

2. Materialien und Methoden

2.1. Polyacrylamidträger

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

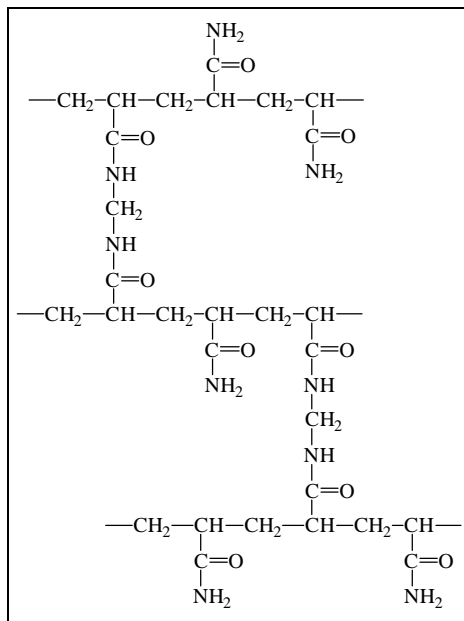


Abb. 1 Ausschnitt aus der Struktur der Polyacrylamidmatrix

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

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

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

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

2.2. Herstellung magnetischer Polymerträger

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

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

2.3. Fraktionierung der Polymerträger nach Partikelgröße und Magnetisierungsgrad

2.3.1. Fieldflow-Fraktionierung (FFF)

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

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

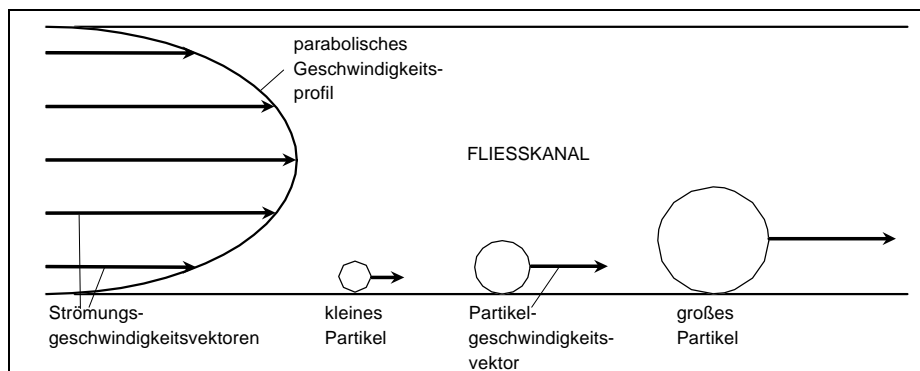


Abb. 2: Schematische Darstellung der Seitenansicht eines FFF-Kanals. Gezeigt sind die relativen Unterschiede der Geschwindigkeitsvektoren des Fließmediums, die die Bewegung der Partikel bestimmen.

