



**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences**

**Kryokonservierung von Assay Ready Cells in  
Kleinstvolumina zur Optimierung des Auftauprozesses**

Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

**Niklas Alexander Böhle**



Hamburg

am 02.02.2023

<b>1. Gutachter:</b>	Prof. Dr. Christian Kaiser	HAW Hamburg
<b>2. Gutachter:</b>	Lukas Focke M. Sc.	acCELLerate GmbH

acCELLerate GmbH  
Osterfeldstraße 12-14  
22529 Hamburg

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	IV
Tabellenverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1. Einleitung.....	1
1.1. Forschung am Zellmodell.....	1
1.2. Grundlagen der Zellkultur.....	2
1.2.1. Die Primärkultur .....	2
1.2.2. Die permanente Zellkultur .....	2
1.2.3. Adhärent wachsende Kulturen .....	3
1.2.4. Suspensionskulturen .....	3
1.2.5. Nutzen.....	3
1.3. Kryokonservierung .....	4
1.4. Nutzung von Zellkulturen als „Assay Ready Cells“ .....	7
1.5. Resazurin als Mittel zur Proliferationsbestimmung .....	8
1.6. Verwendete Zelllinien .....	9
1.6.1. Hep-G2 .....	9
1.6.2. Jurkat .....	11
1.6.3. U-2 OS .....	12
1.7. Forschungsbegründung .....	13
1.7.1. Problemstellung und Ansatz.....	13
1.7.2. Ziel .....	14
2. Material und Methoden .....	16
2.1. Material- und Gerätelisten.....	16
2.2. Zellkultur .....	18
2.2.1. Auftauen.....	18
2.2.2. Erhaltung und Expansion .....	19
2.2.3. Ernte und Einfrieren.....	21
2.3. Auftaukontrolle .....	22

2.4. Zellzählung, Probenanalyse.....	23
2.5. Morphologie-Untersuchung.....	24
2.6. Resazurin-basierter Proliferationsassay .....	24
3. Ergebnisse .....	26
3.1. Hep-G2 .....	27
3.2. Jurkat.....	36
3.3. U-2 OS.....	41
4. Diskussion.....	48
4.1. Methodik .....	48
4.2. Hep-G2 .....	49
4.3. Jurkat.....	50
4.4. U-2 OS.....	51
4.5. Linienübergreifende Einordnung.....	52
4.6. Fazit.....	53
5. Literaturverzeichnis.....	VI

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zelle während des Einfrierprozesses bei verschiedenen Kühlraten (Schema).....	5
Abbildung 2: Temperaturverlauf im Einfrierprozess mit auftretender Kristallisationswärme (Schema) .....	7
Abbildung 3: Reduktion von Resazurin zu Resorufin.....	9
Abbildung 4: Hep-G2 Zellen .....	10
Abbildung 5: Jurkat Zellen .....	11
Abbildung 6: U-2 OS Zellen .....	13
Abbildung 7: Exemplarischer Temperaturverlauf des Einfrierprozesses im Einfrierautomaten.....	26
Abbildung 8: Wiederfindungsrate vitaler Hep-G2 Zellen, gemessen mittels CASY TT .....	28
Abbildung 9: Anteil vitaler Hep-G2 Zellen, gemessen mittels CASY TT .....	29
Abbildung 10: Wiederfindungsrate vitaler Hep-G2 Zellen, ermittelt in Zählkammer	30
Abbildung 11: Anteil vitaler Hep-G2 Zellen, ermittelt in Zählkammer .....	31
Abbildung 12: Debrisrate der Hep-G2 Zellen .....	32
Abbildung 13: Wachstumsrate der Hep-G2 Zellen.....	33
Abbildung 14: Hep-G2 Kulturen in Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll.....	34
Abbildung 15: Hep-G2 Kulturen in Auftaukontrolle nach „wash“-Protokoll.....	35
Abbildung 16: Wiederfindungsrate vitaler Jurkat Zellen.....	36
Abbildung 17: Anteil vitaler Jurkat Zellen .....	37
Abbildung 18: Debrisrate der Jurkat Zellen .....	38
Abbildung 19: Wachstumsrate der Jurkat Zellen .....	39
Abbildung 20: Jurkat Kulturen in Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll.....	40
Abbildung 21: Jurkat Kulturen in Auftaukontrolle nach „wash“-Protokoll.....	41
Abbildung 22: Wiederfindungsrate vitaler U-2 OS Zellen .....	42
Abbildung 23: Vitalität der U-2 OS Zellen.....	43
Abbildung 24: Debrisrate der U-2 OS Zellen.....	44
Abbildung 25: Wachstumsrate der U-2 OS Zellen .....	45
Abbildung 26: U-2 OS Kulturen in Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll .....	46
Abbildung 27: U-2 OS Kulturen in Auftaukontrolle nach „wash“-Protokoll.....	47

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendetes Kulturmedium Hep-G2 und sowie zusätzliche Reagenz ...	16
Tabelle 2: Verwendetes Kulturmedium Jurkat.....	16
Tabelle 3: Verwendetes Kulturmedium U-2 OS .....	16
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien .....	16
Tabelle 5: Verwendete Geräte .....	17
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien .....	18
Tabelle 7: Volumina verwendeter Agenzien zur Expansion adhärenter Zellen.....	20

## Abkürzungsverzeichnis

ARC	Assay Ready Cells
c	Zellen ( <i>cells</i> ), als Einheit in Zellkonzentration oder Aussaatdichte
CPA	Kryoprotektive Agentie ( <i>cryoprotective agents</i> )
CRF	Programmierbarer Einfrierautomat ( <i>controlled-rate freezer</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
FBS	Fötales bovines Serum
liN <sub>2</sub>	flüssiger Stickstoff
OS	Osteosarkom

# 1. Einleitung

## 1.1. Forschung am Zellmodell

In vielen Bereichen der Forschung und industrieller Untersuchungen werden in Experimenten Modelle benötigt. Wird ein Modell für einen gesamten menschlichen Organismus benötigt, so wird zumeist auf den Tierversuch zurückgegriffen, da alternative Modelle die Komplexität eines gesamten biologischen Systems nicht vollständig abbilden können. Eine Verwendung des Tiermodells sollte immer unter ethischen Aspekten abgewogen werden. Zusätzlich sind die erlangten Erkenntnisse nur begrenzt auf den Menschen übertragbar sind (Exner und Limbach 2016). Daher besteht ein Bedarf an alternativen und ergänzenden Modellen.

In der Forschung erhöhen sich zudem die Kosten für die Entwicklung eines zugelassenen Medikaments um mehr als das Doppelte pro Dekade (DiMasi et al. 2016). Die durchschnittliche Entwicklungsdauer für zugelassene Arzneimittel beträgt über 13 Jahre. Daher kann die pharmazeutische Industrie durch Patentablauf ihre Produktentwicklung nicht kostendeckend weiterführen, sollte es nicht zu einer deutlichen Erhöhung der zeitlichen Effizienz in Forschung und Entwicklung kommen (Paul et al. 2010).

Da im Durchschnitt 5000 Substanzen zur Entwicklung eines Medikaments überprüft werden, ist es von hoher Bedeutung, so früh wie möglich genaue und belastbare Daten über Pharmakokinetik und Metabolisierung möglicher Kandidaten zu erhalten. Daher haben viele pharmazeutische Unternehmen Versuche zu Pharmakokinetik und Toxizität in der frühen *Screening*-Phase eingeführt. Unter Zeitdruck muss eine Vielzahl möglicher Substanzen geprüft werden, welche aus kombinatorischer Chemie und Hochdurchsatz-*Screening* entspringen. Daher steigt der Bedarf an *in vitro* Assays für qualitative und quantitative Prüfungen der Pharmakokinetik (van Breemen und Li 2005).

Auf Zellkulturen basierenden *in vitro* Tests und Modelle können durch die Vielzahl verfügbarer Zelllinien in fast jeder Fragestellung eingesetzt werden und stellen daher auch einen Ersatz zum Tierversuch dar. Grundlegende Funktionen der Bausteine des Organismus lassen sich in Kultur schneller und effektiver untersuchen, während die Zellkultur eine exakte Kontrolle von Versuchsparametern zulässt. Der Einsatz humaner Zelllinien ermöglicht eine höhere Übertragbarkeit auf den Menschen (Schmitz 2020).

Die Verträglichkeit von Medizinprodukten lässt sich beispielsweise überprüfen, indem nach DIN EN ISO 10993-5 die Zytotoxizität mithilfe von Zellkulturen untersucht wird (DIN EN ISO 10993-5:2009-10). Zur Beurteilung können Zellschäden an der Morphologie der eingesetzten Zellen geprüft werden. Zudem sind Messungen des Wachstums und spezifischer Anteile des Zellstoffwechsels möglich, um schadensbedingte Abweichungen zu erkennen (Kirkpatrick et al. 1998).

## **1.2. Grundlagen der Zellkultur**

### **1.2.1. Die Primärkultur**

Bei der Primärkultur handelt es sich um Zellen, die direkt aus Geweben oder Flüssigkeiten des Spenderorganismus entnommen wurden und unverändert kultiviert werden. Ihre Aktivität sinkt über einen längeren Zeitraum und sie zeigen ab ungefähr 60 Populationsverdopplungen Seneszenz. Durch dieses Abnehmen des Wachstums besitzen sie eine begrenzte Lebensdauer, weshalb sie auch als finite Kulturen bezeichnet werden.

Da sie zwischen Entnahme und Kultivierung keine Veränderung erfahren haben, ist ihr Verhalten *in vitro* in den meisten Eigenschaften ähnlich zu denen *in vivo*. Besonders geeignet sind sie zur Untersuchung zellulärer Antworten und zur Analyse ihrer Genexpressionsprofile. Durch diese Ähnlichkeiten stellen sie eine Art Brücke zwischen *in vivo* Modellen und synthetischen Systemen dar.

Bei der Isolierung einzelner Zellen aus einem Spendergewebe liegt meist ein heterogenes Zellgemisch vor, sodass die Etablierung reiner Primärkulturen mit Aufwand und Schwierigkeiten verbunden ist. Daher sind große Kulturzahlen mit einheitlicher Morphologie aus Primärkulturen schwer realisierbar. Gleichzeitig sind Primärkulturen ein exaktes Abbild des Spenderorganismus, da die Zellen unverändert aus dem Spender kultiviert werden. Daher sind sie besonders für Patientenstudien und die Untersuchung individueller Phänomene geeignet (Schmitz 2020).

### **1.2.2. Die permanente Zellkultur**

Um die Seneszenz der Primärkultur zu umgehen, werden Tumorzellen oder stabil transfizierte Zellen eingesetzt, da diese anspruchsloser und theoretisch unsterblich wachsen. Solche Zelllinien sind durch Kulturbanken verfügbarer und im etablierten Status homogen, wodurch hohe Kulturzahlen und reproduzierbare Ergebnisse möglich sind. Mit den veränderten genetischen Informationen geht auch ein

veränderter Phänotyp einher, sodass wenige *in vivo* Eigenschaften verbleiben, vor allem im Bereich von Wachstumsregulation, Zyklusarrest und Seneszenz. Diese Veränderungen sind in Anbetracht des Vorteils dieser Kulturen natürlich zum Teil auch gewünscht. Aufgrund der Herkunft dieser Zelllinien aus Tumoren oder transformierten Zellen kommt es außerdem zu veränderter Genexpression und Morphologie bis hin zu Chromosomenveränderungen und anormaler Chromosomenanzahl (Schmitz 2020).

### **1.2.3. Adhärenz wachsende Kulturen**

Das Ursprungs-Gewebe der Zelllinie bestimmt, ob diese in Kultur adhärenz oder in Suspension wächst (Schmitz 2020). Haften Zellen auf einer Oberfläche an (Adhäsion) und wachsen auf diesem Substrat, wird der Begriff der adhärenz Zellen verwendet. Dabei sind die meisten dieser Linien für Wachstum und Vermehrung unbedingt auf das Anheften angewiesen (engl. *anchorage-dependent*) (Gstraunthaler und Lindl 2021).

Die Kultur formt eine einlagige Zellschicht, den *monolayer*, oder bei dreidimensionalem Wachstum *multilayer* oder Sphäroide. Zum Ernten oder Passagieren muss die Adhäsion aufgebrochen und die Zellen gezielt abgelöst werden. Adhärenz Zelllinien stammen generell aus soliden Organen und *in vivo* unbeweglichen Geweben und zeigen zelldichteabhängige Proliferationshemmung. Ausgenommen sind hier allerdings tumorartige Zelllinien (s. Kap. 1.2.2. Die permanente Zellkultur) (Schmitz 2020).

### **1.2.4. Suspensionskulturen**

Zellen in Suspensionskulturen sind nicht an einem Substrat adhärenz, sondern wachsen in Suspension als Einzelzellen oder Zellklümpchen. Dabei tritt keine Kontaktinhibition auf. Suspensionskulturen entstammen generell Zellen, die *in vivo* frei zirkulieren. Im Blut vorkommende Zelltypen wie Lymphozyten wachsen beispielsweise in Suspension (Schmitz 2020).

### **1.2.5. Nutzen**

Vorteilhaft bei Zellkulturen im Allgemeinen ist, dass die Einflussfaktoren gut kontrollierbar und standardisierbar sind, unter anderem die Temperatur und Nährstoffzufuhr. Sie zeigen innerhalb einer Kultur eine einheitliche Morphologie und sind platzsparender als Tiermodelle in vergleichbarer Stückzahl. Auch sind sie durch kürzere Anwachsdauer, schnellere Generationsfolgen und kleinere



Stoffwechselwege zeitsparender und damit kostengünstiger als Tiermodelle. Mit ihnen lassen sich intrazelluläre Eigenschaften und Abläufe, Signalwege, interzelluläre Wechselwirkung, toxikologische Reaktionen und Mechanismen zellulärer Infektionen, unter anderem durch Viren, nachweisen. Zellkulturen sind jedoch ungeeignet zur Darstellung eines gesamten Organismus mit Regulationsmechanismen zwischen unterschiedlichen Geweben und Organen. Auch die Klärung der Funktion und Regulation von Genen bei Krankheiten sowie auch immunologische Fragen über komplexe Immunreaktionen sind mit klassischen Zellkulturen nicht möglich (Schmitz 2020).

### **1.3. Kryokonservierung**

Seit der Entdeckung der kryoprotektiven Eigenschaften von Glycerol im Jahr 1949 ist die Möglichkeit, Zellen in einem potenziell vitalen Zustand gefroren zu konservieren, immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus gerückt (Amann und Pickett 1987). Anstelle eine Zelllinie in kontinuierlicher Kultur zu erhalten, ergeben sich viele Vorteile daraus, Zellen zu konservieren und nur bei Bedarf in Kultur zu nehmen.

Während der Lagerung im gefrorenen Zustand sind keine Zellschäden zu befürchten. Diese Sicherheit ist im Überschreiten der Temperaturdifferenz beim Einfrieren und Auftauen nicht gegeben. Besonders das Einfrieren ist nicht als einzelner Prozess, sondern als Kombination mehrerer physikalischer und chemischer Vorkommnisse zu betrachten. Für eine erfolgreiche Kryokonservierung müssen die potenziellen Schäden jedes Phänomens auf die Zellkultur minimal gehalten werden (Mazur 1984, 1985).

Wird eine wässrige Lösung im Allgemeinen unter den Gefrierpunkt gekühlt, so setzt das Gefrieren nicht sofort und schlagartig ein. Fehlen Kristallisationskeime für das Ausbilden von Eis, verbleibt die Lösung flüssig und unterkühlt. Durch gelöste Salze und andere Substanzen besitzt vor der Konservierung einer Zellsuspension sowohl das intrazelluläre Zytosol als auch das extrazelluläre Medium einen Gefrierpunkt unter 0°C. Wird während des Einfrierprozesses die Zelllösung unter diesen Gefrierpunkt gebracht, beginnt die Kristallisation extrazellulär. Die Zellmembran und eine höhere intrazelluläre Salzkonzentration hindern das Wachstum von Eiskristallen in die Zelle und das Zytosol wird unterkühlt. Da Eiskristalle gelöste Stoffe ausschließen, werden diese im verbleibenden Medium aufkonzentriert. Dazu zählen unter anderem Salze. Durch die entstehende osmotische Differenz verlieren die Zellen Wasser und schrumpfen, wodurch auch das Zytosol aufkonzentriert wird.

Durch diese Aufkonzentrierung werden die Gefrierpunkte des verbleibenden Mediums und Zytosols gesenkt und ein Gleichgewicht zwischen Kristallisation und Aufkonzentrierung tritt ein (Mazur 1963, 1984).

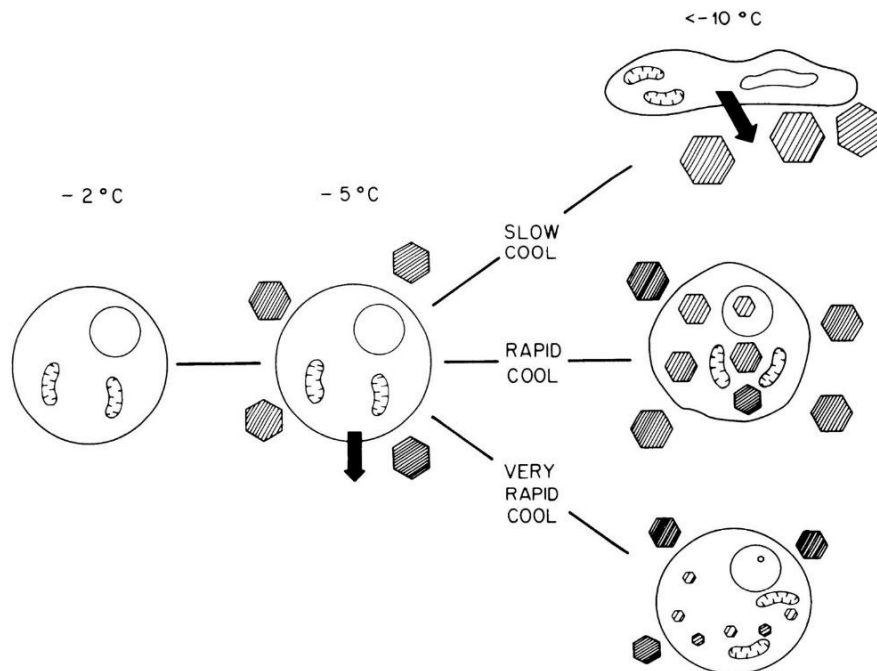


Abbildung 1: Zelle während des Einfrierprozesses bei verschiedenen Kühlraten (Schema)

Diese schematische Darstellung zeigt die Auswirkungen verschiedener Abkühlraten auf Zellen während des Einfrierprozesses. Zunächst wird der Gefrierpunkt von Zytosol und Medium unterschritten und diese Lösungen unterkühlt. Im nächsten Schritt beginnt die Kristallisation extrazellulär. Die Zellmembran und höhere intrazelluläre Salzkonzentration hindern das Wachstum von Kristallen in die Zelle und das Zytosol wird unterkühlt. Durch extrazelluläre Konzentrationsänderung dehydriert die Zelle. Bei einer geringen Abkühlrate führt die Aufkonzentrierung des flüssig verbleibenden Mediums zu weiterer Dehydrierung und zur Aufkonzentrierung des Zytosols. Die Zelle schrumpft, gefriert durch den geringeren Gefrierpunkt nicht, bis Vitrifikation eintritt. Dieser Vorgang wird als schonend für die Zellen eingestuft. Bei höheren Abkühlraten geschieht der Ausfluss der Zelle nicht schnell genug. Eine Aufkonzentrierung des Zytosols bleibt aus und intrazelluläre Kristalle entstehen mit schadhaftem Effekt für die Zelle. (Die durch sehr hohe Raten entstehenden Mikrokristalle sind zwar weniger schädlich, ihr Auftreten bringt jedoch hier nicht erwähnte Komplikationen mit sich.) (Mazur 1984)

Ist die Abkühlungsrate gering genug, um in diesem Vorgang den benötigten Ausfluss des Zytosols zu gewährleisten, so wird intrazelluläre Kristallisation vermieden und die geschrumpften Zellen finden sich in verbleibenden Flüssigkeitskanälen zwischen den Eiskristallen ein. Sind diese zu schmal, kann es zu Beschädigungen durch extrazelluläre Kristalle kommen, wobei von Mazur (1985) ein ungefrorener Anteil von 15% als vorteilhaft beschrieben wird. Im niedrigsten Temperaturbereich sind durch Vitrifikation keine Zellschäden zu erwarten. Als Vitrifikation versteht man den Übergang in einen glasähnlichen Zustand, in dem das Wasser durch eine hohe Viskosität verfestigt, jedoch kein Kristallgitter ausgebildet wird. Bei zu hohen Abkühlungsraten können Zellen nicht schnell genug schrumpfen und unterkühlen daher, bis intrazelluläres Eis entsteht und zu erheblichen

Zellschäden führt (Abbildung 1). Gleichzeitig sollte die Rate so nur gering wie nötig sein, um die Zellen möglichst kurz den potenziell schadhafte Bedingungen extremer Kälte, Deformation und Toxizität der stark konzentrierten gelösten Substanzen auszusetzen, Bereits 1963 wurden niedrige Abkühlungsrate bei 1 °C/min etabliert und werden noch heute in der Praxis benutzt. Das Optimum variiert hier jedoch für jede Zelllinie (Mazur 1963, 1984, 1985; Acker und McGann 2003; Brockbank et al. 2007).

Zur Kryokonservierung können kryoprotektive Agentien (CPAs) eingesetzt werden, um Zellschäden während des Einfrier- und Auftauprozesses zu vermeiden. CPAs werden dazu gelöst in der Zellsuspension eingesetzt und erhöhen den ungefrorenen Anteil des Mediums. Gleichzeitig senken sie die Salzkonzentration und damit die entstehende Konzentrationstoxizität. Durch beide Effekte wird die Dehydrierung der Zellen verringert. Penetrierende CPAs dringen in die Zellen ein; auch die intrazelluläre Eisbildung kann verringert werden. Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) ist als penetrierendes CPA verbreitet und etabliert und findet auch bei der acCELLerate GmbH Verwendung (Mazur 1984; Brockbank et al. 2007; Best 2015; Rajan und Matsumura 2018).

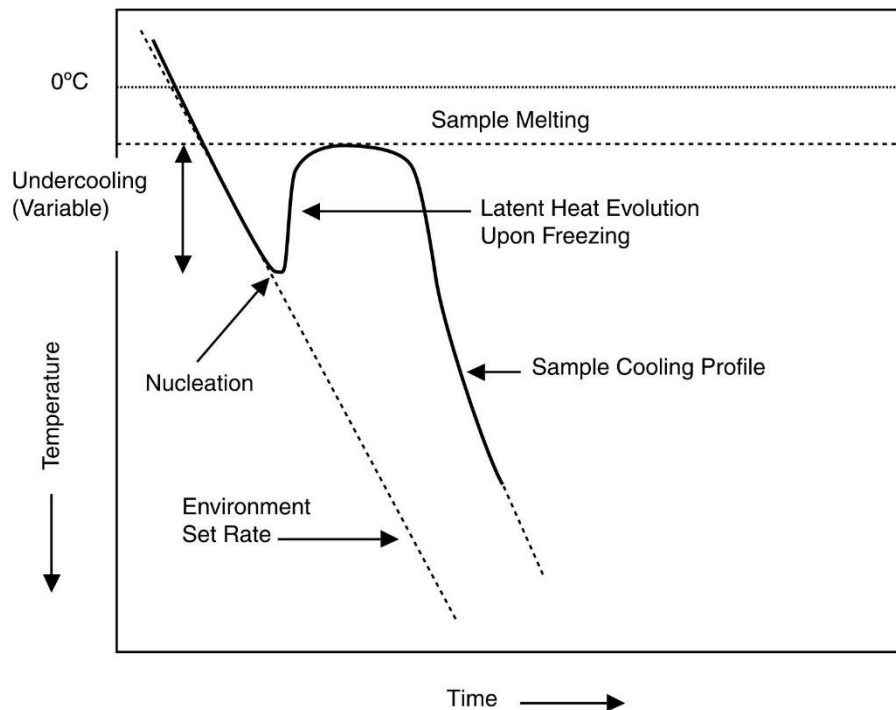


Abbildung 2: Temperaturverlauf im Einfrierprozess mit auftretender Kristallisationswärme (Schema)

Das Temperatur-Zeit-Diagramm zeigt die theoretische Gerade einer konstant sinkenden Kammertemperatur im Einfriergerät (gestrichelt). Die schwarze Temperaturkurve zeigt schematisch den Verlauf in einer Beispielsuspension. Die Lösung wird unter  $0^{\circ}\text{C}$  gekühlt und unterkühlt auch unter ihren Gefrierpunkt hinweg. Bei einsetzender Kristallisation wird Wärme an die Lösung abgegeben und die Temperatur steigt sprunghaft bis zum Gefrierpunkt an. Durch das kurzzeitige Gleichgewicht zwischen Kristallisation, Wärmeabgabe und dem Abkühlen der Kammer bleibt diese Temperatur konstant, bis bei dieser keine Kristallisation mehr stattfindet. Die Probe nähert sich der Umgebungstemperatur und die Kurve passt sich der Parallelen der Umgebungsrate an (Brockbank et al. 2007).

