

Untersuchungen zum Einsatz der Elektrofusionstechnik für die
Herstellung von Lymphozytenhybridomen unter besonderer Berücksichtigung
der Methodenoptimierung und -erweiterung

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.

Dem Wissenschaftlichen Rat der Universität Leipzig vorgelegt von

Diplom-Biologe Bertolt Seidel
geb. am 06.01.1958 in Leipzig

angefertigt an der
Universität Leipzig
Sektion Biowissenschaften
Bereich Tierphysiologie und Immunbiologie

betreut von Prof. Dr. rer. nat. habil. Helmut Fiebig
Sektion Biowissenschaften
Bereich Tierphysiologie und Immunbiologie

Dezember 1991

Beschluß über die Verleihung des akademischen Grades
Doktor eine Wissenschaftszweiges vom **20. Okt. 1992**



Ge-2-4-10
T

W. 5. 1. 2.

W. 7. 1. 2.

1. 2. 3.

1. 2. 3.

Bibliographische Beschreibung:

Seidel, Bertolt

Untersuchungen zum Einsatz der Elektrofusionstechnik für die Herstellung von Lymphozytenhybridomen unter besonderer Berücksichtigung der Methodenoptimierung und -erweiterung

Leipzig, Universität, Diss. A

Dezember 1991

124 S., 163 Lit., 29 Abb., 7 Tab.

Referat:

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Anwendung der Elektrofusionsmethode in der Hybridomtechnik mit dem Ziel ihrer Effektivierung. Der Vergleich mit parallel durchgeführten chemisch vermittelten Zellhybridisierungen bestätigt eine eindeutige Verbesserung der absoluten Fusionsfrequenzen unter Anwendung der Elektrofusion. Als die wesentlichen Faktoren, die den Fusionserfolg determinieren, werden primär solche erkannt, die die Zellkulturbedingungen beeinflussen. Hingegen spielen die Parameter, die sich aus der elektrischen Behandlung der Zellsuspension ergeben, innerhalb des jeweils untersuchten Meßbereiches eher eine untergeordnete Rolle.

Mittels Rezeptor-vermittelter Elektrofusion läßt sich teilweise eine Erhöhung der spezifischen Fusionsfrequenz auf das mehr als Dreifache erzielen. Nach zytofluorimetrischer Sortierung der zur Fusion eingesetzten Maus-Milzzellen steigt die spezifische Fusionsfrequenz um etwa das Achtfache.

Weiterhin wird die besondere Eignung der Elektrofusion für die Herstellung von Hybrid-Hybridomen nach FACS-Sortierung der Fusionsprodukte nachgewiesen. Unter Anwendung eines fluoreszierenden Antigens und der dagegen gerichteten bispezifischen monoklonalen Antikörper ergeben sich konkrete Ansatzpunkte für alternative fluoreszenzimmunologische Detektionsverfahren.

INHALTSVERZEICHNIS

0.	Abkürzungsverzeichnis	I-II
1.	Einleitung	1
	Die elektrisch induzierte Zellfusion als Methode in der Hybridomtechnik - Ein Literaturüberblick	13
2.	Material und Methoden	22
2.1.	Tiermaterial	22
2.2.	Zur Immunisierung eingesetzte Antigene	22
2.2.1.	Zelluläre Antigene	22
2.2.2.	Protein-Antigene	23
2.3.	Zellkulturarbeiten	24
2.3.1.	PEG-Zellfusionen	24
2.3.2.	Materialien und Substanzen	24
2.3.3.	Kultivierung und Konservierung der Hybridome	27
2.3.4.	Myelom- und Hybridomzelllinien für die Zellfusionen	27
2.4.	Elektrofusion	28
2.4.1.	Gerätetechnik	28
2.4.2.	Elektrodenkammern	29
2.4.3.	Vorbehandlung der Zellen	30
2.4.3.1.	Myelomzellen	30
2.4.3.2.	Milzzellen	30
2.4.4.	Fusionsmedien	31
2.4.5.	Arbeitsschritte bei der Elektrofusion lymphoider Zellen	32
2.4.5.1.	Arbeit mit der Plattenkammer	32
2.4.5.2.	Arbeit mit der Objektträgerkammer	34
2.4.5.3.	Arbeit mit der Mäanderkammer	35
2.5.	Ermittlung der Fusionsfrequenzen und Primärscreening	35
2.5.1.	ELISA	36
2.5.2.	Indirekte Immunfluoreszenz	37
2.5.3.	Immunhistochemische Untersuchungen	37
2.6.	Zellmarkierungen	38
2.6.1.	Biotinylierung von Myelomzellen bzw. Hybridomzellen	38
2.6.2.	Fluoreszenzmarkierung von Hybridomzellen	38
2.6.3.	R-PE-Markierung von antigenbindenden Milzzellen	38

2.7.	Herstellung von Konjugaten	39
2.7.1.	Antigen-Avidin-Konjugate	39
2.7.2.	Haptenisierungen	39
2.8.	Versuche zur Rezeptor-vermittelten Elektrofusion	40
2.8.1.	Avidin-Biotin-Methode nach LO et al. (1984)	40
2.8.2.	Avidin-Biotin-Brückenmethode nach WOJCHOWSKI und SYTKOWSKI (1986)	40
2.9.	Zellsortierungen am FACS	41
2.10.	Isotypbestimmung	41
2.11.	Statistik	41
3.	Ergebnisse	42
3.1.	Fusionsfrequenzen der durchgeführten Elektro- fusionen zur Herstellung von murinen Hybri- domen	42
3.2.	Vergleich der parallel durchgeführten Elektro- bzw. PEG-Fusionen hinsichtlich ihrer Fusions- frequenzen	44
3.3.	Abhängigkeit der absoluten Fusionsfrequenz von ausgewählten Parametern	48
3.3.1.	Einfluß des numerischen Verhältnisses der Zellzahlen beider Fusionspartner (Milzzellen : Myelomzellen)	48
3.3.2.	Absolute Fusionsfrequenzen nach Fusionen mit kryokonservierten Mausmilzzellen	49
3.3.3.	Einfluß von Pronase-Vorbehandlung der Myelom- zellen auf die absolute Fusionsfrequenz	51
3.3.4.	Einfluß der Vitalität der Myelomzellen auf die absolute Fusionsfrequenz	52
3.3.5.	Einfluß des Blastenanteils in der Milzzell- population auf die Fusionsfrequenz	53
3.3.6.	Einfluß des "feeder cell layer" auf die abso- lute Fusionsfrequenz	54
3.3.7.	Einfluß des Separierens der mononukleären Zellen aus der Milzzellsuspension durch Dichtegradientenzentrifugation	55
3.3.8.	Einfluß des Zellkulturmediums auf die abso- lute Fusionsfrequenz	56
3.3.9.	Einfluß des Fusionsmediums auf die absolute Fusionsfrequenz	57
3.3.10.	Einfluß der Frequenz des elektrischen Wechselfeldes für die Zelldielektrophorese auf die absolute Fusionsfrequenz	58

3.3.11.	Einfluß der Dauer des elektrischen Wechsel- feldes für die Zelldielektrophorese auf die absolute Fusionsfrequenz	59
3.3.12.	Einfluß der Feldstärke des elektrischen Wechselfeldes für die Zelldielektrophorese auf die absolute Fusionsfrequenz	60
3.3.13.	Einfluß der Dauer des Gleichstromimpulses auf die absolute Fusionsfrequenz	61
3.3.14.	Einfluß der Feldstärke des Gleichstrom- impulses auf die absolute Fusionsfrequenz	62
3.3.15.	Einfluß der Anzahl der Gleichstromimpulse auf die absolute Fusionsfrequenz	63
3.4.	Versuche mit verschiedenen Kammertypen	64
3.4.1.	Versuche mit kleinen Zellzahlen in der Plattenkammer	64
3.4.2.	Versuche mit der Objektträgerkammer	65
3.4.3.	Versuche mit der Mäanderkammer nach KATENKAMP	66
3.5.	Versuche zur Erhöhung der spezifischen Fusionsfrequenz	67
3.5.1.	Avidin-Biotin-Methode nach LO et al. (1984)	67
3.5.2.	Avidin-Biotin-Brückenmethode nach WOJCHOWSKI und SYTKOWSKI (1986)	68
3.5.3.	Fusion mit FACS-sortierten Milzzellen	69
3.6.	Elektrofusionen zur Herstellung von Hybrid- Hybridomen, die bispezifische Antikörper pro- duzieren	70
3.7.	Fotografische Dokumentation von Zellhybriden nach Elektrofusion	75
4.	Diskussion	76
5.	Zusammenfassung	97
6.	Literatur	101
7.	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	123

Abkürzungen

2-ME	2-Merkaptoethanol
a.c.	alternating current (Wechselstrom)
ACh-BSA	Azetylcholin-Rinderserumalbumin-Konjugat
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)
Ag	Antigen
BNHS	Biotinyl-N-Hydroxysuccinimid
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	cluster of differentiation
ConA	Concanavalin A
d.c.	direct current (Gleichstrom)
DE	Dielektrophorese
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EF	Elektrofusion
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FF _a	Absolute Fusionsfrequenz
FF _a /Mi	Absolute Fusionsfrequenz, bezogen auf Milzzellen
FF _a /My	Absolute Fusionsfrequenz, bezogen auf Myelomzellen
FF _s	Spezifische Fusionsfrequenz
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
Fab	antigen-binding fragment
Fc	crystallizable fragment
GZZ	Gesamtzellzahl
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HF	Hochfrequenz
HGPRT	Hypoxanthin-Guanidin-Phosphoribosyltransferase
HLA	human leucocyte antigen
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HT	Hypoxanthin-Thymidin

II

IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IMDM	Iscove's Modified Dulbeccos Medium
i.p.	intraperitoneal
KFA	Komplettes FREUND'sches Adjuvans
KLH	keyhole limpet hemocyanine
LGL	large granular lymphocytes
LPS	Lipopolysaccharid
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
o-PD	ortho-Phenylendiamin
p.a.	pro analysi
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (0,15 M NaCl; 0,01 M Phosphat; pH 7,4)
PBS/Azid	PBS, 0,02 % Natriumazid enthaltend
PBS/Tween	PBS, 0,05 % Tween 20 enthaltend
PCC	premature chromosome condensing
PEG	Polyethylenglykol
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
RF	REISSNER'scher Faden
R-PE	R-Phycoerythrin
s.d.	standard deviation of mean (Standardabweichung)
SE	Schaf-Erythrozyten
SIFIN	Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien
SPDP	N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat
TK	Thymidinkinase
ZAM	Ziege-anti-Mausimmunglobulin-Antiserum
ZAM/FITC	Ziege-anti-Mausimmunglobulin-Fluorescein- isothiocyanat-Konjugat
ZAM/HRP	Ziege-anti-Mausimmunglobulin-Meerrettich- peroxidase-Konjugat

1. EINLEITUNG

Mit der Entdeckung des Prinzips zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern (mAK; KÖHLER und MILSTEIN 1975) wurde eine neue Etappe in der biologischen Forschung eingeleitet. Das Interesse an immunologischen Methoden wuchs in den verschiedensten Bereichen von Medizin und Biowissenschaften. Insbesondere die klinische Diagnostik profitierte von den verbesserten Nachweismethoden auf der Grundlage monoklonaler Antikörper.

Die quantitative Bestimmung von Hormonen, die Detektion viraler Antigene oder auch die Differenzierung der Blutleukozyten stellen exponierte Anwendungsgebiete dieser neuartigen Immunreagenzien dar. Die Verfügbarkeit von homogenen, in praktisch unlimitierter Menge herstellbaren Antikörpern befruchtete die Entwicklung von immunologischen Testsystemen und erleichterte ihre Standardisierung außerordentlich. Techniken wie die hochempfindlichen Radio- und Enzymimmunoassays, immunochemische Analysen mittels Proteinblotting oder die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung spiegeln den neuen, qualitativ höheren Stand der immunologischen Methodik eindrucksvoll wider. Stofftrennung bzw. -reinigung auf Basis der Immunaффinitätschromatografie sowie die Antigendetektion mittels immunhistochemischer Techniken sind ebenfalls aufs engste mit der Entwicklung und dem Einsatz monoklonaler Antikörper verbunden. Heute nutzen Molekularbiologen ebenso wie Neuroanatomen, Biochemiker wie auch Hämatologen und Krebsforscher die Vorzüge der monoklonalen Antikörper.

Obwohl bei der praktischen Anwendung nach wie vor die Diagnostik und die Grundlagenforschung im Vordergrund stehen, rückt verständlicherweise die Therapie mit mAK - die von Beginn an erwogen wurde und mit welcher große Hoffnungen verbunden waren - in den Mittelpunkt des allgemeinen Interesses. Dabei wird es sich um ausgewählte, geeignete und erfolgversprechende Einsatzgebiete handeln. Gegenwärtig konzentriert sich die therapeutische Anwendung einmal auf die Verbesserung der Transplantattoleranz nach Organverpflanzungen und zum zweiten in der Leukämietherapie auf die Ausschaltung bzw. Abschwächung der graft-versus-host-Erkrankung.

kung nach allogenen Knochenmarktransplantationen. In beiden Fällen ist das Wirkprinzip eine spezifische T-Zell- bzw. T-Zell-Subpopulationsdepletion, die über die zytolytischen Eigenschaften der Antikörper (Komplementaktivierung) realisiert wird. Auf die spezifische Zelleliminierung zielen auch die Untersuchungen zum möglichen Einsatz von Konjugaten aus monoklonalen Antikörpern und Toxinen (Immuntoxine). Eine Barriere für den Einsatz von monoklonalen Antikörpern als Therapeutika bildet die zu erwartende Reaktion des menschlichen Immunsystems auf das Fremdprotein, da es sich bei den Antikörpern in der Regel um murines (seltener Ratten-) Immunglobulin handelt. Um diese Barriere abzubauen, verfolgt man zwei Wege:

1. Die Immunogenität des Präparates wird gentechnisch durch molekularen Chimärismus herabgesetzt, d.h. murine Fab-Fragmente werden mit humanen Fc-Fragmenten kombiniert (Transfektome).
2. Es werden humane monoklonale Antikörper hergestellt.

Die Produktion humaner mAK ist weitaus komplizierter als die Hybridomtechnik mit Mauszellen, insbesondere ist die Gewinnung einer ausreichenden Anzahl antigenspezifischer B-Lymphozyten für die Immortalisierung problematisch.

Potentielle Einsatzgebiete für die therapeutische Nutzung humaner mAK sind virale Infektionen, die Neutralisierung von Bakterienendotoxinen, die Rh-Komplikationsprophylaxe durch Anti-D-Immunglobulin und die Serotherapie von Tumoren.

Aufgrund der Bedeutsamkeit der Hybridomtechnik für Forschung und klinische Praxis und der daraus resultierenden weiten Verbreitung in den immunologischen Laboratorien gab es schon bald nach ihrer Entdeckung verschiedene Ansätze zur Optimierung der Methode.

Da eine hohe Rate antigenspezifischer B-Zellen Voraussetzung für einen hohen Anteil spezifischer Klone (eine hohe spezifische Fusionsfrequenz) ist, stellt die effektive Immunisierung des Tieres einen bedeutsamen Parameter innerhalb des Gesamtprozesses dar. FOX et al. (1981) erzielten mit der Methode des adoptiven Transfers von Milzzellen in bestrahlte syngene Rezipienten eine

10fache Steigerung der spezifischen Fusionsfrequenz. SPITZ et al. (1984) beschrieben die intralienale Applikationsform, also das Applizieren des Antigens direkt in ein lymphoides Organ, unter Einsatz sehr geringer Antigenmengen als effektiver gegenüber herkömmlichen Immunisierungsschemata. Hyperimmunisierungen (CIANFRIGLIA et al. 1987) bzw. die In-vitro-Immunisierung mit elektrophoretisch getrenntem und auf Nitrozellulose transferiertem Antigen (GRATECOS et al. 1987) sind weitere Beispiele für die Anreicherung von antigenspezifischen B-Zellen auf dem Wege der Immunisierung. BESSLER et al. (1985) konnten durch die kovalente Bindung des Antigens an ein synthetisches Lipopeptid die immunogenen Eigenschaften eines Ag-Carrier-Komplexes und die Adjuvanseigenschaft des Lipopeptides kombinieren und damit die verstärkte Proliferation Ag-reaktiver B-Zell-Klone induzieren.

Die Immortalisierung der AK-bildenden Zellen erfolgt in der Regel durch die Fusion mit einer Permanentzelllinie (Myelom- oder lymphoblastoide Linien). In der Originalarbeit von KÖHLER und MILSTEIN (1975) wurde die Myelomzelllinie P3-X63-Ag8, die selbst noch Maus-Ig (MOPC, IgG1/κ) sezerniert, eingesetzt. Die Entwicklung auf dem Gebiet der Myelomzelllinien ging dahin, Fusionspartner mit hoher Fusionseffizienz zu etablieren, die außerdem möglichst selbst keine Ig bzw. Ig-Ketten mehr synthetisieren und sezernieren und die biochemisch selektierbar sind (HGPRT- oder TK-Defekt). Die gegenwärtig meistverwendeten Mausmyelomzellen sind "non-secretors": P3-X63-Ag8.653 (KEARNEY et al. 1979), P3-NS1-Ag4-1 (KÖHLER et al. 1976; produziert noch κ-Ketten, die aber nicht sezerniert werden) und SP2/0-Ag14 (SHULMAN et al. 1978).

Die für Human-Fusionen verwendeten Myelom- bzw. lymphoblastoiden Zelllinien sind mit einer Ausnahme (ABRAMS et al. 1983) alle Ig- bzw. Ig-Ketten-Sekretoren. Daneben werden Heteromyelomlinien (Maus-Myelomzelle x Human-Lymphozyt), die ihre AK-Produktion eingestellt haben, eingesetzt (ÖSTBERG und PURSCH 1983, GRUNOW et al. 1988).

Für die Selektion der Hybridzellen wird das HAT-Prinzip nach LITTLEFIELD (1964) ausgenutzt, wobei die Hybride aufgrund ihrer

kompletten Enzymausstattung, die von den Lymphozyten herrührt, einen Selektionsvorteil gegenüber den Aminopterin-sensitiven (HGPRT-negativen) parental Myelomzellen besitzen. Andere, weit- aus weniger genutzte Selektionsmarker sind die Ouabainresistenz der Myelomzellen (KOZBOR et al. 1982) und ihre Azaserin-Sensitivität (EDWARDS et al. 1982). Die Selektion auf Azaserin-Resistenz kann vor allem bei der Verwendung von mykoplasmenkontaminierten Zellen ein Vorteil sein (KARSTEN und RUDOLPH 1985), da eine Mykoplasmeninfektion in der HAT-Selektionsphase das Aufwachsen von Hybridomen verhindert (LANG 1985).

Mit den Fortschritten der Hybridomtechnik geht auch ein erhöhtes Interesse an chemisch definierten Zellzuchtmedien einher. Insbesondere geht es um die Substitution des obligaten Serumzusatzes (meist fetales Kälberserum) durch definierte, chargenunabhängige Additiva. Im Hinblick auf die Massenproduktion von Hybridomzellen in Fermentoren sowie auf die erleichterte Reinigung der mAK spielen dabei auch wirtschaftliche Erwägungen eine Rolle. Ungeachtet einer Vielzahl von Rezepturen, die serumfreie Kultivierung der Zellen unter Beibehaltung der Antikörperproduktion ermöglichen sollen (favorisiert werden Zusätze wie Transferrin, Insulin, Albumin, Steroide und Selenit), ist eine generelle Ablösung des Serums noch nicht absehbar (Übersicht bei SAMOILOVICH et al. 1987).

Mit dem Problem der Medienqualität in engem Zusammenhang steht die Tatsache, daß das "feeder cell layer" - meist syngene Peritonealmakrophagen, Milzzellen oder Thymozyten - die Kulturbedingungen stark beeinflussen kann, was gerade in der sensiblen Phase der HAT-Selektion von entscheidender Bedeutung ist. Neben den das Wachstum der Hybridome fördernden Effekten kann andererseits auch durch Medienzehrung, Metabolitenanreicherung und Zellattackierung (aktivierte Makrophagen !) das Gegenteil bewirkt werden, von möglichen Infektionen der Zellkultur ganz abgesehen. Konditionierte Medien von etablierten Makrophagen-Zelllinien (P388D1, NORDAN und POTTER 1986) können - bei Ausschluß der genannten negativen Effekte - die gleichen positiven Wirkungen wie "feeder" - Zellen entfalten.

Die Optimierung der In-vivo-Kultivierung von Hybridomzellen zielt auf hohe Anwachsrate, d.h. auf die Verhinderung der Abstoßung der implantierten Zellen durch Bestrahlung der Rezipiententiere (4-6 Gy). Diese Bestrahlung ist insbesondere für das Anwachsen nicht-muriner Hybridome in Mäuse unabdingbar. Demgegenüber spielt Immunsuppression anderer Art, beispielsweise durch Zyklophosphamid (RAYBOULDT et al. 1985b) in der Aszitesproduktion eine untergeordnete Rolle.

Der Schwerpunkt bei der Entwicklung der Massenproduktion von mAK liegt eindeutig auf der Kultivierung der Hybridomzellen in speziell für die Säugierzellfermentation designierten Bioreaktoren. Gegenwärtig werden Fermentersysteme verschiedener Bauarten (Rühr-, Airlift-, Membranfermenter) von den einschlägigen Firmen angeboten. Die biotechnologische Produktion von mAK, speziell von humanen mAK, wird im Hinblick auf die klinischen Anwendungen mit Sicherheit an Bedeutung gewinnen (Übersicht bei SAMOILOVICH et al. 1987).

Die Versuche, die Technik der mAK auf ein breiteres Artenspektrum auszudehnen, sind nicht allzu zahlreich. Dennoch sind sie für die Veterinärmedizin wie auch für die Humanmedizin (Primaten-Antikörper !) von Interesse. Bisher wurden mAK aus Schaf (GROVES et al. 1987), Kaninchen (YARMUSH et al. 1985), Rind (RAYBOULDT et al. 1985a), Schwein (RAYBOULDT et al. 1985b), Ziege (CAPPARELLI et al. 1990), aus verschiedenen Hamsterspezies (SANCHEZ-MADRID et al. 1983, PALMER und JONES 1986) sowie aus Rhesusaffe und Schimpanse (VAN MEEL et al. 1985) neben Maus-, Ratte- und humanen mAK hergestellt. Fusionspartner waren dabei Mausmyelom- oder Mensch-Maus-Heteromyelomzellen.