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

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

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

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

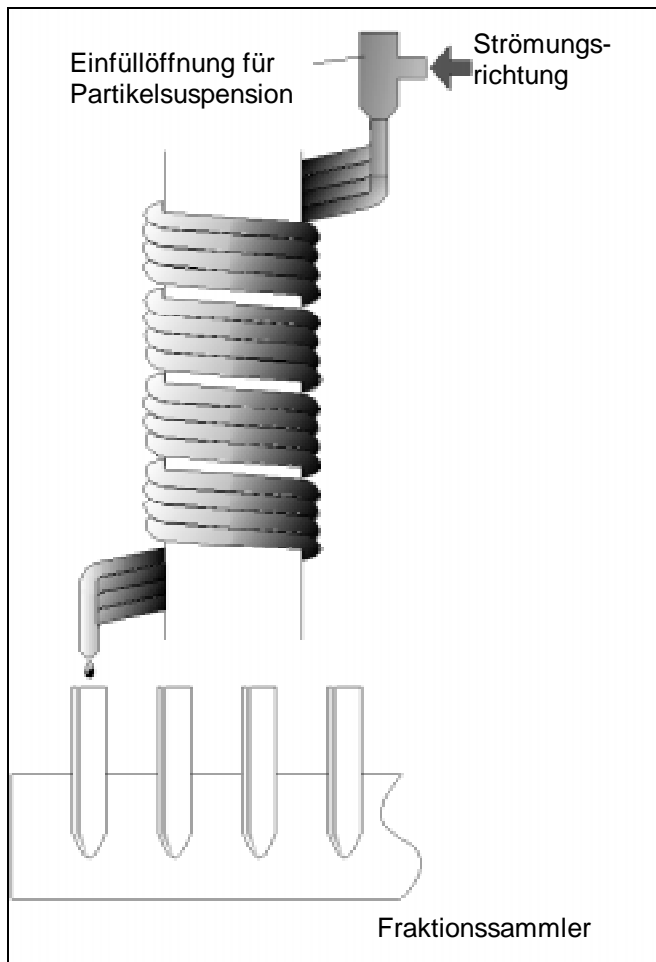


Abb. 3 Schematische Darstellung der Anlage zur sterischen FFF
Mit Hilfe einer Peristaltikpumpe wird ein Fließstrom erzeugt, der die Partikel aus der Suspension unterschiedlich schnell bewegt. Die getrennten Partikel werden in Fraktionssammlerröhrchen aufgefangen.

2.3.2. Aussieben

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

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

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

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

2.4. Derivatisierung magnetischer Polyacrylamidträger

2.4.1. Hydrazid-Derivat

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

2.4.2. Succinyl-Derivat

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

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

2.4.3. Naphtolsulfonsäure-Derivat

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

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

2.4.4. Aminoethyl-Derivat

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

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

2.4.5. Carboxyliertes Derivat

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

2.4.6. Phosphoryliertes Derivat

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

filtriert und mit Wasser gewaschen.

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

2.4.7. Lipidiertes Derivat

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

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

2.4.8. Albuminiertes Derivat

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

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

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

2.4.9. Collageniertes Derivat

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

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

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

2.5. Sterilisierung magnetischer Polymerträger-Derivate

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

- organische Lösungsmittel

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

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

- Autoklavierung

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

- Bestrahlung

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

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

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

2.6. Immobilisierung von Rattenhepatozyten an magnetischen Polyacrylamidträgern

2.6.1. Isolation von Rattenhepatozyten

2.6.1.1. Substrate und Materialien

2.6.1.1.1. Pufferlösungen

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

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

II. Präperfusionspuffer (PPP), Ca²⁺-frei

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

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

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

Alle Pufferlösungen werden vor jeder Perfusion frisch hergestellt und sterilfiltriert.