Bilden sich Eiskristalle in wässriger Lösung, wird durch den exothermen Prozess Kristallisationswärme frei und die verbleibende Lösung wärmt sich, Unterkühlung ausgleichend, bis zum eigentlichen Gefrierpunkt auf (Abbildung 2). Um einen unkontrollierten Temperatursprung im Einfrierprozess zu vermeiden, muss die entstehende Wärme abgeführt werden. Eine gleichmäßige Temperaturverteilung und Abkühlrate können andernfalls nicht garantiert werden und zellschädigende Effekte sind nicht auszuschließen. Zur Etablierung einer konstanten Temperaturrate wird zur Kryokonservierung ein *controlled-rate freezer* (CRF) eingesetzt, sodass der entstehenden Wärme entgegensteuert werden und ein möglichst linearer Temperaturverlauf erreicht werden kann (Brockbank et al. 2007).

#### 1.4. Nutzung von Zellkulturen als „Assay Ready Cells“

Die acCELLerate GmbH produziert Kulturen immortaler Linien tierischer und humaner Zellen. Diese werden im kryokonservierten Zustand gelagert und zum Endverbraucher versandt. Die Lagerung in der Gasphase über flüssigem Stickstoff

( $liN_2$ ) sorgt für eine theoretisch endlose Haltbarkeit der Zellen, da Diffusion unterbunden wird und die thermische Energie für chemische Reaktionen fehlt (Mazur 1984). Die hauseigene Qualitätskontrolle sowie Untersuchungen externer Labore sichern die hohen Qualitätsstandards der Produkte. An die Kulturen besteht der Anspruch, als „Assay Ready Cells“ (ARC) beim Kunden direkt nach dem Auftauen in Assays Verwendung zu finden.

Der Verbraucher kann daher die Zellen wie jedes andere Assay-Reagenz behandeln und durch die Entkopplung von Kultivierung und Experimenten mehr Flexibilität erlangen. Werden Zellen aus einer kontinuierlich gehaltenen Kultur in einem Versuch durch ARC aus einem gleichbleibenden Batch ersetzt, sind viele Vorteile erkennbar. Die Kryozellen sind konsistenter, da Passageneffekte wegfallen. Aufgrund von Passagen- und Seneszenzeffekten kann eine Erhaltungskultur nur über einen begrenzten Zeitraum als konstant betrachtet werden (Zaman et al. 2007). Auch das Risiko von Mutationen, dem *genetic drift*, besteht in der Erhaltung (Gstraunthaler und Lindl 2021). Dasselbe Batch eingefrorener Zellen hingegen kann in einem Versuchsaufbau deutlich länger verwendet werden. Somit ist die Reproduzierbarkeit innerhalb des gleichen Batches hoch. ARC-basierte Untersuchungen lassen sich zudem einfacher implementieren und testen als Versuche mit eigener Zellkultur, welche zusätzlich parallel unterhalten werden muss. Zudem fallen durch diese Auslagerung Aufwand und Kosten der Kultivierung, Konservierung sowie der Qualitätskontrolle weg. Insgesamt ist die Nutzung von ARC somit risikoärmer und erspart Zeit und Ressourcen (Cawkill und Eaglestone 2007, Zaman et al. 2007).

### **1.5. Resazurin als Mittel zur Proliferationsbestimmung**

Der Farbstoff Resazurin und das Derivat Resorufin wurden von P. Weselsky bereits 1871 entdeckt (Weselsky 1872; Nietzki et al. 1889). Der Farbwechsel vom blauen Resazurin zum durch Reduktionsreaktion entstehenden pinken Resorufin wurde als erstes 1929 durch Pesch and Simmert eingesetzt, um den Bakteriengehalt von Milch abzuschätzen. Die Reduktion wird durch mikrobielle Aktivität verursacht (Abbildung 3) und wurde daher vermehrt als Indikator für diese in der Milchanalytik genutzt (Twigg 1945; McKenzie 1962).

Resazurin wird auch in Säugerzellen metabolisiert, wobei ein direkter Zusammenhang zwischen der Umsetzung und der Anzahl und Proliferation von Zellen besteht. Daher wird Resazurin in Assays zur Ermittlung der Zellvitalität sowie zytotoxischer Effekte zugesetzter Testsubstanzen eingesetzt. Resazurin zeichnet

sich im Vergleich zu anderen Indikatoren durch geringe Zytotoxizität und Kosten aus. Resazurin-basierte Assays werden als schneller und simpler angesehen (Csepregi et al. 2018).

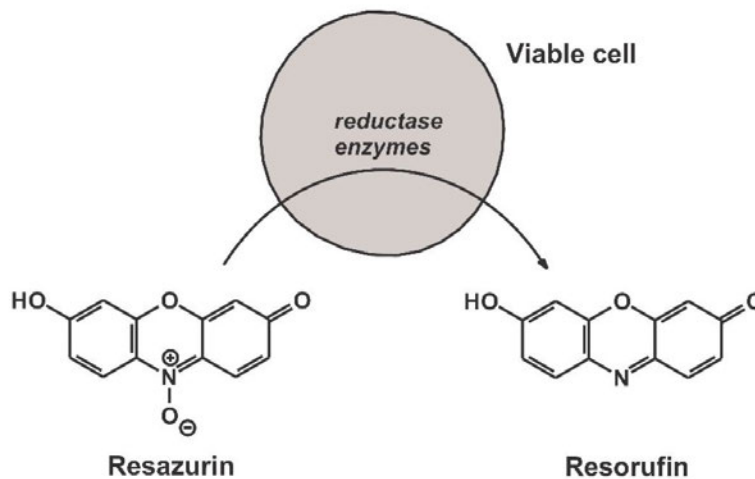


Abbildung 3: Reduktion von Resazurin zu Resorufin

Resazurin weist eine blaue Farbe und eine schwache Fluoreszenz auf. Im Metabolismus vitaler Zellen wird durch Enzyme Resazurin zu Resorufin reduziert. Das pinke Resorufin zeigt eine starke Fluoreszenz. Bei Anregung im Absorptionsmaximum von 570 nm entsteht ein breites Emissionsband um ein Maximum bei 585 nm. (Bild: Csepregi et al. 2018)

Während Resazurin lediglich eine schwach fluoreszierende Eigenschaft besitzt, zeigt Resorufin bei Anregung im Absorptionsmaximum von 570 nm ein breites Emissionsband um ein Maximum bei 585 nm (Bueno et al. 2002). Es ist nicht eindeutig geklärt, an welchem Kompartiment der Zelle die Reduktionsration katalysiert wird. Vermutungen deuten auf mehrere Redox-Enzyme der Mitochondrien, Mikrosomen und dem Zytosol hin (Chen et al. 2018).

## 1.6. Verwendete Zelllinien

Für diese Arbeit wurden repräsentativ für das Spektrum der verfügbaren Zellen der acCELLerate GmbH die folgenden Linien verwendet.

### 1.6.1. Hep-G2

Ein Leberkarzinom wurde 1975 einem 15-jährigem Jungen in Argentinien entnommen. Der Tumor wurde als differenziertes hepatozelluläres Karzinom mit bälckchenartigem Muster beschrieben. Die Zellen in der Biopsie waren epithelförmig und mit den Parenchymalzellen der Leber übereinstimmend. Aus diesen Zellen wurde die Linie Hep-G2 etabliert (Abbildung 4)(Aden et al. 1979). Im Gegensatz zu

anderen Linien aus Leberkrebstumoren besitzt diese keine integrierte DNA des Hepatitis B Virus (Chen et al. 1993).

Mögliche Nutzen dieser Linie wurden im dazugehörigen Patent mit Versuchen zum Metabolismus von Wirkstoffen, Screenings potenzieller Karzinogene und Mutagene, Kultivierung von Viren und Herstellung von Vaccinen genannt. Da die Linie in der Lage ist, zugegebene Verbindungen zu verstoffwechseln, kann sie zur metabolischen Aktivierung von Karzinogenen in Assays mit anderen Zellen verwendet werden (Knowles und Aden 1980).

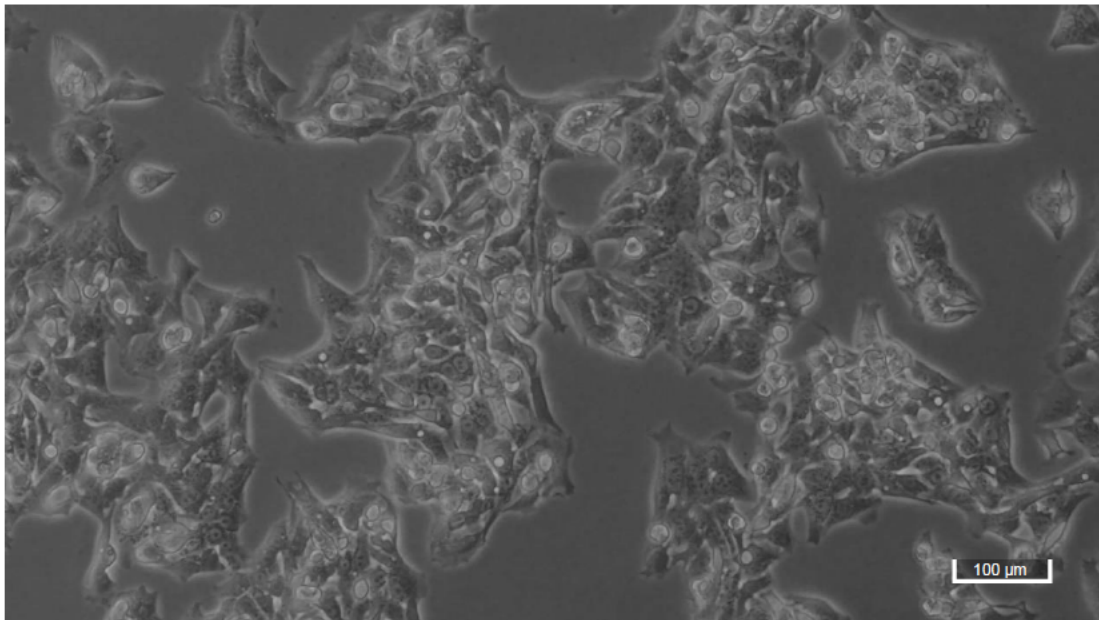


Abbildung 4: Hep-G2 Zellen

Die Abbildung zeigt Hep-G2 Zellen in Kultur innerhalb einer T-Flasche. Diese phasenkontrastmikroskopische Aufnahme wurde mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Originalbild bearbeitet. (Bild: Böhle N.)

Die Linie erhält die Fähigkeit der Leber, eine Vielzahl verschiedener Enzyme zu exprimieren und ist so zur Umwandlung körperfremder Substanzen fähig. Die Zellen können Fremdstoffe aktivieren oder entgiften und damit den Metabolismus im Körper besser abbilden als andere, metabolisch passive Linien. Durch die eigenständige Expression antioxidantischer und Fremdstoff-metabolisierender Enzyme sind die Zellen nützlich als Indikatoren von Agentien mit geno- oder cytotoxischen, cytoprotektiven, anti- oder cogenotoxischen Eigenschaften. Daher ist die Linie geeignet für die Risiko- und Gefahrenstoffbeurteilung. Zusätzlich wird Hep-G2 zur Erforschung von Lebererkrankungen, Genexpression und -transkription und Wirkungsmechanismen von Arzneimitteln eingesetzt (Mersch-Sundermann et al. 2004).



Die Histologie der Linie ist seit ihrer Etablierung umstritten und sie wird in der Literatur größtenteils als hepatozelluläres Karzinom und selten als Hepatoblastom bezeichnet. Es sind inzwischen ausreichend eindeutige Nachweise vorhanden, dass es sich bei Hep-G2 um Zellen aus einem Hepatoblastom handelt, nicht aus einem hepatozellulärem Karzinom (López-Terrada et al. 2009).

### 1.6.2. Jurkat

Die Zelllinie Jurkat, anfangs auch „JM“ genannt, wurde vor 1975 am Institut für Klinische Virologie und der Kinderklinik der Universität Erlangen-Nürnberg etabliert. Spender war ein 14-jähriger Junge, welcher unter akuter lymphoblastischer Leukämie litt und sich im ersten Rezidiv befand. Die Lymphoblasten des peripheren Bluts bilden T-Zell-Marker aus und zeigen Charakteristika von T-Zellen und passende Rezeptoren. In Kultur wachsen sie wie die meisten Blutzellen in Suspension (Abbildung 5)(Schwenk und Schneider 1975, Schneider et al. 1977, ATCC). Spuren einer Infektion des onkogenen Epstein-Barr-Virus konnten nicht nachgewiesen werden (Schneider et al. 1977). Parallel kultivierte Klone weisen durch starke Unterschiede auf eine genetische Instabilität hin, sodass eine Jurkat-Kultur als heterogene Population anzusehen ist (Snow und Judd 1987).

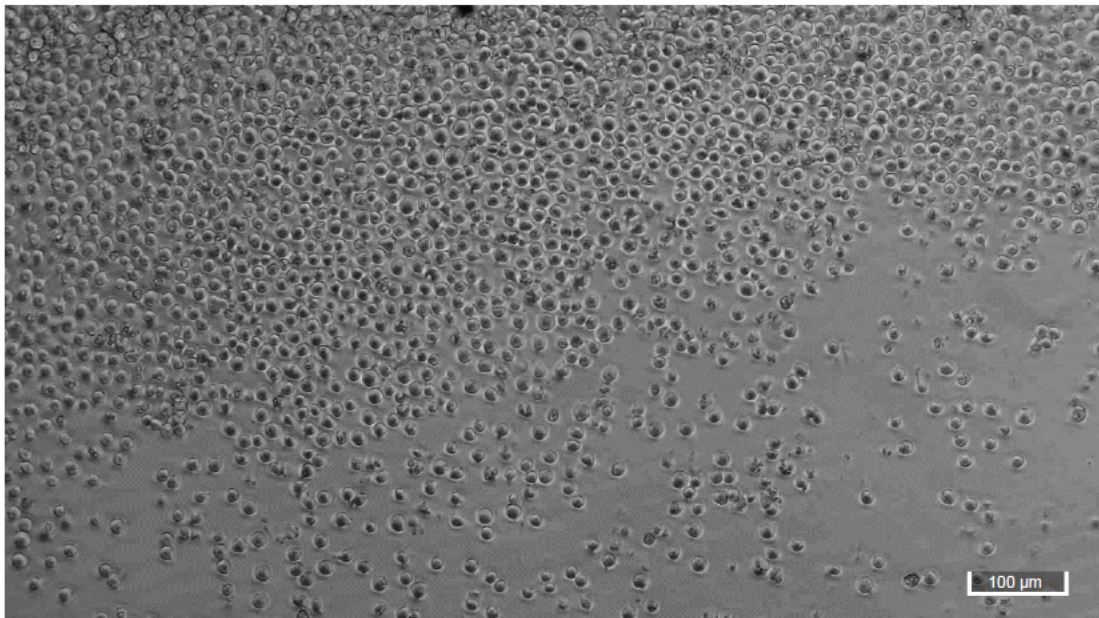


Abbildung 5: Jurkat Zellen

Die Abbildung zeigt Jurkat Zellen zwei Tage nach der Aussaat in einer 24-well Plate. In gesunder Kultur liegen die Zellen vereinzelt in Suspension vor. Diese phasenkontrastmikroskopische Aufnahme wurde mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Originalbild bearbeitet. (Bild: Böhle N.)

Zellen der Jurkat-Linie besitzen die Fähigkeit, unter Anregung signifikante Mengen des T-Zellen-Wachstumsfaktor Interleukin-2 zu produzieren (Gillis und Watson



1980). Die Zellen lassen sich mit dem HI-Virus infizieren und werden daher in der AIDS-Forschung eingesetzt (Majka et al. 2000). Des Weiteren findet die Linie in Antigenversuchen und in der Ursachenforschung von Leukämien Verwendung (Kaplan und Peterson 1976, Kamihira et al. 2009).

Die Jurkat-Linie und ihre Klone wurden zur Erforschung der Signalkette der T-Zell-Rezeptoren eingesetzt. Da die Linien in den 80er- und 90er Jahren zu etlichen Erkenntnissen über die Signalkaskade führten, werden sie als verbreitetste und historisch signifikanteste Linie in diesem Gebiet bezeichnet. Wie die meisten transformierten Linien weicht auch Jurkat an wichtigen Stellen vom eigentlichen *in vivo* Verhalten unveränderten Zellen ab (s. Kap. 1.2.2. Die permanente Zellkultur). Die Unfähigkeit zur Expression einiger Proteine mit Einfluss auf Signalwege bewirkt einen reduzierten Einsatz in der Forschung seit 2000. Als etablierte Linie bleibt sie jedoch eine günstigere und verfügbarere Alternative gegenüber aufwendigeren Modellen (Abraham und Weiss 2004).

### **1.6.3. U-2 OS**

Ein moderat differenziertes osteogenes Sarkom im Schienbein wurde einer 15 Jahre alten Patientin entnommen. Ein intraossärer Teil des Tumors wurde im September 1964 in Kultur gebracht. Die daraus resultierte Linie U-2 OS ist damit eine der ältesten etablierten Krebslinien. Der entnommene Tumor wurde als mesenchymal zugeordnet. Die pleomorphen, adhärent wachsenden Zellen wurden als Pflasterstein-ähnlich und epithelisch beschrieben. Die Form der Zellen wurde polygonal, dreiecksförmig bis etwas länglich oder Spindel-förmig bezeichnet (Abbildung 6)(Pontén und Saksela 1967, Pautke et al. 2004). Wie bei Krebslinien häufig sind die Zellen chromosomal und im Wachstum entartet, sie zeigen weder Kontakthemmung noch Zyklusarrest mit morphologischen Veränderungen (s. Kap. 1.2.2.). Es wurden keine Viren in den Zellen nachgewiesen (Pontén und Saksela 1967).

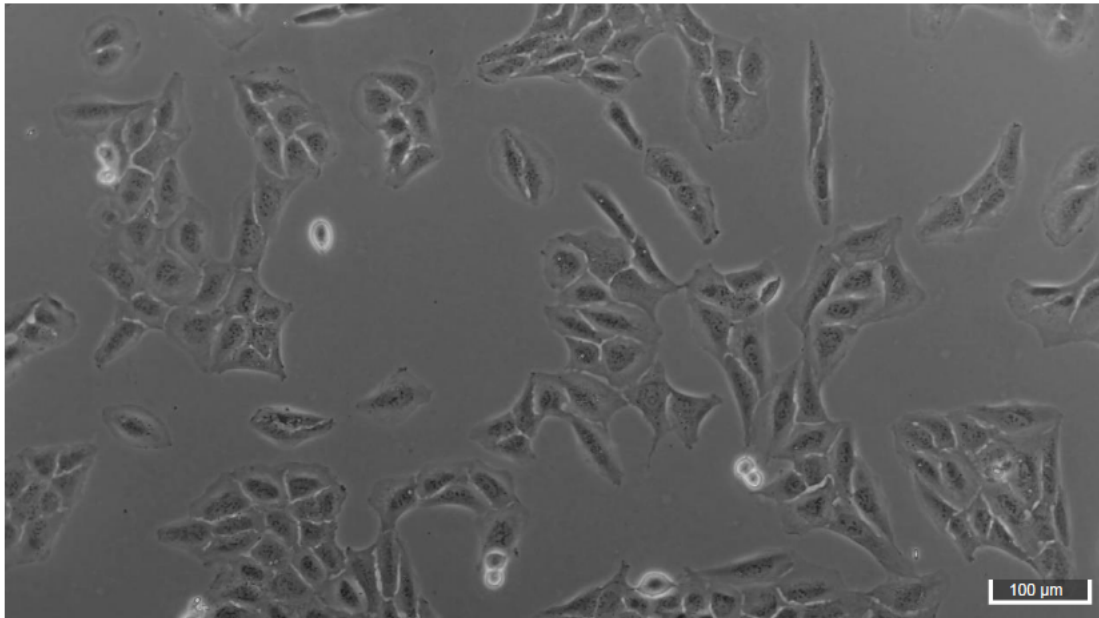


Abbildung 6: U-2 OS Zellen

Die Abbildung zeigt U-2 OS Zellen zwei Tage nach der Aussaat in einer 24-well Plate. Die adhärennten Zellen zeigen wenig Kontrast, da sie flach wachsen. In der Aufnahme ist die polygonale bis spindelförmige Silhouette der Zellen zu erkennen. Diese phasenkontrastmikroskopische Aufnahme wurde mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Originalbild bearbeitet. (Bild: Böhle N.)

Zwar weisen Zellen dieser Linie einige osteoblastische Eigenschaften auf, jedoch auch abnormale durch ihren mutierten Ursprung. Es können auf den Zellen fast keine osteoblastischen Marker nachgewiesen werden, daneben sind aber Kollagenmarker auffindbar, welche für Knorpelgewebe typisch sind. Diese treten nicht bei reifen Osteoblasten auf, sondern nur in frühen Differenzierungsstadien. Daher werden diese Zellen nicht nur als Osteoblasten, sondern auch als Fibroblasten eingeordnet (Pautke et al. 2004).

## 1.7. Forschungsbegründung

### 1.7.1. Problemstellung und Ansatz

Dimethylsulfoxid (DMSO) wird als penetrierendes CPA genutzt. Es zeigt in den zur Kryokonservierung üblichen Konzentrationen von 5 % - 10 % (v/v) über längere Zeiträume cytotoxische Eigenschaften und wird daher als Teil des Kulturmediums von Zelllinien vermieden (Stacey 2004, Rajan und Matsumura 2018). Stattdessen wird dem Gefriermedium möglichst kurz vor dem Einfrieren DMSO zugesetzt. Um eventuelle zellschädigende Effekte dieses und anderer Bestandteile des Gefriermediums in nachfolgender Kultur zu vermeiden, ist nach dem Auftauen das „Waschen“ der Zellen, also ein Medienwechsel, üblich. Dazu wird die Zellsuspension zentrifugiert, das abzutrennende Medium als Überstand

abgenommen und das Zellpellet im gewünschten, DMSO freien Medium resuspendiert.

Gleichzeitig erweisen sich einige Zelllinien in Kultur als sehr empfindlich, besonders im vulnerablen Zustand direkt nach dem Auftauen. Daher kann es von Vorteil sein, die Zellen nicht durch einen Waschschritt dem Stress der Zentrifugation und dem damit verbundenen erhöhten Handling auszusetzen („no wash“-Protokoll). Durch eine starke Reduzierung des Volumens der Zellsuspension im *cryovial* wäre das Tauen und die Aufnahme in Kulturmedium durch einfaches Zugeben von warmem Medium auf die gefrorene Zellsuspension realisierbar. Die Kleinstvolumina an Kryomedium würden eine insignifikant geringe Konzentration an DMSO im Kulturmedium bewirken. Zusätzlich wäre das Handling im Auftauprozess stark vereinfacht und der korrespondierende Stress auf die Zellen reduziert. Daher ist ein Einfrieren dieser Kleinstvolumina zu überprüfen. Aufgrund der etablierten Strukturen im Unternehmen wird die geringste Abweichung vom etablierten Prozess angestrebt.

### **1.7.2. Ziel**

Diese Arbeit untersucht die Machbarkeit der Kryokonservierung in Kleinstvolumina. Als niedrigschwellige Methodik sollen die in der acCELLerate GmbH vorhandenen Materialien und Geräte für den etablierten Gefrierprozess übernommen werden. Diese etablierten Methoden des Einfrierprozesses bilden die Basis des verwendeten Ansatzes. Um eine Ermittlung der Machbarkeit eines adaptierten Gefrierprozesses für Kleinstvolumina durchzuführen, werden folgende Forschungsziele verfolgt:

Betrachtung der Folgen des angepassten Einfrierprozess der acCELLerate GmbH auf Kleinstvolumina von in Suspensionen befindlichen Zellen der Linien Hep-G2, Jurkat und U-2 OS.

Bewertung und Einordnung der Machbarkeit des verwendeten Einfrierprotokolls sowie der Auswirkungen auf den Auftauprozesses.

Zur Erfüllung dieser Forschungsziele werden in dieser Versuchsreihe drei Zelllinien in Kultur genommen und zur Ernte kultiviert. Bei den Ernten werden Suspensionen mit Zellkonzentrationen zwischen  $5E+6$  Zellen/ml und  $5E+7$  Zellen/ml angesetzt und in Kleinstvolumina zwischen 20  $\mu$ l und 400  $\mu$ l abgefüllt und kryokonserviert. Die

verwendeten Zelllinien sind U-2 OS, Hep-G2 und Jurkat (s. Kap. 1.6. Verwendete Zelllinien). Dabei sind die Hep-G2 Zellen als eine erfahrungsgemäß empfindlichere Linie ein Anzeiger für einen schadensarmen Prozess. U-2 OS hingegen ist als robust einzuschätzen. Jurkat wird beispielhaft als Suspensionslinie gewählt.