Monoklonale Antikörper stellen eine homogene Immunglobulinpopulation auch hinsichtlich ihres Isotyps dar, sind also auf eine Immunglobulinklasse bzw. -subklasse festgelegt. Es ist aber u.U. wünschenswert, den AK unter Beibehaltung seiner Spezifität auch als anderen Isotyp verfügbar zu haben, um die damit veränderten biologischen Eigenschaften nutzen zu können (z.B. Komplementbin-

dung). Voraussetzung dafür ist, die sehr seltenen sogenannten "switch"-Varianten (Frequenz 10^{-7} bis 10^{-5}) nachzuweisen und zu isolieren. Dafür ist neben der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung (LIESEGANG et al. 1978) auch eine extensive Klonierung in Verbindung mit hochempfindlichen Immunassays geeignet (MÜLLER und RAJEWSKY 1983).

Andere Wege, um mAK für den jeweils avisierten Einsatz gleichsam "maßzuschneidern", sind die Selektion auf hochaffine Mutanten mittels "Siebselektion" (AGUILA et al. 1986), die schon erwähnte Herstellung von Transfektomen (Maus-Human-Immunglobulinchimären, BOUILANNE et al. 1984) sowie die Fusion zweier verschiedener AK-bildender Zellen mit nachfolgender Selektion der bispezifischen Tri- bzw. Tetradome (MILSTEIN und CUELLO 1983).

Das Prinzip der Hybridomtechnik ist die Immortalisierung AK-bildender Zellen. Folglich richten sich zahlreiche Bestrebungen darauf, diesen entscheidenden Schritt zu effektivieren. Prinzipiell stehen dabei drei Möglichkeiten zur Verfügung:

1. Die Transformation humaner B-Lymphozyten durch das Epstein-Barr-Virus (ROSEN et al. 1977)
2. Die Transfektion, d.h. die durch geeignete Methoden realisierte Einschleusung fremden genetischen Materials in Lymphozyten, welches in diesen exprimiert wird und permanentes Wachstum der Zellen ermöglicht (JONAK und KENETT 1983)
3. Die Fusion mit Myelomzellen bzw. anderen permanent wachsenden lymphoiden Zelllinien. Diese Variante ist die mit Abstand meistgenutzte und bislang effektivste Methode zur Immortalisierung von B-Zellen.

Somatische Zellfusionen gehören seit längerem zum Methodenspektrum in biologischen, insbesondere in genetischen Labors (LITTLEFIELD 1964, GEFTER et al. 1977). Dabei lassen sich im Gegensatz zur Gametenfusion sehr unterschiedliche Zelltypen, sogar pflanzliche mit tierischen Zellen hybridisieren.

Obwohl auch spontane Zellfusionen in vitro auftreten (BANKERT et al. 1977), ist die Rate hierbei noch zu gering, um von prakti-

schem Interesse zu sein. Zu den sogenannten Fusogenen, die eine echte Verbesserung hinsichtlich der Ausbeute an fusionierten Zellen bringen, gehören die fusogenen Viren, die auch in den Originalexperimenten von KÖHLER und MILSTEIN (1975) Anwendung fanden. Das Prinzip dieser Fusionen besteht darin, daß zuerst über die viralen Hämagglutinin/Neuraminidase-Glykoproteine ein enger Zell-Zell-Kontakt realisiert und anschließend durch die Wirkung der sogenannten Fusionsfaktoren (F-Proteine) die Membranverschmelzung eingeleitet wird (KNUTTON und PASTERNAK 1979).

Die virusinduzierte Zellfusion spielt in der Praxis der Hybridomtechnik heute keine große Rolle mehr, allerdings beschreiben neuere Arbeiten (NAGATA et al. 1991a; NAGATA et al. 1991b) die Herstellung von murinen Hybridomen mittels pH-abhängiger Vesicular Stomatitis Virus - medierter Zellfusion.

Ungeachtet dessen ist die durch das synthetische Polymer Polyethylenglykol (PEG) vermittelte Zellfusion (KAO und MICHAYLUK 1974, GALFRE et al. 1977) bis heute die dominierende Methode zur Verschmelzung lymphoider Zellen geblieben. Die Steigerung der Fusionsfrequenz gegenüber der virusvermittelten Zellfusion beträgt etwa das 300fache (GEFTER et al. 1977).

Der Mechanismus der PEG-induzierten Zellfusion ist Gegenstand zahlreicher biophysikalischer Untersuchungen und Theorien (Zusammenfassung bei ARNOLD et al. 1988). Die hohe Affinität des PEG zu Wasser und das daraus folgende Dehydratationsvermögen gegenüber Proteinen und Membranen ist mit Sicherheit Ursache für seine agglutinierende und präzipitierende Wirkung. Durch PEG verändern sich zudem die physikochemischen Eigenschaften des Wassers selbst, infolgedessen es zur Membrandestabilisierung, zur Veränderung der Membranstruktur und zu osmotischem Streß für die Zellen und letztlich zur Membranfusion kommt (ARNOLD et al. 1985).

Ende der 70er Jahre erschienen erste Publikationen über erfolgreiche Zellfusionen, welche mittels elektrischer Feldimpulse ausgelöst wurden. Die dabei verwendeten Zellen waren pflanzliche Protoplasten (SENDA et al. 1979) bzw. Hefeprotoplasten (JACOB et al. 1979) sowie Erythrozyten (ZIMMERMANN und PILWAT 1978). Damit war der Anfang für eine große Anzahl von Arbeiten zu diesem Thema

gemacht. Nunmehr ist diese Methode ein bewährtes Arbeitsmittel von Pflanzenphysiologen, Mikrobiologen und Genetikern geworden. Zunehmend findet sie auch in der Hybridomtechnik Anwendung (Übersicht bei SEIDEL und FIEBIG 1989a). Diese Art der Zellhybridisierung, im folgenden verkürzt Elektrofusion genannt, beruht auf einer Sequenz von vier Teilprozessen:

1. Annäherung der Zellen
2. Membrankontakt
3. Lokale Fusion der Membranen
4. Abrundung des Fusionsproduktes

Die Annäherung der Zellen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen: Primär wurden hohe Suspensionsdichten verwendet, die die Wahrscheinlichkeit von Zellkontakten erhöhen. Als Extremfall ist auch die Fusion im Zellpellet möglich. Mit Erfolg erprobt wurden weiterhin die Verwendung von Mikromanipulatoren zur Positionierung von Nadelelektroden (SENDA et al. 1979, BERG 1982) oder die Zugabe von PEG zwecks Agglutination der Zellen (WEBER et al. 1981) ebenso wie die durch magnetische (KRAMER et al. 1984) und elektro-akustische (VIENKEN et al. 1985) Methoden vermittelte Sammlung und Adhärenz der Zellen. Zellkontakt kann auch durch In-vitro-Kultivierung als Monolayer realisiert werden, erfolgreiche Fusionen unter diese Voraussetzungen sind beschrieben worden (TEISSIE et al. 1982).

Die elegante Methode der immun- bzw. lektinspezifischen Zytoadhärenz verbindet das Erfordernis des Zellkontaktes mit einer gewissen Spezifität der Fusion. Die Vorteile für die Hybridomtechnik - hohe Ausbeute an antigenspezifischen Klonen und reduzierter Screeningaufwand - sind naheliegend (LO et al. 1984, BANKERT et al. 1980, WOJCHOWSKI und SYTKOWSKI 1986, REASON et al. 1987, WIEGAND et al. 1987, ABEL et al. 1988, FORTIER et al. 1988, HEWISH und WERKMEISTER 1989, TOMITA und TSONG 1990, BLANCHER et al. 1991).

Ungeachtet der Vielzahl von Methoden, die den Zellkontakt für die nachfolgende Fusion bewirken sollen, ist eine von ihnen stark favorisiert. Dabei handelt es sich um die dielektrophoretische

Sammlung von Zellen (POHL 1971). Unter Dielektrophorese versteht man die Bewegung von Zellen (oder anderen Partikeln) im hochfrequenten elektrischen Wechselfeld. Diese wird durch eine Dipolinduktion verursacht, welche im Takt des äußeren elektrischen Feldes vor sich geht. Die Partikel wandern in die Bereiche höherer Feldliniendichte, d.h. im inhomogenen Feld in Richtung der Pole und im homogenen Feld - aufgrund der durch die Zellen selbst bedingten Inhomogenitäten - aufeinander zu (ABEL et al. 1986). Voraussetzung für die Initiierung der Membranfusion zwischen den gegenüberliegenden Zellen ist eine Annäherung der Fusionspartner bis auf wenige Nanometer. Eine enzymatische (meist proteolytische) Vorbehandlung der Zellen, um proteinfreie Lipidareale zu schaffen, wird von einigen Autoren empfohlen (ZIMMERMANN et al. 1981, OHNO-SHOSAKU und OKADA 1984, OHNO-SHOSAKU und OKADA 1989), aber auch - bei Verwendung des optimalen Fusionsmediums - als nicht unbedingt notwendig eingeschätzt (VIENKEN und ZIMMERMANN 1985).

Der dritte Schritt innerhalb des Prozesses der Elektrofusion ist die Bildung eines lokalen Fusionsortes innerhalb der opponierenden Membranen. Sie leitet die eigentliche Zellfusion ein und basiert auf dem in der biophysikalischen Literatur als "reversible electrical breakdown" bekannten Phänomen (ZIMMERMANN et al. 1974). Das elektrische Breakdown bezeichnet eine größenordnungsmäßige Zustandsänderung der Membran hinsichtlich ihrer Leitfähigkeit als Folge einer elektrischen Potentialdifferenz. Diese wird in der Praxis durch das Applizieren eines sehr kurzen (im Mikrosekunden-Bereich) Feldimpulses ausreichend hoher Feldstärke (im kVcm^{-1} -Bereich) erreicht. Das kritische Membranpotential (Breakdownspannung) liegt dabei etwa im Bereich von 1 V.

Die lokale Membranfusion wird nach Durchlaufen von Zwischenstufen, über welche verschiedene Auffassungen existieren (Übersicht bei GLASER 1986), realisiert. Mit Sicherheit darf angenommen werden, daß die durch den Feldimpuls induzierten Poren in der Membran dabei eine Rolle spielen. Diese Porenbildung ist Grundlage nicht nur für die elektrische Zellfusion, sondern auch für die zunehmend in der Gentechnik angewandte Technik der Elektroporation, bei welcher große Moleküle, z.B. Plasmide, in

Zellen inkorporiert werden (NEUMANN et al. 1982).

Die Abrundung der Fusionsprodukte schließlich erfolgt unter Aufweitung der primär fusionierten Membranabschnitte: Es kommt zur Plasmogamie. Die hierfür benötigte Zeit variiert in Abhängigkeit von Zellgröße, Beschaffenheit des Zytoskeletts, Temperatur, Ionenmilieu (Mg^{++} , Ca^{++}) und wahrscheinlich auch vom Ausmaß des primär fusionierten Membranabschnittes. Ob durch die Zellfusion Heterokaryen oder echte Hybride entstehen, wird auch davon bestimmt, ob die Karyomembranen ebenfalls fusionieren. Nach BERTSCHE et al. (1988) ist das aufgrund der intrazellulären Dielektrophorese der Kerne relativ häufig der Fall.

Im allgemeinen sind die Zellen, die bei einer Fusion eingesetzt werden, hinsichtlich des Zellzyklus nicht synchronisiert. Da die Fusionsbereitschaft der Zellen nicht von der jeweils erreichten Phase im Zellzyklus abhängt (MIYAHARA et al. 1984), fusionieren also auch Interphase-Zellen mit Zellen in Mitose. Durch den fusionsvermittelten Transfer spezifischer Mitose-induzierender Proteine (MIP) wird im Interphase-Teil des Fusionsproduktes die Kernmembran aufgelöst und eine vorzeitige Chromosomenkondensation eingeleitet ("premature chromosome condensation" = PCC; JOHNSON und RAO 1970). Möglicherweise hängt mit diesem Phänomen die Tatsache zusammen, daß nur aus einer kleinen Fraktion der fusionierten Zellen lebensfähige und Ig-produzierende Hybridzellklone hervorgehen. Versuche, die in der Hybridomtechnik eingesetzten Myelomzellen durch Colcemidbehandlung zu synchronisieren (MIYAHARA et al. 1984) führten zu einer Steigerung der Ausbeute um 26 bis 570 Prozent. Diese Versuche erstreckten sich allerdings nur auf die PEG-vermittelte Zellfusion.

Die jüngste Alternative zu den drei bereits genannten Optionen ist die Laser-induzierte Zellfusion (WIEGAND et al. 1987, WIEGAND-STEUBING 1991): Ein Laserstrahl (340 nm; 0,3 - 0,5 μ m) wird auf das mikroskopisch identifizierte und justierte Zellpärchen gerichtet. Inwieweit diese Technik praktisch nutzbar nicht nur für wenige spezialisierte Labors wird, ist angesichts der wenigen hierzu bisher veröffentlichten Daten noch nicht absehbar.

Parallel zur Zellfusion durch elektrische Feldimpulse wurde auch die verwandte Methode der Elektroporation entwickelt, die ihr exponiertes Anwendungsgebiet in der Gentechnik hat, konkret in der erleichterten Einschleusung von Fremd-Nukleinsäure in Wirtszellen. Diese sollen die derart transfizierten Genen exprimieren (NEUMANN et al. 1982). Darüber hinaus hat die Elektroporation (= Elektrotransfektion) insofern für die Hybridomtechnik Bedeutung erlangt, als sie z.B. die relativ einfache Einführung von Resistenzgenen in Hybridomzellen ermöglicht (STOPPER et al. 1988). Das wiederum ist Voraussetzung für eine biochemische Selektion nach nochmaliger Fusion der Zellen, z.B. zum Zwecke der Herstellung von bispezifischen AK (MILSTEIN und CUELLO 1983). Gentransfer durch Elektroporation war auch die Methode von RÜKER et al. (1987), um Hybridomzellen der gleichen Spezifität mit verschiedenen Resistenzmarkern auszustatten und somit deren Fusionsprodukte selektieren zu können. Diese Hybrid-Hybrid-Zelllinien synthetisierten 3,2 bis 3,8 x mehr Ig als ihre Parentalzelllinien, bezogen auf gleiche Zeit, gleiches Volumen und gleiche Zellzahl.

Neben der Nutzung starker elektrischer Feldimpulse zur Fusion bzw. Elektroporation steht auch die Möglichkeit der elektrischen Stimulierung von metabolischen Aktivitäten der Hybridomzellen: SUZUKI et al. (1985) behandelten murine Hybridomzellkulturen mit einem relativ schwachen elektrischen Wechselfeld (5 kHz , 40 Vcm^{-1} für 48 h im Modus 30 s Feldapplikation - 270 s Pause). Gegenüber unbehandelten Zellen war die Ig-Synthese bei diesen Kulturen um 10 %, die Zellkonzentration um 16 % und die Laktatkonzentration um 30 % gesteigert. Ursache für die Stimulierung des Stoffwechsels könnte eine erhöhte Zellpermeabilität sein, die den Metabolitenaustausch begünstigt, oder auch elektrochemische Effekte (Wasserspaltung und Elektronentransfer zwischen Medium und Zellen).

ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Die allgemeine Zielstellung der Arbeit beinhaltet die Einschätzung, welchen Wert die Elektrofusionsmethode für die Technik der Herstellung monoklonaler Antikörper besitzt. Diese soll auf Grundlage eigener Versuche und unter Berücksichtigung des internationalen Schrifttums erfolgen.

Für die selbst durchzuführenden Fusionsexperimente standen folgende Teilzielstellungen:

1. Einführung und Etablierung der Elektrofusionsmethode im Hybridomlabor der Sektion Biowissenschaften der Universität Leipzig auf der Basis des Zellfusionsgenerators efg 01
2. Vergleich mit parallel durchgeführten PEG-vermittelten Zellfusionen hinsichtlich der Effektivität (Fusionsfrequenz)
3. Versuche zur Steigerung der spezifischen Fusionsfrequenz durch Rezeptor-vermittelte Elektrofusion bzw. durch Präselektion der antigenspezifischen Lymphozyten unter Nutzung der am Hause vorhandenen Gerätetechnik für Durchflußzytometrie (FACS)
4. Einsatz der Elektrofusionstechnik zur Fusion zweier verschiedener mAK produzierender Hybridome mit dem Ziel der Herstellung bispezifischer AK, die in der Zellmarkierung und -differenzierung Einsatz finden können
5. Optimierung einiger wesentlicher Parameter für die Elektrofusion unter den konkreten Laborbedingungen einschließlich der Testung verschiedener Elektrodenkammern

Für alle durchgeführten Versuche galt es, einen Kompromiß zu finden zwischen sinnvoller Versuchsplanung, den Erfordernissen sparsamen Umgangs mit Zellkulturchemikalien und -verbrauchsmaterialien einerseits und möglichst hohen Fusionsfrequenzen andererseits, da die Fusionsexperimente gleichzeitig Zuarbeiten für das übergreifende Forschungsprogramm der Arbeitsgruppe waren.

Extensiv angelegte Versuchsreihen (etwa zum Austesten eines Parameters) waren aufgrund des hohen Materialverbrauches nicht möglich, weshalb sich das Ausmaß eines Fusionsexperimentes stets auf den Labor-Standard einzuschränken hatte.

Die elektrisch induzierte Zellfusion als Methode in der Hybridomtechnik - Ein Literaturüberblick

Die ersten Objekte der Elektrofusion waren pflanzliche Protoplasten (SENDA et al. 1979) sowie Protoplasten von Mikroorganismen (WEBER et al. 1981, SHIVAROVA et al. 1983). Die Hybridisierung von Pflanzen auf dem Wege der somatischen Zellfusion ist nach wie vor eines der Hauptanwendungsgebiete der Elektrofusion. Sie hat die Herstellung von Organismen mit neuen Eigenschaften zum Ziel, was gleichermaßen auch für die Hybridisierung von mikrobiellen Protoplasten gilt.

Für die Tierzucht wurde die Elektrofusion interessant, als nachgewiesen werden konnte, daß mit elektrischen Feldimpulsen auch Blastomeren fusioniert werden können (BERG 1982, KUBIAK und TARKOWSKI 1985).

Mit der Arbeit von VIENKEN und ZIMMERMANN (1982) in einer biophysikalischen Zeitschrift über die elektrisch induzierte Fusion von murinen Milz- und Myelomzellen hielt die Methode praktisch Einzug in die experimentelle Immunologie.

BISCHOFF et al. (1982) beschrieben kurz darauf die Herstellung humaner Hybridomzellen mittels Elektrofusion.

Eine dritte Publikation aus den Anfängen der Elektrofusion stammt von BERG et al. (1983): Mausmilzzellen und -myelomzellen wurden in verschiedenen Elektrodenkammern (parallel gespannte Pt-Drähte, Mikromanipulator-gesteuerte Pt-Nadeln) erfolgreich miteinander fusioniert. Allerdings erfolgte, wie in den anderen bisher erwähnten Arbeiten, keine weitere Kultivierung der Fusionsprodukte.

Erst mit der Veröffentlichung der Arbeit von LO et al. (1984) geriet die Elektrofusion als echte Alternative zur PEG-vermittelten Fusion ernsthaft ins Gespräch, nicht zuletzt aufgrund der eindrucksvollen Ergebnisse. Durch die Kombination von antigenspezifischer Zytadhärenz zwischen den Fusionspartnern und der hoch-effektiven Fusionsmethode erhöhte sich der Anteil an antigenspezifischen Hybridomen auf 100 %.

Auf dem IV. Hybridomkongreß berichteten GLASSY und HOFFMANN (1985) über erfolgreiche Experimente zur Elektrofusion der hu-

manen lymphoblastoiden B-Zelllinie UC 729-6 mit humanen Lymphozyten.

VIENKEN und ZIMMERMANN (1985) erzielten sehr gute Fusionsergebnisse mit SP2/0 - Myelomzellen und Mausmilzzellen nach Lyse der Erythrozyten und unter Verwendung eines neuen Fusionsmediums, das neben Inosit in isotonischer Konzentration auch Mg^{++} - und Ca^{++} - Ionen sowie (sehr niedrigmolar) Phosphatpuffer enthielt.

Schon im Hinblick auf eine konkrete wissenschaftliche Fragestellung (die Herstellung von mAK gegen Zytokeratine) und weniger als Beitrag zur Methodenentwicklung erfolgte der Einsatz der Elektrofusionstechnik bei KARSTEN et al. (1985). Allerdings erlaubte hier der erste direkte Vergleich mit der PEG-Fusion eine bessere Einschätzung der Effektivität: Die Fusionsfrequenzen (als Anzahl von Hybridomzellkulturen pro 10^5 eingesetzte Milzzellen) übersteigen bei Anwendung der Elektrofusion die Werte für die PEG-Fusion um das 10fache.

GRAVEKAMP et al. (1985) nutzten die einfachste Form der Fusionskammertypen, zwei auf einem Objektträger parallel gespannte Pt-Drähte, zu erfolgreichen Fusionen von Zellen einer T-Lymphomlinie mit humanen PBL, PHA-stimulierten T-Zell-Blasten bzw. klonierten zytotoxischen T-Lymphozyten. Einige der entstandenen T-Zell-Hybridome zeigten zytotoxische Aktivität gegenüber den Targetzellen des Fusionspartners. Die parallel durchgeführten PEG-Fusionen waren hinsichtlich der Ausbeute an T-Zellhybridomen deutlich uneffektiver.

Die Dissertation von TRAWINSKI (1985) befaßt sich thematisch ausschließlich mit der Fusion lymphoider Zellen durch elektrische Feldimpulse. Der Autor beschreibt u.a. die Generierung muriner Hybridome durch kombinierte PEG-Elektropuls-Behandlung, die Elektrofusion im Zellpellet (in leitfähigem Medium) und erachtet die DE als zellschädigenden und daher zu umgehenden Schritt innerhalb der Fusionssequenz.

In Anknüpfung an die Arbeit von LO et al. (1984) zur rezeptorvermittelten Elektrofusion publizierten WOJCHOWSKI und SYTKOWSKI (1986) eine Methode, die anstelle des Avidin-Antigen-Konjugates

eine Mehrschritt-Brückentechnik mit biotinyliertem Ag verwendet. Die nach Elektrofusion der Zellpärchen aufwachsenden Hybridome produzierten ausschließlich mAK mit einer Spezifität für das zur Immunisierung verwendete Modell-Antigen (KLH).

Der Schwerpunkt der Publikation von ABEL et al. (1986) über die Herstellung muriner Hybridome durch Elektrofusion liegt auf dem Nachweis, daß homogene Feldbedingungen zwischen den Elektroden genauso wie inhomogene zur DE und zum Fusionserfolg führen. Der Vorteil des homogenen Feldes besteht in der relativen Konstanz der Feldbedingungen innerhalb der gesamten Kammer.

BROWN et al. (1986), die parallel Elektro- und PEG-Fusionen zur Herstellung muriner mAK (mit NS-1-Myelomzellen) durchführten, kamen zu folgenden Ergebnissen: Sowohl mit Protease-vorbehandelten Zellen (Pronase, Dispase) als auch mit nichtvorbehandelten Zellen ließen sich in den Elektrofusionsexperimenten proliferierende Hybridome feststellen. In den beiden beschriebenen Fusionen lag der Prozentsatz "positiver" Kavitäten bei der Elektrofusion etwas höher als bei der PEG-Fusion.

