestel, C. A. M., Dirven-van Breemen, E. M., & Baerselman, R. (1993). Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia*

andrei (Oligochaeta, Annelida). *Science of The Total Environment*, 134, Supplement 1, 585–597. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(05\)80061-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(05)80061-0)

Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>

Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. In A. S. Verma & A. Singh (Eds.), *Animal Biotechnology* (2nd ed., pp. 269–293). Academic Press. London, Vereinigtes Königreich.

von Smoluchowski, M. (1906). Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Annalen der Physik*, 326(14), 756–780. <https://doi.org/10.1002/andp.19063261405>

Wang, Y., Paushter, D., Wang, S., Barbaro, B., Harvat, T., Danielson, K. K., Kinzer, K., Zhang, L., Qi, M., & Oberholzer, J. (2011). Highly Purified versus Filtered Crude Collagenase: Comparable Human Islet Isolation Outcomes. *Cell Transplantation*, 20(11–12), 1817–1825. <https://doi.org/10.3727/096368911X564994>

Weigel, C., Geißler, K., Markwart, R., Schubert, K., Rubio, I., Guntinas-Lichius, O., & Requardt, R. P. (2015). Isolation of viable and functional T-cells from human palatine tonsils. *Journal of Immunological Methods*, 427, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.10.002>

Werner, C., Klouda, P. T., Corréa, M. C., Vassalli, P., & Jeannet, M. (1977). Isolation of B and T lymphocytes by nylon fiber columns. *Tissue Antigens*, 9(4), 227–229. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1977.tb01112.x>

Willcox, H. N., Newsom-Davis, J., & Calder, L. R. (1983). Greatly increased autoantibody production in myasthenia gravis by thymocyte suspensions prepared with proteolytic enzymes. *Clinical and Experimental Immunology*, 54(2), 378–386.

Williams, S. K., McKenney, S., & Jarrell, B. E. (1995). Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion. *Cell Transplantation*, 4(3), 281–289. [https://doi.org/10.1016/0963-6897\(95\)00006-j](https://doi.org/10.1016/0963-6897(95)00006-j)

- Withers, D. R., Fiorini, C., Fischer, R. T., Ettinger, R., Lipsky, P. E., & Grammer, A. C. (2007). T cell-dependent survival of CD20+ and CD20- plasma cells in human secondary lymphoid tissue. *Blood*, *109*(11), 4856–4864. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-043414>
- Wohler, J. E., & Barnum, S. R. (2009). Nylon wool purification alters the activation of T cells. *Molecular Immunology*, *46*(5), 1007–1010. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.09.017>
- Wohlford, E. M., Baresel, P. C., Wilmore, J. R., Mortelliti, A. J., Coleman, C. B., & Rochford, R. (2018). Changes in Tonsil B Cell Phenotypes and EBV Receptor Expression in Children Under 5-Years-Old: Tonsil B Cell Phenotypes And EBV Receptor in Children. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, *94*(2), 291–301. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21589>
- Wong Chung, J. E. R. E., van Benthem, P. P. G., & Blom, H. M. (2018). Tonsillotomy versus tonsillectomy in adults suffering from tonsil-related afflictions: A systematic review. *Acta Oto-Laryngologica*, *138*(5), 492–501. <https://doi.org/10.1080/00016489.2017.1412500>
- Wong, D. W., & Mittal, K. K. (1981). HLA-DR typing: A comparison between nylon wool adherence and T cell rosetting in the isolation of B cells. *Journal of Immunological Methods*, *46*(2), 177–186. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90134-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90134-4)
- Wright, J. F. (2009). Transient Transfection Methods for Clinical Adeno-Associated Viral Vector Production. *Human Gene Therapy*, *20*(7), 698–706. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.064>
- Wünsch, E., & Heidrich, H.-G. (1963). Zur quantitativen Bestimmung der Kollagenase. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, *333*(Jahresband), 149–151. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1963.333.1.149>
- Wurm, F., & Wurm, M. (2017). Cloning of CHO Cells, Productivity and Genetic Stability—A Discussion. *Processes*, *5*(2), 20. <https://doi.org/10.3390/pr5020020>
- Xiao, Y., Zhang, B., Hsieh, A., Thavandiran, N., Martin, C., & Radisic, M. (2013). Microfluidic Cell Culture Techniques. In C. Bettinger, J. T. Borenstein, & S. L. Tao (Eds.), *Microfluidic Cell Culture Systems* (pp. 303–321). William Andrew. Oxford, Vereinigtes Königreich. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3459-1.00012-0>
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomarker*