Aus den so konservierten Batches werden Auftaukontrollen durchgeführt. Das Auftauprotokoll ohne Waschritt wird dabei einem Protokoll mit Medienwechsel durch Zentrifugation gegenübergestellt. Anschließend werden Zellzählungen an den resultierenden Zellsuspensionen durchgeführt. Zu dieser Auftaukontrolle gehört zusätzlich die Betrachtung der Morphologie der Zellen in Kultur über zwei Tage, sowie ein Resazurin-basierter Proliferationsassay (s. Kap. 1.5. Resazurin als Mittel zur Proliferationsbestimmung). Anhand der resultierenden Parameter wird die Qualität der Zellsuspension beurteilt. Diese ergibt sich u.a. aus der Vitalität der Zellen und eventueller Zellschädigungen oder Zellverluste.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material- und Gerätelisten

Die verwendeten Zelllinien Hep-G2, Jurkat und U-2 OS wurden aus je einem *cryovial* aus unternehmenseigenen Beständen in Kultur genommen.

Tabelle 1: Verwendetes Kulturmedium Hep-G2 und sowie zusätzliche Reagenz

<b>Grundmedium</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>	
HAM's F12	PAN-Biotech	P04-14550	
<b>Zusätze</b>			<b>Konzentration</b>
FBS Std. hi.	PAN-Biotech	P30-193306	20 %
L-Glutamine	PAN-Biotech	P04-80100	2 mM
<b>Zusätzliche Reagenz</b>			
Accumax	Sigma-Aldrich	A7089-500ml	

Tabelle 2: Verwendetes Kulturmedium Jurkat

<b>Grundmedium</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>	
RPMI1640	SIGMA	R0883-500ml	
<b>Zusätze</b>			<b>Konzentration</b>
FBS Std. hi.	PAN-Biotech	P30-193306	10 %
L-Glutamine	PAN-Biotech	P04-80100	2 mM

Tabelle 3: Verwendetes Kulturmedium U-2 OS

<b>Grundmedium</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>	
DMEM/F12 w/Hepes	PAN-Biotech	P04-41550	
<b>Zusätze</b>			<b>Konzentration</b>
FBS Std. hi.	PAN-Biotech	P30-193306	5 %
L-Glutamine	PAN-Biotech	P04-80100	2 mM

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>
Trypanblau	Sigma-Aldrich	T8154-100ML
DPBS	PAN-Biotech	P04-36500
Accutase	Sigma-Aldrich	A6964-100ML
DMSO	Sigma-Aldrich	D4540-100ML
Cryomedium NFMG2	acCELLerate	intern
Resazurin gelöst in DPBS	Sigma-Aldrich	R7017-5G
TrypLE Express	Gibco	12604013
CASYton	OMNI Life Science	5651808

Tabelle 5: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Wasserbad	1008	GFL
	1003	GFL
Sicherheitswerkbank	Herasafe HS15	Heraeus
	Herasafe HS18	Heraeus
	MSC-Advantage 1.2	Thermo Scientific
	MSC-Advantage 1.8	Thermo Scientific
Absaugpumpe	Vacusaft	Integra
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2	Integra
Zentrifuge	SL 8	Thermo Scientific
	Megafuge 40	Thermo Scientific
	Megafuge 40R	Thermo Scientific
	S28 centrifuge	Thermo Scientific
Programmierbarer Einfrierautomat/ CRF	Cryomed Typ 7455	Thermo Scientific
Stickstoff-Zelltank	CBS V3000-AB	Custom BioGenic Systems
Zellzählgerät	CASY TT	Roche Innovatis AG
Heamocytometer/ Zählkammer	Neubauer improved	Hecht Assistent
Pipetten 10 µl bis 1000 µl	Eppendorf Research Plus	Eppendorf
Pipetten 100 µl bis 1000 µl	Eppendorf Reference	Eppendorf
Multipette	E3	Eppendorf
Mehrkanalpipetten	XPlorer Multipette	Eppendorf
Reach-in CO <sub>2</sub> -Inkubator	Kendro Heracell 150	Heraeus
Mikroskop	DM IL	Leica
Mikroskop	Axiovert 25 CFL	Zeiss
Mikroskop Kamera	Microcam 1.3MO	Bresser
Spektralphotometer/ Mikroplattenreader	Safire 2	Tecan

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller
Zellkulturgefäße	Cellstack 5 chamber	Corning
	T-Flaschen T175 Standard,	Sarstedt
	T175 Suspension	
	Zellkulturplatte 96 <i>wells</i> , Cell+	Sarstedt
	Zellkulturplatte, 24 <i>wells</i> ,	Sarstedt
	Standard	
Zellkulturplatte, 24 <i>wells</i> ,	Suspension	Sarstedt
Serologische Pipetten	1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sarstedt
Pipettenspitzen	0,1-20 µl, 2-100 µl, 2-200 µl, 1000 µl	Sarstedt
Aspirette	2 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt
Reagiergefäße	1,5 ml, 2 ml	Sarstedt
<i>cryovials</i>	1,8 ml	Nunc, Thermo Scientific
Zentrifugenbecher	500 ml	Corning

## 2.2. Zellkultur

### 2.2.1. Auftauen

Das *cryovial* wird nach der Entnahme aus dem Stickstofftank und in einem Schwimmer 3 min im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Das *vial* wird anschließend, wie alle weiteren Hilfs- und Verbrauchsmittel, mit Ethanol desinfiziert. Wie auch im Folgenden werden alle relevanten Aktivitäten unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die aufgetaute Zellsuspension von 1,8 ml wird in insgesamt 8,2 ml vorgewärmten Medium aufgenommen. Dazu werden ca. 4 ml Medium im Reagenzröhrchen vorgelegt. Mittels einer serologischen Pipette, die bereits einen Teil des Mediums enthält, wird die Zellsuspension aufgenommen und ins Röhrchen überführt. Mit verbleibenden ca. 1,5 ml Medium wird das *vial* gespült und dieser Anteil auch in das Röhrchen überführt. Bei Zellen der Hep-G2 Linie wurde im vorangegangenen Laborbetrieb starkes Aggregieren festgestellt, sodass die Hälfte des Aufnahme-Mediums durch Accumax ersetzt wird. Diese Hep-G2-Suspension wird nach dem Aufnehmen 5 min inkubiert.

Das Reagenzröhrchen wird über 5 min bei 200xg zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand vorsichtig aspiriert. Das Zellpellet am Boden des Röhrchens wird zur Resuspension aufgelockert, durch „Anschnippen“ des Röhrchens oder möglichst gleichmäßiges „Ratschen“ des Röhrchens über die Oberseite eines Röhrchenständers. Das Pellet wird auf ein Endvolumen von 10 ml in Medium resuspendiert. Der Suspension wird eine Probe zu Zellzählung entnommen (s. Kap. 2.4. Zellzählung, Probenanalyse). Die Zellen werden den laborintern etablierten Aussaatdichten für diese Linien entsprechend in Zellkulturflaschen ausgesät (Berechnung s. 2.2.2. Formeln (1)-(4)).

### **2.2.2. Erhaltung und Expansion**

Die Zellen werden, je nach Flächen- und Volumenbedarf, in Zellkulturflaschen oder Cellstacks bei 37 °C bei 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert. Alle 2-4 Tage wird eine Expansion mit Medienwechsel durchgeführt. Cellstacks werden nur bei U-2 OS genutzt.

Bei U-2 OS Kulturen wird zunächst das Kulturmedium aspiriert und die Zellen mit DPBS überspült. Anschließend wird das DPBS abgenommen und Accutase auf den Zellrasen gegeben. Die verwendeten Volumina sind Tabelle 7 zu entnehmen. Das Kulturgefäß wird 5 min bei 37 °C inkubiert.

Bei Hep-G2 Kulturen wird das Kulturmedium aspiriert, DPBS auf die Zellen gegeben und dies für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das DPBS wird aspiriert und durch TrypLE Express ersetzt, welches ebenfalls für 2 min inkubiert und anschließend aspiriert wird. Zum Ablösen wird erneut TrypLE auf den Zellrasen gegeben und die Kulturgefäße für 8 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend führt man durch leichte Stöße an das Kulturgefäß die vollständige Ablösung herbei. Die enzymatische Reaktion wird mit Medium abgestoppt und die resultierende Zellsuspension je nach Volumen in einen Zentrifugationsröhrchen oder -Becher überführt. Sollten nach dem Aufnehmen in Kulturmedium nicht alle Zellen aus dem Gefäß gewaschen sein, kann nach Bedarf mit Medium oder DPBS nachgespült werden. Die gesamte Waschlösung wird in den Zentrifugationsgefäßen gesammelt.

Das Zentrifugationsröhrchen wird bei 200xg über 5 min zentrifugiert, der Becher über 15 Minuten. Analog zum Auftauprozess wird das entstandene Pellet in Suspension gebracht und diese vermessen. In der Erhaltungskultur sollte eine Vitalitätsrate von 90 % nicht unterschritten werden. Bei Hep-G2 wird das Pellet



5 min bei 37 °C mit ca. dem Doppelten an Accumax (v/v) inkubiert, bevor die Mischung mit Medium aufgefüllt und diese Suspension vermessen wird. Die zur Aussaat benötigte Kulturfläche und Volumen der Resuspension pro Kulturgefäß werden durch folgende Formel ermittelt:

$$A = \frac{n_{\text{Resuspension}}}{n/A} \quad (1)$$

$$V_{\text{Resuspension}} = \frac{A_{\text{Gefäß}} \cdot n/A}{c_{\text{Resuspension}}} \quad (2)$$

$$V_{\text{Medium}} = V_{\text{gesamt}} - V_{\text{Resuspension}} \quad (3)$$

$A$	gesamte benötigte Aussaatfläche	in cm <sup>2</sup>
$n_{\text{Resuspension}}$	Gesamtzellzahl	in Zellen
$n/A$	Aussaatdichte	in Zellen/cm <sup>2</sup> oder c/cm <sup>2</sup>
$V_{\text{Resuspension}}$	Verwendete Zellsuspension pro Kulturgefäß	in ml
$A_{\text{Gefäß}}$	Kulturfläche des Kulturgefäß	in cm <sup>2</sup>
$c_{\text{Resuspension}}$	Zellkonzentration der Suspension	in Zellen/ml oder c/ml
$V_{\text{Medium}}$	Verwendetes Kulturmedium pro Kulturgefäß	in ml
$V_{\text{gesamt}}$	Gesamtvolumen pro Kulturgefäß	in ml

Die verwendete Aussaatdichte ist spezifisch gewählt für den Zeitraum bis zur nächsten Expansion. Das zusätzlich benötigte Medium wird in die Kulturflasche vorgelegt und die ermittelte Zellsuspension hinzugegeben. Für einen Cellstack wird die Zellsuspension mit Medium auf 0,5 l angesetzt und in den *stack* gefüllt. Die Kulturgefäße werden wieder in den Inkubator gebracht.

Tabelle 7: Volumina verwendeter Agenzien zur Expansion adhärenter Zellen

Gefäß	Waschen	Ablösen	Inhibieren & Aufnehmen	Aussaat
	PBS [ml]	TrypLE Express/ Accutase [ml]	Kulturmedium [ml]	Kulturmedium [ml]
T175	10	3	10	25-40
Cellstack	150	50	150	500

Bei Jurkat als Suspensionslinie ist die Expansion in weniger Arbeitsschritten strukturiert. Die Zellsuspension aus allen Kulturflaschen wird in einem sterilen Gefäß gesammelt und durch Schwenken homogenisiert. Eine Probe wird genommen und vermessen. Die Menge des Kulturvolumens und Mediums nach der Expansion wird durch folgende Formel ermittelt:

$$V_{\text{gesamt}} = \frac{n_{\text{Resuspension}}}{c_{\text{Saat}}} \quad (4)$$

$n_{\text{Resuspension}}$	Gesamtzellzahl	in Zellen
$c_{\text{Saat}}$	Aussaaddichte	in Zellen/ml oder c/ml
$V_{\text{gesamt}}$	Gesamtvolumen aller Kulturgefäß	in ml

Das Kulturvolumen soll nicht 70 ml pro T175 Kulturflasche übersteigen. Die Zahl an Kulturflaschen ergibt sich aus dem Quotienten aus  $V_{\text{gesamt}}$  und diesem Maximalvolumen. Die Zellsuspension wird gleichmäßig auf diese Kulturflaschen verteilt, nachdem die Menge an Medium durch Formel (3) bestimmt und vorgelegt wird. Die Kulturflaschen werden wieder in den Inkubator gebracht.

### 2.2.3. Ernte und Einfrieren

Zur Ernte werden die adhärennten Linien wie unter 2.2.2 beschrieben abgelöst und die Lösung der so aufgenommenen Zellen in einen Zentrifugenbecher überführt. Die Zellsuspension der Jurkat Linie wird zur Ernte ebenfalls in einen Zentrifugenbecher überführt. Die Zellsuspensionen werden bei 200xg über 15 min zentrifugiert, anschließend der Überstand aspiriert und das Pellet in ca. 5 ml Kryomedium resuspendiert. Dieser Suspension wird eine Probe entnommen und diese vermessen (s. Kap. 2.4. Zellzählung, Probenanalyse). In der Ernte sollte eine Vitalitätsrate von 90 % nicht unterschritten werden. Auch das genaue vorhandene Volumen wird ermittelt.

Das benötigte Volumen an Kryomedium und DMSO (5 % v/v) für die zum Abfüllen geplante Zellkonzentration wird folgend berechnet:

$$V_{\text{gesamt}} = \frac{n_{\text{Resuspension}}}{c_{\text{gesamt}}} \quad (5)$$

$$V_{\text{DMSO}} = V_{\text{gesamt}} \cdot 0,05 \quad (6)$$

$$V_{\text{Kryomedium}} = V_{\text{gesamt}} - V_{\text{DMSO}} - V_{\text{Resuspension}} \quad (7)$$

$V_{\text{gesamt}}$	Gesamtvolumen der Kryosuspension	in ml
$n_{\text{Resuspension}}$	Gesamtzellzahl	in Zellen
$c_{\text{gesamt}}$	angestrebte Zellkonzentration der Kryosuspension	in Zellen/ml oder c/ml
$V_{\text{DMSO}}$	Volumen des DMSO	in ml
$V_{\text{Kryomedium}}$	Volumen des reinen Kryomedium	in ml
$V_{\text{DMSO}}$	Volumen des DMSO	in ml
$V_{\text{Resuspension}}$	Volumen der Zellsuspension in Kryomedium	in ml

Zellsuspensionen werden im Rahmen des Versuchs mit Zellkonzentrationen von  $5,0\text{E}+6$  c/ml,  $1,0\text{E}+7$  c/ml,  $2,5\text{E}+7$  c/ml und  $5,0\text{E}+7$  c/ml in Volumina von 20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 80  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 240  $\mu\text{l}$  und 400  $\mu\text{l}$  abgefüllt. Zum Ansetzen der endgültigen Suspension wird zunächst das DMSO zum reinen Kryomedium gegeben, um die Zellen vor dem exothermen Prozess des Lösens zu schützen. Nachdem sich die entstandene Wärme verflüchtigt hat, wird die nach der Resuspension vermessene Zellsuspension hinzugegeben und die entstandene Kryolösung durch Schwenken homogenisiert. Die Suspension wird bei regelmäßigem Homogenisieren mithilfe der Multipette in *cryovials* gefüllt. Im Cryomed werden die *vials* mit einer Rate von  $-45$  °C/ min bis  $-80$  °C abgekühlt und anschließend in die Lagerung über  $\text{liN}_2$  gebracht.

### 2.3. Auftaukontrolle

Zur Auftaukontrolle wird ein Protokoll ohne Waschschrift durchgeführt, sowie eine parallele Kontrolle mit Waschschrift durch Zentrifugation. Im Folgenden werden diese Prozesse als „no wash“-Protokoll und „wash“-Protokoll bezeichnet. Das *vial* wird mit vorgewärmtem Medium (37 °C) auf 1,8 ml aufgefüllt und bei Bedarf abgewartet, bis die gefrorene Kryolösung vollständig getaut ist. Im „no wash“-Protokoll wird aus der resultierenden Lösung Proben zur Zellzählung entnommen,

und die Lösung wird zum Aussäen oder für den Proliferationsassay weiterverwendet.

Im „wash“-Protokoll wird die Suspension in ein 2 ml Reagiergefäß überführt und dieses für 5 min bei 200xg zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand aspiriert und das Pellet in 1,8 ml Medium resuspendiert. Die resultierende Suspension wird wie nach dem „no wash“-Protokoll zur Analytik weiterverwendet.

### **2.4. Zellzählung, Probenanalyse**

Die Proben der Zellsuspension werden im Zellzählgerät CASY TT vermessen. Dieses erstellt ein Histogramm der gezählten Partikel in Abhängigkeit der Größe. Die Anteile von Debris, Tot- und Lebendzellen wird innerhalb der unternehmensintern bestimmten Größenbereiche zusammengefasst und die Gesamtzellzahl und Vitalität automatisch berechnet. Zusätzlich wird auch das durchschnittliche Volumen der gemessenen Zellen sowie das Volumen am geometrischen Maximum des Histogramms bestimmt. Aus dem Verhältnis des Ersten zum Zweiten wird ein Aggregationsfaktor bestimmt, der Aufschluss über den Grad der Aggregation der Zellen geben soll. Ist die in der Messung erfasste Partikelanzahl unterhalb des Kalibrierungsbereiches des CASY TT, wäre eine Aufkonzentrierung der Probe durch Zentrifugation üblich. Dies wird im analytischen Teil unterlassen, da ein weiterer Zentrifugationsschritt den eigentlichen Versuchsaufbau beeinflussen würde.

Eine weitere Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung wird mittels Trypanblau-Ausschlusses in der Neubauer Zählkammer durchgeführt. Diese wird lediglich für die Hep-G2 Linie angewendet, wobei in Expansion und Ernte diese Ergebnisse statt denen des Zellzählgeräts verwendet werden. Es werden zu gleichen Volumenanteilen Zellsuspension und Trypanblau-Lösung vermischt und in die Zählkammer gebracht. Die Größen werden als arithmetische Mittel der vier Großquadrate bestimmt, nachdem die Zellen in je allen 16 Kleinstquadraten analog am Mikroskop erfasst werden. Für eine statistische Belastbarkeit sollte der Zählbereich von 20 Zellen pro Großquadrat nicht unterschritten werden. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist im analytischen Teil eine Aufkonzentrierung durch Zentrifugation nicht möglich.

## 2.5. Morphologie-Untersuchung

Unter Verwendung der für die Linien intern bestimmten Aussaatdichten werden die Zellen in 24-*well-plates* ausgesät. Die äußeren 16 *wells* werden mit DPBS auf das Nennvolumen von 1 ml aufgefüllt und nur die inneren 8 *wells* werden zur Aussaat verwendet. Somit werden Verdunstungs- und andere Rand-Effekte vermieden, die Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben könnten und somit das Ergebnis verfälschen könnten. Die benötigten Volumina an Zellsuspension und Medium werden für adhärenente Zellen mit den Formeln (8) und (10) bestimmt, für Suspensionszellen mit den Formeln (9) und (10).

$$V_{Suspension} = \frac{A_{well} \cdot n/A}{c_{Suspension}} \quad (8)$$

$$V_{Suspension} = \frac{V_{well} \cdot c_{Saat}}{c_{Suspension}} \quad (9)$$

$$V_{Medium} = V_{well} - V_{Suspension} \quad (10)$$

$V_{Suspension}$	Verwendete Zellsuspension pro <i>well</i>	in ml
$A_{well}$	Kulturfläche im <i>well</i>	in $cm^2$
$n/A$	Aussaatdichte adhärenente Zellen	in Zellen/ $cm^2$ oder c/ $cm^2$
$c_{Suspension}$	Zellkonzentration der Suspension	in Zellen/ml oder c/ml
$V_{well}$	Nennvolumen im <i>well</i>	in $cm^3$
$c_{Saat}$	Aussaatdichte Suspensionszellen	in Zellen/ml oder c/ml
$V_{Medium}$	Verwendetes Kulturmedium pro <i>well</i>	in ml

Die laborintern verwendeten Aussaatdichten der Zelllinien für eine über zwei Tage laufende Kultur werden genutzt. Nach der Aussaat werden die *wells* durch unregelmäßiges kreisförmiges Schieben der Platten homogenisiert. Die Zellkulturplatten werden im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach ca. 24 h, 48 h und 72 h werden die *wells* unter Phasenkontrastmikroskopie bei 40-facher und 100-facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert.

## 2.6. Resazurin-basierter Proliferationsassay

Im Proliferationsassay werden für die Untersuchung des „no wash“-Protokolls drei *vials* pro Zelllinie, Zellkonzentration und Einfriervolumen verwendet, beim „wash“-Protokoll zwei *vials*. Die Zellen werden aufgetaut und die Suspensionen vermessen (s. Kap. 2.3. & 2.4.). Der Assay wird in zwei 96-*well-plates* durchgeführt, wobei die äußeren *wells* nicht genutzt werden und auf das Nennvolumen von 0,1 ml mit DBPS

aufgefüllt werden. So sollen Verdunstungs- und andere Randeffekte vermieden werden. Die Zellen eines jeden *well* werden auf beiden Platten in je 3 *wells* ausgesät. Die benötigten Volumina an Zellsuspension und Medium werden für adhärenente Zellen mit den Formeln (8) und (10) bestimmt, für Suspensionszellen mit den Formeln (9) und (10). Die laborintern verwendeten Aussaatdichten der Zelllinien für eine über drei Tage laufende Kultur werden genutzt. Beide Platten werden je 4 h vor dem Vermessen mit 25 µl Resazurin pro *well* bestückt. Die Platten werden immer im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die erste Platte wird 4 h nach Aussaat vermessen, die zweite nach 76 h. Nach Zugabe von Resazurin und vor dem Vermessen wird die Platte 30 s auf dem Plattenschüttler homogenisiert. Die Platten werden im Mikroplattenreader bei einer Extinktion von 540 nm angeregt und bei einer Emission von 590 nm vermessen.

Aus den Extinktionswerten beider Messungen sowie der Zeitdifferenz wird die Wachstumsrate wie folgt ermittelt:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{E_{t2}}{E_{t1}}\right)}{\Delta t} \quad (11)$$

$\mu$	Wachstumsrate	in 1/d
$E_2$	Emission in Messung nach 76 h	in RFU
$E_1$	Emission in Messung nach 4 h	in RFU
$\Delta t$	Zeitdifferenz zwischen den Messungen	in d

### 3. Ergebnisse

Die Zellen der genannten Zelllinien wurden wie in Kapitel 2.2 beschrieben kultiviert, geerntet und in *cryovials* abgefüllt.

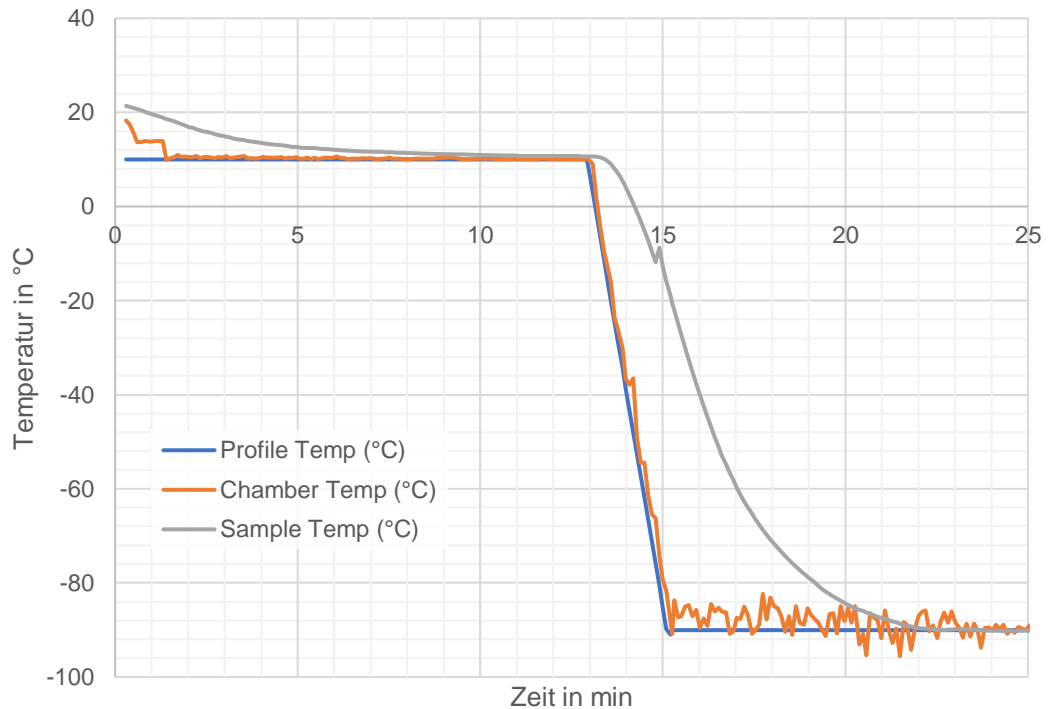


Abbildung 7: Exemplarischer Temperaturverlauf des Einfrierprozesses im Einfrierautomaten

Die Abbildung zeigt den Temperaturverlauf im Einfrierautomaten während der Kryokonservierung von Jurkat Zellen in einer Zellkonzentration von  $2,5E+7$  c/ml. Die Daten stehen exemplarisch für jegliche Einfrierprozesse im Rahmen dieser Arbeit. Die Kammertemperatur (orange) folgt dem programmiertem Temperaturprofil (blau). Die Probestemperatur (grau) nähert sich der Kammertemperatur asymptotisch an. Bei 15 min und ca.  $-10$  °C zeigt die Probestemperatur einen Sprung.