Zwei verschiedene Typen von Elektrofusionskammern, die Variante mit planaren Elektroden und die Objektträgerausführung mit fixierten Pt-Drähten, verwendeten MANGOLDT et al. (1987) bei ihren Versuchen, NS-1-Zellen und immunisierte Mausmilzzellen zu fusionieren.

GRAVEKAMP et al. (1987) verglichen wiederum die Effektivitäten von PEG- und Elektrofusionen hinsichtlich der absoluten Fusionsfrequenz (humane T-Zell-Hybridome) sowie auch hinsichtlich des verwendeten Fusionspartners. Für die humane T-Lymphomzelllinie HSB-1 wurde nachgewiesen, daß mittels Elektrofusion bedeutend höhere Fusionsfrequenzen erzielt werden konnten. Ein interessanter Nebebefund ist, daß eine positive Korrelation zwischen der Anzahl mikroskopisch beobachteter Fusionen und der Anzahl aufwachsender Hybridome nicht feststellbar war.

Nach OHNISHI et al. (1987) sind es nur etwa 1/500 (Maussystem) bzw. 1/5000 (Humansystem) der physisch fusionierten Zellen, die nach HAT-Selektion zur Bildung von Hybridomen führen. Die Autoren

erklären das als Folge suboptimaler Kulturbedingungen oder aber aus der Tatsache, daß nur eine bestimmte Fraktion der B-Zellen die Potenz zur Hybridombildung in sich trägt. Eine deutliche Steigerung der Fusionsfrequenz wurde durch Zugabe bestimmter "facilitators", insbesondere durch Liposomen (Glyzeryl-Monooleat) und durch Calmodulin, erreicht.

Einen weiteren erfolgreichen Versuch zur Herstellung humaner Hybridome mittels Elektrofusion unternahmen PRATT et al. (1987): Die humane lymphoblastoide Zelllinie UC 729-6 wurde entweder mit PBL, mit Lymphozyten aus Lymphknoten oder mit Lymphomzellen fusioniert. Dabei wurde mit den Lymphomzellen die höchste absolute Fusionsfrequenz erzielt.

In der Publikation von ABEL et al. (1988) wird ein weiteres Mal an die Avidin-Biotin-Methode nach LO et al. (1984) angeknüpft; der Erfolg hinsichtlich der spezifischen Fusionsfrequenz ist aber geringer. Der Anteil Ag-bindender Hybridome erhöhte sich von 8,3 auf 28,0 % , die absolute Fusionsfrequenz sank gegenüber der "Standard-Elektrofusion" von 2,4 auf 0,2 Klone/10⁵ Milzzellen.

MICHEEL et al. (1988) berichteten über die Herstellung von mAK gegen FITC mittels Elektrofusion. Dabei wurden die Myelomzellen direkt mit dem Hapten markiert und mit den Milzzellen der Maus, welche mit einem entsprechenden Hapten-Carrier-Konjugat immunisiert worden war, zusammen inkubiert. Eine reale Steigerung der spezifischen Fusionsfrequenz war jedoch nicht zu verzeichnen.

Murine Hybridome, die mAK gegen Hc-Antigene von Salmonella yollo produzieren, wurden mittels elektrischer Feldimpulse in der Helix-Kammer nach SCHNETTLER et al. (1984) von TSONEVA et al. (1988) hergestellt. Proteasenvorbehandlung steigerte dabei die Ausbeute nicht signifikant, aber die Fusionsfrequenzen waren bei den Elektrofusionen generell höher als bei den durchgeführten PEG-Fusionen.

Die Arbeit von STENGER et al. (1988) beschäftigt sich wiederum mit der Optimierung der Elektrofusionsparameter für die Generierung muriner Hybridome mittels der Myelomzelllinie SP2/0. Dabei konzentrierten sich die Autoren auf die Zusammensetzung, Osmola-

rität und Konduktivität des Fusionsmediums, auf Amplitude und Dauer des Gleichspannungsimpulses sowie auf die Proteasenvorbehandlung der Zellen. Sie erhielten etwas höhere Fusionsfrequenzen bei einer Reduktion der Osmolarität des Mediums. Eine bedeutende Verbesserung bewirkte der Ersatz von Phosphat durch L-Histidin als Puffersubstanz. Dieses neue Fusionsmedium wies eine etwa 3x geringere Konduktivität auf als das Referenzmedium nach VIENKEN und ZIMMERMANN (1985).

KARSTEN et al. (1988) faßten ihre Erfahrungen mit der Elektrofusion, die sie in einer Reihe von Experimenten und im direkten Vergleich mit der PEG-Fusion gemacht haben, wie folgt zusammen: Die absolute Fusionsfrequenz liegt 3,8x bis 33x höher und die spezifische Fusionsfrequenz ist gegenüber der PEG-Methode nicht verändert. Gleichfalls keine Unterschiede bestehen hinsichtlich AK-Titer, Isotypverteilung, Stabilität der AK-Produktion, Transplantierbarkeit in Mäuse und Kryokonservierbarkeit.

Eine weitere Art von rezeptorvermittelter Elektrofusion stellen auch die Experimente dar, die von FORTIER et al. (1988) publiziert wurden. Das verwendete Antigen waren Mannoproteine aus *Candida albicans*. Die antigenspezifische Zytoadhärenz wurde durch die Lektinwirkung von Con A als Bindeglied zwischen Myelomzellen und denjenigen Lymphozyten, die das Ag gebunden haben, erreicht.

GLASSY et al. (1988) sieht für die Elektrofusion eine Perspektive primär auf dem Gebiet der humanen Hybridome, wo oft nur sehr geringe Lymphozytenmengen verfügbar sind. Er verweist desweiteren auf neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Elektrodenkammern, die sowohl die direkte visuelle Beobachtbarkeit als auch das Verarbeiten größerer Zellzahlen (z.B. die Zellpopulation einer gesamten Mäusemilz) ermöglichen.

In der Absicht, die Technik der Elektrofusion für die Herstellung humaner mAK zu optimieren, führten GLASER et al. (1989a, 1989b) Versuche mit der Mensch-Maus-Heteromyelomlinie CB-F7 durch. Unter Verwendung einer Mikrokammer mit annähernd homogenen Feldbedingungen, die mikroskopisch kontrolliert werden konnte, wurden bis zu $15 \text{ Hybridome}/10^5 \text{ Lymphozyten}$ hergestellt. Die Autoren fanden einen relativ weiten Optimalbereich für Pulslänge und -stärke.

Die Vorbehandlung mit Pronase steigerte die absolute Fusionsfrequenz, wohingegen die Anwesenheit des Enzyms während der elektrischen Behandlung die Zellen irreversibel schädigte. Weiterhin wird der möglichst schnelle Transfer der elektropulsbehandelten Zellsuspension in physiologisches Ionenmilieu als kritisch bewertet.

Unter derselben Thematik - der effektiven Herstellung humaner mAK mittels einer Heteromyelomlinie und elektrischer Feldimpulse - steht auch die Arbeit von FOUNG und PERKINS (1989). Die humanen B-Lymphozyten aus Blut bzw. Milz wurden mit EBV bzw. Pokeweed-Mitogen stimuliert und in einer helikalen Fusionskammer nach SCHNETTLER et al. (1984) fusioniert. Im Gegensatz zu GLASER et al. (1989b), die eine schnelle Überführung der Zellen in normales Ionenmilieu empfehlen, verblieben hier die fusionierten Zellen nach dem Impuls für 10 min im Fusionsmedium (isotone Inositolösung mit Ca^{++} - und Mg^{++} - Ionen). Die erzielten Fusionsfrequenzen lagen bei einigen Elektrofusionen sehr hoch. Die Autoren halten Fusionsfrequenzen von 100 - 1000, bei einer gleichzeitigen Reduzierung der Zellzahl auf 10^5 für prinzipiell möglich.

SCHMITT et al. (1989b) ermittelten die Optimalwerte für einige Parameter in der Elektrofusion von SP2/0-Myelomzellen mit murinen Milzzellen nach Lyse der Erythrozyten sowie der T-Zellen. Eine enzymatische Vorbehandlung der Zellen wurde in keinem Fall durchgeführt. Die höchste absolute Fusionsfrequenz (24 Klone/ 10^5 Milzzellen) wurde bei einer Feldstärke des Impulses von 2 kVcm^{-1} erreicht; bei 4 kVcm^{-1} war die Fusionsfrequenz bereits um das mehr als 10fache verringert. Die Autoren nehmen an, daß auch die Auswahl eines geeigneten Subklones der verwendeten Myelomzelllinie mitentscheidend für den Erfolg der Fusion ist.

Weitere Arbeiten (SCHMITT und ZIMMERMANN 1989, SCHMITT et al. 1989a) befassen sich mit der Wirkung hypoosmolarer Bedingungen auf die Elektrofusion. Nach Selektion eines SP2/0-Subklones, der osmotisch resistent war, wurden Fusionsmedien auf Sorbitolbasis (mit Ca^{++} , Mg^{++} , BSA) verschiedener Osmolaritäten getestet. Dabei erwies sich das stark hypotone Medium mit 75 mosM/l als jenes, mit dem die höchsten Fusionsfrequenzen erreichbar waren. Die Ergebnisse waren gut reproduzierbar (im Gegensatz zu Versuchen

mit isoosmolaren Lösungen). Auch die Fusionierung relativ weniger Zellen (10^5) war mit dieser Methode möglich. Als Ursache für die 1,5- bis 2-fache Steigerung der Hybridomausbeute in 75 mosM - Medium diskutierten die Autoren einen geringen und einheitlichen Anstieg der Membranpermeabilität und/oder die Destabilisierung der zytoskeletalen Elemente der Zellen.

KATENKAMP et al. (1989) versuchten in Anlehnung an die Arbeit von TRAWINSKI (1985), murine Hybridome durch elektrische Zellfusion im Zellkulturmedium (RPMI 1640) herzustellen. Es konnten mit dieser Methode keine Hybridome erzeugt werden, wohingegen Fusionen in isotoner Mannit-Lösung unter Zusatz von Mg^{++} - und Ca^{++} -Ionen erfolgreich waren. Die unter optimalen Bedingungen erreichte Frequenz betrug 2,2 Hybridome/ 10^5 Milzzellen (bei einem Impuls von 4 kVcm^{-1} für $10 \mu\text{s}$). Parallel durchgeführte PEG-Fusionen ergaben nur Werte bis zu maximal 0,55 Hybridome/ 10^5 Milzzellen.

Eine weitere Arbeit zur Antigen-vermittelten Elektrofusion nach LO et al. (1984) wurde von HEWISH und WERKMEISTER (1989) publiziert. Mit einer Streptavidin-Biotin-Brücken-Technik und einem Elektroporationsgerät (Bio-Rad) erreichten die Autoren eine beträchtliche Steigerung der spezifischen Fusionsfrequenz sowohl beim Einsatz von starken als auch von schwachen Immunogenen.

Einen deutlichen Anstieg der absoluten Fusionsfrequenz - bei keiner signifikanten Änderung des Anteils antigen-positiver Klone - verzeichneten auch VAN DUIJN et al. (1989) bei ihren Experimenten zur Herstellung von Hybridomen aus in vivo oder in vitro immunisierten Mauslymphozyten. Die Werte erreichten etwa das 80fache im Vergleich mit PEG-Fusionen.

Neben den Publikationen, die den Akzent auf die Entwicklung der Elektrofusion als Methode legen, gibt es neuere Arbeiten zur Herstellung von mAK, die die Elektrofusionstechnik nur als Mittel zum Zweck erwähnen, ohne auf methodische Einzelheiten einzugehen (MENG und TRAWINSKI 1988, PAQUE und MILLER 1989, TALBOT und HALLÉE 1989).

FOUNG et al. (1990) sowie auch ZIMMERMANN et al. (1990) verwenden in Anlehnung an frühere Arbeiten hypoosmolares Fusionsmedium zur

Herstellung von Human- bzw. Maus-Mensch-Heterohybridomen. Durch die bedeutende Steigerung der Fusionsfrequenz in 75 mosM Medium gegenüber dem Standard-Fusionsmedium mit 300 mosM konnten FOUNG et al. (1990) Mikrofusionen mit einem Ansatz von $1-2 \times 10^5$ EBV-transformierten humanen B-Zellen erfolgreich durchführen.

TAKAHASHI et al. (1991) brachten insofern einen neuen Gesichtspunkt ins Spiel, als daß sie das elektrische Breakdown nicht mehr mit einem d.c. Puls induzierten, sondern statt dessen einen a.c. Puls (10 kHz; 0,3 ms; 12 kV/cm) applizierten, was gleichfalls Zellfusionen auslöste. Der Zellkontakt wurde hier nicht durch DE, sondern durch Zentrifugation hergestellt.

Ag-vermittelte Elektrofusionen sind Gegenstand der Publikationen von TOMITA und TSONG (1990) sowie von BLANCHER et al. (1991). Die Präselektion der Zellen erfolgte entweder durch Avidin-Biotin-Techniken nach LO et al. (1984) oder durch direktes Targeting der Antigen-positiven B-Zellen an die Myelomzellen. Das Antigen wurde dabei direkt in die Myelomzellmembran eingebaut oder im Falle von Human-IgM auf der Human-Maus-Heteromyelomlinie a priori exprimiert (BLANCHER et al. 1991). Während TOMITA und TSONG mit ihrem Fusionsprotokoll eine Steigerung der spezifischen Fusions-effizienz erreichten, stellten BLANCHER et al. mit der Methode des direkten Targeting keine diesbezügliche Verbesserung im Vergleich mit "Zufallsfusionen" fest.

In Anbetracht der Vielzahl von Einzeldaten und -befunden und der zahlreichen, z.T. einander widersprechenden Auffassungen zu den kritischen Parametern der Elektrofusion ist eine zusammenfassende Wertung nicht einfach. Wie generell in der Hybridomtechnik, gibt es einen Trend zu höherer Effektivität, d.h. zu höherer absoluter Fusionsfrequenz und einen Trend zu höherer spezifischer Fusionsfrequenz. Beidem trägt auch die Entwicklung auf dem Gebiet der Elektrofusion Rechnung.

- Fast alle Autoren favorisieren die Elektrofusion hinsichtlich der erreichbaren absoluten Fusionsfrequenz.

- Eine Steigerung der spezifischen Fusionsfrequenz ist durch die Präselektion der B-Zellen prinzipiell möglich. Für ausgewählte Antigene ist die Präselektionsmethode sinnvoll, insbesondere für die Methode der humanen mAK.
- Vorbehandlung der Zellen mit Proteasen wird von der Mehrzahl der Autoren als günstig angesehen, die höchsten Fusionsfrequenzen sind allerdings ohne eine solche erreicht worden (FOUNG und PERKINS 1989).
- Es sind prinzipiell verschiedene Kammertypen - die auch unterschiedliche Feldbedingungen zur Folge haben - einsetzbar. Die Wahl ist abhängig von der jeweils konkreten Aufgabenstellung (z.B. die Fusion relativ geringer Zellmengen).
- Sowohl murine als auch humane Hybridome sind durch die Elektrofusion herstellbar. Gleichfalls können mit dieser Technik sowohl B-Zell- als auch T-Zell-Hybridome generiert werden.
- Modifikationen des Fusionsmediums (Konduktivität, Osmolarität, Ionengehalt, Anwesenheit von "facilitators") haben Einfluß auf den Fusionserfolg.
- Variation der elektrischen Parameter (Feldstärke, Impulsdauer, Anzahl der Impulse usw.) beeinflußt ebenfalls - in bestimmten Grenzen - die Fusionsfrequenz.

In Auswertung der Veröffentlichungen zur Elektrofusion als Methode der Hybridomtechnik kommt man zu dem Schluß, daß die wesentlichen Parameter für die Elektrofusion den konkreten Bedingungen des jeweiligen Hybridomlabors angepaßt werden sollten, in Anlehnung an das publizierte Datenmaterial. Dafür sprechen u.a. die relative Vielfalt von Geräte- und Kammertypen, die laborspezifischen Zellkulturbedingungen (Wasser, Glaswäsche, Serumcharge u.ä.) sowie die Tatsache, daß im Laufe der Zeit Sublinien von etablierten Myelomzelllinien entstanden sein dürften, die voneinander in den Eigenschaften, die für die Elektropulstechnik relevant sind, abweichen können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiermaterial

Zur Immunisierung wurden adulte weibliche Tiere des Stammes BALB/c eingesetzt (Tierzuchtbetrieb Schönwalde, unter SPF-Bedingungen gehalten). Solche Tiere dienten auch als Spender der Stützzellen für Zellkulturarbeiten und zur In-vivo-Kultivierung der Hybridome. Standardmischfutter und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

2.2. Zur Immunisierung eingesetzte Antigene

2.2.1. Zelluläre Antigene

Zur Immunisierung der Mäuse wurden Zellen der B-Zell-Linien Raji und LICR-LON-HMy-2, der T-Zell-Linien JURKAT, HUT 102 und der Non-T-Non-B-Linie Reh verwendet. Darüber hinaus wurden Mäuse mit ConA-stimulierten T-Zell-Blasten, mit der SE bindenden Lymphozytenfraktion des peripheren Blutes, mit der Fraktion der LGL aus dem peripheren Blut, mit einer an Basophilen angereicherten Fraktion der peripheren Blutleukozyten sowie mit Thymozyten immunisiert. Weitere zelluläre Antigene waren die Zelllinie U 937 (Herkunft: Histiozytäres Lymphom), fixierte Tonsillenzellen sowie eine Leukozytenpräparation aus Schweineblut.

Der Immunisierungsmodus war in allen Fällen ähnlich und entsprach einer Mehrfachapplikation des Antigens (Zellsuspension von 10^6 bis 10^7 Zellen in PBS). Appliziert wurde i.p. ohne KFA. Jeweils 4 Tage nach der letzten (Booster-) Immunisierung wurden die Milzen entnommen und zur Fusion verwendet.

2.2.2. Protein-Antigene

- Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm, Forschungsinstitut für Medizinische Diagnostik Dresden)
- Streptokinase (Arzneimittelwerk Dresden, Werkspräparation)
- Glukoseoxidase (aus Aspergillus niger, präpariert am Bereich Biochemie der Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig)
- IgG1(λ)_{Kir} (humanes Myelomprotein, präpariert von Frau Dr. Hädge, KMU Leipzig)
- IgE(λ)_{ND} (humanes Myelomprotein, zur Verfügung gestellt von Dr. Stefani, Kinderklinik Moskau)
- IgE(α)_{Yu} (humanes Myelomprotein, zur Verfügung gestellt von Dr. Stefani, Kinderklinik Moskau)
- IgD(λ)_{Di} zur Verfügung gestellt von Prof. Spiegelberg, USA
- λ _{Kir} (Leichtkettenpräparat aus dem Myelomprotein IgG1(λ)_{Kir}, präpariert von Frau Dr. Hädge, KMU Leipzig)
- PMSG (präpariert im Forschungszentrum für Tierzucht der Akademie der Landwirtschaftswissenschaften Rostock-Dummerstorf)
- Serotonin-BSA (präpariert von Dr. Petter, Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig)
- ACh-BSA (zur Verfügung gestellt von Dr. Petter, Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig)
- RF (Präparat aus Glykoproteinen des REISSNER'schen Fadens vom Rind, präpariert von Dr. Naumann, Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig)
- R-PE (Präparat von R-Phycoerythrin aus der Rotalge Ceramium rubrum [Huds. 1762], präpariert von Dipl.-Biol. M. Ladusch [KRAUS et al. 1987], Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig)

Die Immunisierung erfolgte durch Mehrfachapplikation des Antigens i.p. nach verschiedenen Schemata und in solchen Dosen, die erfahrungsgemäß zu einer starken Immunantwort führen. Die Primärimmunisierung erfolgte in KFA (Difco, USA; Verhältnis der Volumina 1:1). Die Entnahme der Milzen erfolgte 4 Tage nach der letzten Immunisierung.

2.3. Zellkulturarbeiten

2.3.1. PEG-Zellfusionen

Die PEG-vermittelten Fusionen erfolgten nach Standardmethoden, ebenso die Kultivierung in vitro und in vivo sowie die Kryokonservierung (FIEBIG 1984). Die verwendeten Fusionspartner sind unter 2.3.3. aufgeführt.

2.3.2. Materialien und Substanzen

A) Zellkulturmedien

- | | |
|-------------|----------------------|
| - RPMI 1640 | SIFIN |
| - RPMI 1640 | SERVA, Heidelberg |
| - IMDM | GIBCO, Glasgow |
| - IMDM | Boehringer, Mannheim |

B) Medienzusätze

- | | |
|---|--|
| - 5×10^{-5} M 2-ME (p.a.) | FERAK, Berlin |
| - 100 µg/ml Gentamycin | Pharmachim, Bulgarien |
| - 10 mM HEPES (p.a.) | SERVA, Heidelberg |
| - 2mM L-Glutamin (in
3tägigem Abstand) | REANAL, Ungarn |
| - 10 % FKS | SIFIN oder
Flow Laboratories GmbH, Meckenheim |

C) Zusätze für das HAT-Selektionsmedium

- 1×10^{-4} M Hypoxanthin
(chromatografisch rein) REANAL, Ungarn
- 4×10^{-7} M Aminopterin
(für Laborgebrauch) SCHUCHARD, München
- $1,6 \times 10^{-5}$ M Thymidin
(p.a.) Sigma Chemie, USA

Die gleiche Zusammensetzung, jedoch ohne Aminopterin, gilt für das HT-Medium.

Außerdem kam die HAT-Stammlösung (50 x) von SERVA zum Einsatz.

D) Gefriermedium

RPMI 1640, 7% DMSO und
20% FKS enthaltend

E) Mykoplasmenprotektion

Für mykoplasmengefährdete Kulturen wurden dem Medium

- 50 $\mu\text{g/ml}$ Tylosin, SERVA, Heidelberg, sowie
- 500 $\mu\text{g/ml}$ Lincomyzin, SERVA, Heidelberg

zugesezt.

F) PEG - Fusionsmedium

- Zellkulturmedium ohne 2-ME und ohne FKS

Alle Medien wurden mit tridestilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert (Sterilfiltrationsanlage SM 16274-142, Membranfilter SM 11306, Porengröße $0,45 \mu\text{m}$, SARTORIUS GmbH, Göttingen) und mit CO_2 pH-justiert.

G) Plastkulturgefäße

Als Fusions- und Klonierungsplatten wurden Gewebekulturplatten mit 96 Kavitäten (mit Flachboden, steril) der Firmen Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Becton Dickinson, USA (Falcon Microtest II 3008) und Costar, USA, verwendet.

Außerdem kamen in einigen Experimenten Mikrottestplatten des Kombimates MLW, VEB Polyplast Halberstadt (sterilisiert durch Gammabestrahlung) zum Einsatz. Diese wurden in keiner Weise vorbehandelt.