2.6.1.1.2. Zellkulturmedien

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

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

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

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

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

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

2.6.1.2. Leberperfusion

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

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

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



Abb. 4 Kanülierung im geöffneten Bauchraum der Ratte

2.6.1.3. Präperfusionsphase

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

2.6.1.4. Leberperfusion mit collagenasehaltigem Perfusionspuffer

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

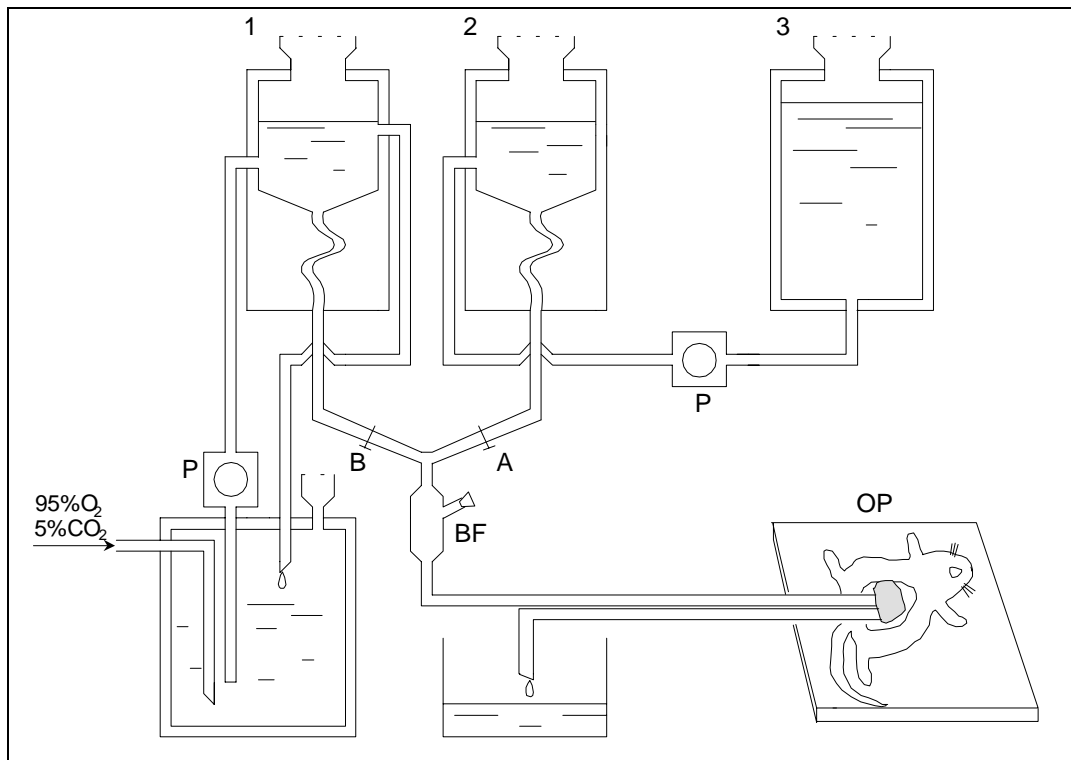


Abb. 5 Aufbau der Anlage zur in situ Perfusion der Rattenleber

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

2.6.1.5. Freisetzung der Leberzellen und Reinigung der Hepatozyten

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

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

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

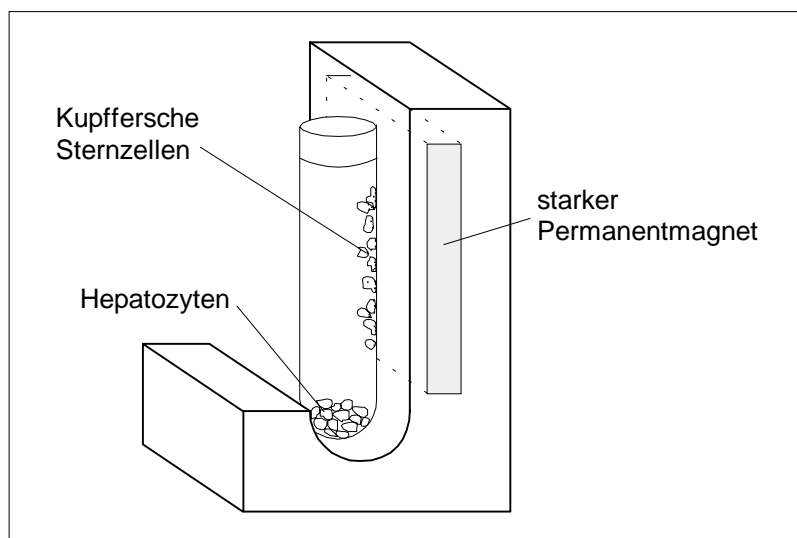


Abb. 6 Anlage zur Separation Kupfferscher Sternzellen von Hepatozyten. Die mit magnetischen Mikropartikeln beladenen Kupfferschen Sternzellen werden von einem starken Permanentmagneten an die Glaswand des Röhrchens gezogen, während die nichtbeladenen Hepatozyten auf den Röhrchenboden absinken.