Die mit Zellsuspension gefüllten *cryovials* wurden im Einfrierautomat Cryomed auf unter  $-80$  °C gebracht. In der verwendeten Programmierung hielt die Kammer des Cryomed zunächst eine Temperatur von  $10$  °C, bis die Temperatur der Probe  $15$  °C unterschritt. Die Probe war dabei ein *cryovial* mit dem regulären Füllvolumen von  $1,8$  ml, in das der Messfühler des Cryomed eingeführt war. Nachdem die Probe  $15$  °C unterschritten hatte, wurde die Kammertemperatur für weitere 10 min auf  $10$  °C gehalten. Anschließend wurde die Kammertemperatur mit einer Rate von  $-45$  °C/min auf  $-90$  °C gesenkt. Diese Temperatur wurde für mindestens 5 min gehalten. Im Versuch hielt der Cryomed die Kammertemperatur, bis der Prozess beendet und der Automat zur Entnahme der *vials* geöffnet wurde. In Abbildung 7 sind die aufgezeichneten Daten der Kryokonservierung von Jurkat Zellen in einer Zellkonzentration von  $2,5E+7$  c/ml dargestellt. Die Verläufe der übrigen Einfrierprozesse im Rahmen dieser Arbeit entsprechen dem dargestellten.

Die gemessene Kammertemperatur entspricht im Einfrierprozess dem Temperaturprofil unter leichten Schwankungen. In den ersten 13 min passt sich die Proben­temperatur asymptotisch der Kammertemperatur an. Während der Temperaturrampe ist bei 15 min und ca. -10 °C ein Sprung in der Temperatur der Probe von ca. 3 °C zu erkennen. Anschließend passt sich die Temperaturprobe wieder asymptotisch der Kammertemperatur an. Am Ende des gesteuerten Programms, 5 min nach dem Erreichen der endgültigen Kammertemperatur, hat die Proben­temperatur -80 °C unterschritten.

In der Auftaukontrolle wurden die Zellsuspensionen wie in den Kapitel 2.3 beschrieben aufgetaut. Das vorgewärmte Medium wurde im *cryovial* auf die gefrorene Zellsuspension gegeben. Bei Füllvolumina von 20 µl bis 40 µl taut die Suspension sofort oder in wenigen Sekunden vollständig. Die Füllvolumina 80 µl bis 100 µl tauen in unter 1 min. Gefrorene Zellsuspensionen im Volumen 200 µl brauchen ca. 2 min zum vollständigen Auftauen, bei 240 µl sind es über 3 min. Das vollständige Tauen dauert zwischen 6 min und 7 min bei einem Füllvolumen von 400 µl.

Es sind Kriterien für ARCs definiert, an denen die Ergebnisse der Auftaukontrollen im Folgenden verglichen werden. Die Zellen sollten eine Vitalitätsrate von 90 % nicht unterschreiten. Die Wachstumsrate sollte nicht um mehr als 20 % vom vor der Ernte in Kultur bestimmten Vergleichswert abweichen. Die Morphologie sollte dem gesunden Phänotyp entsprechen und wird mit repräsentativen Aufnahmen verglichen.

### **3.1. Hep-G2**

Zellen der Linie Hep-G2 wurden in Zellkonzentrationen von 5,0E+6 c/ml, 1,0E+7 c/ml und 2,5E+7 c/ml in Suspension gebracht. Diese Suspensionen wurden in Volumina von 20 µl, 40 µl, 80 µl, 100 µl, 200 µl, und 400 µl abgefüllt und kryokonserviert. Jegliche Parameter wurden in einer Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll überprüft. Alle Füllvolumina der Konzentrationen 5E+6 c/ml und 1E+7 c/ml wurden ebenso nach „wash“-Protokoll kontrolliert. Durch eine begrenzte Probenmenge konnte die Konzentration 2,5E+7 c/ml nicht nach „wash“-Protokoll untersucht werden.



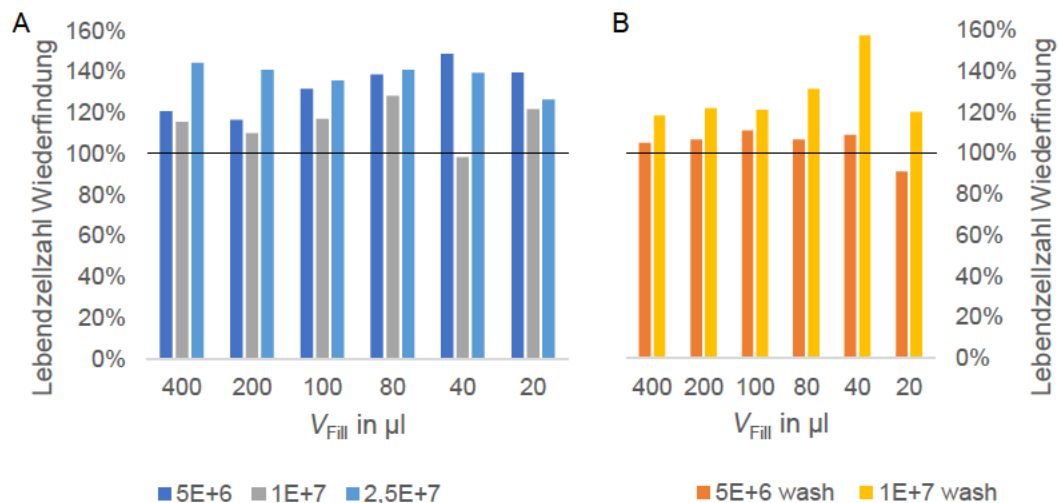


Abbildung 8: Wiederfindungsrate vitaler Hep-G2 Zellen, gemessen mittels CASY TT

Die Abbildung zeigt den Anteil der Lebendzellen in Bezug auf die theoretisch im *vial* enthaltene Zellzahl vitaler Hep-G2 Zellen. Die Anzahl der Lebendzellen wurde nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) bestimmt. Zellzahl bei Abfüllung in Zählkammer ermittelt, Auftaukontrolle gemessen mittels CASY TT, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Die Wiederfindungsrate liegt nach „no wash“-Protokoll zwischen 98 % und 149 %. Bei identischen Volumina ist die Rate bei 1E+7 c/ml am niedrigsten. Die Rate beträgt nach „wash“-Protokoll 91 % bis 157 % mit geringeren Werten für 5E+6 c/ml.

Die ermittelte Wiederfindungsrate beschreibt die in der Auftaukontrolle bestimmte Lebendzellzahl pro *vial* im Verhältnis zur theoretischen Zellzahl im *vial*. Die in Abbildung 8 verwendeten Ergebnisse wurden im Auftauversuch mittels CASY-Zellzählergerät gemessen. Die in der Ernte verwendeten Volumina zum Ansetzen der Zellsuspension und dem Erreichen der gewünschten Zellkonzentration basieren auf Zählungen in der Neubauerkammer. Die Proben aus Auftauprozessen mit „no wash“-Protokoll erreichen Raten von 98 % bis 149 %. Bis auf den Wert der Konzentration von 1E+7 c/ml bei 40µl liegen alle Werte über einer Wiederfindung von 100 % (Abbildung 8 A). Bei gleichem Abfüllvolumen weist die Datenreihe von 1E+7 c/ml gegenüber den restlichen Konzentrationen die niedrigste Rate auf. Im Bereich  $\geq 80 \mu\text{l}$  zeigt 2,5E+7 c/ml das höchste Ergebnis. Bei  $\leq 40 \mu\text{l}$  besitzt die Konzentration 5E+6 c/ml den größten Wert.

Aus den Auftaukontrollen nach „no wash“-Protokoll ergeben sich Wiederfindungsraten zwischen 91 % und 157 %. Außer jenes Wertes bei 5E+6 c/ml im Volumen 20 µl liegen alle Werte über einer Rate von 100 % (Abbildung 8 B). Im Vergleich bei identischem Abfüllvolumen weist die Konzentration 1E+7 c/ml stetig höhere Werte auf als 5E+6 c/ml. Im Vergleich der Ergebnisse beider Protokolle bei identischen Parametern zeigen sich bei der Konzentration 5E+6 c/ml nach „no wash“-Protokoll die höheren Raten. Bei 1E+7 c/ml sind die Werte nach „wash“-Protokoll gleich oder größer.

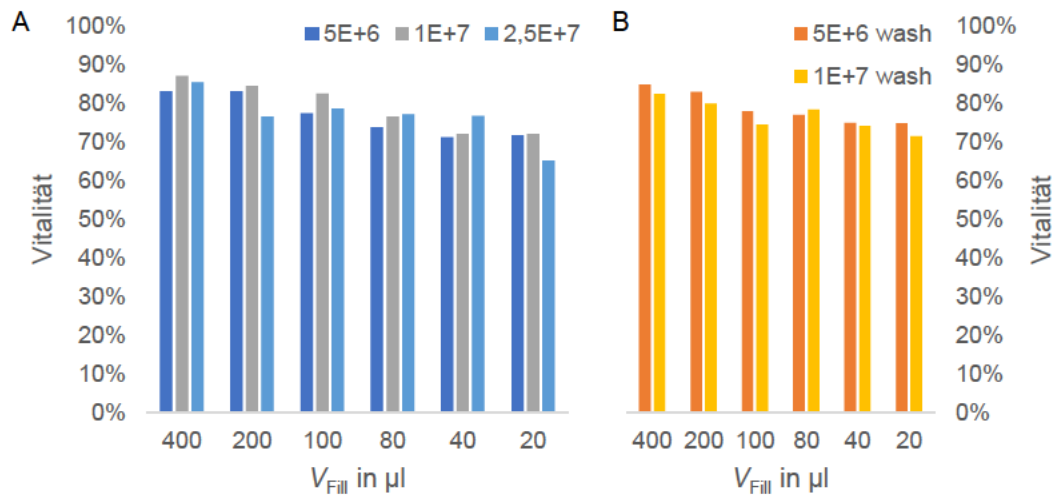


Abbildung 9: Anteil vitaler Hep-G2 Zellen, gemessen mittels CASY TT

Die Abbildung zeigt die Vitalität der Hep-G2 Zellen, bestimmt nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B). Gemessen mittels CASY TT, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Die Auftaukontrollen nach „no wash“-Protokoll ergeben Vitalitätsraten von 65 % bis 87 %. Nach „wash“-Protokoll resultieren Vitalitätsraten zwischen 72 % und 85 %. Alle Ergebnisse liegen unter dem unternehmensintern angestrebten Wert von  $\geq 90\%$  sowie den Vitalitätsraten bei Ernte. Bei gleicher Zellkonzentration wird die Vitalität mit sinkendem Abfüllvolumen geringer.

In Kultur erwies sich die Hep-G2 Linie als empfindlich und die laborintern angestrebte Vitalität von  $\geq 90\%$  wurde teilweise unterschritten. Die für die Zellkonzentration von 5E+6 c/ml verwendeten Zellen besaßen in der Ernte eine mittels CASY TT bestimmte Vitalität von 92 %. Für 1E+7 c/ml betrug die Vitalität 88 % und bei 2,5E+7 c/ml 86 %. Diese Werte werden in der Auftaukontrolle in Messungen mittels CASY TT jeweils nicht erreicht. Alle Datenreihen zeigen zudem die Tendenz, mit abnehmendem Abfüllvolumen zu sinken (Abbildung 9 A). Nach Auftauprozessen ohne Waschschrift schwindet die Vitalität bei 5E+6 c/ml von 83 % auf 71 %. Bei 1E+7 c/ml sinkt der Wert von 87 % auf 72 % und bei 2,5E+7 c/ml von 85 % auf 65 %.

In den Auftaukontrollen nach „wash“-Protokoll ergibt sich bei gleichem Abfüllvolumen ein höherer Wert für die Zellkonzentration 5E+6 c/ml, außer bei 80 µl (Abbildung 9 B). Die Datenreihe von 5E+6 c/ml sinkt mit dem Volumen von 85 % auf 75 %, bei 1E+7 c/ml von 82 % auf 72 %. Im Verhältnis zu den Werten nach „no wash“-Protokoll sind bei 5E+6 c/ml die Vitalitätsraten nach „wash“-Protokoll um bis zu 5 % höher. Die Ergebnisse nach „wash“-Protokoll betragen für 1E+7 c/ml zwischen 90 % und 103 % der Vitalitätsraten nach „no wash“-Protokoll.

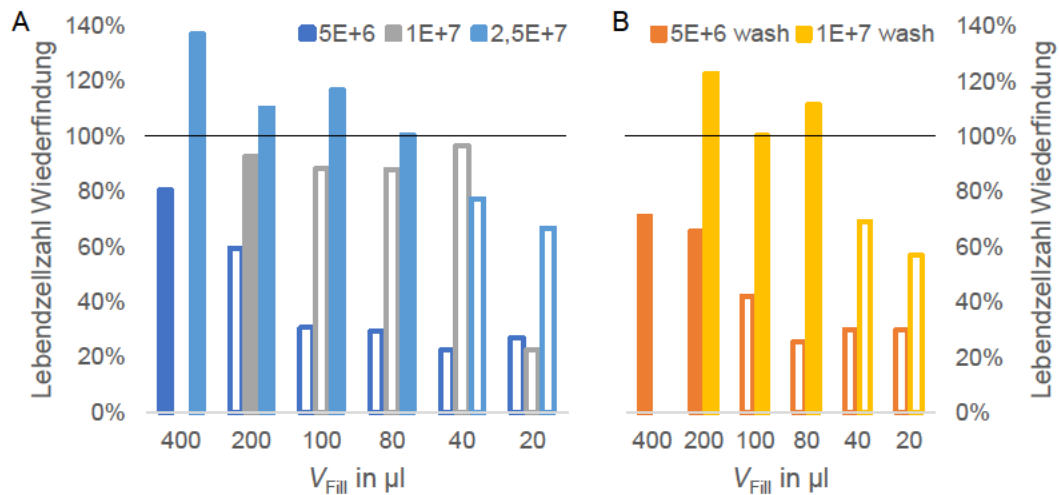


Abbildung 10: Wiederfindungsrate vitaler Hep-G2 Zellen, ermittelt in Zählkammer

Die Abbildung zeigt den Anteil der Lebendzellen in Bezug auf die theoretisch im *via* enthaltene Zellzahl vitaler Hep-G2 Zellen. Die Anzahl der Lebendzellen wurde nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) bestimmt. Zellzahl bei Abfüllung und Auftaukontrolle gemessen mittels Neubauer Zählkammer, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Ungefüllte Balken weisen auf einen Messwert unterhalb des Zählbereiches hin. Werte für 1E+7 c/ml in 400  $\mu\text{l}$  nicht vorhanden. Die belastbaren Werte der Wiederfindungsrate liegen nach „no wash“-Protokoll zwischen 81 % und 137% und betragen nach „wash“-Protokoll 66 % bis 123 %. Bei gleichem Volumen und Auftauprotokoll kommt es bei höheren Zellkonzentrationen zu größeren Wiederfindungsraten.

Nachdem die Zellen im Auftauprozess in Medium aufgenommen wurden, sind die resultierenden Konzentrationen so niedrig, dass teilweise der etablierte Zählbereich der Neubauerkammer unterschritten wird. Daraus folgende Ergebnisse sind nicht als genau und belastbar anzusehen und es können lediglich relative Tendenzen betrachtet werden. Die in Abbildung 10 dargestellten Wiederfindungsraten basieren auf Zellzählungen mittels Neubauerkammer in Ernte und Auftaukontrolle. Nach „no wash“-Protokoll ergibt sich für die Konzentration von 5E+6 c/ml in 400  $\mu\text{l}$  eine Rate von 81 %. Bei 1E+7 c/ml in 200  $\mu\text{l}$  beträgt der Wert 93 %. Die Reihe der Konzentration von 2,5E+7 c/ml schwindet von 137 % bei 400  $\mu\text{l}$  auf 100 % bei 80  $\mu\text{l}$  (Abbildung 10 A).

In den Ergebnissen nach „wash“-Protokoll sinkt die Rate bei einer Konzentration von 5E+6 c/ml von 71 % bei 400  $\mu\text{l}$  auf 66 % bei 200  $\mu\text{l}$ . Die Werte der Konzentration 1E+7 c/ml liegen bei 200  $\mu\text{l}$  bis 80  $\mu\text{l}$  zwischen 123 % und 100 % (Abbildung 10 B). Im Vergleich der Protokolle beträgt bei 5E+6 c/ml in 400  $\mu\text{l}$  der Wert nach „wash“-Protokoll 88 % des Wertes nach „no wash“-Protokoll. Für 1E+7 c/ml in 200  $\mu\text{l}$  liegt das Verhältnis bei 132 %. Bei gleichem Volumen und Auftauprotokoll ergibt eine geringere Zellkonzentration niedrigere Wiederfindungsraten.

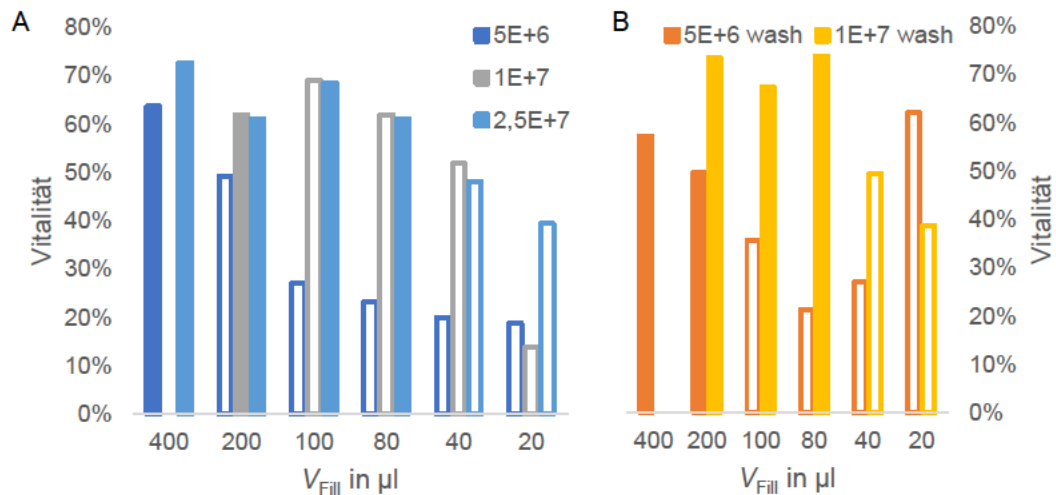


Abbildung 11: Anteil vitaler Hep-G2 Zellen, ermittelt in Zählkammer

Die Abbildung zeigt die Vitalität der Hep-G2 Zellen, bestimmt nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B). Gemessen mittels Neubauer Zählkammer, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Ungefüllte Balken weisen auf einen Messwert unterhalb des Zählbereiches hin. Werte für 1E+7 c/ml in 400 µl nicht vorhanden. Die Auftaukontrollen nach „no wash“-Protokoll ergeben in belastbaren Werten Vitalitätsraten von 61 % bis 73 %. Nach „wash“-Protokoll resultieren Vitalitätsraten zwischen 50 % und 74 %. Alle Ergebnisse liegen unter dem unternehmensintern angestrebten Wert von  $\geq 90$  % sowie der Werte zum Zeitpunkt der Ernte.

Wie unter Abbildung 9 beschrieben unterschritten die Hep-G2 Zellen in Kultur teilweise die angestrebte Vitalität von  $\geq 90$  %. Die in der Zählkammer ermittelte Vitalität in der Suspension der Konzentration 5E+6 c/ml betrug zum Zeitpunkt der Ernte 93 %. Bei 1E+7 c/ml betrug der Wert 86 % und für 2,5E+7 c/ml 80 %. Diese Vitalitätsraten werden jeweils in der Auftaukontrolle unterschritten (Abbildung 11 A). Die Zählung nach „no wash“-Protokoll ergibt bei 5E+6 c/ml in 400 µl eine Vitalität von 64 %. Für 1E+7 c/ml in 200 µl beträgt sie 62%. Die Werte der Reihe der Konzentration 2,5E+7 c/ml schwanken zwischen 73 % und 61 % in Volumina  $\geq 80$  µl.

In der Kontrolle nach „wash“-Protokoll sinkt bei 5E+6 c/ml die Vitalität von 57 % in 400 µl auf 50 % in 200 µl. Im Bereich zwischen 200 µl und 80 µl liegen bei 1E+7 c/ml die Ergebnisse zwischen 74 % und 67 % (Abbildung 11 B). Im Verhältnis des Wertes nach „no wash“-Protokoll ist die Vitalität für 5E+6 c/ml in 400 µl nach „wash“-Protokoll 10 % niedriger. Der Wert aus 1E+7 c/ml bei 200 µl liegt 19 % über dem Ergebnis nach „no wash“-Protokoll.

Die Ergebnisse für Zellzahlen und Vitalitätsraten aus dem Zellzählgerät und der Neubauerkammer sind nicht identisch. In der Kultivierung vor den Ernten wurden dieselben Proben in beiden Methoden vermessen. Die durch das CASY TT bestimmte Lebendzellzahl bemisst im Verhältnis zum Wert aus der Zählkammer 87 % im arithmetischen Mittel allen Proben. Die Standardabweichung beträgt 29 %.



Bei den Werten für die Vitalität ergibt das Verhältnis im Mittel 101 % bei einer Standardabweichung von 9 %. In den Auftaukontrollen liegen für 11 Parameterkombinationen belastbare Neubauer-Zählungen vor. Im Verhältnis zu diesen betragen die Lebendzellzahlen nach CASY im Mittel 128 % bei 19 % Standardabweichung. Für Vitalitätsraten liegt das Verhältnis durchschnittlich 126 % mit einer Standardabweichung von 18 %.

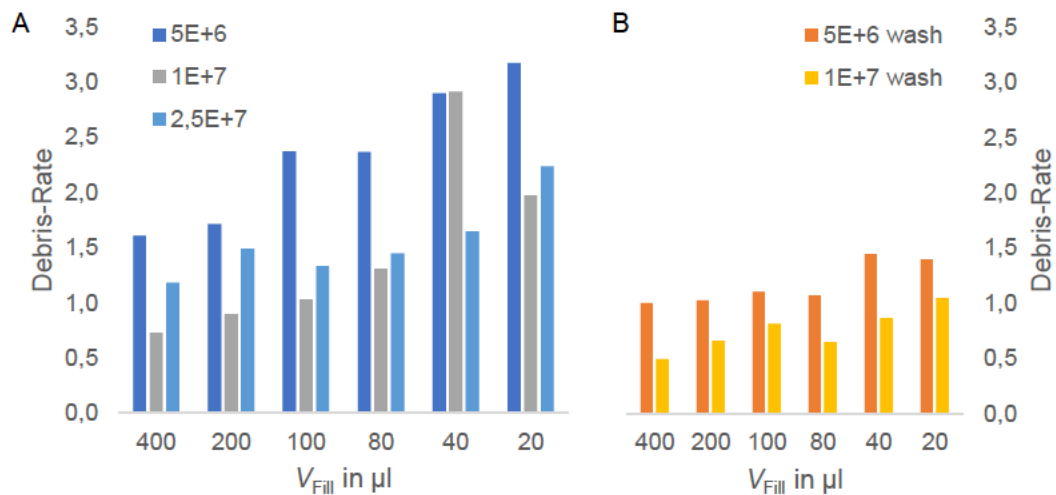


Abbildung 12: Debrisrate der Hep-G2 Zellen

Die Abbildung zeigt den Anteil der Debristeile in Bezug auf die Hep-G2 Lebendzellzahl. Die Messung wurde mittels CASY TT nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) bestimmt. Ergebnisse gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Nach dem „no wash“-Protokoll ergeben sich Raten zwischen 0,73 und 3,17. Die Werte steigen mit sinkendem Volumen an. Raten zwischen 0,49 und 1,45 treten nach dem „wash“-Protokoll mit einer leichten Tendenz zu höheren Werten in kleineren Volumina auf. Bei gleichen Parametern sind die Werte nach „wash“-Protokoll konstant geringer.