H) Glaskulturgefäße

MÜLLER- und BOVITZKY-Gewebekulturflaschen verschiedener Größen wurden vom VEB Technisches Glas Ilmenau bezogen.

I) Verwendete monoklonale Antikörper

Zur Markierung humaner Leukozyten mittels indirekter Immunfluoreszenz:

Bezeichnung	Antigen	Isotyp H-Kette	Quelle
BL-TP 3b	CD 3	gamma 1	Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig
BL-TH 4	CD 4	my	-----"-----
BL-TS 8/2	CD 8	gamma 1	-----"-----
BL-PE/20	R-PE	gamma 1	-----"-----
BL-PE/34	R-PE	gamma 1	-----"-----
BL-IgM/11	μ -Ketten	gamma 1	-----"-----
	humaner Ig	gamma 1	-----"-----

Als Kontrollantikörper in durchgeführten ELISA-Tests wurde eingesetzt:

Bezeichnung	Antigen	Isotyp H-Kette	Quelle
BL-HSC/3	Humane Sekretorische Komponente	gamma 1	Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig

2.3.3. Kultivierung und Konservierung der Hybridome

Die Zellkulturen wurden in einem CO₂ - Inkubator (Cytoperm^R HERAEUS, Hanau) bei 37°C in wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das Wachstum der Zellen wurde mit dem Umkehrmikroskop TELAVAL (Carl Zeiss Jena) kontrolliert.

Die Langzeitlagerung der Klone erfolgte in Flüssigstickstoff in Kryocontainern BO 200 (Kältetechnik Niedersachswerfen).

2.3.4. Myelom- und Hybridomzelllinien für die Zellfusionen

Als Fusionspartner in den meisten PEG- und Elektrofusionen diente die murine Myelomzelllinie P3-X63-Ag8.653 (KEARNEY et al. 1979) sowie in einigen Fällen die murine Myelomzelllinie SP2/0-Ag14 (SHULMAN et al. 1978).

In den Experimenten zur Herstellung bispezifischer mAK fanden die folgenden Hybridomzelllinien Einsatz (vollständig aus der Sektion Biowissenschaften der KMU Leipzig stammend):

Bezeichnung	Antigen	Isotyp H-Kette
H-BL-TP 3b	CD 3	gamma 1
H-BL-TS 8/2	CD 8	gamma 1
H-BL-PE/34	R-PE	gamma 1
H-BL-IgM/11	μ-Kette humaner Ig	gamma 1

2.4. Elektrofusion

2.4.1. Gerätetechnik

Der Elektrofusionsgenerator efg 01 wurde vom Wissenschaftlichen Gerätebau des Zentralinstitutes für Molekularbiologie Berlin-Buch konstruiert und gebaut. Er vereinigt in sich die Eigenschaften eines HF- und eines Impulsgenerators. Seine wesentlichen Parameter sind:

- Rechteckimpulse 100 - 300 V
- Impulsbreite 0,5 - 15 μ s
- Dielektrophoresespannung 10 bis 60 V
(Scheitelspannung)
- Dauer des Wechselfeldes 0,1 bis 15 s
- 3 Festfrequenzen 0,5 - 1,0 - 2,0 MHz

Es existiert darüber hinaus die Möglichkeit des Volumenabgleiches (0 bis 100 μ l, bezogen auf die Arbeit mit der Makro-Elektrodenkammer (s.u.)), wodurch die elektrischen Parameter bei unterschiedlichen Volumina konstant gehalten werden.

Schaltungstechnisch realisiert wurde, daß nach jedem d.c. Impuls nochmals für 5 s das Wechselfeld mit der vorgewählten Frequenz angelegt wird. Die HF ist andererseits auch komplett abschaltbar. Wählbar ist weiterhin der Hand- bzw. Automatikmodus. Bei letzterem läuft die Sequenz DE - Impuls - DE mit den vorgewählten Werten automatisch ab. Zur Kontrolle der eingestellten Parameter wurde ein Speicheroszilloskop vom Typ S 1/70 (SU) angeschlossen. Die Elektrofusionen 1 bis 44 wurden mit einem Vorläufer des beschriebenen Gerätes durchgeführt, welches in der gleichen Einrichtung hergestellt wurde. Es besitzt keinen Automatikmodus, nur eine Festfrequenz (1 MHz) und muß mit einem externen Spannungsversorgungsgerät (bis 300 V d.c., STATRON, Fürstenwalde) ergänzt werden. Impulszeiten und -feldstärken wurden mit Hilfe des Oszilloskopbildes eingestellt.

2.4.2. Elektrodenkammern

Als Elektrodenkammer diente in den meisten Fällen eine Konstruktion, die zum Lieferumfang des Gerätes efg 01 gehört. Dabei handelt es sich um zwei aus hochlegiertem Stahl gefertigte kreisförmige Plattenelektroden ($r = 25 \text{ mm}$, Stärke 1 mm), die durch einen isolierenden Kunststoffring voneinander getrennt werden (Innendurchradius 15 mm ; Stärke $0,5 \text{ mm}$). Damit wird gleichzeitig die Kammer in Form eines flachen Zylinders mit $h = 0,5 \text{ mm}$ und $r = 15 \text{ mm}$ gebildet (Volumen etwa $350 \mu\text{l}$). Vorteile dieses Kammertyps sind die gute Handhabbarkeit und die Tatsache, daß kein Totraum (= der Anteil der Suspension, der nicht zwischen den Elektroden liegt) existiert. Zellsuspensionen von 5 bis $200 \mu\text{l}$ sind problemlos zu verarbeiten. Die Plattenelektroden werden hitzesterilisiert. Durch Einlegen der Elektroden in ein Gehäuse wird der elektrische Kontakt hergestellt und gleichzeitig den Sicherheitsanforderungen entsprochen. Zweiter Kammertyp ist eine im Eigenbau hergestellte Objektträgerkammer (Mechanische Werkstatt der Sektion Biowissenschaften der KMU). Auf einem Glasobjektträger wurden parallel zwei Platindrähte (kreisrunder Querschnitt, $r = 0,1 \text{ mm}$) im Abstand von $0,2 \text{ mm}$ fixiert. Die Kontaktierung erfolgte durch das Einschieben des Objektträgers in ein Piakryl-Sicherheitsgehäuse mit Federkontakten, welches aufgrund seiner Transparenz auch die direkte mikroskopische Beobachtung des Fusionsprozesses ermöglicht. Nachteilig ist die schwierige Bergung der pulsbehandelten Zellen und das Vorhandensein von Totraum. Zur Sterilisierung der gesamten Kammer diente 70%iges Ethanol.

Der dritte Kammertyp, der getestet wurde, ist eine Entwicklung aus dem Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie Jena (KATENKAMP et al. 1989) und wurde uns dankenswerterweise von Dr. Katenkamp zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen Glasträger von etwa Objektträgergröße, dessen metallische Elektrodenfläche aufgedampft und mittels Ionenstrahlätzung so strukturiert wurde, daß die beiden Elektroden kammartig ineinandergreifen (Mäanderkammer nach FÖRSTER und EMEIS 1985). Auf eine 20 nm starke Nickel-Chrom-Schicht wurde eine $1,2 \mu\text{m}$

starke Aluminiumschicht aufgetragen und nach der Ätzung mit einer 35 nm starken SiO_2 -Schicht als mechanischem Schutz versiegelt. Die elektrische Verbindung wurde über ein Kupferblech realisiert, welches durch Gold-Bonden mit der Elektrodenfläche kontaktiert ist. Drei Elektrodenflächen mit Distanzen von 50, 100 bzw. 200 μm sind nutzbar. Die Stärke der Elektrodenfläche liegt mit 1,22 μm beträchtlich unter dem Durchmesser der Zellen, die zum Einsatz kommen, woraus sich Konsequenzen für die Feldbedingungen ergeben. Sterilisiert wurde mit 70%igem Ethanol. Im Gegensatz zur Platten-elektrodenkammer, bei der annähernd homogene Feldbedingungen vorliegen, sind die Felder, die mit den anderen beiden Kammertypen aufgebaut werden, inhomogen.

2.4.3. Vorbehandlung der Zellen

2.4.3.1. Myelomzellen

Die in der Phase exponentiellen Wachstums geernteten Myelomzellen wurden in einigen Fällen proteolytisch vorbehandelt. Dabei wurde Pronase aus *Streptomyces griseus* (Boehringer Mannheim) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml PBS eingesetzt. In einem Fall wurde eine Konzentration von 0,5 mg/ml gewählt. Höhere Konzentrationen erwiesen sich in Vorversuchen als ungeeignet. Die Dichte der Zellsuspension betrug hierbei 1×10^7 Zellen/ml sterilfiltrierte Pronaselösung. Nach kurzer Einwirkzeit (30 s bei 37°C) wurde das 10fache Volumen an eisgekühlter PBS zugegeben, die Zellen sedimentiert (300 x g, 10 min) und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Eventuell auftretende Zellaggregate wurden entfernt. Die Vitalität der Zellen wurde mit Trypanblau bestimmt.

2.4.3.2. Milzzellen

In einigen Fällen wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation nach BÖYUM (1976) eine Auftrennung der Milzzellsuspension vorgenommen. Die Dichte des Trennmediums betrug in den ersten Versuchen $1,077 \text{ g/cm}^3$. In vergleichenden Experimenten erwies sich die Dichte von $1,087 \text{ g/cm}^3$ als effektiver und wurde daraufhin verwen-

det. Das Trennmedium wurde mit einem identischen Volumen der Zellsuspension überschichtet, die Zelldichte betrug etwa 2×10^7 Zellen/ml. Zentrifugiert wurde bei Raumtemperatur und $450 \times g$ (20 min). Der Lymphozytenring wurde abgenommen und 3x in PBS gewaschen.

Substanzen:	- Dextran	Pharmacia, Uppsala, Schweden
	- Visotrast 370	Fahlberg-List, Magdeburg

Andere Vorbehandlungen in Form von Fluoreszenz- und Haptenmarkierungen sind in den Abschnitten 2.7. und 2.8. beschrieben. Vor dem Einsatz in der Zellfusion wurde mikroskopisch der Anteil blastenähnlicher Zellen bestimmt.

2.4.4. Fusionsmedien

Folgende Fusionsmedien wurden für die Elektrofusion eingesetzt:

- A) Fusionsmedium F1 (nach VIENKEN und ZIMMERMANN 1985)
 280 mM myo-Inosit SERVA, Heidelberg
 0,1 mM Kalziumazetat
 0,5 mM Magnesiumazetat
 1 mM Phosphatpuffer
- B) Fusionsmedium F2
 - wie F1, aber myo-Inosit ersetzt durch D-Mannit (SERVA, Heidelberg) gleicher Konzentration
- C) Fusionsmedium F3 (hypoton, nach STENGER et al. 1988)
 250 mM myo-Inosit SERVA, Heidelberg
 0,1 mM Kalziumazetat
 0,2 mM Magnesiumazetat
 1 mM L-Histidin SERVA, Heidelberg
- D) Fusionsmedium F4
 - isotonische Saccharoselösung (290 mM)

Alle Fusionsmedien wurden mit tridestilliertem Wasser angesetzt und ihre Leitfähigkeit mittels Konduktometer (Radelkis, Ungarn) bestimmt. Sie betrug für die einzelnen Medien:

F1	185 μScm^{-1}
F2	185 μScm^{-1}
F3	60 μScm^{-1}
F4	15 μScm^{-1}

2.4.5. Arbeitsschritte bei der Elektrofusion lymphoider Zellen

2.4.5.1. Arbeit mit der Plattenkammer

Alle Arbeiten (außer Zentrifugationen) wurden in einer Laminarbox durchgeführt.

Die zu fusionierenden Zellen wurden, nachdem sie eventuell wie unter 2.4.3. beschrieben vorbehandelt worden waren, in einem bestimmten numerischen Verhältnis gemischt, in ein 10ml-Zentrifugenröhrchen (Spitzboden) pipettiert und zusammen sedimentiert (Kühlzentrifuge K23 Janetzki, Engelsdorf; 300 x g, 10 min). Das numerische Verhältnis von kernhaltigen Milzzellen zu Myelomzellen betrug im Mittel $2,64 \pm 2,14$. Das Zellpellet wurde in 300 μl Fusionsmedium schonend resuspendiert und im gleichen Volumen 3x gewaschen (Tischzentrifuge T52.1 Janetzki, Engelsdorf; 300 x g, jeweils 2 min). Nach dem letzten Waschen wurden die Zellen in einem bestimmten Volumen Fusionsmedium aufgenommen, so daß die Zelldichte $1 \times 10^5 / \mu\text{l}$ betrug. Aus diesem Ansatz wurde das gewünschte Volumen (5-150 μl) vorsichtig auf die untere Plattenelektrode pipettiert, welche bereits vorher im Sicherheitsgehäuse fixiert wurde und zusammen mit dem Kunststoffring die Lage der Fusionskammer markiert. Eventuell beim Pipettieren aufgetretene Luftblasen wurden beseitigt, die Kammer durch Auflegen der oberen Plattenelektrode geschlossen und der Gehäusedeckel aufgeschraubt. Die Kammer wurde mit dem Fusionsgenerator verbunden, an welchem vorher die elektrischen Feldparameter (siehe 2.4.1.) eingestellt worden waren. Unmittelbar danach wurde die Fusionssequenz ausge-

löst und konnte am Oszilloskop kontrolliert werden. Nach Beendigung der elektrischen Behandlung wurde die Kammer vom Generator getrennt und geöffnet. Die an den Platten haftende Zellsuspension wurde vorsichtig mit je 0,5 ml auf 37°C erwärmtem Medium (IMDM oder RPMI 1640, jeweils 10% FKS) überschichtet. Nach schonender Durchmischung wurde die Suspension in 1 ml Medium überführt. Nochmaliges Überschichten der Platten mit je 0,5 ml Medium und leichtes Ankippen gestatteten eine maximale Rückgewinnung der eingesetzten Zellen. Vor dem Einstellen in den CO₂-Inkubator wurde der Zellsuspension eine geringe Probe (ca. 2 µl) entnommen und in einer speziellen Beobachtungskammer mikroskopisch auf Zellzustand und Vorliegen von Fusionsprodukten ausgewertet (LABOVAL 4, Carl Zeiss Jena). Diese Kammer wurde aus einem Objektträger und einem dünnen Messingring (Innenradius 4 mm, ca. 0,2 mm stark) gebildet. Nach dem Einpipettieren der Probe wurde sie mit einem Deckglas verschlossen. Die elektropulsbehandelten Zellen verblieben für 30 bis 60 min im CO₂-Brutschrank. Während dieser Zeit konnten sich weitere Fusionen - unter Verwendung jeweils neuer steriler Plattenelektroden - in der beschriebenen Abfolge anschließen. Der Zeitumfang einer Teilfusion von der Resuspension des gewaschenen Zellpellets bis zum Einstellen der Röhrchen in den Inkubator lag bei etwa 2 min. Nach der post-fusion Inkubation wurden die Zellen sedimentiert (Bedingungen wie beim Waschen) und das Pellet in HAT-Medium aufgenommen. Die Zelldichte wurde hierbei so eingestellt, daß beim Ausplattieren ca. 1×10^5 Zellen pro Vertiefung der 96er Zellkulturplatte ausgesät wurden. Diese Platten wurden in der Regel einen Tag vor der Fusion durch Ausplattieren von syngenen Maus-Peritonealmakrophagen (5×10^3 /well) oder Maus-Milzzellen (1×10^5 /well) vorbereitet und über Nacht inkubiert. In einigen Fällen wurde auch erst am Tag nach der Fusion das Normalmedium durch HAT-Medium ersetzt. Ansonsten erfolgte der Medienwechsel im Abstand von 3-4 Tagen. Da das Auftreten der ersten Hybridome innerhalb der einzelnen Fusionen sehr differierte (4 Tage bis zu zwei Wochen), wurde die Umstellung von HAT- auf HT-Medium in Abhängigkeit vom Hybridomwachstum vorgenommen. Gleiches gilt auch für das Auszählen der gewachsenen Klone. Zum Ermitteln der absoluten Fusionsfrequenzen wurde der

Wert der jeweils letzten Auszählung verwendet, wobei alle gewachsenen Hybridome berücksichtigt wurden, einschließlich solcher, die in einer relativ frühen Phase abgestorben waren. Nach zweimaligem Füttern der Kulturen mit HT-Medium konnten sie problemlos auf Normalmedium umgestellt werden.

2.4.5.2. Arbeit mit der Objektträgerkammer

Die Zellsuspension, in der sich die Fusionspartner in gleichen Verhältnissen wie bei der Arbeit mit der Plattenkammer befinden, wurde nach 3maligem Waschen in Fusionsmedium auf eine Zelldichte von $10^4/\mu\text{l}$ eingestellt. Die Kammer faßt ein Volumen von etwa 5 bis 20 μl , wobei der Totraum (der Anteil der Suspension, der nicht zwischen den Elektroden liegt) relativ groß ist. Das Füllen der Kammer erfolgte mittels Lufthubpipette. Nach dem Verschließen und damit dem Kontaktieren der Kammer konnte sie unter einem Invers- oder einem Normal-Durchlichtmikroskop fixiert und der Prozeß der DE sowie die Zellfusion selbst direkt beobachtet werden. Die Parameter für die elektrische Behandlung mußten aufgrund der unterschiedlichen Kammerbedingungen neu eingestellt werden: Dazu dienten entsprechende Vorversuche mit irrelevanten Milz- und Myelomzellen. Zur Bergung der Zellen nach der Fusion wurden die Platindrähte mit 200 μl Normalmedium überschichtet und die Suspension vorsichtig aufpipettiert. Dieser Vorgang wurde mindestens 1 x wiederholt. Die mikroskopische Kontrolle ergab jedoch, daß in keinem Fall eine 100%ige Rückgewinnung der eingesetzten Zellen erfolgte. Die weitere Behandlung (Inkubieren, Ausplattieren) gleicht der unter 2.4.5.1. beschriebenen, die Zelleinsaatdichte lag allerdings um etwa das 10fache niedriger. Eine Wiederholung des Fusionsvorganges war durch sofortiges intensives Spülen mit aqua dest. und Einlegen der Kammer in 70%iges Ethanol möglich.

2.4.5.3. Arbeit mit der Mäanderkammer

Hierbei mußten wiederum die elektrischen Parameter in Vorversuchen neu eingestellt werden, da veränderte Feldbedingungen gegenüber den oben angeführten Kammertypen vorlagen. Genutzt wurden die Elektrodenflächen mit 100 und 200 μm Distanz. Die Zelldichte lag bei $5 \times 10^3 - 1 \times 10^4 / \mu\text{l}$, die Kammerfüllung erfolgte mittels Lufthubpipette. Die eingesetzten Volumina lagen zwischen 10 und 50 μl Zellsuspension. Zum Zweck der besseren mikroskopischen Kontrolle und der Verteilung der Zellen über eine möglichst große Elektrodenfläche wurde dieselbe mit einem sterilen Deckgläschen verschlossen. Nach der Kontaktierung und der Fixierung der Kammer unter dem Durchlichtmikroskop wurde die Fusionssequenz ausgelöst. Die Zellen wurden nach Überschichten mit Normalmedium geborgen, wobei dieser Arbeitsgang noch einmal wiederholt wurde. Der Anteil der nicht zurückgewonnenen Zellen lag dabei unter einem Prozent. Für wiederholte Fusionen mit der Mäanderkammer mußte mit sterilem aqua dest. zwischengeschpült werden. Für Inkubation und Ausplattieren gilt das für die Plattenkammer beschriebene Verfahren.

2.5. Ermittlung der Fusionsfrequenzen und Primärscreening

Die absolute Fusionsfrequenz FF_a ergibt sich aus den Werten für die Gesamtzahl der aufgewachsenen Hybridome (ermittelt nach mehrmaligen Auszählungen) n_{Hyb} und der Anzahl eingesetzter Myelomzellen n_{My} bzw. Milzzellen n_{Mi} :

$$FF_{a/\text{My}} = n_{\text{Hyb}}/n_{\text{My}} \times 10^5 \quad (FF_a, \text{ bezogen auf Myelomzellen})$$

$$FF_{a/\text{Mi}} = n_{\text{Hyb}}/n_{\text{Mi}} \times 10^5 \quad (FF_a, \text{ bezogen auf Milzzellen})$$

Die Überstände von Hybridomen, die eine bestimmte Größe erreicht hatten (mehr als 100 Zellen), wurden in einem Primärscreening auf das Vorhandensein von Ag-spezifischen AK getestet. Je nach Art des zur Immunisierung eingesetzten Ag kam dabei ein ELISA, die indirekte Immunfluoreszenz oder immunhistochemische Detektionsverfahren zum Einsatz. Dieser Test wurde zur Absicherung der

5. Inkubation für 1 h bei 37°C
6. Dreimaliges Waschen der Platten mit PBS/Tween, jeweils 3 min
7. Einpipettieren von 100 µl ZAM/HRP (Gebrauchsverdünnung 1:1000 in PBS/Tween)
8. Inkubation für 1 h bei 37°C
9. Dreimaliges Waschen der Platten mit PBS/Tween, jeweils 3 min
10. Einpipettieren von jeweils 100 µl der frisch angesetzten Substratlösung
Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß
11. Abstoppen der Reaktion mit je 100 µl 4N H₂SO₄
12. Photometrische Auswertung des Reaktionsproduktes mit dem Gerät SUMAL PE (Carl Zeiss Jena) bei $\lambda = 492 \text{ nm}$

Gegebenenfalls (z.B. bei Mangel an Ag) können die Probenvolumina ohne größeren Informationsverlust auf je 50 µl reduziert werden.

2.5.2. Indirekte Immunfluoreszenz

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung (JENALUMAR Carl Zeiss Jena) und die zytofluorimetrischen Analysen am FACS 440, (Becton/Dickinson, USA) zum Zwecke der Primärtestung sowie für die Analyse von Hybrid-Hybridomen wurden so durchgeführt, wie bei SEIFERT (1989) beschrieben.

Der Test auf Bispezifität von AK-Hybriden gegenüber Membran-Ag von PBL und R-PE erfolgte durch eine Zweischnitt-Technik, wobei im ersten Schritt PBL mit dem Überstand des entsprechenden Klones und nach Waschen im zweiten Schritt mit einer R-PE-Lösung in Gebrauchsverdünnung inkubiert wurden.

2.5.3. Immunhistochemische Untersuchungen

Diese wurden in Kooperation mit Dr. Kupper (KMU Leipzig; humanes lymphatisches Gewebe) und Dr. Petter (KMU Leipzig; Rattenhirn) durchgeführt. Die entsprechende Methodik ist bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben worden (KUPPER et al. 1984, TYPLT 1986).