*Research*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0102-y>

Zhang, M., Ma, Z., Selliah, N., Weiss, G., Genin, A., Finkel, T. H., & Cron, R. Q. (2014). The impact of Nucleofection® on the activation state of primary human CD4 T cells. *Journal of Immunological Methods*, 408, 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.05.014>

Zhang, X., Lu, Y., Shi, Y., Chen, C., Yang, Z., Li, Y., & Feng, Y. (2009). Antioxidant and metabolic responses induced by cadmium and pyrene in the earthworm *Eisenia fetida* in two different systems: Contact and soil tests. *Chemistry and Ecology*, 25(3), 205–215. <https://doi.org/10.1080/02757540902942388>

Zhang, Z., Qiu, S., Zhang, X., & Chen, W. (2018). Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. *BMC Biotechnology*, 18(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0419-0>

Zhao, N., Qi, J., Zeng, Z., Parekh, P., Chang, C.-C., Tung, C.-H., & Zu, Y. (2012). Transfecting the hard-to-transfect lymphoma/leukemia cells using a simple cationic polymer nanocomplex. *Journal of Controlled Release*, 159(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.01.007>

Zhao, Y., Zheng, Z., Cohen, C. J., Gattinoni, L., Palmer, D. C., Restifo, N. P., Rosenberg, S. A., & Morgan, R. A. (2006). High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation. *Molecular Therapy*, 13(1), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.07.688>

Zhou, A. J., Clokie, C. M. L., & Peel, S. A. F. (2012). Polyarginine peptide IND-1 enhances recombinant human bone morphogenetic protein-2 yield in mammalian cells. *Biotechnology Letters*, 34(2), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0781-7>

Zhu, M. M., Mollet, M., Hubert, R. S., Kyung, Y. S., & Zhang, G. G. (2017). Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. In J. A. Kent, T. V. Bommaraju, & S. D. Barnicki (Eds.), *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology* (13th ed., pp. 1639–1669). Springer Cham. Cham, Deutschland. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6\\_29](https://doi.org/10.1007/978-3-319-52287-6_29)

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
a	Jahr(e)
A	Absorption
AgNP	Silbernanopartikel
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
a.u.	<i>arbitrary unit</i>
b	Basenpaar(e)
BC	Buffy Coat
BC <sub>MACS</sub>	Buff Coat MACS B Zell Fraktion
BME	<i>Basal Medium Eagle</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDU	<i>Collagen Digestion Unit</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CMV	<i>human cytomegalovirus</i>

Cy	Cyanin
Da	Dalton
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E	Erwachsener
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>E. fetida</i>	<i>Eisenia fetida</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ELS	elektrophoretische Lichtstreuung
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EV	enzymatische Vorbehandlung
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>

g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GC	<i>germinal center</i>
GGE	<i>Guaiacol Glyceryl Ether</i>
h	Stunde(n)
h	human
HBG	<i>HEPES-buffered glucose solution</i>
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSPG	<i>heparan sulfate proteoglycan</i>
HZD	Hochzelldichte
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
K	Kind
l	linear
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LBSS	<i>Lumbricus Balanced Salt Solution</i>
LC <sub>50</sub>	letale Konzentration <sub>50</sub>
LG	LymphoGrow

LM	lineares Modell
$\mu$	spezifische Wachstumsrate
m	Meter
MACS	<i>magnetically assisted cell sorting</i>
MFI	<i>Median Fluorescence Intensity</i>
M-HBSS	<i>Modified Hanks Balanced Salt Solution</i>
min	Minute(n)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NW-B	Nylon Wolle B Zell Fraktion
NW-T	Nylon Wolle T Zell Fraktion
OD	optische Dichte
pA	Polyadenylierung (polyA)
<i>P. aspergillum</i>	<i>Pheretima aspergillum</i>
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PDMAEMA	<i>Poly(2-dimethylamino) ethyl methacrylate</i>
pDNA	Plasmid-DNA
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
PSTGA	Penicillin, Streptomycin, Tetracyclin, Gentamicin, Amphotericin B
pt	<i>post-transfection</i>
q	zellspezifische Produktivität
r	rekombinant