Die Debrisrate wird in der Auswertung der Ergebnisse des CASY-Zellzählgerätes automatisch bestimmt. Sie beschreibt das Verhältnis der gezählten Debristeile in Bezug auf die erfassten Lebendzellen. Zum Zeitpunkt der Ernte besaß die auf 5E+6 c/ml gebrachte Suspension eine Rate von 0,50. Für 1E+7 c/ml lag sie bei 0,25 und für 2,5E+7 c/ml bei 0,41. Diese Relationen finden sich in den Ergebnissen wieder. Gleichzeitig werden die Raten jeweils in der Auftaukontrolle überschritten. In den Ergebnissen nach „no wash“-Protokoll zeigen die Datenreihen aller Konzentrationen den Trend, mit sinkendem Abfüllvolumen anzusteigen (Abbildung 12 A). Bei 5E+6 c/ml wächst die Rate von 1,61 bei 400  $\mu\text{l}$  auf 3,17 bei 20  $\mu\text{l}$ . Für 2,5E+7 c/ml 1,18 bei 400  $\mu\text{l}$  auf 2,23 bei 20  $\mu\text{l}$ . In der Konzentration von 1E+7 c/ml steigt die Rate von 0,73 bei 400  $\mu\text{l}$  auf 1,97 bei 20  $\mu\text{l}$ , abseits eines stark abweichenden Wertes für 40  $\mu\text{l}$ .

Die Auftaukontrollen nach „wash“-Protokoll ergeben bei 5E+6 c/ml Raten zwischen 1,00 und 1,45. Für die Zellkonzentration 1E+7 c/ml ist die Rate auf 0,49 bis 1,04

bestimmt. Beide Reihen zeigen einen leichten Trend zu höheren Werten in niedrigen Volumina (Abbildung 12 B). Die Raten sind im Vergleich bei identischen Parametern konstant niedriger als in Kontrollen nach „no wash“-Protokoll.

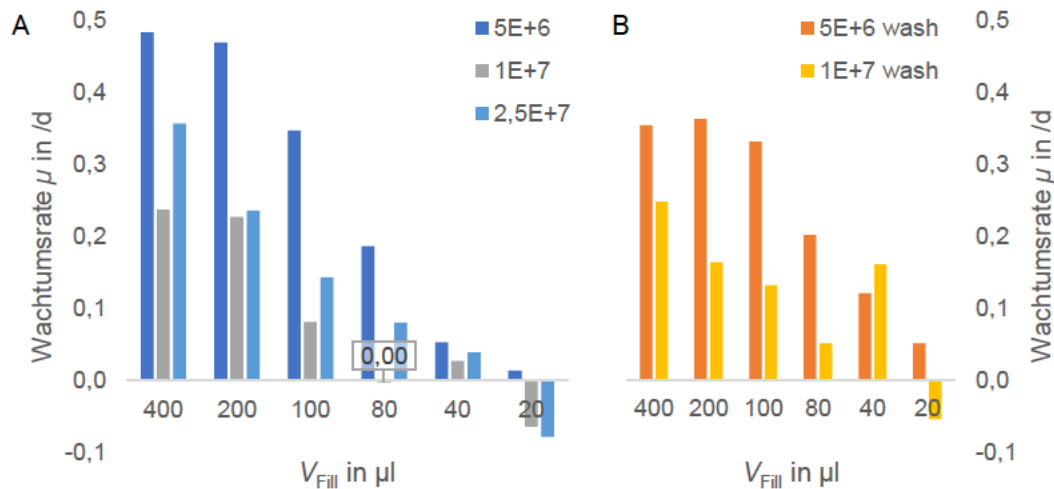


Abbildung 13: Wachstumsrate der Hep-G2 Zellen

Die Abbildung zeigt die Wachstumsrate der Hep-G2 Zellen im Resazurin-Assay. Der Assay wurde nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) durchgeführt. Ergebnisse gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Zellen der Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll erreichen Wachstumsraten zwischen -0,08 /d und 0,48 /d. Nach „wash“-Protokoll ergeben sich Raten von -0,05 /d bis 0,36 /d. Raten der Konzentration 5E+6 c/ml liegen über der Rate bei 1E+7 c/ml für gleichem Füllvolumina. Die Raten schwinden in allen Datenreihen mit dem Abfüllvolumen.

Während der Kultivierung bemaß die Wachstumsrate ein arithmetisches Mittel von 0,27 /d bei einer Standardabweichung von 0,19 /d. Aufgrund dieser Schwankungen ist der Mittelwert als Vergleichswert für die Ergebnisse des Resazurin-Assays nur bedingt belastbar. In der Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll ist bei allen Konzentrationen eine starke Abnahme der Wachstumsrate mit sinkendem Volumen zu erkennen (Abbildung 13 A). Den höchsten Wert weisen die Datenreihen in 400 µl auf. Die Konzentration 5E+6 c/ml besitzt dort eine Rate von 0,48 /d, 1E+7 c/ml eine Rate von 0,24 /d und 2,5E+7 c/ml von 0,36 /d. Bis 20 µl sinken diese Reihen auf Werte zwischen 0,01 /d und -0,08 /d. Bei gleichem Volumen weist die Konzentration 5E+6 c/ml dabei immer den höchsten Wert auf und 1E+7 c/ml tendenziell den niedrigsten.

Die Ergebnisse der „wash“-Auftaukontrolle zeigen ähnliche Tendenzen (Abbildung 13 B). Die Werte der Konzentration 5E+6 c/ml sinken von 0,36 /d bei 200 µl auf 0,05 /d bei 20 µl. Bei 1E+7 c/ml schwindet die Rate von 0,25 /d bei 400 µl auf -0,05 /d bei 20 µl, mit einem stark abweichenden Wert bei 40µl.

In den Ernten wurden Aggregationsfaktoren von 2,31 bis 2,99 ermittelt. Die Auftaukontrollen nach „no wash“-Protokoll zeigen Faktoren von 1,44 bis 4,31 mit einem Mittelwert von 2,51. In Auftauprozessen nach „wash“-Protokoll ergaben sich Werte zwischen 1,58 und 2,97 mit einem ähnlichen arithmetischen Mittel bei 2,45.

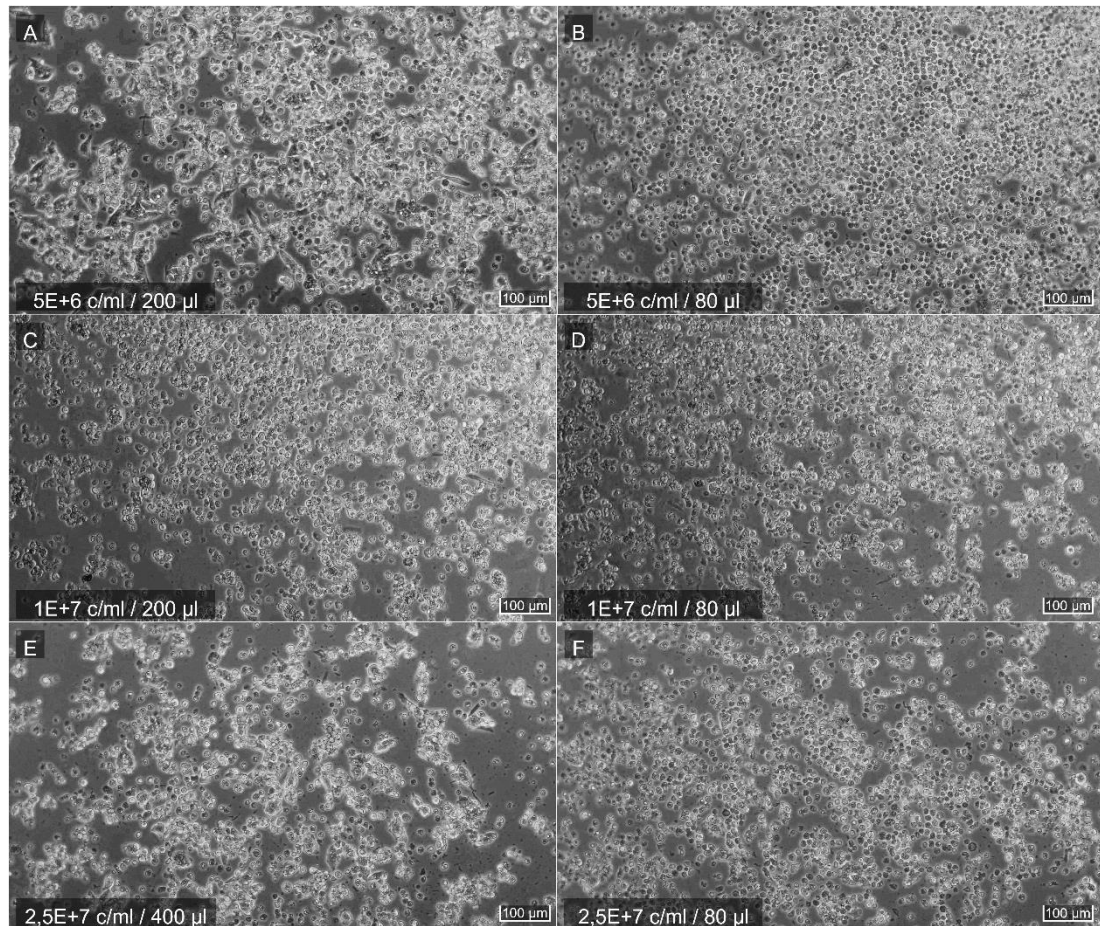


Abbildung 14: Hep-G2 Kulturen in Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll

Die Abbildung zeigt Hep-G2 Kulturen einen Tag nach der Aussaat in einer 24-well plate, nachdem diese dem Auftauprozess nach „no wash“-Protokoll unterzogen wurden. Die Zellen stammen aus vials mit den Abfüllparametern 5E+6 c/ml & 200 µl (A), 5E+6 c/ml & 80 µl (B), 1E+7 c/ml & 200 µl (C), 1E+7 c/ml & 80 µl (D), 2,5E+7 c/ml & 400 µl (E) und 2,5E+7 c/ml & 80 µl (F). Die Kulturen aus den Zellkonzentrationen 5E+6 c/ml und 2,5E+7 c/ml zeigen in hohen Abfüllvolumina vereinzelt angewachsene Zellen (A, E). Der bereits hohe Anteil beschädigter Zellen steigt bei kleineren Volumina weiter (B, D, F). Diese phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab entspricht 100 µm. Originalbilder bearbeitet. (Bilder: Böhle N.)

In der Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll sind nach einem Tag in Kultur keine relevanten Anteile angewachsener Hep-G2 Zellen zu erkennen. Zellen aus dem Einfrierprozess mit einer Zellkonzentration von 5E+6 c/ml zeigen in höheren Volumina  $\geq 200 \mu\text{l}$  vereinzelt flach angewachsene Zellen. Es ist daneben eine hohe Menge an beschädigten, deformierten oder toten Zellen zu erkennen. Dieser Anteil mehrt sich mit schwindendem Volumen (Abbildung 14 A, B). Bei Zellen aus 1E+7 c/ml sind nach 24 h keine adhärenenten Zellen zu erkennen, bei 2,5E+7 c/ml

kaum angewachsene Zellen in hohen Volumina (Abbildung 14 **C, D, E, F**). Bei allen Konzentrationen mehrt sich der Anteil beschädigter und toter Zellen mit schwindendem Volumen. Eine Kultur von gewünschter Morphologie ist nicht vorhanden (vgl. Abbildung 4: Hep-G2 Zellen). In Kontrollen aus Abfüllvolumina  $\geq 200\mu\text{l}$  erhöht sich der Anteil phänotypisch gesunder Zellen leicht über einen Zeitraum von 3 Tagen nach Aussaat. Die meisten adhären Zellen sind dann in der Kontrolle aus  $5\text{E}+6$  c/ml zu erkennen, wobei deren Anteil dennoch weit unter der Morphologie einer typischen Kultur liegt. Kaum phänotypisch intakte Zellen sind auch nach 3 Tagen in der Kultur aus  $1\text{E}+7$  c/ml vorhanden.

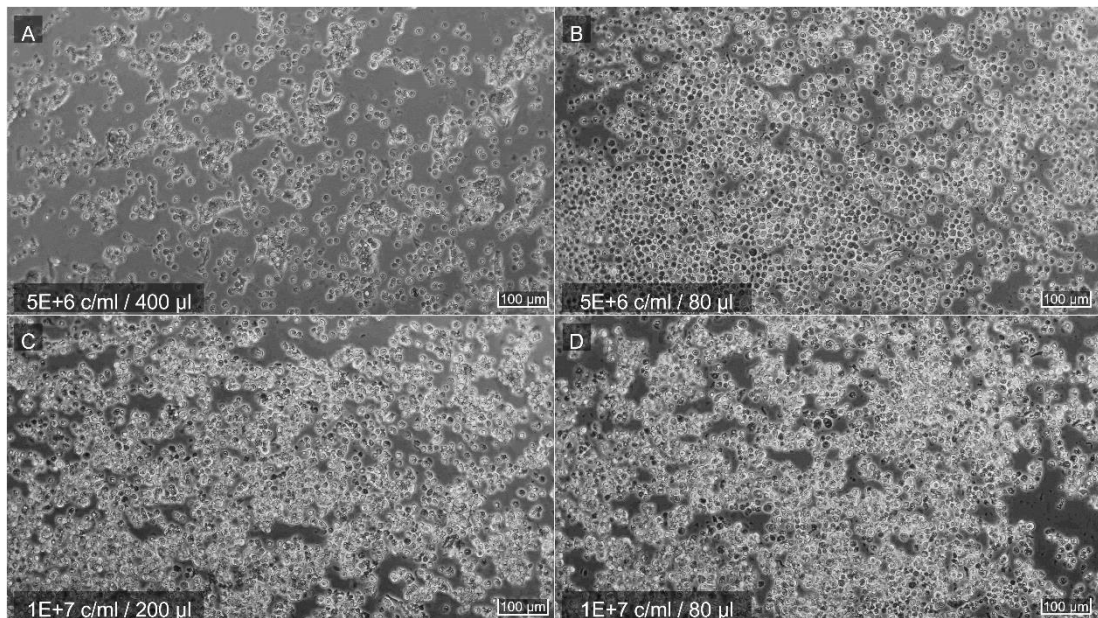


Abbildung 15: Hep-G2 Kulturen in Auftaukontrolle nach „wash“-Protokoll

Die Abbildung zeigt Hep-G2 Kulturen einen Tag nach der Aussaat in einer 24-well plate, nachdem diese dem Auftauprozess nach „wash“-Protokoll unterzogen wurden. Die Zellen stammen aus vials mit den Abfüllparametern  $5\text{E}+6$  c/ml &  $400\mu\text{l}$  (**A**),  $5\text{E}+6$  c/ml &  $80\mu\text{l}$  (**B**),  $1\text{E}+7$  c/ml &  $200\mu\text{l}$  (**C**) und  $1\text{E}+7$  c/ml &  $80\mu\text{l}$  (**D**). Die Kultur aus der Konzentration  $5\text{E}+6$  c/ml besitzt in großen Volumina vereinzelte angewachsene Zellen (**A**). Der bereits hohe Anteil beschädigter Zellen steigt bei kleineren Volumina weiter (**B**). Die Kultur aus der Konzentration  $1\text{E}+7$  c/ml zeigt keine adhären Zellen. Der Anteil toter und beschädigter Zellen ist geringer (**C, D**). Diese phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab entspricht  $100\mu\text{m}$ . Originalbilder bearbeitet. (Bilder: Böhle N.)

Die Hep-G2 Zellen aus einer Zellkonzentration von  $5\text{E}+6$  c/ml zeigen in der Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll eine größtenteils beschädigte Morphologie. Bei einem Einfriervolumen von  $400\mu\text{l}$  sind nach einem Tag in Kultur kaum angewachsene Zellen vorhanden. Der Anteil unbeschädigter Zellen nimmt mit dem Abfüllvolumen ab (Abbildung 15 **A, B**). In den Kontrollen der Konzentration  $1\text{E}+7$  c/ml sind keinerlei adhären Zellen zu erkennen. Im Vergleich zu  $5\text{E}+6$  c/ml ist der Anteil toter Zellen geringer und über die Volumenänderung konstanter (Abbildung 15 **C, D**). In fortlaufender Kultur sind nach insgesamt drei Tagen bei



$1E+7$  c/ml und  $\geq 200\mu\text{l}$  vereinzelt angewachsene Zellen zu erkennen. Ein größerer Anteil an beschädigten, nicht adhärenen Zellen verbleibt. Nach derselben Zeit zeigt die Kultur des Parameters  $5E+6$  c/ml in Abfüllvolumina  $\geq 200\mu\text{l}$  stellenweise im *well* Gruppen angewachsener Zellen der typischen Morphologie (vgl. Abbildung 4). Diese werden von suspendierten Zellen abgewechselt, sodass keine homogene Kultur vorhanden ist.

### 3.2. Jurkat

Die Zellen der Zelllinie Jurkat wurden in den Zellkonzentrationen  $5,0E+6$  c/ml,  $1,0E+7$  c/ml und  $2,5E+7$  c/ml je in den Volumina  $20\mu\text{l}$ ,  $40\mu\text{l}$ ,  $80\mu\text{l}$ ,  $100\mu\text{l}$ ,  $200\mu\text{l}$ , und  $400\mu\text{l}$  abgefüllt. Eine Suspension der Zellkonzentration  $5,0E+7$  c/ml wurde ebenfalls in jenen Volumina abgefüllt, wobei  $200\mu\text{l}$  durch ein Abfüllvolumen von  $240\mu\text{l}$  ersetzt wurde. In den Auftaukontrollen wurden die Proben wie in Kapitel 2.3 bis 2.6 beschrieben im CASY-Zellzählgerät vermessen. Das Resazurin-Assay sowie die morphologische Kontrolle wurden durchgeführt.

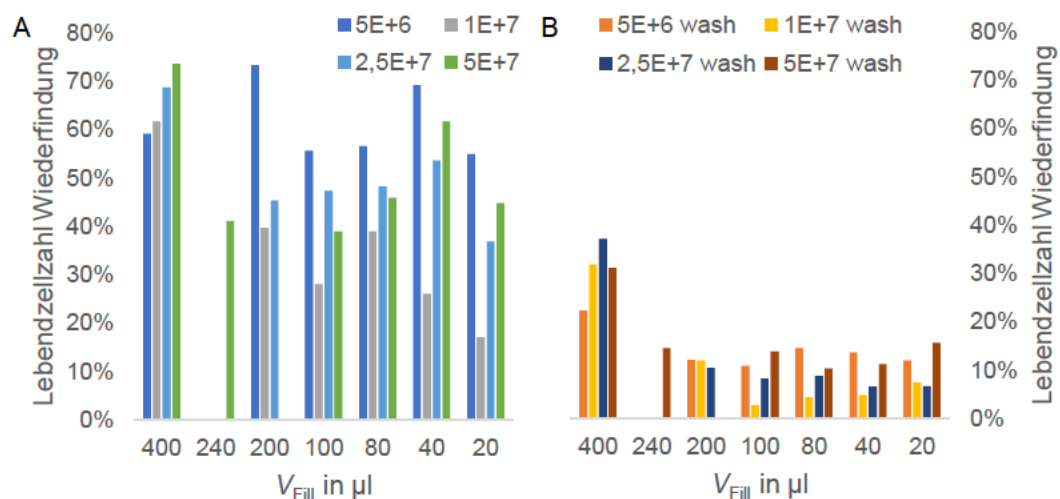


Abbildung 16: Wiederfindungsrate vitaler Jurkat Zellen

Die Abbildung zeigt den Anteil der Lebendzellen in Bezug auf die theoretisch im *vial* enthaltene Zellzahl vitaler Jurkat Zellen. Die Anzahl der Lebendzellen wurde nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) bestimmt. Zellzahl bei Abfüllung und Auftaukontrolle gemessen mittels CASY TT, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Die Wiederfindungsrate liegt nach „no wash“-Protokoll zwischen 17 % und 74% und beträgt nach „wash“-Protokoll 3 % bis 37 %. Bei identischen Parametern ist die Rate nach „no wash“-Protokoll stets höher.

Auf Grundlage der gemessenen Zellzahlen pro *vial* wurde im Verhältnis zur theoretischen Zellzahl im *vial* die Wiederfindungsrate bestimmt. Auftauversuche nach dem „no wash“-Protokoll zeigen Wiederfindungsraten zwischen 17 % und 74 % (Abbildung 16 A). Bei  $400\mu\text{l}$  liegen die Ergebnisse der Zellkonzentrationen mit

59 % und 74 % relativ beieinander. Außer bei 5E+6 c/ml kommt es bei diesem Volumen zu den höchsten Wiederfindungen. Die Zellkonzentration 5E+6 c/ml weist den höchsten Wert bei 200 µl auf. Bei der Zellkonzentration 1E+7 c/ml sinkt die Rate tendenziell mit sinkendem Volumen, die verbleibenden Konzentrationen zeigen in ihren Ergebnissen starke Schwankungen ohne Trend in Relation zum Volumen. Unter 400 µl weisen bei gleichem Volumen Versuche bei 1E+7 c/ml die niedrigste Wiederfindung auf und Versuche bei 5E+6 c/ml die größte.

Auch die Auftaukontrollen nach „wash“-Protokoll von *vials* mit einem Füllvolumen von 400 µl zeigen deutlich höhere Wiederfindungen als bei geringeren Volumina (Abbildung 16 B). Die Ergebnisse liegen zwischen 22 % bis 37 %, bei den verbleibenden Volumina unter 16 %. Im Vergleich sind die Ergebnisse nach „wash“-Protokoll höchstens halb so groß wie jene Raten nach „no wash“-Protokoll.

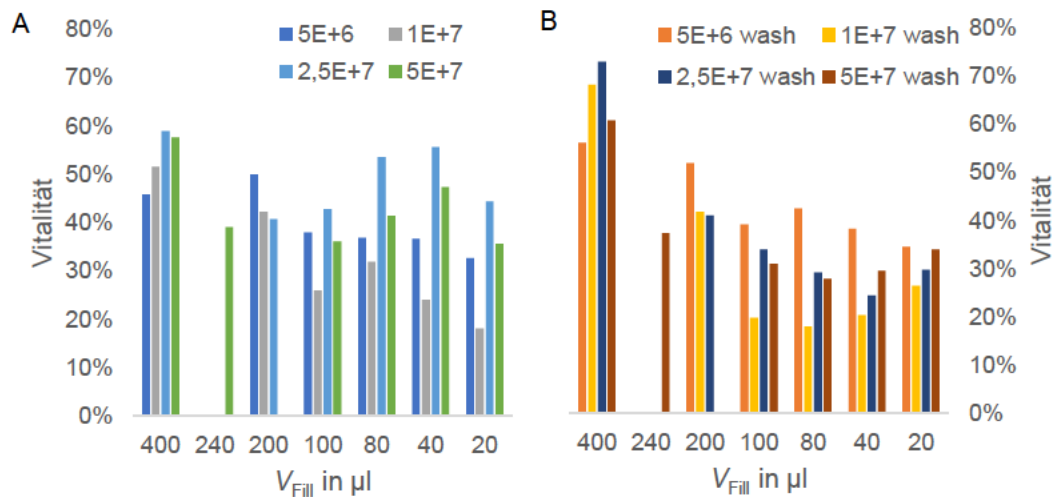


Abbildung 17: Anteil vitaler Jurkat Zellen

Die Abbildung zeigt die Vitalität der Jurkat Zellen, bestimmt nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B). Gemessen mittels CASY TT, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Die Auftaukontrollen nach „no wash“-Protokoll ergeben Vitalitätsraten von 18 % bis 59 %. Nach „wash“-Protokoll resultieren Vitalitätsraten zwischen 18 % und 73 %. Alle Ergebnisse liegen unter dem unternehmensintern angestrebten Wert von  $\geq 90$  %. Bei 400 µl sowie bei einer Zellkonzentration von 5E+6 c/ml ist das Ergebnis nach „wash“-Protokoll größer als nach „no wash“-Protokoll.

In der Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll beträgt der Anteil vitaler Jurkat Zellen zwischen 18 % und 59 %. Damit liegen alle Vitalitätsraten deutlich unter der unternehmensintern angestrebten Vitalität von mindestens 90 % (Abbildung 17 A). Die Werte bei einem Abfüllvolumen von 400 µl liegen bei 46 % bis 59 % beieinander. Für die Zellkonzentrationen 1E+7 c/ml bis 5E+7 c/ml ist dies der höchste Wert. Bei den Zellkonzentrationen 5E+6 c/ml und 1E+7 c/ml sinkt die Vitalität mit dem Abfüllvolumen, bei den restlichen ist unter Schwankungen keine

Tendenz zu erkennen. Bei gleichem Abfüllvolumen ist im Bereich  $\leq 100 \mu\text{l}$  je die Vitalität bei  $1\text{E}+7$  c/ml am niedrigsten und bei  $2,5\text{E}+7$  c/ml am höchsten.