2.6. Zellmarkierungen

2.6.1. Biotinylierung von Myelomzellen bzw. Hybridomzellen

1×10^7 Myelomzellen (P3-X63-Ag8.653 oder SP2/0-Ag14) wurden 2x in steriler PBS gewaschen und in 2ml PBS resuspendiert (Zelldichte 5×10^6 /ml). BNHS (Boehringer Mannheim) wurde in Dimethylformamid gelöst (5 mg/ml). Von dieser Lösung wurden 5 μ l der Zellsuspension zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schütteln wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml eisgekühlter PBS gestoppt und die Zellen 2x im gleichen Volumen PBS gewaschen. Die erfolgte Biotinylierung wurde nach Inkubation eines Aliquots mit Avidin/FITC (s.u.) in Gebrauchsverdünnung fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen (JENA-LUMAR, Carl Zeiss Jena). Für Hybridomzellen, die biotinyliert werden sollten, wurde gleichermaßen verfahren.

2.6.2. Fluoreszenzmarkierung von Hybridomzellen

5×10^7 Zellen einer Hybridomzelllinie wurden 2x in steriler PBS gewaschen und das Sediment in 1 ml ZAM/FITC (SIFIN, Gebrauchsverdünnung in PBS) oder alternativ nach Biotinylierung (s. 2.6.1.) in Avidin/FITC (Gebrauchsverdünnung, s. 2.7.2.) aufgenommen. Die Inkubation erfolgte unter Lichtabschluß für 30 min bei 4°C. Dreimaliges Waschen in PBS schloß sich an. Das an das Membranimmunoglobulin gebundene FITC-Konjugat ließ sich fluoreszenzmikroskopisch nachweisen.

Für die R-PE-Markierung wurden 5×10^6 Hybridomzellen, die mAK gegen R-PE produzieren, gewaschen und das Zellsediment in 0,5 ml R-PE-Lösung (5 μ g/ml) resuspendiert. Inkubation, Waschen und mikroskopische Kontrolle erfolgten wie oben beschrieben.

2.6.3. R-PE-Markierung von antigenbindenden Milzzellen

Milzzellen der mit R-PE immunisierten Maus wurden präpariert und gewaschen. 2×10^7 Zellen der Suspension wurden in 2 ml einer R-PE-Lösung (10 μ g/ml) aufgenommen und inkubiert (30 min bei 4°C

unter Lichtabschluß). Nach zweimaligem Waschen in PBS konnten die markierten Zellen im FACS 440 sortiert werden.

2.7. Herstellung von Konjugaten

2.7.1. Antigen-Avidin-Konjugate

Die Konjugation erfolgte nach der SPDP-Methode (CARLSSON et al. 1978): 350 μg Avidin (FERAK, Berlin) bzw. 1 mg Antigen (IgD_{Di}) wurden mit dem 13fachen (Antigen) bzw. mit dem 5fachen (Avidin) molaren Überschuß an SPDP modifiziert. Das modifizierte Avidin wurde bei pH 4,5 mittels DTT reduziert und nach Dialyse mit dem modifizierten Ag vermischt. Die Reaktion wurde photometrisch durch die Extinktionsmessung bei 343 nm (Freisetzen von Pyridin-2-thion; SPEKOL 20, Carl Zeiss Jena) kontrolliert. Das Reaktionsprodukt wurde gegen PBS dialysiert und sterilfiltriert.

2.7.2. Haptenisierungen

Die Fluoreszenzmarkierung von Avidin für den Test auf erfolgreiche Biotinylierung von Zellen erfolgte nach Standardmethoden:

1 mg FITC wurde in 100 μl Karbonatpuffer pH 9,5 gelöst und mit 10 μl einer FITC-Lösung (Isomer I, SERVA Heidelberg) in Karbonatpuffer (2 mg FITC/ml Puffer) versetzt. Nach 3 h Reaktionszeit bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß wurde das Reaktionsgemisch in einer Sephadex-G-25-Säule (Pharmacia, Uppsala) aufgetrennt und das Konjugat in einem geeigneten System getestet und austitriert (PBL, vorinkubiert mit biotinylierten mAK gegen PBL-Membranantigene).

Die Biotinylierung von IgE_{ND} , AP und HRP (Reinheitsgrad 1, Boehringer Mannheim) wurde durch die Reaktion der Proteine mit BNHS (Boehringer Mannheim) in 0,2 M Boratpuffer pH 8,5 realisiert. Zu 1 mg Protein wurden 250 μg BNHS (gelöst in Dimethylformamid) gegeben und das Reaktionsgemisch 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 μl 3 M Glyzin gestoppt und das

freie BNHS an Sephadex G-25 abgetrennt. In einem ELISA, bei welchem das biotinylierte Protein in starker Verdünnung an Plaste adsorbiert wurde, konnte mit Avidin als Brückenmolekül sowie mit biotinylierter HRP-Lösung - bei Anwendung geeigneter Kontrollen - die erfolgte Haptenisierung nachgewiesen werden.

2.8. Versuche zur Rezeptor-vermittelten Elektrofusion

2.8.1. Avidin-Biotin-Methode nach LO et al.(1984)

3×10^7 Milzzellen einer mit IgD immunisierten Maus wurden 2x in serumfreiem Medium RPMI 1640 gewaschen und in 5 ml steriler PBS, welche das nach 2.7.1. hergestellte IgD-Avidin-Konjugat enthielt, aufgenommen (Inkubationszeit 4 h bei 4°C). Nach zweimaligem Waschen mit kaltem Medium wurde die so vorbehandelte Milzzellsuspension mit $2,1 \times 10^6$ biotinylierten Myelomzellen (SP2/0, präpariert nach 2.6.1.) gemischt und für 3 h bei 4°C zusammen inkubiert. Die zur Elektrofusion gewählten Parameter sind mit den unter 2.8.1. angegebenen identisch.

2.8.2. Avidin-Biotin-Brückenmethode nach WOJCHOWSKI und SYTKOWSKI (1986)

$3,2 \times 10^7$ (Fusion Nr. 6) bzw. 1×10^7 (Fusionen Nr. 9 und 24) Milzzellen der immunisierten Maus (Antigene AP und IgE_{ND}) wurden zweimal in serumfreiem Medium RPMI 1640 gewaschen und in 2 ml einer Lösung des biotinylierten Ag ($10 \mu\text{g/ml}$ PBS) aufgenommen. Nach 3 h Inkubation bei 4°C wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 2 ml einer Lösung von Avidin (FERAK, Berlin) bzw. Streptavidin (Präparat von Dr.Schröder, Zentralinstitut für Molekularbiologie Berlin-Buch) aufgenommen ($50 \mu\text{g/ml}$), in welcher sie 30 min bei 4°C verblieben. Zwischenzeitlich wurden Myelomzellen (P3-X63-Ag8.653) biotinyliert, wie unter 2.6.1. beschrieben. Nach Ablauf der Inkubationszeiten und nachfolgendem Waschen in PBS wurden Milzzellen und Myelomzellen in einem bestimmten Verhältnis gemischt (Fusion Nr.6: 1:1; Fusionen Nr.9 und 24: 2:1) und

zusammen 1 h bei 37 °C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte (Waschen in Fusionsmedium F1 und Elektrofusion) erfolgten wie unter 2.8.2. beschrieben.

2.9. Zellsortierungen am FACS

Sortiert wurden vor der Fusion Nr.51 (Ag: R-PE) die rotfluoreszierenden (R-PE bindenden) Zellen in einem entsprechenden Sortierfenster. Ausgangsmenge waren ca. $1,5 \times 10^7$ mit R-PE inkubierte und gewaschene Mausmilzzellen.

Nach den Fusionen Nr. 56, 57, 63, 64 und 72 (zur Herstellung bispezifischer mAK) wurden die doppeltmarkierten Fusionsprodukte aus den beiden Hybridomzelltypen (FITC- und R-PE-markiert) in einem entsprechend gelegten Sortierfenster isoliert.

Zur Sterilisierung des Schlauchsystems des FACS diente 70%iges Ethanol und sterilfiltrierte PBS.

2.10. Isotypbestimmung

Die Isotypbestimmung der hergestellten mAK wurde freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. Edelmann übernommen. Der ELISA basiert auf isotypspezifischen Kaninchen-anti-Maus-Isotyp-Antiseren (Miles Lab., USA) für IgG1, IgG2_a, IgG2_b, IgG3 und IgM:

Antigen- bzw. ZAM-beschichtete Mikrottestplatten wurden nacheinander mit dem mAK-haltigen Überständen, mit den isotypspezifischen Antiseren und mit einem selbstpräparierten Ziege-anti-Kaninchen-HRP-Konjugat inkubiert (in der jeweiligen Gebrauchsverdünnung). Die Waschschritte sowie die Detektion und Messung des gebundenen AK-HRP-Konjugates erfolgten wie unter 2.5.1. beschrieben.

2.11. Statistik

Zur statistischen Auswertung der Fusionsfrequenzen wurde der U-Test nach MANN und WHITNEY (WEBER 1986) herangezogen (Signifikanzniveau $p = 0,05$). Für die statistische Sicherung der Korrelationskoeffizienten wurde ebenfalls von einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p = 0,05$ ausgegangen (GRIMM und RECKNAGEL 1985).

3. ERGEBNISSE

3.1. Fusionsfrequenzen der durchgeführten Elektrofusionen zur Herstellung von murinen Hybridomen

In den Tabellen 1 bis 3 sind die Fusionsfrequenzen aller 74 durchgeführten Elektrofusionen zur Herstellung muriner Hybridome zusammengefaßt. Aufgrund der Tatsache, daß innerhalb der Fusionsexperimente einzelne Parameter gezielt verändert wurden, die einzelnen Fusionen also nur bedingt vergleichbar sind, werden keine Mittel- und Streuungswerte angegeben.

Tabelle 1: Zusammenfassende Darstellung der Fusionsfrequenzen der durchgeführten Elektrofusionen zur Herstellung von murinen Hybridomen

Fusion Nr.	Antigen	FF _{E/My/1} ¹⁾	FF _{E/My/2} ²⁾	FF _{E/Mi/1} ¹⁾	FF _{E/Mi/2} ²⁾	FF _s (%) ³⁾	Anzahl Hybridome
1	AP	1,82	1,82	0,91	0,91	9	91
2	LGL	0,92	0,92	0,46	0,46	0	46
4	LGL	1,60	3,38	1,00	2,11	5	400
6	AP	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
7	T-Ly. ⁴⁾	7,20	9,60	2,70	3,60	11	864
8	Thym. ⁵⁾	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
9	AP	1,50	1,70	0,89	0,97	11	90
10	SHT-BSA	1,28	2,24	0,43	0,75	5	64
11	IgG1 _{Kir}	3,87	4,67	1,64	2,00	14	118
12	IgG1 _{Kir}	2,62	2,83	0,67	0,72	15	80
13	JURKAT	4,30	4,36	2,69	2,73	38	215
14	JURKAT	5,07	6,17	3,58	3,97	21	304
15	Thym. ⁵⁾	0,23	0,23	0,06	0,06	33	30
16	SHT-BSA	0,73	0,73	0,16	0,16	0	29
17	SHT-BSA	0,25	0,15	0,25	0,15	0	25
18	T-Ly. ⁴⁾	1,39	1,55	0,67	0,75	10	153
19	IgD _{Di}	3,05	3,05	0,21	0,21	28	64
20	IgD _{Di}	4,57	4,57	0,32	0,32	8	96
21	SHT-BSA	0,34	0,94	0,13	0,38	0	18
22	SK	5,27	6,60	1,84	2,30	10	295

- 1) Anzahl Hybridome/10⁵ eingesetzte Zellen (My = Myelomzellen; Mi = Milzzellen)
Index 1 kennzeichnet den durchschnittlichen Wert, der sich aus allen durchgeführten Teilfusionen ergibt.
- 2) Index 2 kennzeichnet den Wert der jeweils besten Teilfusion.
- 3) Anteil Ag-positiver Klone an der Gesamtheit der gewachsenen Kulturen
- 4) humane T-Lymphozyten aus PBL
- 5) humane Thymozyten

Tabelle 2: Zusammenfassende Darstellung der Fusionsfrequenzen der durchgeführten Elektrofusionen zur Herstellung von murinen Hybridomen (Fortsetzung)

Fusion Nr.	Antigen	FF _{E/My/1} ¹⁾	FF _{E/My/2} ²⁾	FF _{E/Mi/1} ¹⁾	FF _{E/Mi/2} ²⁾	FF _S (%) ³⁾	Anzahl Hybridome
23	IgE _{ND+Yu}	0,56	0,82	0,29	0,42	18	57
24	IgE _{ND+Yu}	0,34	0,36	0,17	0,18	14	17
25	LGL	3,10	6,05	1,09	2,90	12	395
26	LGL/Thym.	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
27	lambda _{Kir}	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
28	LGL/T-Ly.	8,40	10,40	1,93	2,36	11	552
29	fix.Ly. ⁶⁾	1,55	2,92	0,42	0,79	7	101
30	PMSG	0,57	0,87	0,43	0,87	12	82
31	5HT-BSA	0,30	0,73	0,11	0,22	0	26
32	5HT-BSA	1,45	1,60	2,42	2,67	0	29
33	lambda _{Kir}	3,40	3,90	1,51	2,16	23	136
34	Basophile	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
35	HUT	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
36	Raji	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
37	HUT	2,11	3,20	1,67	2,67	15	95
38	lambda _{Kir}	0,51	0,90	0,21	0,29	15	22
39	Basophile	0,13	0,50	0,06	0,13	20	6
40	PMSG	3,50	5,01	1,15	1,29	26	161
41	5HT-BSA	0,81	0,83	1,38	1,78	0	29
42	IgG1 _{Kir}	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
43	Raji	8,36	9,60	1,77	2,40	16	585
44	Raji	1,69	5,90	0,36	1,50	19	118
45	Basophile	1,51	2,15	0,38	0,55	37	86
46	IgG1 _{Kir}	1,40	2,00	2,08	2,27	5	120
47	lambda _{Kir}	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
48	ACh-BSA	3,76	10,20	1,54	2,55	38	338
49	RF	2,24	3,33	1,10	1,64	35	121
50	R-PE	3,15	5,80	1,58	2,90	7	441
51	R-PE	3,67	4,30	7,33	8,70	59	22
52	HMy	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
53	HMy	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
54	ACh-BSA	1,18	2,20	0,74	1,37	21	26
55	HMy	9,27	12,70	2,60	3,60	26	649
58	LGL	3,17	7,03	1,37	2,00	21	342
59	T-Bl. ⁷⁾	0,12	0,60	0,05	0,30	40	16
60	LGL	0,10	0,10	0,04	0,04	0	12
61	T-Bl. ⁷⁾	2,44	5,00	0,82	2,00	5	198
62	Leu/Sch ⁸⁾	2,38	2,90	0,63	0,77	5	190
66	LGL	12,85	16,85	4,28	5,62	5	1028
67	R-PE	0,37	3,00	0,37	3,00	5	9
68	fix.Ly. ⁶⁾	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0

1) - 5) siehe Tabelle 1

6) fixierte Tonsillenlymphozyten

Tabelle 3: Zusammenfassende Darstellung der Fusionsfrequenzen der durchgeführten Elektrofusionen zur Herstellung von murinen Hybridomen (Fortsetzung)

Fusion Nr.	Antigen	FF _{E/My/1} ¹⁾	FF _{E/My/2} ²⁾	FF _{E/Mi/1} ¹⁾	FF _{E/Mi/2} ²⁾	FF _S (%) ³⁾	Anzahl Hybridome
69	fix.Ly. ⁶⁾	9,73	12,00	3,08	3,96	0	895
71	T-Bl. ⁷⁾	10,44	12,00	3,68	4,20	0	919
73	GOX	9,28	10,90	2,97	3,50	2	742
74	U 937 ⁹⁾	3,25	5,90	1,08	2,00	40	244
76	5-HT-BSA	3,20	3,20	1,61	1,61	0	435
77	Raji	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
78	5-HT-BSA	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
79	Raji	0,00	0,00	0,00	0,00	0	0
80	HUT 102	9,00	9,00	3,60	3,60	12	360
81	5-HT-BSA	3,33	3,50	1,67	1,75	0	200
82	Raji	14,53	16,15	2,91	3,23	10	581
83	B-Zel. ¹⁰⁾	12,08	12,10	2,42	2,42	11	483
84	GOX	15,38	15,40	6,06	6,06	20	600

- 1) - 6) siehe Tabellen 1 und 2
7) ConA-stimulierte humane T-Zell-Blasten
8) Leukozyten aus Schweineblut
9) Zelllinie (Herkunft histiozytäres Lymphom)
10) humane B-Zellen

3.2. Vergleich der parallel durchgeführten Elektro- bzw. PEG-Fusionen hinsichtlich ihrer Fusionsfrequenzen

In 33 Fällen wurden Elektro- und PEG-Fusion für den direkten Vergleich parallel durchgeführt, d.h. mit demselben Ausgangsmaterial an Milzzellen und Myelomzellen. Aus Tabelle 4 sind die mit beiden Techniken erreichten absoluten Fusionsfrequenzen ersichtlich. Trotz der relativ hohen Standardabweichungen sowohl bei PEG- als auch bei Elektrofusionen ist klar erkennbar, daß bei letzteren die FF deutlich höher liegt. Diese Erhöhung ist signifikant ($p=0,05$).

Tabelle 4: Fusionsfrequenzen der parallel durchgeführten Elektro- und PEG-Fusionen

Fusion Nr.	Antigen	FF _{P/My} ¹⁾	FF _{P/Mi} ²⁾	FF _{E/My/1} ³⁾	FF _{E/My/2} ⁴⁾	FF _{E/Mi/1} ⁵⁾	FF _{E/Mi/2} ⁶⁾
1	AP	0,64	0,13	1,82	1,82	0,91	0,91
2	LGL	0,38	0,09	0,92	0,92	0,46	0,46
4	LGL	0,42	0,06	1,60	3,38	1,00	2,11
7	T-Ly. ⁷⁾	1,48	0,29	7,20	9,60	2,70	3,60
9	AP	0,12	0,03	1,50	1,70	0,89	0,97
11	IgG1 _{Kir}	0,54	0,12	3,87	4,67	1,64	2,00
12	IgG1 _{Kir}	0,28	0,03	2,62	2,83	0,67	0,72
14	JURKAT	0,78	0,17	5,07	6,17	3,58	3,97
18	T-Ly.	1,31	0,10	1,39	1,55	0,67	0,75
22	SK	0,57	0,04	5,27	6,60	1,84	2,30
23	IgE _{ND+Yu}	0,34	0,10	0,56	0,82	0,29	0,34
24	IgE _{ND+Yu}	0,34	0,10	0,34	0,36	0,17	0,18
25	LGL	1,15	0,35	3,10	6,05	1,09	2,90
28	LGL/T-Ly.	3,00	1,14	8,40	10,40	1,93	2,36
29	fix.Ly.	0,55	0,15	1,55	2,92	0,42	0,79
30	PMSG	0,11	0,04	0,57	0,87	0,43	0,87
33	lambda _{Kir}	0,74	0,06	3,40	3,90	1,51	2,16
37	HUT	0,92	0,18	2,11	3,20	1,67	2,67
38	lambda _{Kir}	0,05	0,01	0,51	0,90	0,21	0,29
39	Basophile	0,01	0,003	0,13	0,50	0,06	0,13
40	PMSG	1,65	0,33	3,50	5,01	1,15	1,29
43	Raji	0,89	0,18	8,36	9,60	1,77	2,40
44	Raji	0,71	0,14	1,69	5,90	0,36	1,50
49	RF	0,37	0,04	2,24	3,33	1,10	1,64
55	HMy	0,71	0,09	9,27	12,70	2,60	3,60
58	LGL	0,27	0,06	3,17	7,03	1,37	2,00
60	LGL	0,05	0,005	0,10	0,10	0,04	0,04
61	T-Bl. ⁷⁾	0,15	0,03	2,44	5,00	0,82	2,00
62	Leu/Sch	0,46	0,05	2,38	2,90	0,63	0,77
66	LGL	5,00	1,00	12,85	16,85	4,28	5,62
73	GOX	1,50	0,30	9,28	10,90	2,97	3,50
84	GOX	3,00	0,67	15,38	15,40	6,06	6,06
Mittelwerte: ⁸⁾ (n=33)		0,91	0,19	3,81	5,14	1,41	1,91
Standard- abweichung(±)		1,04	0,26	3,77	4,38	1,32	1,49

- 1) absolute FF der PEG-Fusionen, berechnet als Klone/10⁵ Myelomzellen
2) absolute FF der PEG-Fusionen, berechnet als Klone/10⁵ Milzzellen
3) absolute FF der Elektrofusionen (Mittel über alle Teilfusionen): Klone/10⁵ Myelomzellen
4) absolute FF der Elektrofusionen (jeweils beste Teilfusion): Klone/10⁵ Myelomzellen
5) absolute FF der Elektrofusionen (Mittel über alle Teilfusionen): Klone/10⁵ Milzzellen
6) absolute FF der Elektrofusionen (jeweils beste Teilfusion): Klone/10⁵ Milzzellen
7) Abkürzungen der Antigene siehe Tabellen 1 - 3
8) In die Mittelwertbildung gehen nur die Werte der Tabelle 4 ein. Fusionen, bei denen PEG- und Elektrofusionstechnik parallel eingesetzt wurden, die aber aus verschiedenen Gründen keinen objektiven Vergleich zuließen (Infektionen, unterschiedliche Kulturbedingungen), wurden in der Tabelle 4 nicht erfaßt und bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.

Bildet man für jeden Parallelversuch das numerische Verhältnis zwischen den absoluten Fusionsfrequenzen für EF und PEG-Fusion und wertet diese Verhältniszahlen statistisch aus, so erhält man die in Tabelle 5 zusammengefaßten Werte. Je nach Berechnungsbasis und Bezugnahme auf die mittlere bzw. maximale FF_a bei den Elektrofusionen ist also die Elektrofusion hinsichtlich der absoluten FF 5- bis 20-mal effektiver als die PEG-Technik.

Tabelle 5: Mittelwerte der Quotienten aus den vergleichbaren Fusionsfrequenzen von Elektro- und PEG-vermittelten Fusionen (n=33)

	EF : PEG (Mittelwert aller Teilfusionen EF)	EF : PEG (jeweils beste Teil- fusion EF berücksichtigt)

FF berechnet auf 10^5 eingesetzte Myelomzellen	5,76 ± 4,14	9,45 ± 10,13
FF berechnet auf 10^5 eingesetzte Milzzellen	13,58 ± 10,69	19,93 ± 16,60

In Abb.1 sind die Werte für die absoluten Fusionsfrequenzen bei EF bzw. PEG-Fusion graphisch dargestellt. Der Graphik ist u.a. zu entnehmen, daß häufig in Versuchen mit erfolgreicher Elektrofusion auch die PEG-Fusion zu guten FF führte. Diese Korrelation konnte bestätigt und als signifikant ($p=0,05$) bestimmt werden (Abb.2). Da eine direkte Beeinflussung der beiden Methoden untereinander ausgeschlossen werden kann, liegt es nahe, daß eine gemeinsame Abhängigkeit von einem oder mehreren anderen Faktoren besteht. Diese sind in den zur Fusion verwendeten Zellen oder in den gleich guten bzw. weniger guten Kulturbedingungen zum Zeitpunkt des Fusionsexperimentes zu suchen.