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>
RT	Raumtemperatur
RTT	<i>repeated transient transfection</i> (wiederholte transiente Transfektion)
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
sec	Sekunde(n)
SDM	Schneider's Drosophila Medium
SSC	<i>side scatter</i>
TAE	TRIS Acetat EDTA
TCR	<i>T cell receptor</i>
TE	Transfektionseffizienz
TGE	Transiente Genexpression
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
ÜN	über Nacht (> 12 h)
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
WF	Wurmfiltrat
w/v	<i>weight/volume</i>
Z	Zelle(n)

## 10. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 3-1:</b> Entwickeltes experimentelles Protokoll für die Isolation primärer intestinaler Zellen des Kompostwurmes <i>E. fetida</i> mit nachfolgender Kultivierung und Analytik. ....	23
<b>Abbildung 3-2:</b> Einfluss von LBSS, M-HBSS und M-HBSS supplementiert mit 50,4 mM GGE auf den Isolationsprozess von primären intestinalen Zellen des Kompostwurmes <i>E. fetida</i> . ....	24
<b>Abbildung 3-3:</b> Kultivierung primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> in unterschiedlichen Medienformulierungen basierend auf den Basalmedien L-15 und SDM. ....	27
<b>Abbildung 3-4:</b> Anpassung der Medienformulierung für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> . ....	29
<b>Abbildung 3-5:</b> Metabolische Aktivität primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> in L-15-60% basierten Medienformulierungen mit den angegebenen Konzentrationen FCS und/oder WF. ....	32
<b>Abbildung 3-6:</b> Repräsentative mikroskopische Aufnahmen primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> ausgesät mit unterschiedlichen Animpfzellichten nach 48 h Kultivierung. ....	33
<b>Abbildung 3-7:</b> Ökotoxizitätsassays mit primären intestinalen Zellen von <i>E. fetida</i> . ....	34
<b>Abbildung 4-1:</b> Entwickeltes experimentelles Protokoll für die Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen. ....	53
<b>Abbildung 4-2:</b> Entwicklung der A) Zellausbeute und B) B-Zellausbeute im Verlauf des Isolationsprotokolls in den verschiedenen Fraktionen. ....	54
<b>Abbildung 4-3:</b> Entwicklung des Anteils B- und T-Zellen im Verlauf des Isolationsprotokolls in den verschiedenen Fraktionen. ....	57
<b>Abbildung 4-4:</b> Charakterisierung von B-Zellen in verschiedene B-Zell Subtypen anhand der CD20, CD27 und CD38 Expression in den unterschiedlichen Geweben/Fraktionen. ....	60

<b>Abbildung 6-1:</b> Expressionskassetten der verwendeten Plasmide zur transienten Produktion von BMP2 und EGFP als Reporterprotein. ....	85
<b>Abbildung 6-2:</b> A) Polyplex-Transfektion und B) HZD-Transfektion im Mikro-Scale von HEK <sub>sus</sub> Zellen mit pEGFP-N1 und l-PEI sowie des Nanosterns.....	99
<b>Abbildung 6-3:</b> Optimierung der HZD-Transfektion von CHO <sub>sus</sub> Zellen im Mikro-Scale mit A) pEGFP-N1 und B) phBMP2-EGFP. ....	100
<b>Abbildung 6-4:</b> Transiente BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen mittels Small-Scale Transfektion und nachfolgender Kultivierung in einer Spinner-Flasche. ....	108
<b>Abbildung 6-5:</b> RTT von HEK <sub>sus</sub> Zellen im Mikro-Scale mit pEGFP-N1. ....	111
<b>Abbildung 6-6:</b> RTT für die transiente BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen im Mikro-Scale. ....	115
<b>Abbildung 6-7:</b> Scale-up der RTT von Medium- zu Large-Scale für die transiente BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen.....	120
<b>Abbildung 7-1:</b> Auswertestrategie der Analyse von B-Zellen mittels Durchflusszytometrie. ....	125
<b>Abbildung 7-2:</b> Repräsentative Auswertung der Bestimmung der TE und des EGFP Expressionslevels mittels Durchflusszytometrie 48 h nach der transienten Transfektion.....	132