Auftaukontrollen nach „wash“-Protokoll ergeben ebenfalls die höchsten Vitalitätsraten von 56 % bis 73% bei  $400 \mu\text{l}$  (Abbildung 17 **B**). In der Datenreihe der Zellkonzentration von  $5\text{E}+6$  c/ml sinkt die Vitalität mit dem Abfüllvolumen. Bei den übrigen Konzentrationen lässt sich diese Tendenz lediglich in den größeren Volumina bis  $80 \mu\text{l}$  erkennen. Bei gleichem Volumen ergeben unter  $200 \mu\text{l}$  die Kontrollen der Konzentration  $5\text{E}+6$  c/ml stets die höchste Vitalität und  $1\text{E}+7$  c/ml die geringste. Vergleicht man die verwendeten Protokolle, ist die Vitalität der Proben aller Konzentrationen bei  $400 \mu\text{l}$  nach „wash“-Protokoll höher. Auch die Ergebnisse der Zellkonzentrationen  $5\text{E}+6$  c/ml sind konstant höher.

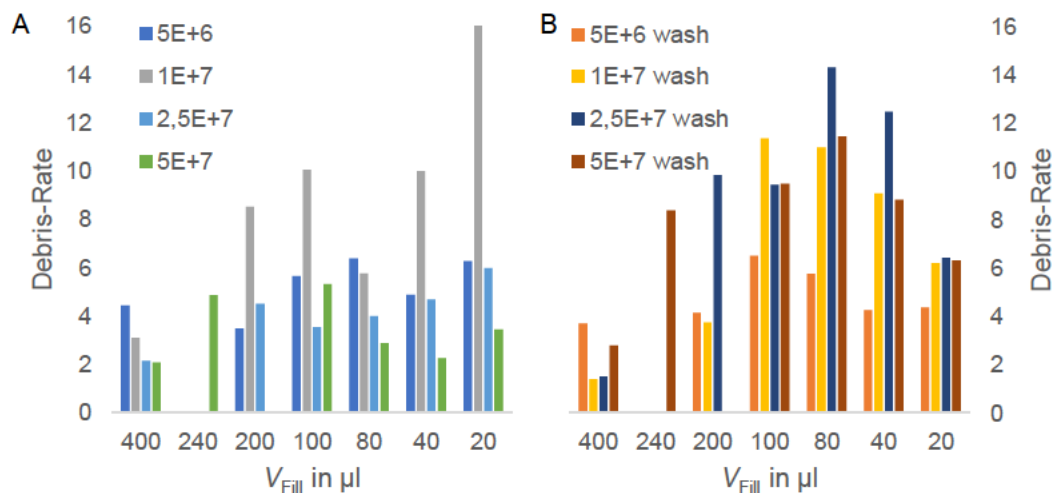


Abbildung 18: Debrisrate der Jurkat Zellen

Die Abbildung zeigt den Anteil der Debristeile in Bezug auf die Jurkat Lebendzellzahl. Die Messung wurde mittels CASY TT nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (**A**) und „wash“-Protokoll (**B**) bestimmt. Ergebnisse gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Nach dem „no wash“-Protokoll ergeben sich Raten zwischen 2,1 und 16,1. Raten zwischen 1,4 und 14,3 treten nach dem „wash“-Protokoll auf.

Die Debrisrate ergibt bei Messungen durch das CASY TT während der Kultur und nach Ernte und Abfüllen der Jurkat Zellen Werte bis 0,2. Im Vergleich dazu sind die Raten im Auftauversuch nach „no wash“-Protokoll mit 2,1 bis 16,1 deutlich höher (Abbildung 18 **A**). Die Werte der Zellkonzentration  $1\text{E}+7$  c/ml betragen 8,1 bis 16,1 in Volumina bis  $200 \mu\text{l}$  und sind damit deutlich größer als die Ergebnisse der restlichen Konzentrationen. Diese erreichen Raten bis 6,4.

Proben im Auftauprozess nach „wash“-Protokoll ergeben Werte von 1,4 bis 14,3 (Abbildung 18 **B**). Diese Raten sind damit ebenfalls erheblich größer als vor dem Einfrierprozess. Die niedrigsten Raten bis 3,7 treten bei einem Abfüllvolumen von

400  $\mu\text{l}$  auf. Bei Volumina unter 200  $\mu\text{l}$  ist bei gleichem Abfüllvolumen der Wert der Zellkonzentration  $5\text{E}+6$  c/ml am geringsten. Im Vergleich der verwendeten Protokolle ist keine universelle Tendenz festzustellen. Die ermittelten Raten der Zellkonzentration  $5\text{E}+7$  c/ml sind bei allen Volumina nach „wash“-Protokoll höher. Bei  $2,5\text{E}+7$  c/ml sind die Ergebnisse nach „wash“-Protokoll für Volumina  $\leq 200$   $\mu\text{l}$  größer.

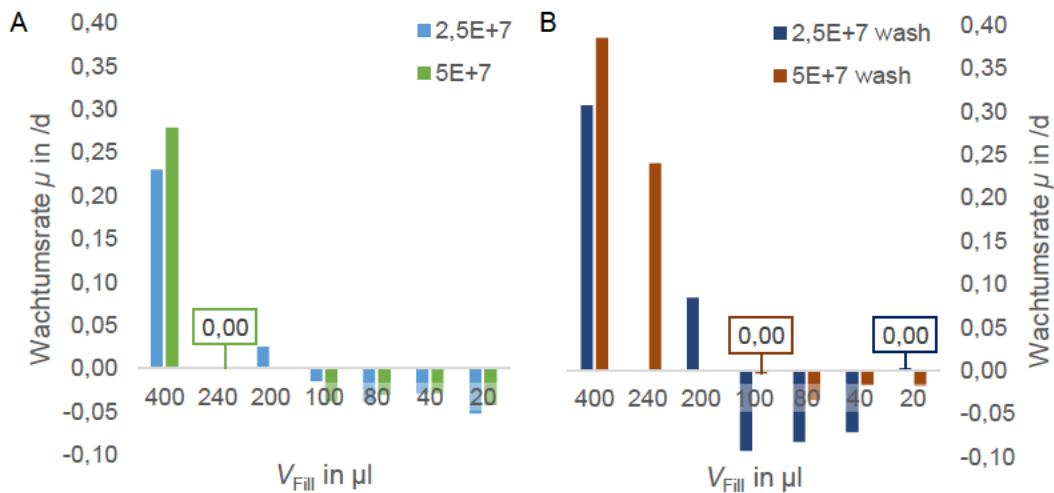


Abbildung 19: Wachstumsrate der Jurkat Zellen

Die Abbildung zeigt die Wachstumsrate der Jurkat Zellen im Resazurin-Assay. Der Assay wurde nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) durchgeführt. Ergebnisse gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Zellen der Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll erreichen bei 400  $\mu\text{l}$  Wachstumsraten zwischen 0,23 /d und 0,28 /d. Nach „wash“-Protokoll ergeben sich bei  $\geq 200$   $\mu\text{l}$  Raten von 0,08 /d bis 0,38 /d. Die übrigen Werte liegen unter 0,05 /d.

In der Kultur dieser Zelllinie ergab sich eine durchschnittliche Wachstumsrate von 0,72 /d. Diese dient im Resazurin-Assay als Vergleichswert. Durch Abweichungen in der Durchführung liegen belastbare Ergebnisse des Resazurin Assays nur für die Zellkonzentrationen  $2,5\text{E}+7$  c/ml und  $5\text{E}+7$  c/ml vor. Nach einem Auftauprozess nach „no wash“-Protokoll zeigen Zellen aus dem Abfüllvolumen von 400  $\mu\text{l}$  Wachstumsraten von 0,23 /d bis 0,28 /d (Abbildung 19 A). Damit wird der Vergleichswert nicht erreicht. Zu den verbleibenden Volumina gehören Werte um 0 /d, größtenteils negative.

Die Versuche nach „wash“-Protokoll ergeben bei Volumina  $\geq 200$   $\mu\text{l}$  Raten zwischen 0,08 /d und 0,38 /d. Die Rate sinkt mit dem Abfüllvolumen (Abbildung 19 B). Im Bereich  $\leq 100$   $\mu\text{l}$  liegen die Raten bei 0,00 /d und niedriger. Im Vergleich der Protokolle ist bei  $\geq 200$   $\mu\text{l}$  das Ergebnis nach „wash“-Protokoll höher. Werden Raten über 0,05 /d erreicht, liegt bei gleichem oder annähernd gleichem Volumen der Wert der Zellkonzentration  $5\text{E}+7$  c/ml über dem von  $2,5\text{E}+7$  c/ml.



Zum Zeitpunkt der Ernten wurden Aggregationsfaktoren von 1,15 bis 1,25 ermittelt. In den Auftauversuchen aller Parameterkombinationen wurden Aggregationsfaktoren zwischen 1,39 und 4,79 mit einem arithmetischen Mittelwert von 3,87 bestimmt. In den Datenreihen der Versuche nach „no wash“-Protokoll war bei identischem Abfüllvolumen der Faktor bei einer Zellkonzentration  $5E+6$  c/ml konstant niedriger als die übrigen Werte. Des Weiteren waren keine eindeutigen Tendenzen zu erkennen.

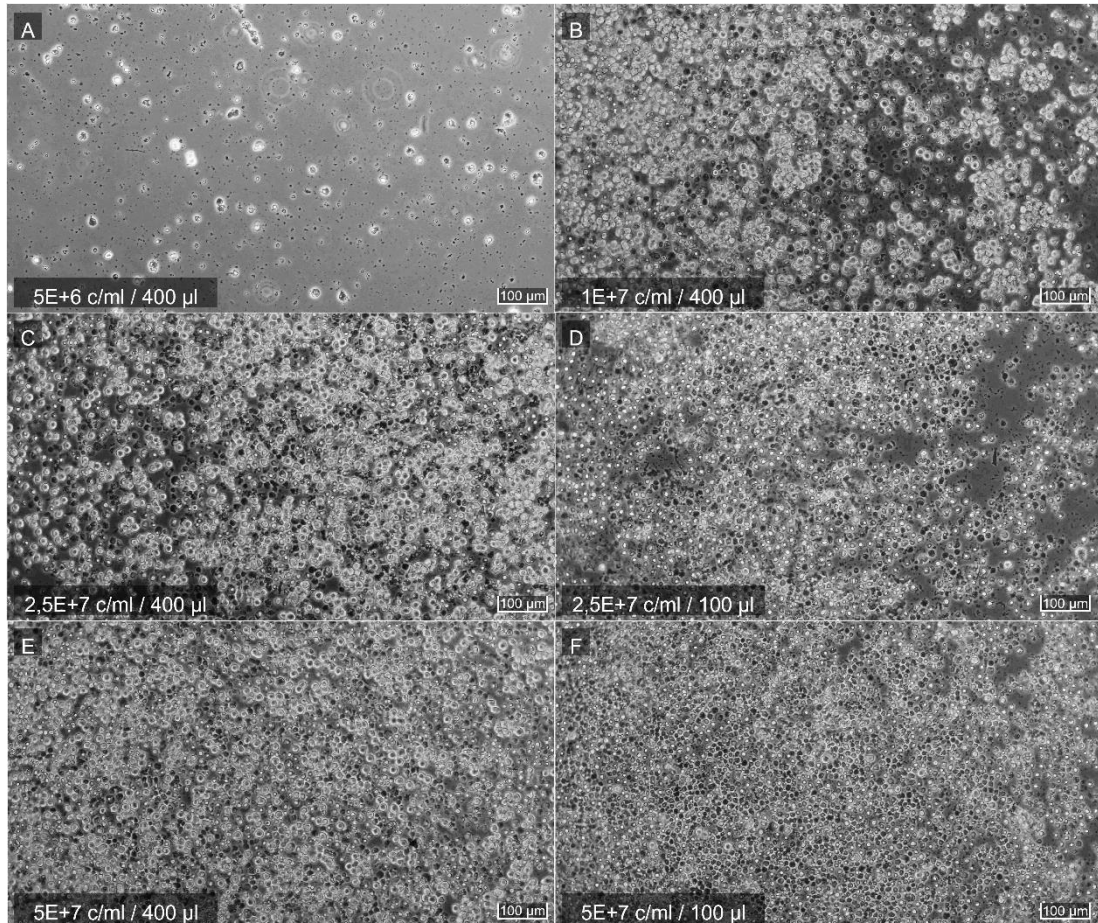


Abbildung 20: Jurkat Kulturen in Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll

Die Abbildung zeigt Jurkat Kulturen einen Tag nach der Aussaat in einer 24-well plate, nachdem diese dem Auftauprozess nach „no wash“-Protokoll unterzogen wurden. Die Zellen stammen aus *vials* mit den Parametern  $5E+6$  c/ml & 400 µl (A),  $1E+7$  c/ml & 400 µl (B),  $2,5E+7$  c/ml & 400 µl (C),  $2,5E+7$  c/ml & 100 µl (D),  $5E+7$  c/ml & 400 µl (E) und  $5E+7$  c/ml & 100 µl (F). Es sind eindeutige Zellschäden zu erkennen und wenige Zellen mit dem für Jurkat typischen Phänotyp. Bei kleineren Volumina nimmt der Anteil dieser Zellen weiter ab (D, F). Diese phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab entspricht 100 µm. Originalbilder bearbeitet. (Bilder: Böhle N.)

An den Jurkat Zellen sind in Kultur nach einem Auftauprozess nach „no wash“-Protokoll ein großer Anteil an beschädigten, deformierten oder toten Zellen und Zelldebris zu erkennen (Abbildung 20 A-F). Der Anteil an Zellen mit typischer, gesunder Morphologie sinkt mit dem Abfüllvolumen (vgl. Abbildung 5:

Jurkat Zellen). Eine homogen und ganzheitlich dieser Morphologie entsprechenden Kultur ist nicht vorhanden.

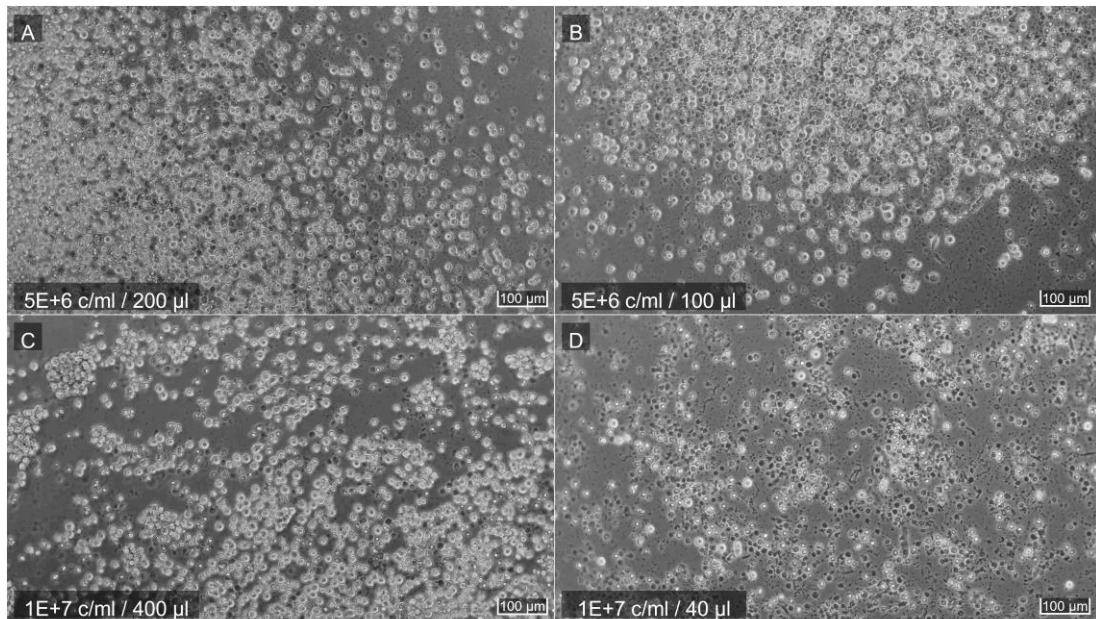


Abbildung 21: Jurkat Kulturen in Auftaukontrolle nach „wash“-Protokoll

Die Abbildung zeigt Jurkat Kulturen einen Tag nach der Aussaat in einer 24-well plate, nachdem diese dem Auftauprozess nach „wash“-Protokoll unterzogen wurden. Die Zellen stammen aus vials mit den Parametern 5E+6 c/ml & 200 µl (A), 5E+6 c/ml & 100 µl (B), 1E+7 c/ml & 400 µl (C) und 1E+7 c/ml & 40 µl (D). Es sind nur zum Teil Zellen mit dem für Jurkat typischen Phänotyp erkennbar. Zellschäden verschiedener Ausprägung sind zu erkennen, deren Anteil in kleineren Volumina zunimmt (B, D). Diese phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab entspricht 100 µm. Originalbilder bearbeitet. (Bilder: Böhle N.)

Nach dem Auftauprozess nach „wash“-Protokoll sind ebenfalls eindeutige Zellschäden zu erkennen. Der Anteil an Zellen von typischer Morphologie nimmt mit sinkendem Abfüllvolumen ab (Abbildung 21 A-D). Im Vergleich zu Kulturen nach dem „no wash“-Protokoll sind in hohen Abfüllvolumina von 400 µl hier höhere Anteile intakter Zellen zu erkennen. Insgesamt entspricht keine der untersuchten Kulturen in ihrer Morphologie den unternehmensinternen Ansprüchen an Assay Ready Cells.

### 3.3. U-2 OS

Kulturen der Zelllinie U-2 OS wurden in Zellkonzentrationen von 5,0E+6 c/ml, 1,0E+7 c/ml und 2,5E+7 c/ml in Volumina von 20 µl, 40 µl, 80 µl, 100 µl, 200 µl, und 400 µl abgefüllt und kryokonserviert. In der Auftaukontrolle wurden im „no wash“-Protokoll alle Volumina bei jeglichen Konzentrationen untersucht. Nach dem „wash“-Protokoll wurden sämtliche Volumina bei den Zellkonzentrationen von 5E+6 c/ml und 1E+7 c/ml betrachtet. Durch eine begrenzte Probenmenge konnte

die Konzentration  $2,5E+7$  c/ml nicht nach „wash“-Protokoll untersucht werden. In den Auftaukontrollen wurden die Proben wie in Kapitel 2.3 bis 2.6 beschrieben im CASY-Zellzählgerät vermessen. Das Resazurin-Assay sowie die morphologische Kontrolle wurden durchgeführt.

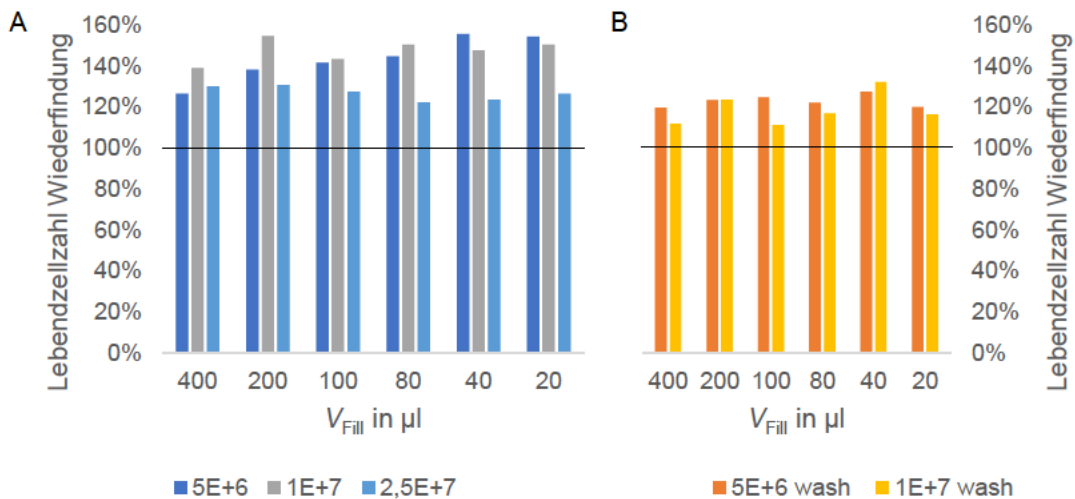


Abbildung 22: Wiederfindungsrate vitaler U-2 OS Zellen

Die Abbildung zeigt den Anteil der Lebendzellen in Bezug auf die theoretisch im *vial* enthaltene Zellzahl vitaler U-2 OS Zellen. Die Anzahl der Lebendzellen wurde nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) bestimmt. Zellzahl bei Abfüllung und Auftaukontrolle gemessen mittels CASY TT, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Vollständige *recovery* der Lebendzellen bei 100 % gekennzeichnet. Die Wiederfindungsrate liegt nach „no wash“-Protokoll zwischen 122 % und 155% und beträgt nach „wash“-Protokoll 111 % bis 132 %. Bei identischen Parametern ist die Rate nach „no wash“-Protokoll stets höher.

Zur Betrachtung der Wiederfindung der eingefrorenen Zellen wurde die Wiederfindungsrate ermittelt. Dazu wurde die in der Auftaukontrolle durch das CASY TT ermittelte Lebendzellzahl jedes *vials* zu der nach Abfüllung theoretisch vorhandenen Zellzahl ins Verhältnis gesetzt. In den Kontrollen nach „no wash“-Protokoll wurden Wiederfindungsraten zwischen 122 % und 155% festgestellt (Abbildung 22 A). Bei *vials* der Zellkonzentration  $5E+6$  c/ml steigt die Rate mit sinkendem Abfüllvolumen, bei  $1E+7$  c/ml ist keine eindeutige Tendenz erkennbar. Bei  $2,5E+7$  c/ml sinkt die Rate von 130 % bei Volumina bis 200 µl mit dem Volumen auf ca. 123 % ab 80 µl. Bei gleichem Abfüllvolumen ist die Rate bei einer Zellkonzentration von  $1E+7$  c/ml höher als bei  $2,5E+7$  c/ml. Bei 40 µl bis 20 µl ist die Rate bei  $5E+6$  c/ml am höchsten, bei größeren Volumina bei  $1E+7$  c/ml.

Auftauprozesse nach „wash“-Protokoll weisen Raten von 111 % bis 132 % auf (Abbildung 22 B). Es besteht keine eindeutige Tendenz bei Änderung des

Abfüllvolumens. Bei fast allen Volumina ist die Rate bei einer Zellkonzentration von  $5E+6$  c/ml höher als bei  $1E+7$  c/ml. In gleichem Abfüllvolumen und identischer Zellkonzentration ist die Wiederfindung stets nach „wash“-Protokoll geringer als nach „no wash“-Protokoll. Bei  $5E+6$  c/ml beträgt die Wiederfindung bei  $400\ \mu\text{l}$  im Verhältnis 5 % weniger und sinkt stetig mit dem Volumen auf -22 % bei  $20\ \mu\text{l}$ . Die Messwerte von  $1E+7$  c/ml liegen bei -11 % bis -23 %.

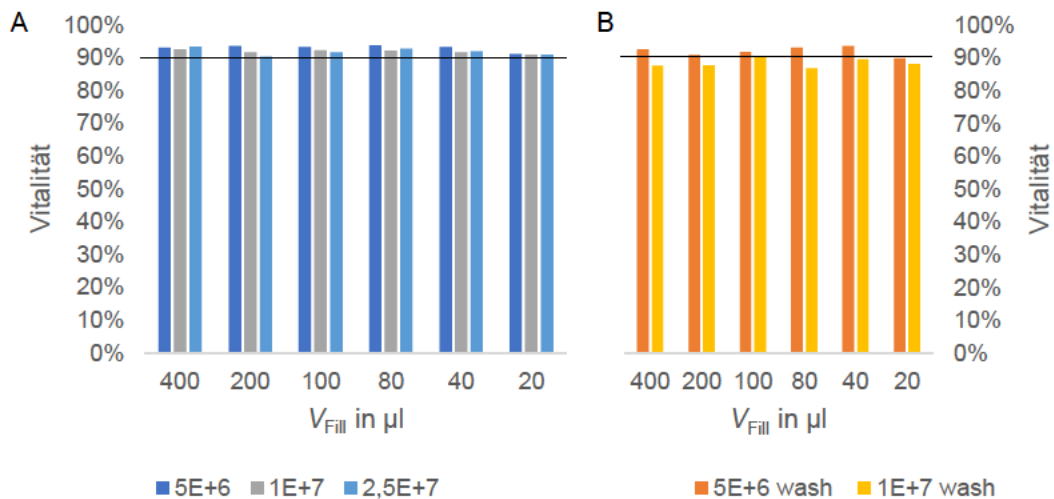


Abbildung 23: Vitalität der U-2 OS Zellen

Die Abbildung zeigt die Vitalität der U-2 OS Zellen, bestimmt nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B). Gemessen mittels CASY TT, gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Minimal angestrebte Vitalität der Lebendzellen von 90 % gekennzeichnet. Die Auftaukontrollen nach „no wash“-Protokoll und bei einer Zellkonzentration von  $5E+6$  c/ml nach „wash“-Protokoll ergeben Vitalitätsraten von 90 % bis 94 %. Bei  $1E+7$  c/ml nach „wash“-Protokoll resultieren Vitalitätsraten zwischen 87 % und 90 %.