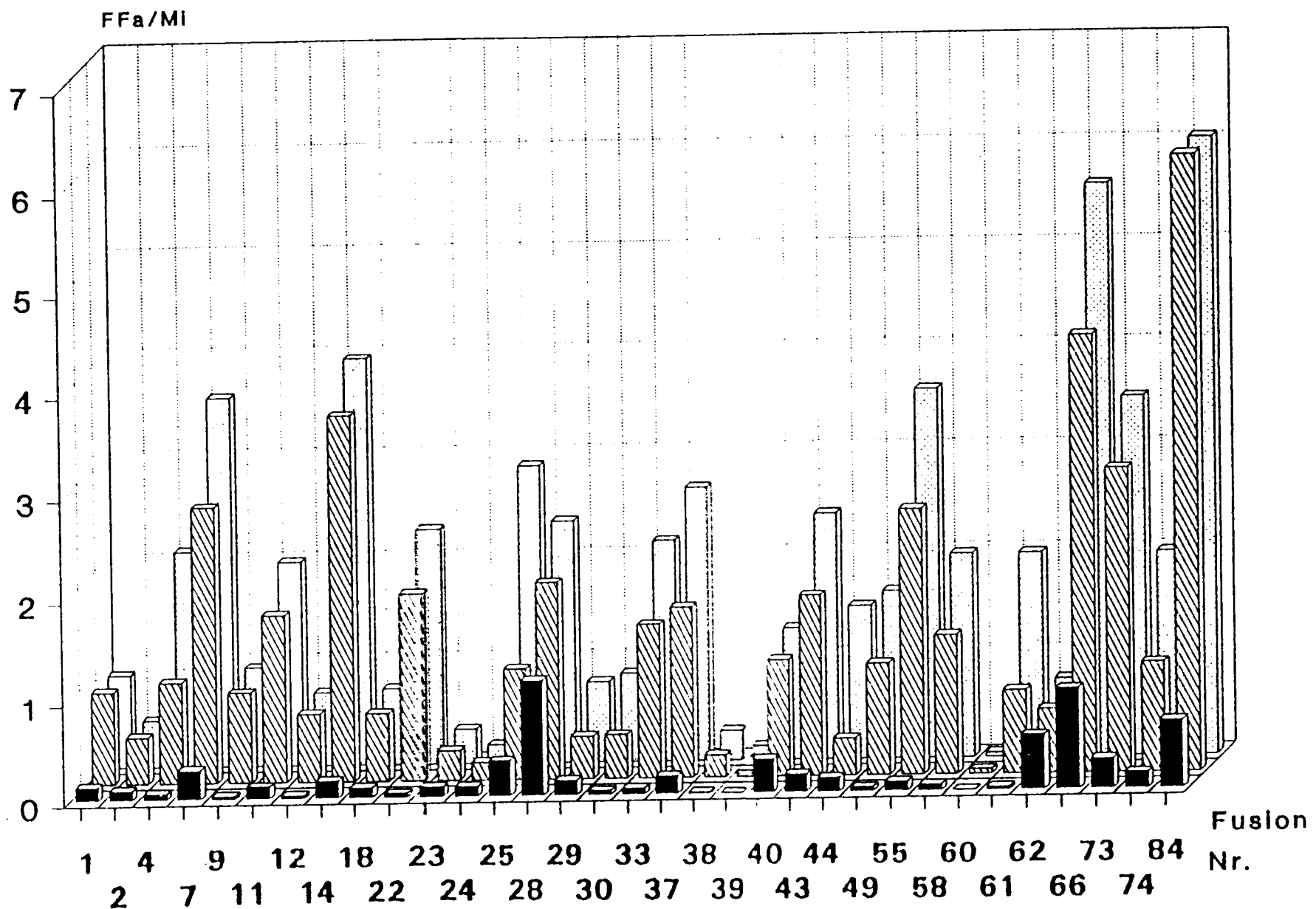


Abb. 1: Absolute Fusionsfrequenzen (FF_a/M_i) bei parallel durchgeführten PEG- und Elektrofusionen (vordere Balken stehen für die PEG-Fusionen, mittlere für den Mittelwert der Teilfusionen bei Elektrofusion, hintere für die jeweils beste Elektro-Teilfusion)

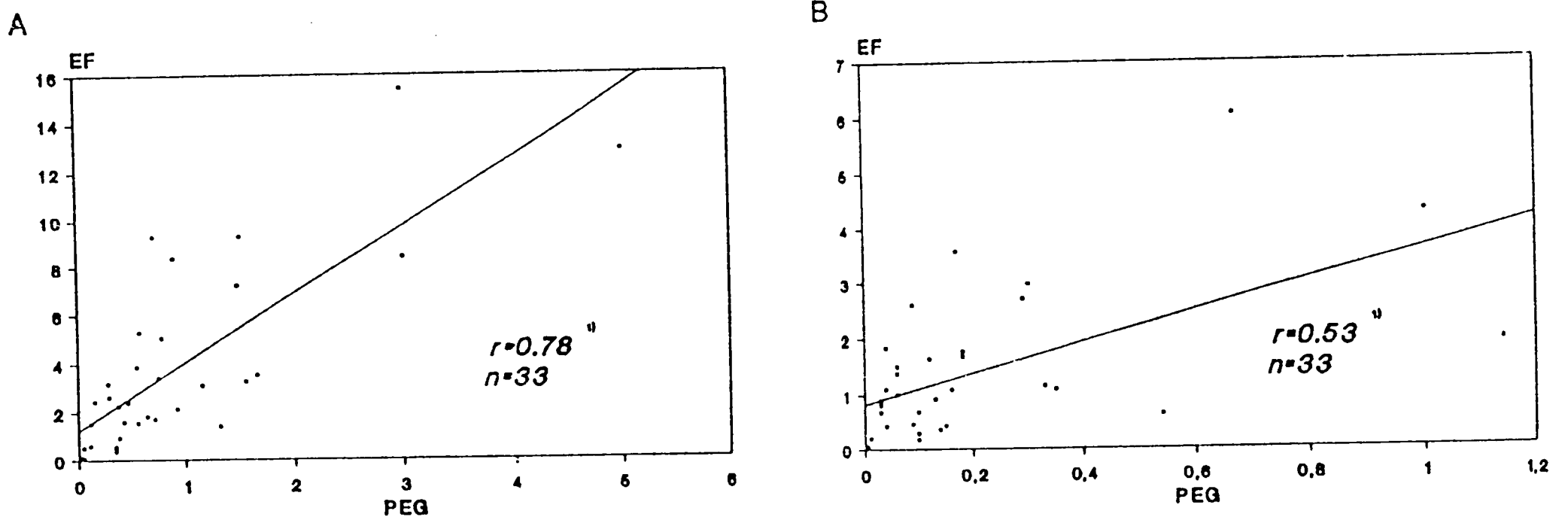


Abb. 2: Korrelation zwischen den Fusionsfrequenzen der parallel durchgeführten Elektro- und PEG-Fusionen
 A - Werte für die absoluten Fusionsfrequenzen, bezogen auf Myelomzellen und ohne Berücksichtigung der einzelnen Teilfusionen bei Elektrofusion (Mittelwert der entsprechenden Teilfusionen)
 B - wie A, aber bezogen auf Milzzellen
 1) Die Korrelationskoeffizienten sind statistisch gesichert ($p = 0,05$).

3.3. Abhängigkeit der absoluten Fusionsfrequenz von ausgewählten Parametern

3.3.1. Einfluß des numerischen Verhältnisses der Zellzahlen beider Fusionspartner (Milzzellen : Myelomzellen)

In insgesamt 11 Elektrofusionen wurde mit differierenden numerischen Verhältnissen der Fusionspartner gearbeitet. Dazu wurden je 2 bis 3 Teilfusionen durchgeführt. Als auszuwertender Parameter wurde hier die absolute Fusionsfrequenz FF_a hinsichtlich der Gesamtzahl eingesetzter Zellen (Anzahl Klone/ 10^5 [Myelom plus Milzzellen]) gewählt, da die FF_a/My bzw. die FF_a/Mi selbst Variable bei veränderten Zellzahlverhältnissen ist.

Es konnte keine direkte Beeinflussung der FF_a durch ein verändertes numerisches Zellzahlverhältnis (Milzzellen : Myelomzellen) innerhalb des untersuchten Intervalls 0,4 - 5,6 festgestellt werden.

Eine gesonderte Betrachtung der einzelnen Fusionsexperimente, innerhalb derer mit unterschiedlichen Zellzahlverhältnissen gearbeitet wurde, ergibt z.T. entgegengesetzte Trends. Diese kann man formal den drei Fallgruppen mit den Tendenzen steigend, fallend und gleichbleibend bzw. unregelmäßig zuordnen (s. Abbn.3A,B,C). Deren Analyse erbrachte jedoch keine Aussage über eine gemeinsame Größe innerhalb der jeweiligen Fallgruppen, die zu den entsprechenden Tendenzen in Beziehung stehen könnte. Besagte Tendenzen scheinen daher eher zufälliger Natur zu sein, zumal auch die zusammenfassende Auswertung der entsprechenden Versuche (Auftragung der Fusionsfrequenzen gegen das Zellzahlverhältnis bei allen Teilfusionen unabhängig von den Einzelversuchen) keine signifikante Korrelation ($r=0,14$; $n=25$; $p=0,05$) ausweist.

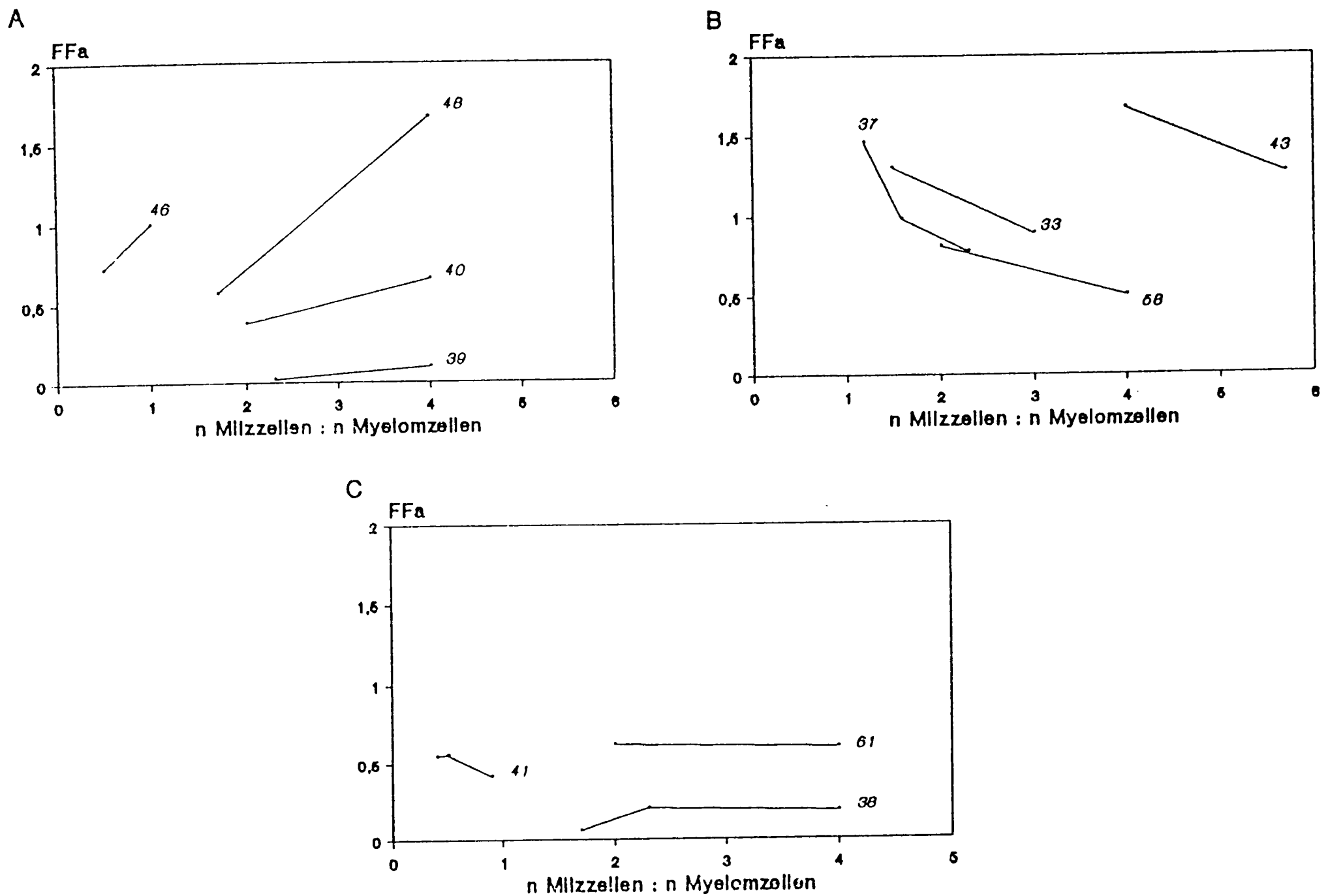


Abb.3: Trends der Fusionsfrequenz FF_a in 11 Elektrofusionsexperimenten, bei deren Teilfusionen das numerische Zellzahlverhältnis variiert wurde.
3 Fallgruppen mit steigender (A), fallender (B) und gleichbleibender bzw. unregelmäßiger (C) Tendenz der FF_a (Ziffern an den Kurven = Fusionsnummern)

3.3.2. Absolute Fusionsfrequenzen nach Fusionen mit kryokonservierten Mausmilzzellen

In 4 Fällen wurden die bei einem Elektrofusionsexperiment nicht verbrauchten Milzzellen durch Lagerung in Flüssigstickstoff kryokonserviert und zu einem späteren Zeitpunkt für weitere Versuche aufgetaut. Um tote Zellen zu eliminieren, wurde die Suspension in der Regel nach dem Auftauen über einen Dichtegradienten aufgetrennt (Dextran/ Visotrast; Dichte 1,086 bzw. bei Fusion Nr. 21 Dichte 1,077). Ausnahmen sind die Fusionen Nr.16 und 17, bei

welchen die Milzzellen sofort nach dem Auftauen mit Myelomzellen fusioniert wurden.

Die Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt.

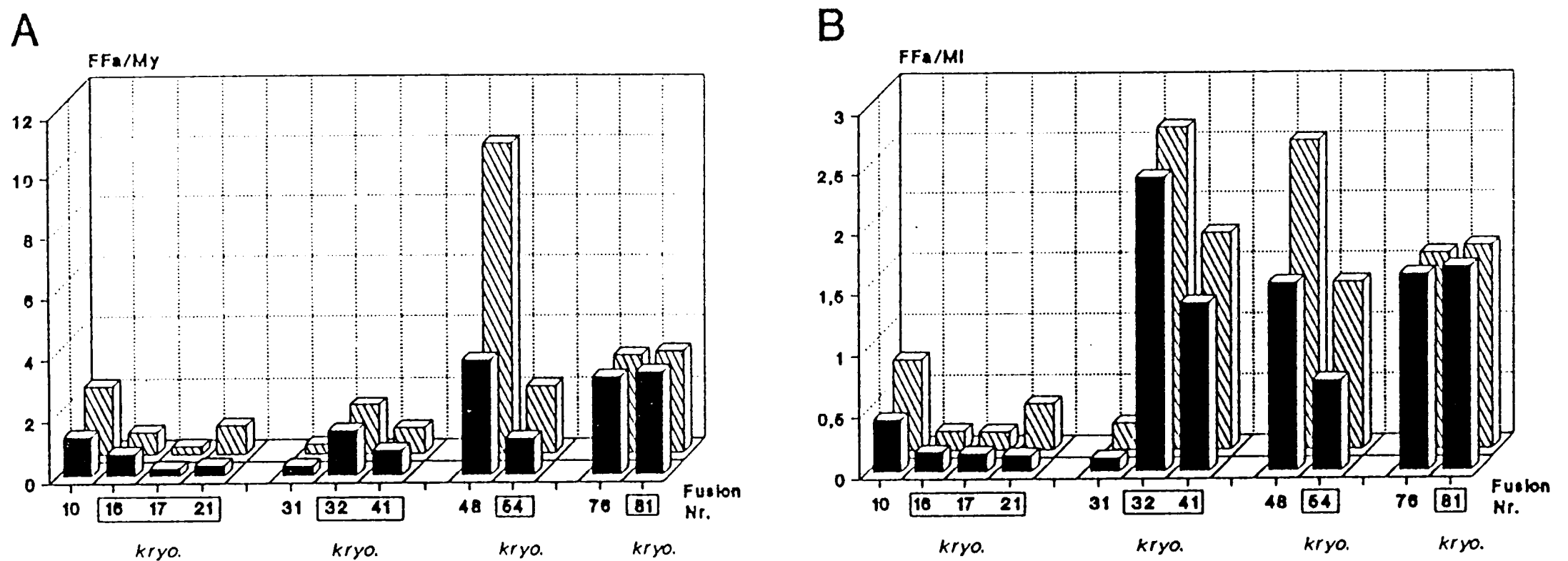


Abb.4: Absolute Fusionsfrequenzen¹⁾ bei Elektrofusionen, die mit kryokonservierten und aufgetauten Mausmilzzellen durchgeführt wurden (A: FFa, bezogen auf eingesetzte Myelomzellen; B: FFa, bezogen auf eingesetzte Milzzellen)

¹⁾ Die Fusionen 10, 31, 48 und 76 sind die jeweiligen Originalfusionen, bei denen die Milzzellen frisch präpariert eingesetzt wurden. Die sich rechts anschließenden Balken stellen die Ergebnisse der dazugehörigen Experimente mit eingefrorenen und wieder aufgetauten Milzzellen dar. Die jeweils hinteren Balken repräsentieren die maximale FF_a in allen durchgeführten Teilfusionen, die vorderen die mittleren FF_a über alle Teilfusionen.

Wie Abb. 4 verdeutlicht, konnte keine gesicherte Beeinflussung der FF_a durch den Umstand, ob frisch präparierte oder kryokonservierte Milzzellen zur Fusion verwendet wurden, nachgewiesen werden. Der Annahme, daß die Fusionsfrequenzen bei Verwendung eingefrorener und wiederaufgetauter Milzzellen geringer sind, stehen die Ergebnisse von den Fusionen Nr. 32, 41 und 81 gegenüber, bei welchen die Fusionsfrequenz gegenüber dem Erstversuch sogar höher liegen.

3.3.3. Einfluß von Pronase-Vorbehandlung der Myelomzellen auf die absolute Fusionsfrequenz

Bei 5 Fusionen (Nr. 4, 7, 37, 40 und 58) wurden - parallel zu Versuchen mit nicht vorbehandelten Zellen - jeweils eine oder zwei Teilfusionen mit Pronase-vorbehandelten Myelomzellen durchgeführt. Die Myelomzelllinie war P3-X63-Ag8.653, die Konzentration der Pronaselösung betrug 0,1 mg/ml PBS. Abb.5 zeigt die dabei erzielten absoluten Fusionsfrequenzen im Vergleich mit den Werten aus den anderen Teilfusionen. Während bei den Teilfusionen Nr. 4c, 37c und 40c eine annähernd gleichbleibende bzw. erhöhte FF_a registriert wurde, kam es bei den Teilfusionen Nr. 4d, 7c, 7d und 58d nach Proteasevorbehandlung zu einem starken Abfall der FF_a . Bei fast allen Versuchen, bei denen Zellen mit Pronase inkubiert wurden, stellten wir Zellagglutinationen fest, was z.T. zur Zellverlusten führte.