## 11. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3-1:</b> Eigenschaften und detaillierte Zusammensetzung von M-HBSS und LBSS. ....	15
<b>Tabelle 3-2:</b> Parameter der Beschichtung von 24-Well-Zellkulturplatten mit Adhärenz-verbessernden Substanzen. ....	19
<b>Tabelle 3-3:</b> Verwendete Bedingungen bei der Analyse des Einflusses von 40 nm AgNP auf primäre intestinale Zellen von <i>E. fetida</i> . ....	21
<b>Tabelle 3-4:</b> Zusammensetzung der analysierten Medienformulierungen <sup>a</sup> für die Kultivierung primärer intestinaler Zellen von <i>E. fetida</i> . ....	26
<b>Tabelle 3-5:</b> Verwendete Medienformulierungen <sup>a</sup> für die Anpassung der Osmolalität mittels unterschiedlich hoher Verdünnung des Basalmediums L-15. ....	30
<b>Tabelle 4-1:</b> Klassifizierung von B-Zellen in unterschiedliche Subtypen anhand der Expression phänotypischer CD-Marker. ....	41
<b>Tabelle 4-2:</b> Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung hinsichtlich der relativen Zellausbeute und Viabilität in der erhaltenen DGZ Fraktion aus Tonsillen von Kindern und Erwachsenen. ....	51
<b>Tabelle 5-1:</b> Bedingungen der Polyplex-Bildung zur transienten Transfektion primärer humaner T-Zellen. ....	70
<b>Tabelle 5-2:</b> Polyplex- und HZD-Transfektion primärer humaner T-Zellen mit dem Nanostern. ....	74
<b>Tabelle 6-1:</b> Bedingungen der Polyplex-Bildung zur transienten Transfektion von HEK <sub>sus</sub> Zellen. ....	88
<b>Tabelle 6-2:</b> HZD-Transfektion von HEK <sub>sus</sub> und CHO <sub>sus</sub> Zellen in verschiedenen Maßstäben. ....	90
<b>Tabelle 6-3:</b> TGE in CHO <sub>sus</sub> Zellen nach HZD-Transfektion im Mikro-Scale mit verschiedenen Plasmiden. ....	103
<b>Tabelle 6-4:</b> TGE in HEK <sub>sus</sub> Zellen nach HZD-Transfektion im Mikro-Scale mit verschiedenen Plasmiden. ....	106

<b>Tabelle 6-5:</b> BMP2 Ausbeute in der RTT für die transiente BMP2 Produktion in HEK <sub>sus</sub> Zellen im Mikro-Scale.....	117
<b>Tabelle 7-1:</b> Eigenschaften und ausgewählte Bestandteile von L-15 Medium (Leibovitz, 1963) und Schneider’s Drosophila Medium (I. Schneider, 1964).....	124
<b>Tabelle 7-2:</b> Informationen zu den untersuchten humanen Spendern des tonsillären Gewebes und des Blutes (Buffy Coat). .....	125
<b>Tabelle 7-3:</b> Einfluss der enzymatischen Vorbehandlung (EV) auf die isolierten Zellen in der DGZ Fraktion bei der Isolation primärer humaner B-Zellen aus Tonsillen von Kindern und Erwachsenen.....	126
<b>Tabelle 7-4:</b> Individuelle Daten der analysierten Spender für die Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Kindern.....	127
<b>Tabelle 7-5:</b> Individuelle Daten der analysierten Spender für die Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Erwachsenen. ....	128
<b>Tabelle 7-6:</b> Individuelle Daten der analysierten Spender für die Isolation von B-Zellen aus humanem Blut (Buffy Coat) von Erwachsenen.....	129
<b>Tabelle 7-7:</b> Expression der Oberflächenmarker CD20, CD27 und CD38 in der B-Zell Population (CD19 <sup>+</sup> ) vor und nach der Aufreinigung mittels Nylon Wolle sowie die Wiederfindungsrate bei der Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Kindern.....	130
<b>Tabelle 7-8:</b> Expression der Oberflächenmarker CD20, CD27 und CD38 in der B-Zell Population (CD19 <sup>+</sup> ) vor und nach der Aufreinigung mittels Nylon Wolle sowie die Wiederfindungsrate bei der Isolation von B-Zellen aus humanen Tonsillen von Erwachsenen.....	130
<b>Tabelle 7-9:</b> Expression der Oberflächenmarker CD20, CD27 und CD38 in der B-Zell Population (CD19 <sup>+</sup> ) vor und nach der Aufreinigung mittels MACS sowie die Wiederfindungsrate bei der Isolation von B-Zellen aus humanem Blut (Buffy Coat). .....	131
<b>Tabelle 7-10:</b> Zellspezifische Produktivität (q) und Wachstumsrate (μ) der HEK <sub>sus</sub> Zellen in der RTT für die transiente BMP2 Produktion im Mikro-Scale. ....	133
<b>Tabelle 7-11:</b> Verwendete Chemikalien und Reagenzien, Puffer und Lösungen, Kits. ....	133