Der Anteil vitaler Zellen in Auftaukontrollen nach „no wash“-Protokoll beträgt 90 % bis 94 % (Abbildung 23 A). Die Ergebnisse liegen alle in der intern angestrebten Vitalität von  $\geq 90\%$  und zugleich nah beieinander, sodass keine eindeutigen Tendenzen anzunehmen sind. Messungen nach dem „wash“-Protokoll ergeben in den Kontrollen von *vials* mit einer Zellkonzentration von  $5E+6$  c/ml Vitalitätsraten zwischen 90 % und 94 % (Abbildung 23 B). Bei  $1E+7$  c/ml beträgt die resultierende Vitalität 87 % bis 90 %. Lediglich die Ergebnisse bei einem Volumen von  $100\ \mu\text{l}$  und  $40\ \mu\text{l}$  liegen innerhalb der angestrebten Vitalität.



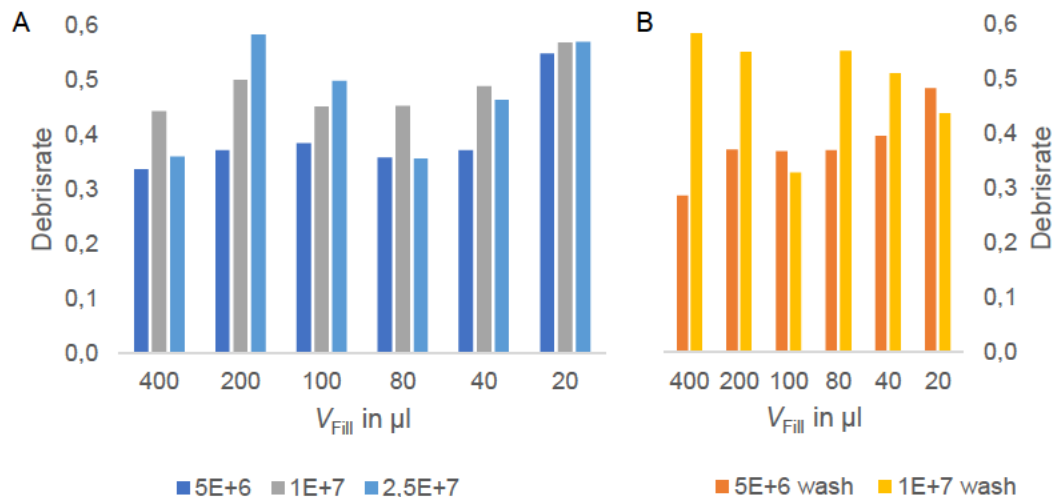


Abbildung 24: Debrisrate der U-2 OS Zellen

Die Abbildung zeigt den Anteil der Debristeile in Bezug auf die U-2 OS Lebendzellzahl. Die Messung wurde mittels CASY TT nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) bestimmt. Ergebnisse gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Nach dem „no wash“-Protokoll ergeben sich Raten zwischen 0,34 und 0,58, wobei die Werte gleicher Konzentration ohne Tendenz schwanken und sich bei 20  $\mu\text{l}$  alle auf 0,55 bis 0,57 annähern. Raten zwischen 0,29 und 0,58 treten nach dem „wash“-Protokoll auf. Dabei steigen die Raten bei  $5E+6$  c/ml mit geringerem Volumen an, während sie bei  $1E+7$  c/ml sinken.

Die Debrisrate wurde innerhalb des Messverfahrens am Zellzählgerät aus dem Verhältnis der Debristeile zur Lebendzellzahl automatisch ermittelt. Zum Zeitpunkt der Ernten wiesen die Kulturen Raten zwischen 0,14 und 0,26 auf. Die Ergebnisse der Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll betragen zwischen 0,34 und 0,58 (Abbildung 24 A). Füllvolumina von 400  $\mu\text{l}$  bis 40  $\mu\text{l}$  zeigen Ergebnisse der Zellkonzentration  $5E+6$  c/ml im Bereich von 0,34 bis 0,38. Bei  $1E+7$  c/ml variieren die Werte zwischen 0,44 und 0,50 und bei  $2,5E+7$  c/ml zwischen 0,36 und 0,58, je ohne eindeutige Tendenz. Die Kontrolle des Volumens von 20  $\mu\text{l}$  ergibt bei allen Konzentrationen einen gleichmäßigen Wert bei 0,55 bis 0,57. Bei gleichem Volumen weist die Datenreihe von  $5E+6$  c/ml meist das niedrigste Ergebnis auf und der Wert von  $1E+7$  c/ml ist stets größer. Der Auftauprozess nach „wash“-Protokoll zeigt Ergebnisse zwischen 0,29 und 0,58 (Abbildung 24 B). Die Werte der Zellkonzentration von  $5E+6$  c/ml steigen mit sinkendem Volumen von 0,29 auf 0,48 an. Bei  $1E+7$  c/ml sinkt die Rate mit dem Volumen von 0,58 stetig auf 0,44 ab, bis auf den Wert 0,33 bei 100  $\mu\text{l}$ . Bei gleichem Volumen liegt die Rate bei  $1E+7$  c/ml höher, außer bei den Volumina 100  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$ . Durch die Fluktuation der Werte ist keine eindeutige Tendenz im Vergleich der beiden Protokolle bei gleicher Konzentration zu erkennen.

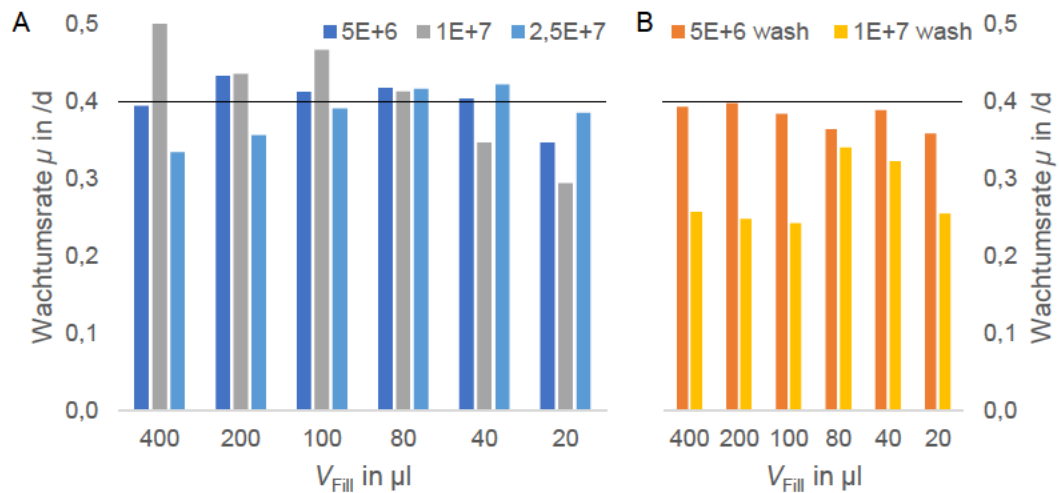


Abbildung 25: Wachstumsrate der U-2 OS Zellen

Die Abbildung zeigt die Wachstumsrate der U-2 OS im Resazurin-Assay. Der Assay wurde nach einem Auftauprozess mit „no wash“-Protokoll (A) und „wash“-Protokoll (B) durchgeführt. Ergebnisse gegen das Abfüllvolumen aufgetragen und nach Zellzahl pro ml eingefärbt. Vergleichswert aus Kultivierung bei 0,4 /d gekennzeichnet. Zellen aus Auftauprozessen nach „no wash“-Protokoll erreichen Wachstumsraten von 0,29 /d bis 0,50 /d. Zellen, die mittels „wash“-Protokoll aufgetaut wurden, unterschreiten den Vergleichswert bis auf 0,24 /d.

Die Wachstumsrate der Zellen als Ergebnis des Resazurin-Assays kann mit der durchschnittlichen Rate von 0,40 /d innerhalb der Kultivierung vor der Kryokonservierung verglichen werden (vgl. 2.6. Resazurin-basierter Proliferationsassay). Sie liegt nach einem Auftauprozess nach „no wash“-Protokoll zwischen 0,29 /d und 0,50 /d (Abbildung 25 A). Die Ergebnisse der Zellkonzentration von 5E+6 c/ml sinken im Bereich von 200 μl bis 20 μl mit schwindendem Volumen von 0,43 /d auf 0,35 /d. Die Werte bei 400 μl und 20 μl liegen unter 0,40 /d. Bei einer Konzentration von 1E+7 c/ml sinkt die Rate mit dem Volumen und unterschreitet ab 40 μl den Vergleichswert. Die Daten der Reihe von 2,5E+7 c/ml steigen von 400 μl bis 40 μl mit sinkendem Volumen an, wobei nur bei den Volumina 80 μl und 40 μl Werte über 0,40 /d erzielt werden. In den Volumina von 400 μl bis 100 μl weist je die Konzentration 1E+7 c/ml den größten Wert und 2,5E+7 c/ml den geringsten auf. Von 80 μl bis 20 μl zeigt 2,5E+7 c/ml die höchste und 1E+7 c/ml die kleinste Rate.

Die Wachstumsraten der Zellen aus Auftauprozessen nach „wash“-Protokoll liegen zwischen 0,24 /d und 0,40 /d (Abbildung 25 B). Bei gleicher Konzentration weist die Rate keine Trends durch verändertes Abfüllvolumen auf. Bei gleichem Volumen ist der Wert der Konzentration 5E+6 c/ml stets höher, erreicht jedoch nur bei 200 μl den Vergleichswert. Alle anderen Ergebnisse liegen darunter. Im Vergleich ist die Wachstumsrate nach „wash“-Protokoll bei 11 Ergebnissen geringer als nach

„no wash“-Protokoll. Die Ergebnisse der Konzentration  $5E+6$  c/ml sind außer bei  $20\mu\text{l}$  um bis zu 13 % geringer. Bei  $1E+7$  c/ml betragen die Raten 51 % bis 93 % im Verhältnis zum korrespondierenden Wert nach „no wash“-Protokoll.

Der Aggregationsfaktor wurde in den Ernten von 1,30 bis 1,52 bestimmt. Die Auftaukontrollen ergeben Werte zwischen 1,01 und 1,33.

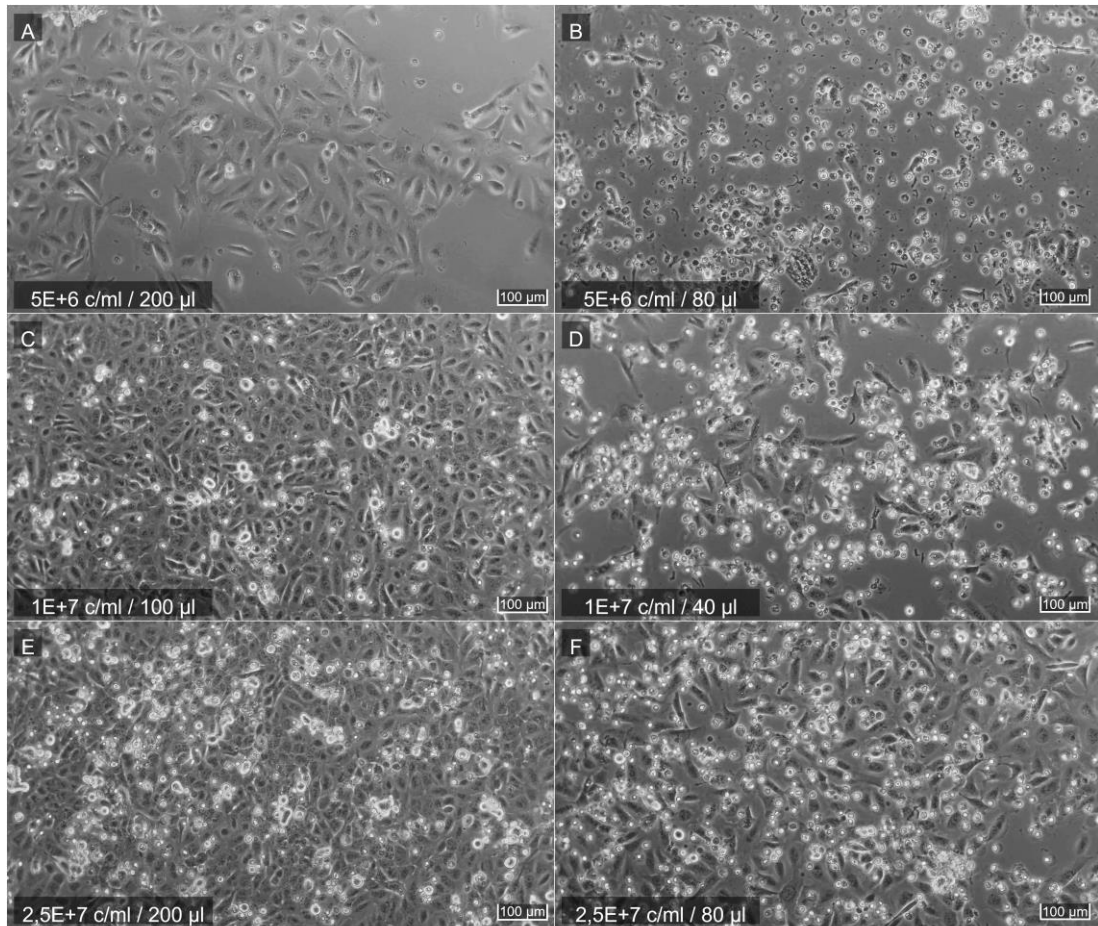


Abbildung 26: U-2 OS Kulturen in Auftaukontrolle nach „no wash“-Protokoll

Die Abbildung zeigt U-2 OS Kulturen einen Tag nach der Aussaat in einer 24-well plate, nachdem diese dem Auftauprozess nach „no wash“-Protokoll unterzogen wurden. Die Zellen stammen aus *vials* mit den Parametern  $5E+6$  c/ml &  $200\mu\text{l}$  (A),  $5E+6$  c/ml &  $80\mu\text{l}$  (B),  $1E+7$  c/ml &  $100\mu\text{l}$  (C),  $1E+7$  c/ml &  $40\mu\text{l}$  (D),  $2,5E+7$  c/ml &  $200\mu\text{l}$  (E) und  $2,5E+7$  c/ml &  $80\mu\text{l}$  (F). Die Kulturen aus größeren Volumina bilden im *layer* den für U-2 OS typischen Phänotyp (A, C, E). Bei kleineren Volumina sind vermehrt Zellschäden zu erkennen (B, D, F). Diese phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab entspricht  $100\mu\text{m}$ . Originalbilder bearbeitet. (Bilder: Böhle N.)

Die Abbildung 26 zeigt Auftaukontrollen nach dem „no wash“-Protokoll nach einem Tag in Kultur. Bei einer Zellkonzentration von  $5E+6$  c/ml zeigen die Zellen aus den Abfüllvolumina  $400\mu\text{l}$  und  $200\mu\text{l}$  ein adhärentes Wachstum im für U-2 OS typischen Phänotyp. Ab einem Volumen von  $100\mu\text{l}$  sind vermehrt nicht angewachsene oder beschädigte Zellen zu erkennen (Abbildung 26 A & B). Bei niedrigeren Volumina sind kaum Zellen angewachsen und die Mehrzahl erscheint beschädigt oder

zerstört. Die Kontrollen von  $1E+7$  c/ml weisen bis  $100\ \mu\text{l}$  über ihrem typischen *monolayer* vereinzelt nicht angewachsene und beschädigte Zellen auf. Diese nehmen unter  $80\ \mu\text{l}$  stark zu, während ein Teil der Zellen weiterhin anwächst (Abbildung 26 **C & D**). Bei  $2,5E+7$  c/ml nimmt in den Volumina über  $100\ \mu\text{l}$  der Anteil beschädigter und nicht angewachsener Zellen gegenüber den vorherigen Konzentrationen zu. Auch hier sind in niedrigen Volumina mehr schadhafte Zellen zu erkennen, es wachsen hier mehr Zellen an als bei den vorherigen Konzentrationen (Abbildung 26 **E & F**).

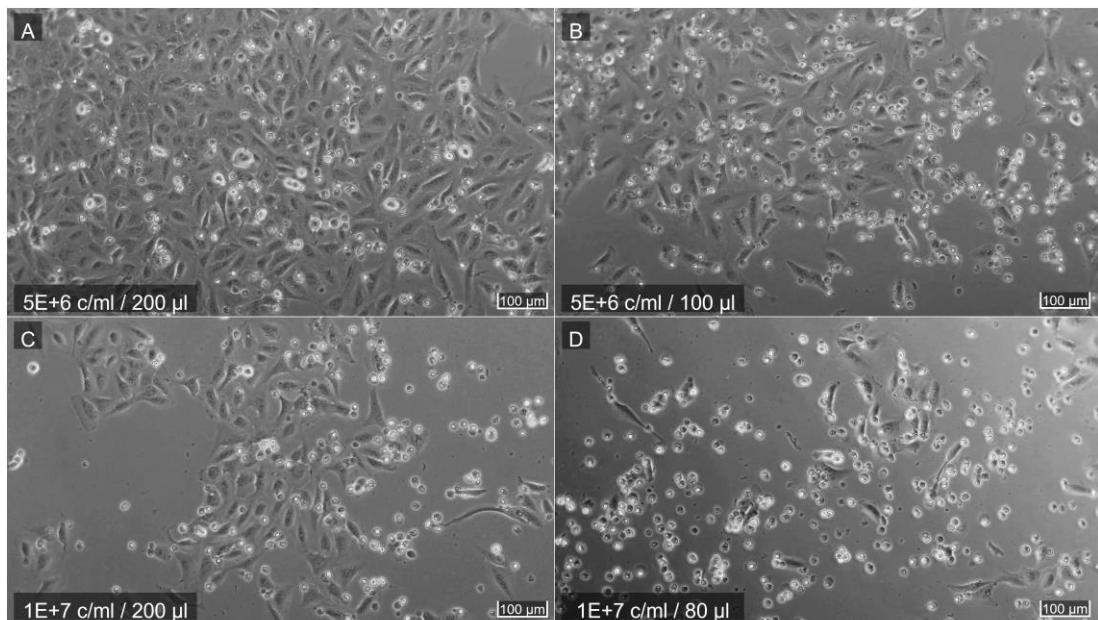


Abbildung 27: U-2 OS Kulturen in Auftaukontrolle nach „wash“-Protokoll

Die Abbildung zeigt U-2 OS Kulturen einen Tag nach der Aussaat in einer *24-well plate*, nachdem diese dem Auftauprozess nach „wash“-Protokoll unterzogen wurden. Die Zellen stammen aus *vials* mit den Parametern  $5E+6$  c/ml &  $200\ \mu\text{l}$  (**A**),  $5E+6$  c/ml &  $100\ \mu\text{l}$  (**B**),  $1E+7$  c/ml &  $200\ \mu\text{l}$  (**C**) und  $1E+7$  c/ml &  $80\ \mu\text{l}$  (**D**). Die Kulturen aus größeren Volumina bilden im *layer* den für U-2 OS typischen Phänotyp (**A**, **C**). Bei kleineren Volumina sind vermehrt Zellschäden zu erkennen (**B**, **D**). Diese phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstab entspricht  $100\ \mu\text{m}$ . Originalbilder bearbeitet. (Bilder: Böhle N.)

Zellen in Kultur nach einem Auftauprozess nach „wash“-Protokoll zeigen ebenfalls einen Anstieg der erkennbaren Schäden bei Volumina von  $100\ \mu\text{l}$  und niedriger (Abbildung 27 **B & D**). Bei einer Konzentration von  $5E+6$  c/ml sind in Kulturen aus kleinen Abfüllvolumina jedoch im Vergleich zum vorherigen Protokoll mehr intakte Zellen zu erkennen (Abbildung 27 **B**, vgl. Abbildung 26 **B**).

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Machbarkeit der Kryokonservierung von permanenten Zelllinien in Kleinstvolumina untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte der Zustand der Zellen nach diesem Einfrierprozess ermittelt werden. Auch der potenziell zellschonende und aufwandssparende Effekt eines Auftauprotokolls ohne Waschschrift durch Zentrifugation sollte betrachtet werden. Im praktischen Teil dieser Arbeit wurden die Zelllinien Hep-G2, Jurkat und U-2 OS nach angepassten Methoden der acCELLerate GmbH kultiviert, geerntet und in Kleinstvolumina eingefroren. Im Kryoprozess wurden Zellkonzentrationen zwischen  $5E+6$  c/ml und  $5E+7$  c/ml in Volumina von 20  $\mu$ l bis 400  $\mu$ l variiert. Im Auftauprozess wurde parallel der etablierte Waschschrift durch Zentrifugation sowie das alternative Protokoll ohne Waschschrift verwendet. In der Analytik wurden Zellzahl, Vitalitätsrate, Debrisrate, Wachstumsrate und Aggregationsfaktor bestimmt, sowie die Morphologie der Zellen betrachtet.

Der Einfrierprozess konnte in einem experimentellen Maßstab durchgeführt werden. Das Auftauprotokoll ohne Waschschrift reduzierte den Aufwand im Auftauprozess. Die Zellen zeigten zwischen den Zelllinien eindeutige Unterschiede in ihren Ergebnissen. Während U-2 OS Zellen bei den meisten Messparametern die Vergleichskriterien erfüllen konnten, verfehlten die Linien Hep-G2 und Jurkat größtenteils die Anforderungen an Assay Ready Cells (s. Kap. 3.1 S. 31).

### 4.1. Methodik

Während die Ergebnisse dieser Arbeit einen Einblick in die Kryokonservierung in Kleinstvolumina bieten, müssen bei der Diskussion der Ergebnisse folgende Haupteinflussfaktoren der Methodik beachtet werden:

Im Prozess der Ernte und des Abfüllens der Zellsuspension wurden die unterschiedlichen Zellkonzentrationen nicht aus einer Stammlösung angesetzt. Die einzelnen Zellkonzentrationen wurden an verschiedenen Versuchstagen aus unterschiedlichen Teilernten angesetzt. Durch äußere Einflüsse könnte es zu Unterschieden im Ernte- und Abfüllprozess gekommen sein. Auch eine Kultur selbst ist zeitlich nicht exakt konstant, sodass es mit steigender Passagenzahl zu abweichenden Parametern kommen kann. Diese würden als systematische und statistische Abweichungen zwischen den Zellkonzentrationen Einfluss in die Messergebnisse gefunden haben. Zur Optimierung des Versuchs sollten alle Parametervarianten aus derselben Stammlösung einer einzigen Ernte angesetzt

werden. Für die benötigten Zellzahlen in dieser Ernte wäre eine Kultur im größeren Umfang als im durchgeführten Versuch notwendig.

Das CASY-Zellzählgerät bestimmt Volumen und Durchmesser der Körper in der vermessenen Zellsuspension. Durch festgelegte Größenbereiche werden diese Körper dann als Debristeil, Tot- oder Lebendzelle erfasst und gezählt. Durch Aggregation könnten mehrere kleine Körper als ein größerer erfasst werden, wodurch die Ergebnisse von Vitalität und Zellzahl beeinträchtigt würden. Die rechnerische Korrektur über den Aggregationsfaktor wird als nicht genau eingeordnet. Unterscheidet sich der Grad der Aggregation zwischen Ernte und Auftaukontrolle, könnte dies zu einer systematischen Abweichung der Ergebnisse geführt haben.

Die Zellen bildeten in *wells* keine homogenen Kulturen, sodass die mikroskopische Photographie mit einem heterogenen Motiv konfrontiert war. Einzelne Aufnahmen konnten die Gesamtheit der Phänotypen einer Kultur nur bedingt repräsentieren. Die morphologische Einordnung war durch menschliche Betrachtung subjektiv und Anteile beschädigter oder toter Zellen waren nicht quantifizierbar.