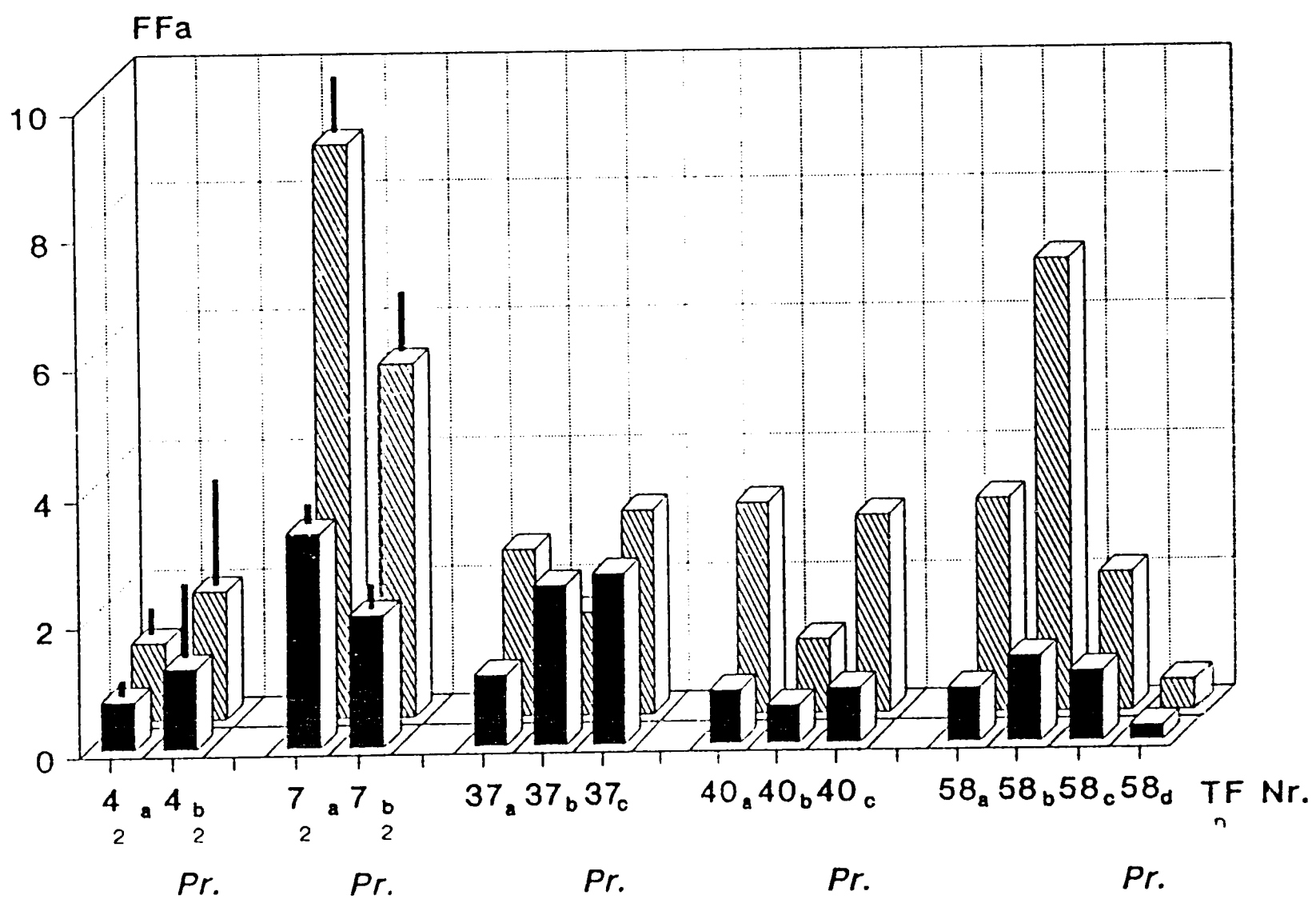
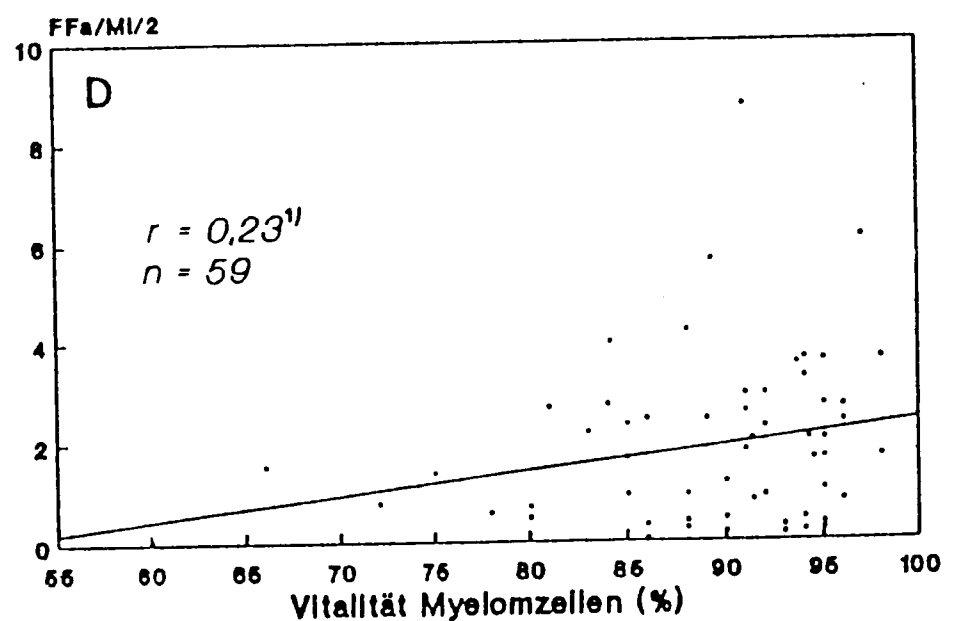
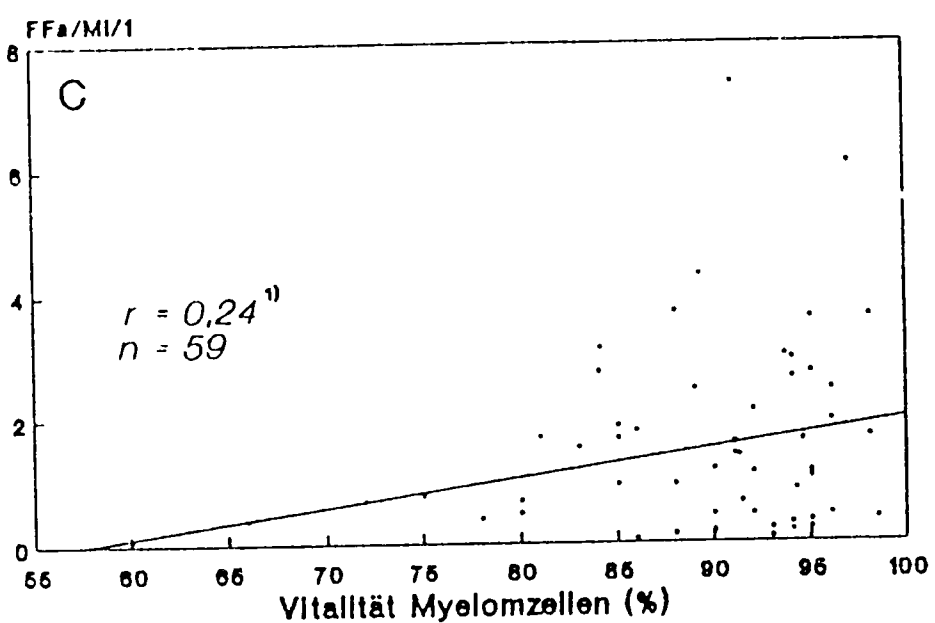
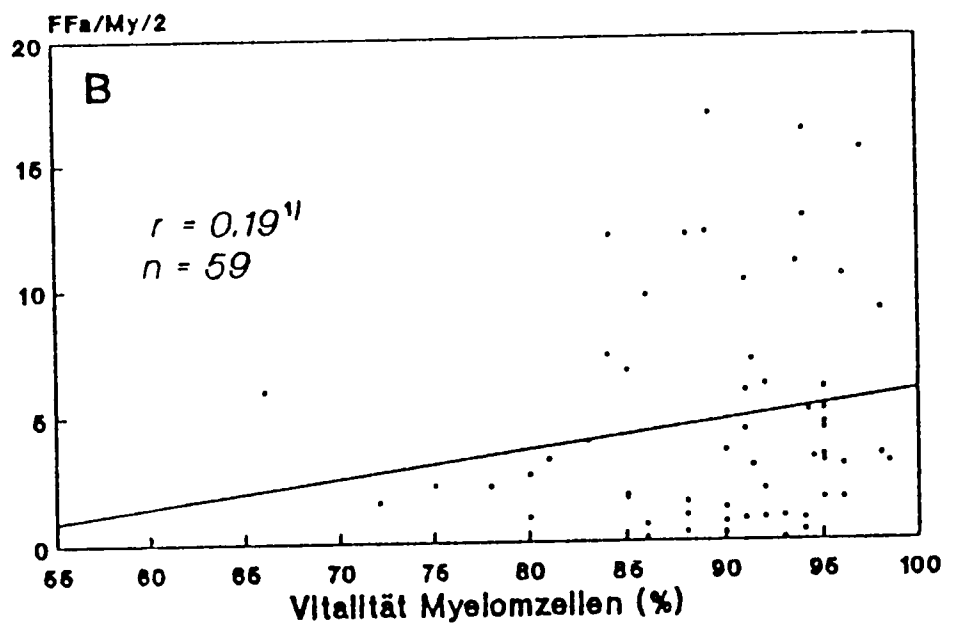
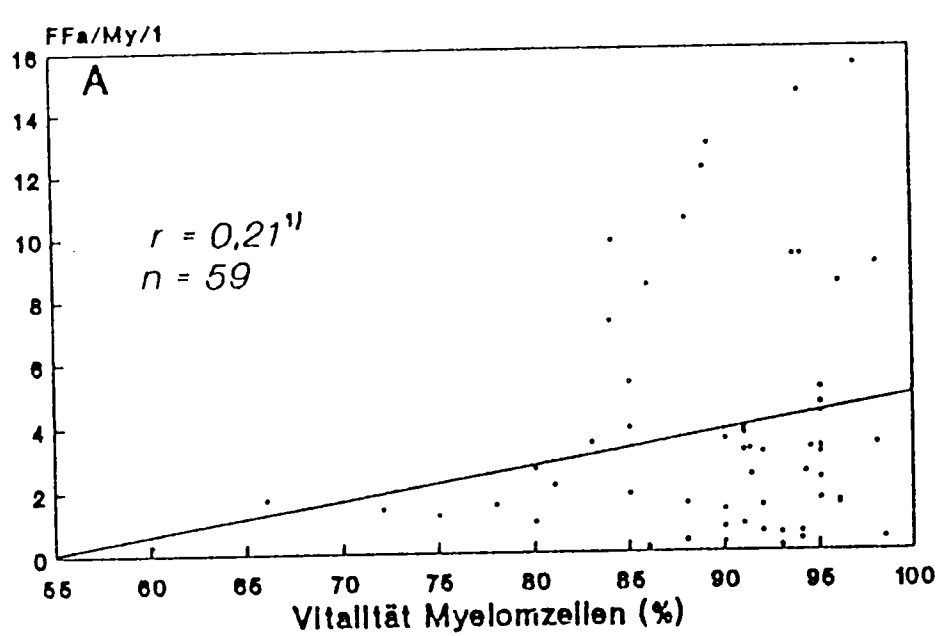


Abb. 5: Einfluß von Pronase-Vorbehandlung der Myelomzellen auf die FF_a (1). In den mit "Pr." markierten Teilfusionen wurde Pronase eingesetzt.

Vordere Balken stehen für die FF_a/Mi , hintere für die FF_a/My .

3.3.4. Einfluß der Vitalität der Myelomzellen auf die absolute Fusionsfrequenz

Die Vitalität der Myelomzellen wurde unter Anwendung des Trypanblau-Ausschlußtestes festgestellt und in Prozent der Gesamtzellzahl an Myelomzellen ausgedrückt. In Abb. 6 sind die Werte für die absoluten Fusionsfrequenzen in Abhängigkeit von der Vitalität der Zellsuspension auf 59 Elektrofusionen zur Herstellung muriner Hybridome dargestellt.



1) nicht signifikant bei $p = 0,05$

Abb. 6: Einfluß der Vitalität der Myelomzellen auf die absolute Fusionsfrequenz bei der Elektrofusion
 A - FF_a , bezogen auf Myelomzellen (Mittelwert über alle Teilfusionen)
 B - wie A, aber bezogen auf jeweils beste Teilfusion
 C - FF_a , bezogen auf Milzzellen (Mittelwert über alle Teilfusionen)
 D - wie C, aber bezogen auf jeweils beste Teilfusion

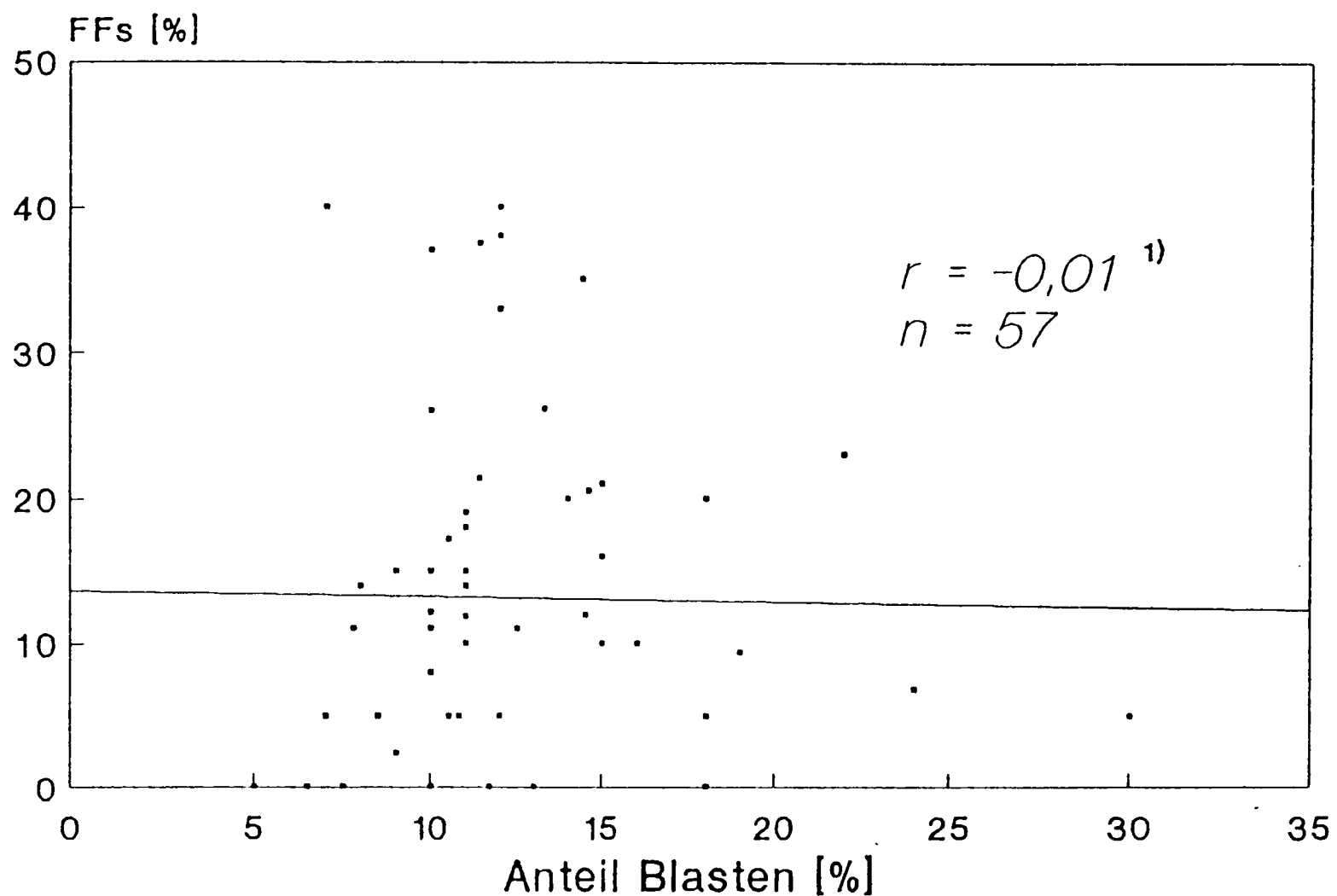
Es wird deutlich, daß - zumindest innerhalb der Spannweite des Parameters in unseren Versuchen (60 - 98%) - kein direkter Einfluß der Vitalität der Myelomzellsuspension auf die FF_a nachzuweisen ist. Zwar ist eine Tendenz zur positiven Korrelation erkennbar, jedoch ist diese nicht als signifikant nachweisbar. Da relativ viele Versuche mit Myelomzellsuspensionen hoher Vitalität nur niedrige FF_a ergaben, ist zu vermuten, daß bei diesen ein anderer Faktor limitierend wirkte (z.B. Zellkulturbedingungen) und damit eine mögliche Abhängigkeit der FF_a von der Vitalität der Zellen überdeckt wird.

Außerdem muß man einschränkend in Rechnung stellen, daß die Aussagekraft des Trypanblau-Ausschlußtestes begrenzt ist und keine endgültigen Aussagen über die Qualität der Zellen zuläßt.

3.3.5. Einfluß des Blastenanteils in der Milzzellpopulation auf die Fusionsfrequenz

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Effektivität der Immunisierung und der Fusionsfrequenz nachzuweisen, wurde der Anteil blastenähnlicher Zellen innerhalb der Milzzellpopulation durch lichtmikroskopische Auswertung bestimmt. Die Auswertung der Fusionsfrequenzen hinsichtlich dieses Parameters ergab, daß die FF_a in keinem direkten Zusammenhang mit dem Rate der Lymphoblasten steht (Korrelationskoeffizienten von -0.014 bis - 0,094, je nach Art der Berechnung der FF).

Für die spezifische Fusionsfrequenz FF_s konnte gleichfalls keine direkte Abhängigkeit von der Rate der Lymphoblasten in der Milzzellsuspension (s.Abb. 7) konstatiert werden. (Die Fusionen Nr.19 und Nr.51, bei welchen eine Ag-selektive Auswahl der Milzzellen erfolgte, wurden in die Berechnung nicht mit einbezogen.) Diese Aussage wird durch den Umstand, daß hier 57 verschiedene Fusionsexperimente in die Auswertung einbezogen wurden, die in mehr als nur der Frequenz der Lymphoblasten variierten, relativiert. Bei einer hohen Wertigkeit dieses Parameters wäre aufgrund der relativ großen Stichprobenzahl trotz der erwähnten Variabilität eine Korrelation erkennbar gewesen.



¹⁾ nicht signifikant bei $p = 0,05$

Abb. 7: Einfluß des Blastenanteils an der Milzzellpopulation auf die spezifische Fusionsfrequenz FF_s bei der Elektrofusion

3.3.6. Einfluß des "feeder cell layer" auf die absolute Fusionsfrequenz

Standardmäßig wurden in die Zellkulturplatten, die die fusionierten Zellen aufnehmen sollten, murine Peritonealmakrophagen in einer Dichte von 5×10^3 Zellen/well vorplattiert (1 Tag vor der Fusion oder unmittelbar vor der Fusion). Davon abweichend, wurde in Fusion Nr. 10 die Zellsuspension nach der Elektrofusion halbiert und auf 2 Plattenhälften mit entweder vorplattierten Makrophagen (5×10^3 Zellen/well) oder Milzzellen (1×10^5 kernhaltige Zellen/well) ausgesät.

Die absoluten Fusionsfrequenzen in den mit Makrophagen vorplattierten Kulturgefäßen übertreffen, unabhängig von der Teilfusion, die Frequenzen in den mit Milzzellen präparierten Kulturgefäßen im Mittel um das 2,8fache (s. Abb. 8).

Die Verdopplung der Makrophagendichte im "feeder cell layer" (in Fusion Nr. 54) führte zu keiner signifikanten Erhöhung der FF_a , birgt hingegen ein erhöhtes Risiko des Hybridomverlustes durch aktivierte Makrophagen in sich.

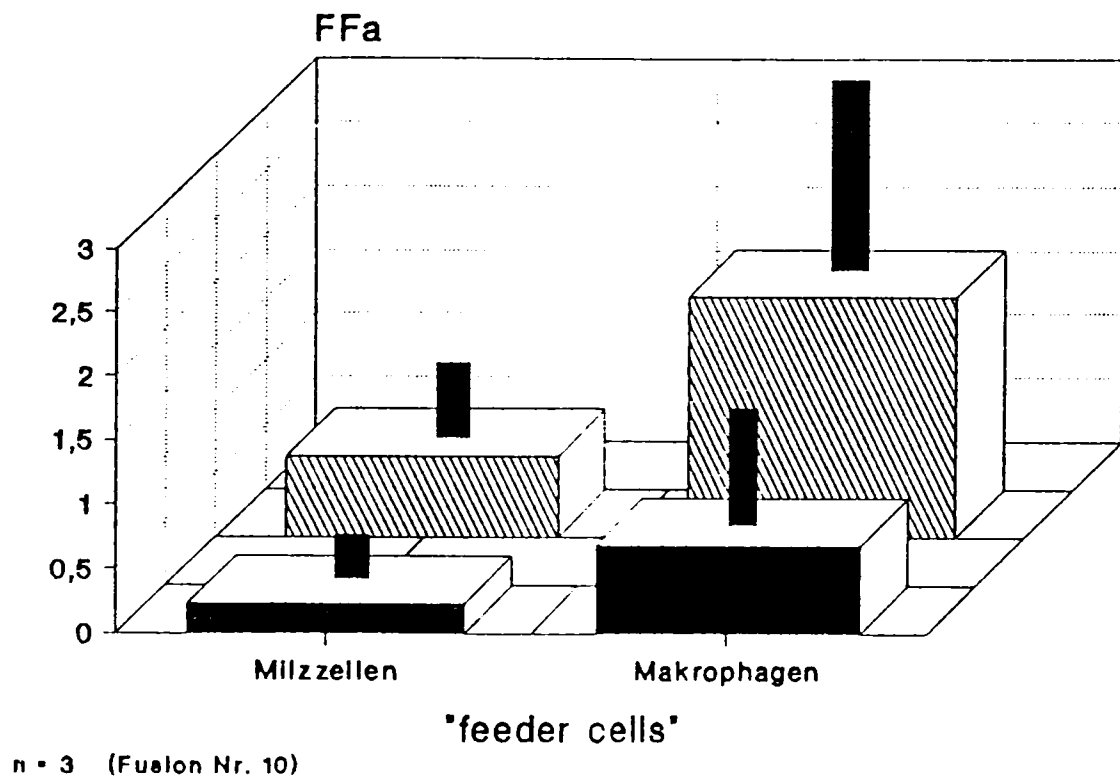


Abb. 8: Einfluß des "feeder cell layer" auf die absoluten Fusionsfrequenzen bei Elektrofusion (Fusion Nr.10)
Vordere Balken stehen für die FF_a/M_i , hintere für die FF_a/M_y .

3.3.7. Einfluß des Separierens der mononukleären Zellen aus der Milzellsuspension durch Dichtegradientenzentrifugation

In der Regel wurde die gesamte Milzzellpopulation nach den entsprechenden Waschschritten in den Elektrofusionen eingesetzt. Eine Ausnahme bilden hierbei Fusionen mit kryokonservierten und wiederaufgetauten Milzzellen.

Weitere Ausnahmen stellen die Fusionen Nr.22 und Nr.31 dar, bei welchen 2 bzw. 3 Teilfusionen mit Milzzellen ohne Separationsschritt und weitere 2 Teilfusionen mit separierten mononukleären Milzzellen (Dextran/ Visotrast Dichte 1,077 bei Fusion Nr.22 und Dichte 1,086 bei Fusion Nr.31) parallel durchgeführt wurden. Wie die Abbildungen 9A und 9B zeigen, führt dieser Separationsschritt nur bei den Versuchen mit kryokonservierten Milzzellen unter Verwendung von Trennmedium mit einer Dichte von 1,086 zu einer geringen Erhöhung der FF_a , im Mittel um den Faktor 1,9 (FF_a/M_i) bzw. 3,3 (FF_a/M_y). Dieser Effekt hat seine Ursache in der Eliminierung des relativ hohen Anteils von toten Zellen nach Kryokonservierung, da diese die Dielektrophorese beeinflussen und damit die primäre Fusionsfrequenz reduzieren können.

Für die Fusionen mit eingefrorenen und wiederaufgetauten Milzzellen wurde (nach anfänglichen Versuchen mit Separationslösung einer Dichte von 1,077) mit einem Dextran/Visotrast-Gemisch mit der Dichte 1,086-1,087 gearbeitet, nachdem sich in Vorversuchen herausgestellt hatte, daß diese Dichte für die Isolierung von Maus-Lymphozyten effektiver ist.