<b>Tabelle 7-12:</b> Hergestellte Puffer und ihre Zusammensetzung. ....	136
<b>Tabelle 7-13:</b> Verwendete Kulturmedien und Zusätze.....	137
<b>Tabelle 7-14:</b> Verwendete Zelllinien, Zellen und Mikroorganismen. ....	138
<b>Tabelle 7-15:</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien. ....	139
<b>Tabelle 7-16:</b> Verwendete Geräte und Laborausstattung. ....	140

## 12. Publikationsliste

Helm, M., **Riedl, S. A. B.**, Gollner, K., Gollner, U., Jérôme, V., & Freitag, R. (2021). Isolation of primary human B lymphocytes from tonsils compared to blood as alternative source for ex vivo application. *Journal of Chromatography B*, 1179, 122853. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122853>

**Riedl, S. A. B.**, Jérôme, V., & Freitag, R. (2022). Repeated Transient Transfection: An Alternative for the Recombinant Production of Difficult-to-Express Proteins Like BMP2. *Processes*, 10(6), 1064. <https://doi.org/10.3390/pr10061064>

**Riedl, S. A. B.**, Kaiser, P., Raup, A., Synatschke, C., Jérôme, V., & Freitag, R. (2018). Non-Viral Transfection of Human T Lymphocytes. *Processes*, 6(10), 188. <https://doi.org/10.3390/pr6100188>

**Riedl, S. A. B.**, Völkl, M., Holzinger, A., Jasinski, J., Jérôme, V., Scheibel, T., Feldhaar, H., & Freitag, R. (2021). In vitro cultivation of primary intestinal cells from *Eisenia fetida* as basis for ecotoxicological studies. *Ecotoxicology*, 31(2), 221–233. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02495-2>

## 13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in der Zeit meiner Promotion unterstützt haben.

Zuallererst gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Ruth Freitag, für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl Bioprozesstechnik der Universität Bayreuth anfertigen zu können, für die hervorragende und fokussierte Betreuung während meiner Zeit in Bayreuth und für die Möglichkeit, diesen doch sehr breiten Themenkomplex bearbeiten zu können.

Ich danke Frau Dr. Valérie Jérôme für die fachliche Betreuung und Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen sowie für Denkanstöße und Hilfe bei laborpraktischen Anliegen. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Frank Hilbrig für die konstruktiven Diskussionen und seine vielseitige Unterstützung. Ein herzliches Dankeschön an Frau Prof. Dr. Heike Feldhaar für die sehr angenehme und konstruktive Unterstützung und Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Matthias Völkl und Moritz Helm für die konstruktive Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung im Bereich der Primärzellen von *E. fetida* und den B-Zellen. Ich danke Anja Holzinger und Darleen Lücker für die Präparation des Darmgewebes von *E. fetida* und für die gute und reibungslose Zusammenarbeit. Auch bedanke ich mich bei Anja Holzinger für die Durchführung der statistischen Auswertung im Bereich der Primärzellen von *E. fetida* und bei Julia Jasinski für die Durchführung der Messungen im Litesizer. Ganz besonders bedanke ich mich bei Maria John für ihre produktive Masterarbeit und die sehr angenehme Betreuung und Zusammenarbeit. Weiter gilt mein Dank Rostanie Dongue für ihre Bachelorarbeit und allen Studierenden, die ich im Rahmen von Praktika betreuen durfte. Vielen Dank an alle Doktoranden, Thomas Steiner, Stanislava Mlinar, Songyan Ben Huang (auch für die vielen Laufrunden), Daniel Keim, Helene Kaleeva, Leif Meyer und Meshack Simeon für die Unterstützung und die schöne Zeit in Bayreuth. Ich bedanke mich bei Andrea Schott für die Durchführung der Plasmidaufreinigung, sowie bei Edith Hübner, Kristina Thompson und Helena Schneider als Mitarbeitende am Lehrstuhl für die gute Zusammenarbeit.

Zum Schluss möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie und bei Corinna für die vielseitige Unterstützung während meines Studiums und in der Promotion bedanken, in schönen und in schwierigen Zeiten, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

## 14. Erklärung

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

*Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).*

(§ 9 Satz 2 Nr. 3 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 4 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 7 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung meiner Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.*

(§ 9 Satz 2 Nr. 8 PromO BayNAT)

*Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.*

.....

Ort, Datum, Unterschrift