#### **4.2. Hep-G2**

Die Hep-G2 Linie wurde basierend auf Erfahrungswerten im Labor als empfindlich eingeordnet. Schwankungen in der Wachstumsrate und ein Unterschreiten der gewünschten Vitalitätsrate in Kultur haben diese Einschätzung bestätigt. Aufgrund der bekannten Tendenz der Zellen zum Aggregieren in Kultur wurde ein verändertes Expansionsprotokoll verwendet (s. Kap. 2.2.2). Das Erstellen und Optimieren einer zellspezifischen Standardarbeitsanweisung sowie ein Training für diese Prozedur würden zu einer stabileren Kultur führen können. Zusätzlich wurde aufgrund der oben genannten Limitierung des CASY TT eine zusätzliche Zellzählung mittels Neubauerkammer angewandt. Diese Methode unterliegt durch die manuelle Durchführung äußeren Einflüssen. In einem vergleichenden Versuchsaufbau könnte überprüft werden, ob durch automatisierte Bild-basierte Zytometrie-Methoden Fehlerquellen reduziert werden ( Chan et al. 2015; Chan et al. 2017). Die Zählung mittels Neubauerkammer verliert im unteren Zählbereich an statistischer Belastbarkeit. Aufgrund des Versuchsaufbaus war eine Aufkonzentrierung der vermessenen Proben nicht möglich. Die Ergebnisse beider Zählmethoden wichen voneinander teilweise stark ab (s. Kap. 3.1 S. 31).

Die Vitalität der Hep-G2 Zellen unterschritt in der Auftaukontrolle den angestrebten Wert von 90 % und war geringer als zum Zeitpunkt der Ernte. Die Debrisrate überschritt die Messwerte zum Zeitpunkt der Ernte. Über einen Zeitraum von 3 Tagen zeigte keine Kultur in der Auftaukontrolle den typischen und gewünschten Phänotyp. Diese Ergebnisse wiesen auf eine Beschädigung eines Anteils der Zellen durch den Einfrier- und Auftauprozess hin. Die beschädigten Zellen waren besonders in der morphologischen Betrachtung sichtbar. Eine erfolgreiche Kryokonservierung von Hep-G2 Zellen war in diesem Versuchsaufbau nicht möglich. Die Zellen erfüllen nach dem Auftauen nicht die Kriterien für Assay Ready Cells (s. Kap. 3. S. 31).

Die Vitalität und Wachstumsrate sank mit geringerem Einfriervolumen, während die Debrisrate und der Anteil toter Zellen in der morphologischen Betrachtung mit geringerem Volumen stiegen. Die zellschädigende Wirkung des Verfahrens nimmt daher mit geringerem Volumen zu. Durch einen Waschschrift konnte der Anteil von Debristeilen verringert werden. Des Weiteren zeigte das Auftauprotokoll ohne Waschschrift keine Nachteile.

### **4.3. Jurkat**

In der Auftaukontrolle der Jurkat Zellen waren die Vitalitätsraten deutlich niedriger als die Vergleichswerte. Die ermittelten Wachstumsraten lagen größtenteils bei oder unter 0 /d. Die Debrisraten waren im Vergleich zum Zeitpunkt der Ernte vervielfacht. Die Zellen wiesen eine höhere Tendenz zur Aggregation auf. In der morphologischen Betrachtung war ein großer Anteil an Zellschäden zu erkennen. Aus diesen Ergebnissen ließ sich auf eine erhebliche Beschädigung der Zellen im Einfrier- und Auftauprozess schließen. Die Jurkat Zellen befanden sich in der Auftaukontrolle nicht in einem „Assay ready“-Zustand (s. Kap. 3. S. 31).

Die höchsten Vitalitätsraten traten tendenziell in höheren Abfüllvolumina auf. Die höchsten Wachstumsraten wurden bei einem Abfüllvolumen von 400 µl ermittelt und unter 200 µl ließ sich kein Wachstum der Zellen nachweisen. Bei geringeren Abfüllvolumina wurden die höchsten Debrisraten ermittelt. In der mikroskopischen Betrachtung schwand der Anteil morphologisch unbeschadeter Zellen mit sinkendem Abfüllvolumen. Daraus folgt, dass im Rahmen des Einfrier- und Auftauprozesses mit schrumpfenden Volumina eine stärkere zellschädigende Wirkung auftritt. Zusätzlich hatten bei geringeren Volumina jene Zellen, die im Zellzählgerät als Lebendzellen erfasst und ins Resazurin-Assay ausgesät wurden, jegliche Proliferationskapazität verloren.

Die Wiederfindungsraten der Lebendzellen waren in den Auftauversuchen ohne Waschschrift stets höher. Da es keine eindeutigen Unterschiede in der Aggregation der Zellen gab, waren die Zellzahlen der unterschiedlichen Auftauprotokolle vergleichbar. Durch den zusätzlichen Zentrifugationsschritt kam es im „wash“-Protokoll zu einem Lebendzellverlust. Die Abtrennung von Zelldebris war im Zentrifugationsschritt nicht erfolgreich. In den Datenreihen der Zellkonzentrationen  $2,5E+7$  c/ml und  $5E+7$  c/ml lagen die Debrisraten nach einem Waschschrift höher. Nach dem „wash“-Protokoll war bei größeren Abfüllvolumina ein höherer Anteil intakter Zellen in der mikroskopischen Kontrolle der Zellkulturen zu erkennen. Da der Zustand der Jurkat Zellen aus großen Abfüllvolumina von  $400\ \mu\text{l}$  bis  $200\ \mu\text{l}$  unbeschadeter war, waren diese Volumina zum Vergleichen der Protokolle von besonderem Interesse: Bei einem Abfüllvolumen von  $400\ \mu\text{l}$  waren nach dem „wash“-Protokoll geringere Lebendzellzahlen vorhanden, die Vitalitätsraten waren in dieser Zellsuspension jedoch höher als nach einem Waschschrift. In den Kulturen aus Abfüllvolumina von  $400\ \mu\text{l}$  bis  $200\ \mu\text{l}$  waren nach dem Auftauprozess nach „wash“-Protokoll höhere Wachstumsraten nachzuweisen. Zusammenfassend kam es bei den Jurkat Zellen zu Zellverlusten durch den Zentrifugationsschritt. Aus den schadensärmeren Abfüllvolumina von  $400\ \mu\text{l}$  bis  $200\ \mu\text{l}$  waren die verbleibenden Zellen nach einem Waschschrift im Vergleich in einem vitaleren und wachstumsfähigeren Zustand. Durch die Zentrifugation konnte ein höherer Anteil beschädigter Zellen abgetrennt werden.

#### 4.4. U-2 OS

In den Ergebnissen der Zelllinie U-2 OS lag die Wiederfindungsrate konstant über 100 %. Die Aggregation der Zellen hatte im Vergleich zur Ernte bei allen Proben abgenommen, sodass eine systematische Abweichung der Messwerte nicht auszuschließen ist. Die Vitalitäts- und Wachstumsraten erreichten nicht immer die Vergleichswerte, während die Debrisraten im Vergleich zur Ernte erhöht waren. In der morphologischen Überprüfung waren Zellschäden sichtbar. Insgesamt war eine zellschädigende Wirkung des Prozesses in einigen Ergebnissen zu erkennen. Die Morphologie der Kulturen in der Auftaukontrolle zeigten, dass mit sinkendem Abfüllvolumen auch bei dieser Zelllinie die erkennbaren Zellschäden zunehmen.

Der modifizierte Auftauprozess ohne Waschschrift ermöglichte im Vergleich eine höhere Wiederfindung und größere Wachstumsraten. Nach dem „no wash“-Protokoll wurde in den Kontrollen die angestrebte Vitalitätsrate konstant erreicht, während die Kontrollen nach einem Waschschrift diesen Wert teilweise unterschritten.



Kontrollen der Zellkonzentration  $2,5E+7$  c/ml aus  $\geq 200$   $\mu$ l zeigten nach dem Auftauprozess nach „no wash“-Protokoll geringere Wachstumsraten und einen erkennbaren Anteil morphologischer Zellschäden. Diese Schäden waren möglicherweise dadurch verursacht, dass im Kryoprozess durch höhere Zellkonzentrationen die Zellen um den begrenzten Raum in den Flüssigkeitskanälen zwischen den Eiskristallen konkurrieren würden. Die Ergebnisse von  $5E+6$  c/ml und  $1E+7$  c/ml nach „no wash“-Protokoll erfüllten bei Volumina  $\geq 100$   $\mu$ l die Kriterien für Assay Ready Cells (s. Kap. 3.1 S. 31). Für diese Parameter ist dieser Einfrier- und Auftauprozess im Versuch als erfolgreich anzusehen.

#### 4.5. Linienübergreifende Einordnung

Die Versuche an drei Zelllinien führten zu keinen einheitlichen Ergebnissen. Proben der Linien Hep-G2 und Jurkat konnten in den Auftaukontrollen nicht die Kriterien an Assay Ready Cells erfüllen und zeigten in den Ergebnissen teilweise starke Zellschäden. U-2 OS Zellen erwiesen sich dem Prozess gegenüber robuster. Für diese Linie gelang bei bestimmten Parametern eine erfolgreiche Kryokonservierung.

In dieser Versuchsreihe wurden erstmalig im Labor der acCELLerate GmbH Zellen in Kleinstvolumina ab 20  $\mu$ l eingefroren. Eine Messung der Medientemperatur in einem Probe-*vial* während der Kryokonservierung war mittels Messfühler durch das geringe Füllvolumen nicht möglich. Eine Steuerung des Prozesses anhand der Temperatur der Zellsuspension war dadurch nicht durchführbar. Um freigesetzte Kristallisationswärme abzuführen und einen möglichst linearen Temperaturabfall sicherzustellen, wurde für diese erste Versuchsreihe eine steile Abkühlrate von  $-45$   $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  gewählt. Die optimale Abkühlrate kann für verschiedene Zelllinien in Abhängigkeit von Begleitparametern deutlich über der etablierten Rate von  $-1$   $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  liegen (Mazur 1984). Dennoch lässt sich nicht ausschließen, dass die gewählte Rate zu hoch für eine oder mehrere der verwendeten Zelllinien war und es durch intrazelluläre Kristallisation zu Zellschäden kam (vgl. Kap. 1.3. & Abbildung 1). Darüber hinaus weisen Zelllinien aufgrund ihrer verschiedenen Eigenschaften abweichende Ansprüche in der Kryokonservierung auf. Daher könnten für die hier verwendeten Zelllinien unterschiedliche Kühlraten als optimal angesehen werden (Mazur 1984). Die Abweichung der Resultate verschiedener Linien decken sich mit einem vergleichbaren Versuch. Drei Zelllinien wurden in 200  $\mu$ l in identischen *vials* wie in dieser Arbeit abgefüllt, bei  $-1$   $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  eingefroren und durch Zugabe von warmem Medium aufgetaut. Nur eine der verwendeten Linien zeigte in Auftaukontrollen konstant einen vitalen Zustand (Focke 2018).

Die Versuche in dieser Arbeit zeigten an allen Linien eine Zunahme der Zellschäden mit sinkendem Abfüllvolumen. Durch schwindendes Volumen wächst die Abweichung vom etablierten Prozess in 1,8 ml. Durch Wechselwirkungen mit einem wachsenden Luftvolumen im *vial* an einer in Relation wachsenden Grenzschicht sind schadhafte Prozesse, wie das Verdampfen des CPA, nicht auszuschließen. In Anbetracht der sinkenden Tauzeiten sind auch schadhafte hohe Erwärmungsraten möglich, bei denen die Zellen durch das aufkonzentrierte Zytoplasma einen osmotischen Schock erleiden (Mazur 1984). Ein langsames Auftauen durch Zugabe kalten Mediums und einem Erwärmen in Inkubator oder Wasserbad könnte in vergleichenden Versuchen überprüft werden.

Der entfallene Waschschrift im „no wash“-Protokoll führte zu keinem eindeutigen Vorteil dieses Auftauprozesses. Durch das Protokoll verringerte sich der Zeit- und Arbeitsaufwand des Auftauprozesses. Im vulnerablen Zustand der Zellen direkt nach dem Auftauen ist ein schnellerer Übergang in Kulturbedingungen vorteilhaft. In den Versuchen der Linie Hep-G2 wurde durch den Waschschrift Debris abgetrennt. Bei Jurkat Zellen kam es im Waschschrift zwar zu einem erheblichen Zellverlust, die verbleibenden Zellen waren in hohen Füllvolumina jedoch in einem besseren Zustand. Bei den Ergebnissen der Linie U-2 OS kam es durch den Waschschrift ebenfalls zu einem Zellverlust. Durch den schonenderen Prozess im „no wash“-Protokoll waren die Zellen vitaler und proliferationsfähiger, sodass der Auftauprozess in diesem Teilversuch eindeutig vorteilhaft war.

#### **4.6. Fazit**

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren der Kryokonservierung ermöglichte es nicht, Zellen der Linien Hep-G2 und Jurkat im angestrebten Zustand zu erhalten. Nach den Auftauprozessen erfüllten sie nicht die an Assay Ready Cells gestellten Ansprüche. Ein Vorteil des modifizierten Auftauprotokolls ohne Waschschrift war nicht eindeutig zu erkennen.

In Versuchen der Zelllinie U-2 OS konnten aus Suspensionen von  $5E+6$  Zellen/ml und  $1E+7$  Zellen/ml in Gefriervolumina  $\geq 100 \mu\text{l}$  Zellen in einem vitalen und proliferationsfähigen Zustand wiedergewonnen werden. Das modifizierte Auftauprotokoll ohne Waschschrift bedingte nachweislich eine höhere Wiederfindung und weniger Zellschäden. Innerhalb dieser Grenzen war dieser Kryo- und Auftauprozess erfolgreich.

Durch die erkennbar schadhafte Wirkung sinkender Abfüllvolumina ist der untersuchte Prozess mit den verwendeten Kryobehältnissen nicht geeignet, die genannten Linien in Volumina unter 100 µl zu konservieren. Unterschiede im Ausmaß der Zellschäden zwischen den Linien waren evident, sodass variierende Ergebnisse in Versuchen mit weiteren Linien wahrscheinlich sind. Für eine breitere Erkenntnislage sind weitere Versuche mit anderen Zelllinien erforderlich. Eine Verbesserung des Prozesses durch veränderte Abkühlraten ist möglich; auch hier sind weiterführende Versuche sinnvoll.

Die erfolgreiche Kryokonservierung von U-2 OS Zellen war im experimentellen Maßstab durchführbar. Durch das manuelle Abfüllen sind den Möglichkeiten des *scale-up* Grenzen gesetzt. Für einen vergrößerten Produktionsmaßstab mit einem automatisierten Abfüllprozess wäre ein für diese Volumina geeigneter Abfüllautomat notwendig.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abraham, Robert T.; Weiss, Arthur (2004): Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. In: *Nat Rev Immunol* 4 (4), S. 301–308. DOI: 10.1038/nri1330.
- Acker, Jason P.; McGann, Locksley E. (2003): Protective effect of intracellular ice during freezing? In: *Cryobiology* 46 (2), S. 197–202. DOI: 10.1016/S0011-2240(03)00025-7.
- Aden, D. P.; Fogel, A.; Plotkin, S.; Damjanov, I.; Knowles, B. B. (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. In: *Nature* 282 (5739), S. 615–616. DOI: 10.1038/282615a0.
- Amann, R. P.; Pickett, B. W. (1987): Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. In: *Journal of Equine Veterinary Science* 7 (3), S. 145–173. DOI: 10.1016/S0737-0806(87)80025-4.
- ATCC: Jurkat, Clone E6-1. TIB-152 Product Sheet.
- Best, Benjamin P. (2015): Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. In: *Rejuvenation research* 18 (5), S. 422–436. DOI: 10.1089/rej.2014.1656.
- DIN EN ISO 10993-5:2009-10, 2009: Biologische Beurteilung von Medizinprodukten\_- Teil\_5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO\_10993-5:2009); Deutsche Fassung EN\_ISO\_10993-5:2009.
- Brockbank, K.G.M.; Convault, J. C.; Taylor, M. J. (2007): Cryopreservation Guide. Hg. v. Thermo Fischer. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.co.nz/Uploads/file/Scientific/Applications/Equipment-Furniture/Cryopreservation-Guide.PDF>, zuletzt geprüft am 26.11.2022.
- Bueno, C.; Villegas, M. L.; Bertolotti, S. G.; Previtali, C. M.; Neumann, M. G.; Encinas, M. V. (2002): The Excited-State Interaction of Resazurin and Resorufin with Amines in Aqueous Solutions. Photophysics and Photochemical Reaction. In: *Photochemistry and Photobiology* 76 (4), S. 385–390. DOI: 10.1562/0031-8655(2002)0760385TESIOR2.0.CO2.
- Cawkill, Darren; Eaglestone, Simon S. (2007): Evolution of cell-based reagent provision. In: *Drug discovery today* 12 (19-20), S. 820–825. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.08.014.

- Chan, Leo Li-Ying; Kuksin, Dmitry; Lavery, Daniel J.; Saldi, Stephanie; Qiu, Jean (2015): Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. In: *Cytotechnology* 67 (3), S. 461–473. DOI: 10.1007/s10616-014-9704-5.
- Chan, Leo Li-Ying; McCulley, Kelsey J.; Kessel, Sarah L. (2017): Assessment of Cell Viability with Single-, Dual-, and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1601, S. 27–41. DOI: 10.1007/978-1-4939-6960-9\_3.
- Chen, Hui-Ling; Chiu, Ting-Shan; Chen, Pei-Jer; Chen, Ding-Shinn (1993): Cytogenetic studies on human liver cancer cell lines. In: *Cancer Genetics and Cytogenetics* 65 (2), S. 161–166. DOI: 10.1016/0165-4608(93)90227-D.
- Chen, Jian Lin; Steele, Terry W. J.; Stuckey, David C. (2018): Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. In: *Biotechnology and Bioengineering* 115 (2), S. 351–358. DOI: 10.1002/bit.26475.
- Csepregi, Rita; Lemli, Beáta; Kunsági-Máté, Sándor; Szente, Lajos; Kőszegi, Tamás; Németi, Balázs; Poór, Miklós (2018): Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay? In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (2). DOI: 10.3390/molecules23020382.
- DiMasi, Joseph A.; Grabowski, Henry G.; Hansen, Ronald W. (2016): Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. In: *Journal of health economics* 47, S. 20–33. DOI: 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012.
- Exner, Cornelia; Limbach, Christoph (2016): Tierversuche in der Forschung. Stand: 01.02.2016. Hg. v. Cornelia Exner und Christoph Limbach. Bonn: DFG.
- Focke, Lukas (2018): Etablierung von Assay Ready Frozen Cells für den Einsatz im zellbasierten Biokompatibilitätsnachweis bei der Prüfung von Medizinprodukten.
- Gillis, S.; Watson, J. (1980): Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. In: *The Journal of Experimental Medicine* 152 (6), S. 1709–1719. DOI: 10.1084/jem.152.6.1709.
- Gstraunthaler, Gerhard; Lindl, Toni (2021): Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 8. Auflage. Berlin [u.a.]: Springer Spektrum.

- Kamihira, Shimeru; Terada, Chiharu; Sasaki, Daisuke; Yanagihara, Katsunori; Tsukasaki, Kunihiro; Hasegawa, Hiroo; Yamada, Yasuaki (2009): Aberrant p53 protein expression and function in a panel of hematopoietic cell lines with different p53 mutations. In: *European journal of haematology* 82 (4), S. 301–307. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2009.01211.x.
- Kaplan, Joseph; Peterson, Ward D. (1976): Detection of T-Cell Lymphoma-associated Antigens on Cord Blood Lymphocytes and Phytohemagglutinin-stimulated Blasts. In: *Cancer Res* 36 (9\_Part\_2), S. 3471–3475. Online verfügbar unter [https://aacrjournals.org/cancerres/article/36/9\\_Part\\_2/3471/481455/Detection-of-T-Cell-Lymphoma-associated-Antigens](https://aacrjournals.org/cancerres/article/36/9_Part_2/3471/481455/Detection-of-T-Cell-Lymphoma-associated-Antigens).
- Kirkpatrick, C. J.; Bittinger, F.; Wagner, M.; Köhler, H.; van Kooten, T. G.; Klein, C. L.; Otto, M. (1998): Current trends in biocompatibility testing. In: *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* 212 (2), S. 75–84. DOI: 10.1243/0954411981533845.
- Knowles, Barbara B.; Aden, David P. (1980): human hepatomaderived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor am 12.06.1980. Anmeldenr: 158685. Veröffentlichungsnr: 4393133.
- López-Terrada, Dolores; Cheung, Sau Wai; Finegold, Milton J.; Knowles, Barbara B. (2009): Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. In: *Human Pathology* 40 (10), S. 1512–1515. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.07.003.
- Majka, M.; Rozmyslowicz, T.; Honczarenko, M.; Ratajczak, J.; Wasik, M. A.; Gaulton, G. N.; Ratajczak, M. Z. (2000): Biological significance of the expression of HIV-related chemokine coreceptors (CCR5 and CXCR4) and their ligands by human hematopoietic cell lines. In: *Leukemia* 14 (10), S. 1821–1832. DOI: 10.1038/sj.leu.2401891.
- Mazur, P. (1963): KINETICS OF WATER LOSS FROM CELLS AT SUBZERO TEMPERATURES AND THE LIKELIHOOD OF INTRACELLULAR FREEZING. In: *The Journal of general physiology* 47 (2), S. 347–369. DOI: 10.1085/jgp.47.2.347.
- Mazur, P. (1984): Freezing of living cells: mechanisms and implications. In: *The American journal of physiology* 247 (3 Pt 1), C125-42. DOI: 10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125.
- Mazur, P. (1985): Basic concepts in freezing cells (Oak Ridge National Lab., TN (USA), CONF-8508192-1). Online verfügbar unter <https://www.osti.gov/biblio/5494329>.

- McKenzie, D. A. (1962): Milk Testing - a forward look. In: *International Journal of Dairy Technology* 15 (4), S. 207–212. DOI: 10.1111/j.1471-0307.1962.tb01021.x.
- Mersch-Sundermann, Volker; Knasmüller, Siegfried; Wu, Xin-jiang; Darroudi, Firouz; Kassie, Fekadu (2004): Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. In: *Toxicology* 198 (1-3), S. 329–340. DOI: 10.1016/j.tox.2004.02.009.
- Nietzki, R.; Dietze, August; Mäckler, H. (1889): Ueber Weselsky's Resorcinfarbstoffe. In: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 22 (2), S. 3020–3038. DOI: 10.1002/cber.188902202225.
- Paul, Steven M.; Mytelka, Daniel S.; Dunwiddie, Christopher T.; Persinger, Charles C.; Munos, Bernard H.; Lindborg, Stacy R.; Schacht, Aaron L. (2010): How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. In: *Nature reviews. Drug discovery* 9 (3), S. 203–214. DOI: 10.1038/nrd3078.
- Pautke, Christoph; Schieker, Matthias; Tischer, Thomas; Kolk, Andreas; Neth, Peter; Mutschler, Wolf; Milz, Stefan (2004): Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. In: *Anticancer research* 24 (6), S. 3743–3748.
- Pontén, J.; Saksela, E. (1967): Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. In: *International journal of cancer* 2 (5), S. 434–447. DOI: 10.1002/ijc.2910020505.
- Rajan, Robin; Matsumura, Kazuaki (2018): Development and Application of Cryoprotectants. In: *Advances in experimental medicine and biology* 1081, S. 339–354. DOI: 10.1007/978-981-13-1244-1\_18.
- Schmitz, Sabine (2020): *Der Experimentator: Zellkultur*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- 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. In: *International journal of cancer* 19 (5), S. 621–626. DOI: 10.1002/ijc.2910190505.
- Schwenk, H. U.; Schneider, U. (1975): Cell cycle dependency of a T-cell marker on lymphoblasts. In: *Blut* 31 (5), S. 299–306. DOI: 10.1007/BF01634146.
- Snow, K.; Judd, W. (1987): Heterogeneity of a human T-lymphoblastoid cell line. In: *Experimental Cell Research* 171 (2), S. 389–403. DOI: 10.1016/0014-4827(87)90171-6.

Stacey, Glyn (2004): 15 Fundamental Issues for Cell Line Banks in Biotechnology and Regulatory Affairs. Online verfügbar unter [https://www.researchgate.net/profile/glyn-stacey/publication/254957901\\_15\\_fundamental\\_issues\\_for\\_cell\\_line\\_banks\\_in\\_biotechnology\\_and\\_regulatory\\_affairs](https://www.researchgate.net/profile/glyn-stacey/publication/254957901_15_fundamental_issues_for_cell_line_banks_in_biotechnology_and_regulatory_affairs).

Twigg, R. S. (1945): Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin. In: *Nature* 155 (3935), S. 401–402. DOI: 10.1038/155401a0.

van Breemen, Richard B.; Li, Yongmei (2005): Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. In: *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 1 (2), S. 175–185. DOI: 10.1517/17425255.1.2.175.

Weselsky, P. (1872): Ueber die Azoverbindungen des Resorcins. In: *Ann. Chem. Pharm.* 162 (2-3), S. 273–292. DOI: 10.1002/jlac.18721620207.

Zaman, Guido J. R.; Roos, Jeroen A. D. M. de; Blumenröhr, Marion; van Koppen, Chris J.; Oosterom, Julia (2007): Cryopreserved cells facilitate cell-based drug discovery. In: *Drug discovery today* 12 (13-14), S. 521–526. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.05.008.