2.6.1.6. Kryokonservierung

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

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

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

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

2.6.2. Kultivierung von Hepatozyten auf flachen Unterlagen und an Polyacrylamidträgern

2.6.2.1. Monolayerkultivierung

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

2.6.2.2. Kultivierung an Polyacrylamidpartikeln

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

- ◆ Amid
- ◆ Hydrazid
- ◆ Bernsteinsäurehydrazid

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

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

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

2.6.3. Ermittlung der Zellzahl in der Monolayerkultur und am Polymerträger

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

2.6.4. Biochemisch-analytische Methoden

2.6.4.1. Live/dead-Färbung

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

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

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

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

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

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

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

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

2.6.4.2. Bestimmung der Konjugationskapazität kultivierter Hepatozyten

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

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

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

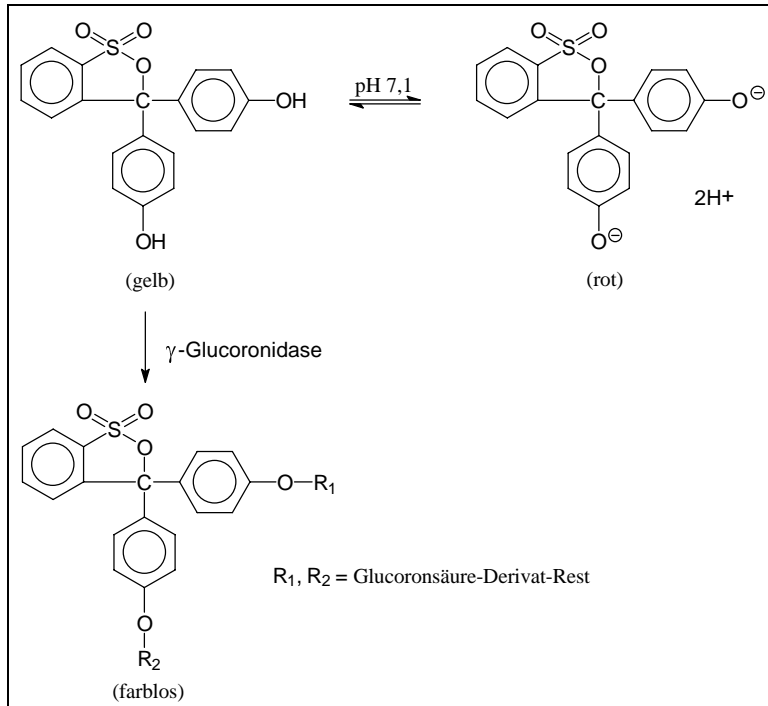


Abb. 7 Phenolrot-Derivate im Medium

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

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

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

2.6.4.3. Bestimmung der Harnstoffproduktion

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

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

2.7. Aufbau eines magnetischen Gitterreaktors zur kontinuierlichen Zellzucht von Hepatozyten

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

Tab. 1 Reaktorraumparameter

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

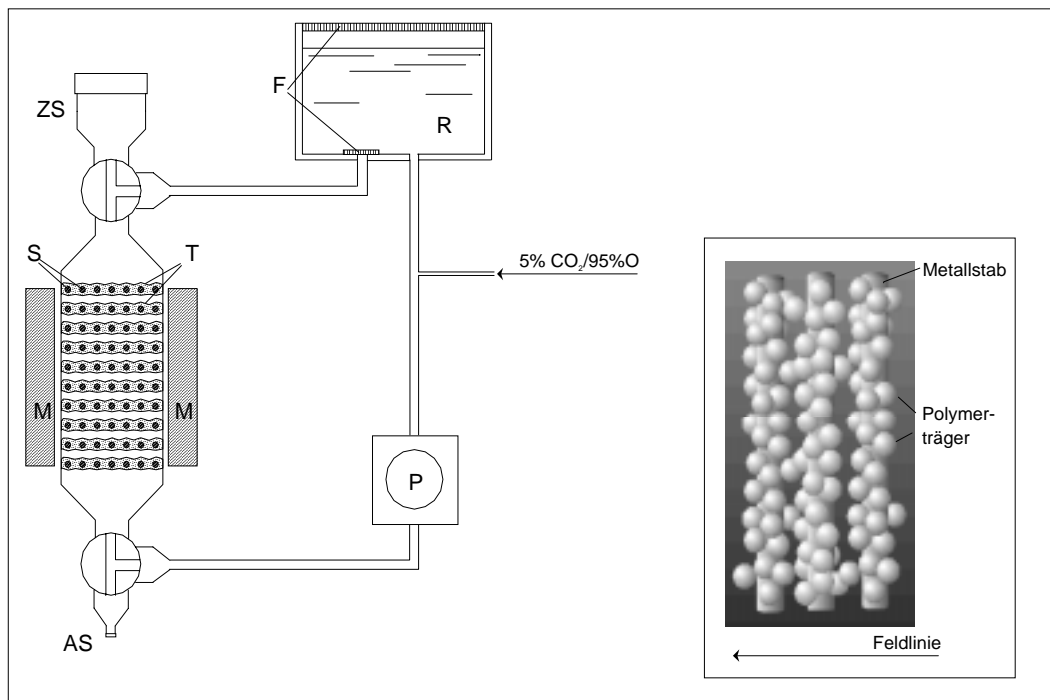


Abb. 8 Schematischer Aufbau und Geräteanordnung des magnetischen Zellzuchtreaktors

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

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

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

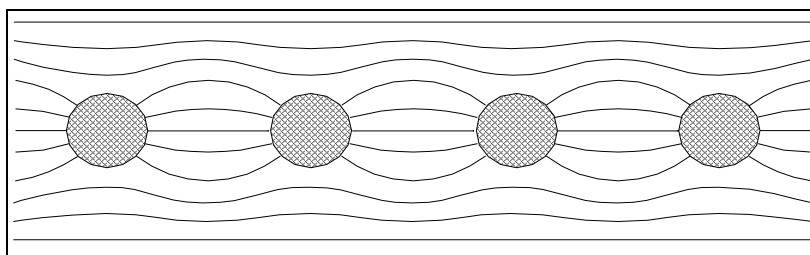


Abb. 9 Feldlinienverlauf an 4 Metallstäben des Reaktorinnenraumes

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

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

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

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

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

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

2.8.1. Zelllinien, Substrate und Kulturmedien

2.8.1.1. Epithelzellen

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

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

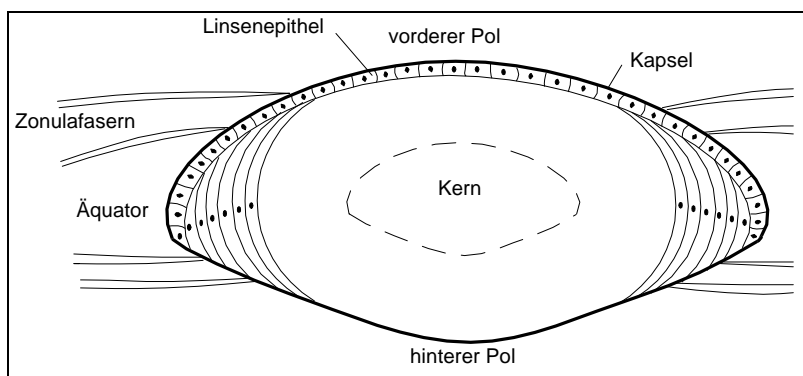


Abb. 10 Schematische Darstellung einer Rinderaugenlinse

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

2.8.1.2. Endothelzellen

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

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

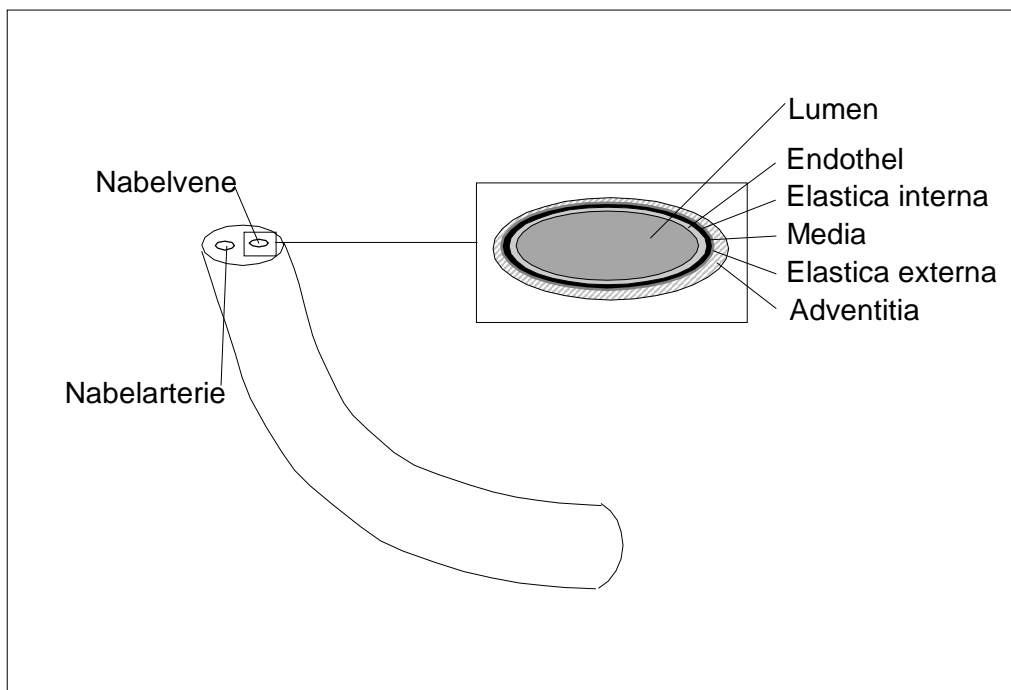


Abb. 11 Schematische Darstellung einer Nabelschnurvene im Querschnitt

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

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

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

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

2.8.2. Zellimmobilisierung an magnetischen und nichtmagnetischen Polymerpartikeln

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

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

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

2.9. Immobilisierung von Cytochrom c-Oxidase an magnetischen Polymerträgern

2.9.1. Reinigung von Cytochrom c

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

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

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

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

2.9.2. Reinigung der Cytochrom c-Oxidase

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

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

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

2.9.3. Enzymimmobilisierung

2.9.3.1. Rohlipidisolierung und Reinigung

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

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

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

- Ninhydrin-Lösung

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

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

- Dragendorff-Reagenz

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

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

- Phosphat-Reagenz

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

2.9.3.2. Lipidierung der Polyacrylamidträger zur Enzymimmobilisierung

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

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

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

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

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

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

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

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

2.9.3.3. Immobilisierung der Cytochrom c-Oxidase am lipidierten Träger

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

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

2.9.3.4. Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Cytochrom c-Oxidase

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

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