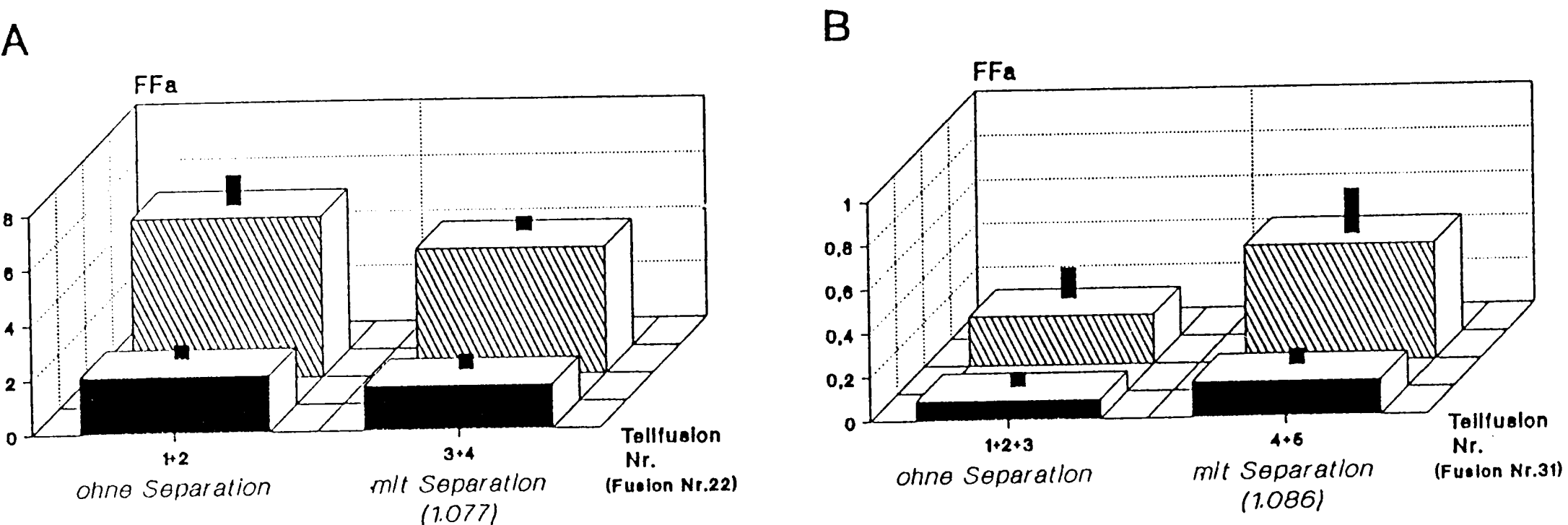


Abb. 9: Absolute Fusionsfrequenzen in parallel durchgeführten Elektrofusionen mit unseparierten Mausmilzzellen bzw. mit durch Dichtegradientenzentrifugation aus der Milzzellpopulation isolierten murinen mononukleären Zellen
 A: Elektrofusion mit frisch präparierten Milzzellen und
 B: mit kryokonservierten und aufgetauten Milzzellen
 Vordere Balken stehen für die FF_a/Mi , hintere für die FF_a/My .

3.3.8. Einfluß des Zellkulturmediums auf die absolute Fusionsfrequenz

Bis auf wenige Ausnahmen diente in allen durchgeführten Elektrofusionen IMDM als Wachstumsmedium bzw. mit HAT-Zusatz als Selektionsmedium. In den Fusionen Nr. 25 und Nr.40 wurden parallel die Zellkulturmedien IMDM (Gibco) und RPMI 1640 (Serva) eingesetzt. Dabei erwies sich in beiden Fällen IMDM als dasjenige Zellkulturmedium, mit dem deutlich höhere Fusionsfrequenzen erreichbar waren (Abb.10). Im Mittel überstiegen die Werte für die FF_a bei den Teilfusionen mit IMDM jene der Teilfusionen mit RPMI 1640 um das 7-fache.

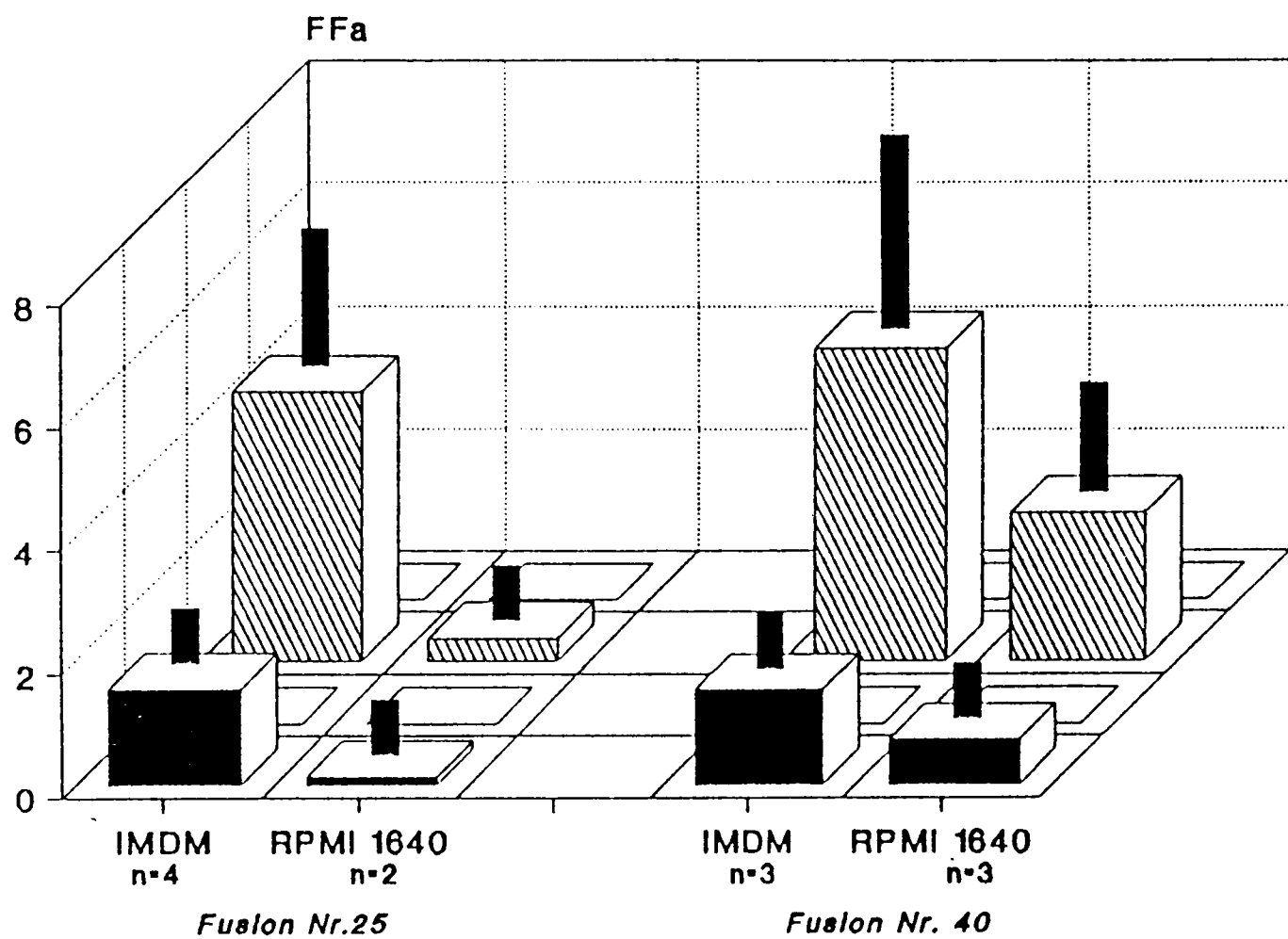


Abb. 10: Absolute Fusionsfrequenzen bei Elektrofusionen nach Ausplattieren in unterschiedlichen Zellkulturmedien: Identisch vorbehandelte Zellsuspensionen wurden jeweils zur Hälfte in IMDM bzw. in RPMI 1640 ausplattiert. Vordere Balken stehen für die FF_a/M_i , hintere für die FF_a/M_y .

3.3.9. Einfluß des Fusionsmediums auf die absolute Fusionsfrequenz

In der überwiegenden Mehrzahl der Fusionen wurden die Zellen im Fusionsmedium F1 nach VIENKEN und ZIMMERMANN (1985) gewaschen und fusioniert. Alternativ dazu kam in Fusion Nr.29 isotonische Saccharoselösung (F4), wie bei KARSTEN et al. (1985) beschrieben, zum Einsatz. Mit diesem Medium wurde zwar eine gute primäre Fusionsfrequenz erzielt (viele Fusionsprodukte im mikroskopischen Bild), allerdings wuchsen im HAT-Medium keine Hybridome. Demgegenüber wurde in den parallel mit F1 durchgeführten Teilfusionen eine mittlere FF_a/M_y von $1,94 \pm 1,10$ bzw. FF_a/M_i von $0,53 \pm 0,30$ erzielt (n=4).

Bei den Fusionen Nr.62 und Nr.69 wurde für zwei Teilfusionen im Fusionsmedium Inosit durch D-Mannit (ebenfalls isotonisch = F2) ersetzt, und bei Fusion Nr.74 wurde für eine Teilfusion das hypoosmolare Fusionsmedium F3 nach STENGER et al. (1988) im Vergleich zu F1 verwendet. In Abb. 11 sind die dabei erhaltenen Ergebnisse anhand der FF_a dargestellt.

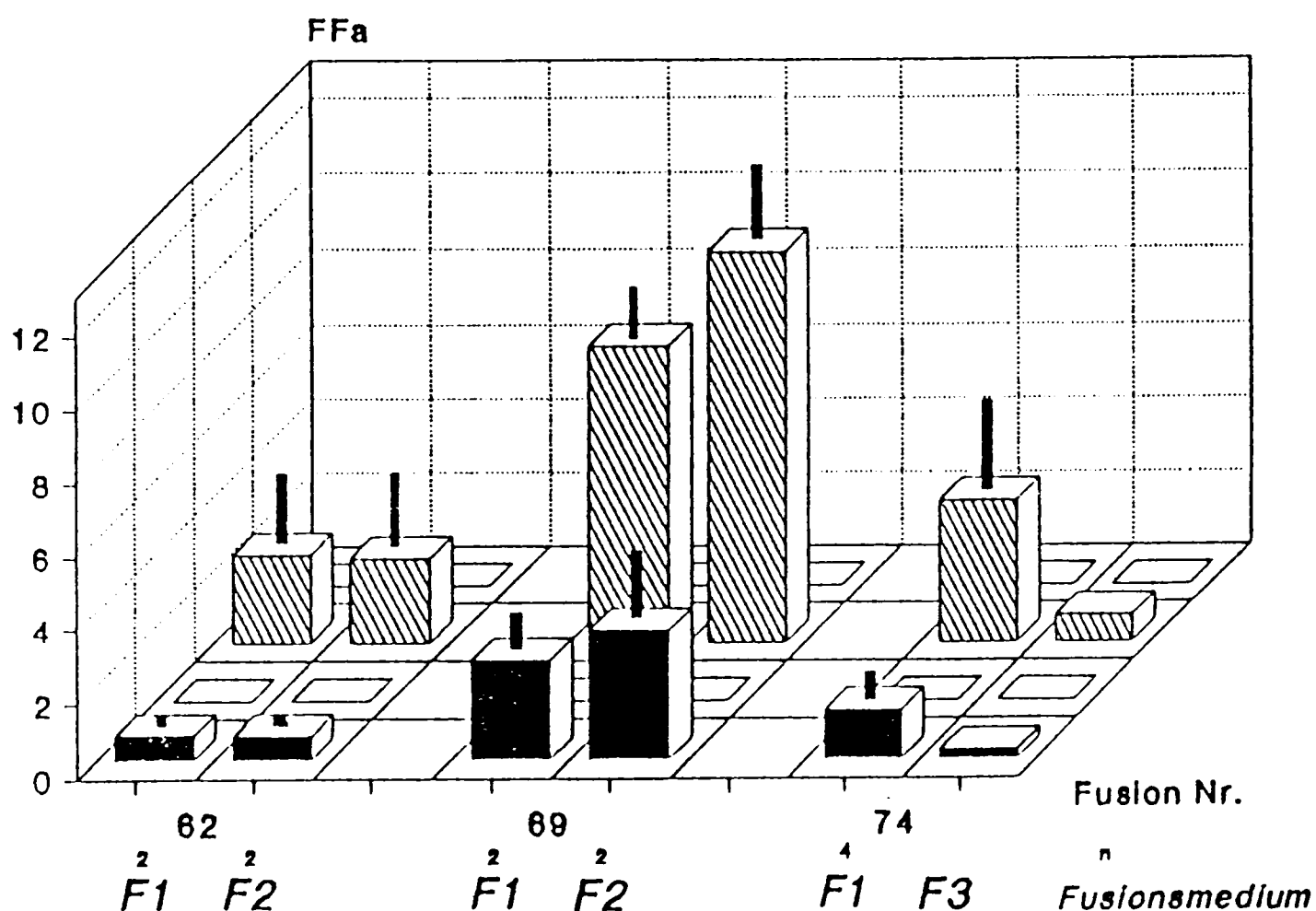


Abb. 11: Einfluß verschiedener Fusionsmedien (F1, F2, F3) auf die absoluten Fusionsfrequenzen bei Elektrofusion (n bezieht sich auf die Anzahl der identisch durchgeführten Teilfusionen)
Vordere Balken stehen für die FF_a/M_i , hintere für die FF_a/M_y .

3.3.10. Einfluß der Frequenz des elektrischen Wechselfeldes für die Zelldielektrophorese auf die absolute Fusionsfrequenz

Die Frequenz des elektrischen Wechselfeldes wurde standardmäßig mit 2 MHz gewählt.

In Fusion Nr.50 wurden die Teilfusionen mit identisch vorbehandelten Zellen und unter Anwendung gleicher elektrischer Parameter durchgeführt, mit Ausnahme der Frequenz für das elektrische Wechselfeld. Die drei am Fusionsgenerator efg 01 wählbaren Frequenzen 2,0; 1,0 und 0,5 MHz wurden getestet.

Wie der Abb. 12 zu entnehmen ist, wurde die höchste FF_a mit 2 MHz erzielt, etwas niedriger liegt der Wert für 1 MHz, und bei einer Frequenz von 0,5 MHz ist ein deutlicher Rückgang der FF_a zu verzeichnen.

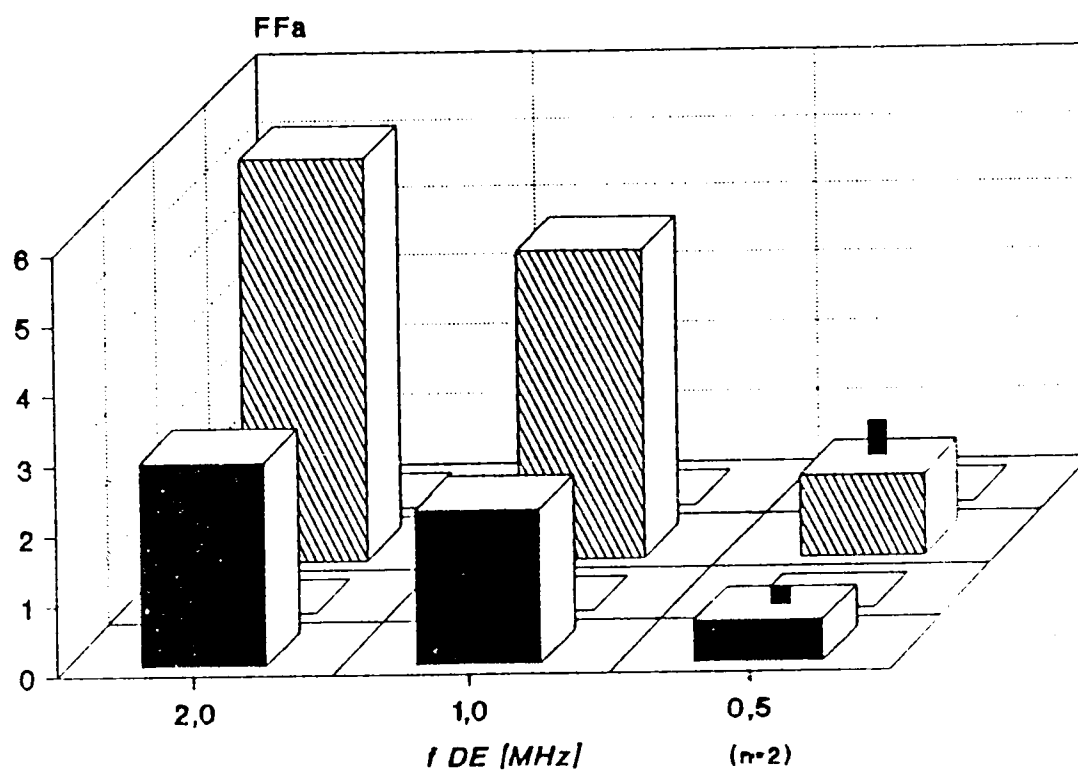


Abb.12: Einfluß der Frequenz des elektrischen Wechselfeldes auf die absolute Fusionsfrequenz

Vordere Balken stehen für die FF_a/M_i , hintere für die FF_a/M_y .

3.3.11. Einfluß der Dauer des elektrischen Wechselfeldes für die Zelldielektrophorese auf die absolute Fusionsfrequenz

Um den Einfluß der DE auf die FF_a hinsichtlich der Dauer des Wechselfeldes zu bestimmen, wurden bei einigen Fusionen die Teilfusionen so durchgeführt, daß die HF für unterschiedliche Zeiten (5 - 20 s) angelegt wurde. Alle anderen Parameter wurden konstant gehalten. Standardwert für die überwiegende Mehrheit der durchgeführten Elektrofusionen war 10 s DE-Dauer. In Auswertung der Ergebnisse aus den Teilfusionen mit unterschiedlich langer DE kann man 3 Fallgruppen unterscheiden: Experimente mit einer positiven Korrelation, solche mit einer negativen und solche, bei denen die FF_a konstant bleibt (Abb.13A, B und C). Da sich den jeweils einer Fallgruppe zugehörigen Fusionen keine gemeinsame Größe zuordnen läßt, die in irgendeiner Form limitierend wirken könnte, handelt es sich bei den erfaßten Trends wahrscheinlich um zufällige Abweichungen. Innerhalb des Intervalls 4 bis 20 s ist die Zeitdauer der DE also kein kritischer Parameter. Auch eine Auswertung aller Daten unabhängig von den Einzelfusionen ergab nur eine schwache negative Korrelation der FF_a/M_i von der Zeitdauer der DE, die nicht signifikant war ($r = -0.32$; $p = 0,05$; $n = 39$).

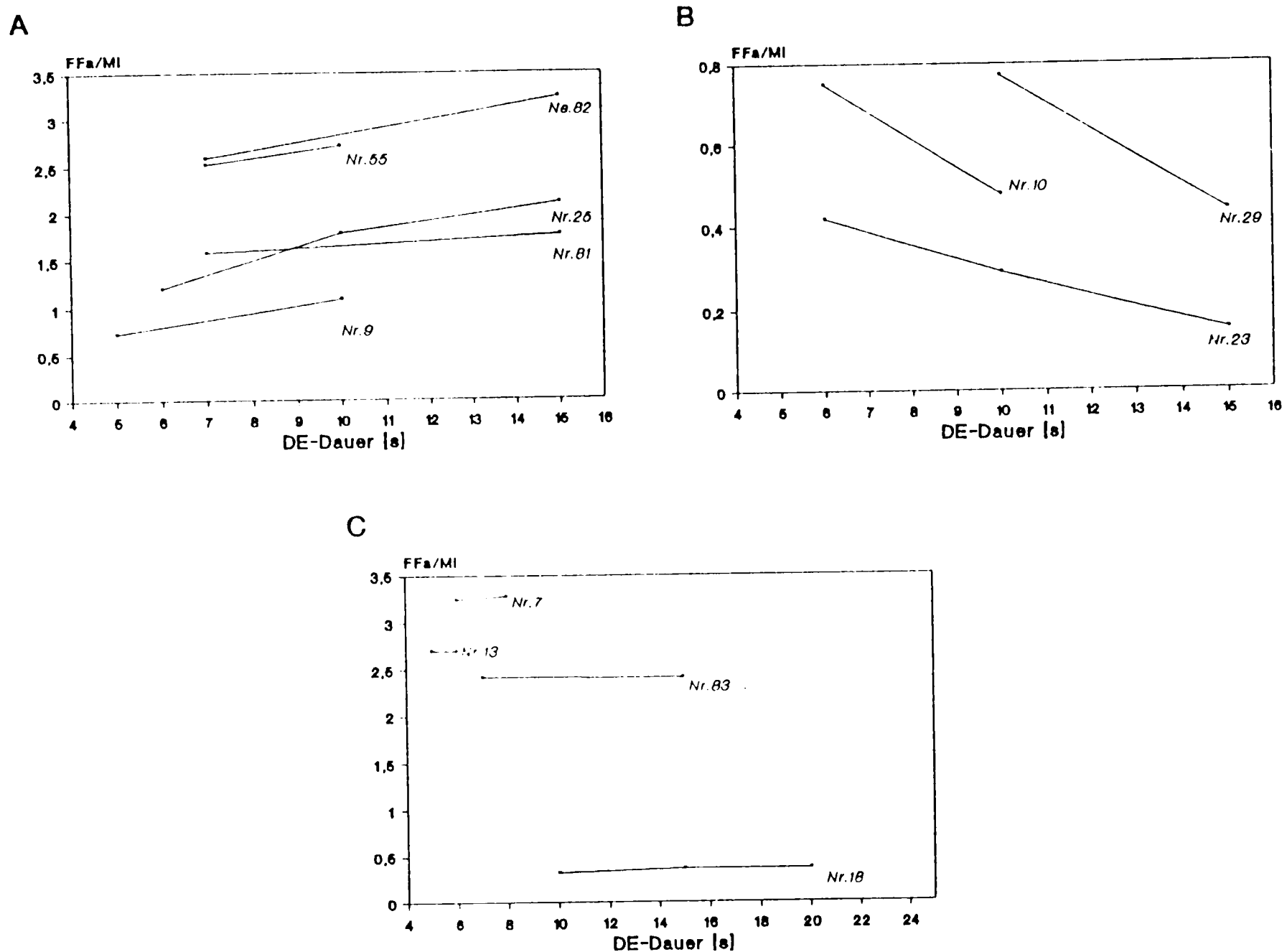


Abb.13: Trends der Fusionsfrequenz FF_a/M_i in 12 Elektrofusionsexperimenten, bei deren Teilfusionen die Zeitdauer des Anlegens der DE-Spannung variiert wurde. 3 Fallgruppen mit steigender (A), fallender (B) und gleichbleibender bzw. unregelmäßiger (C) Tendenz der FF_a (Ziffern an den Kurven = Fusionsnummern)

3.3.12. Einfluß der Feldstärke des elektrischen Wechselfeldes für die Zelldiektrophorese auf die absolute Fusionsfrequenz

In den Fusionen Nr. 30 und 45 wurde für die einzelnen Teilfusionen die Feldstärke des elektrischen Wechselfeldes variiert. Dabei wurden Feldstärken von 300 bis 1000 V/cm gewählt.

In Abb. 14 sind die in den jeweils vergleichbaren Teilfusionen erreichten FF_a dargestellt: Ein direkter Einfluß der DE-Feldstärke auf die FF_a ist bei Fusion Nr. 45 erkennbar. Feldstärken von 800 V/cm und darüber bewirken eine deutliche Reduzierung der Fusionsfrequenz. Die Variierung der Feldstärke in der Fusion Nr.30 (500 bzw. 300 V/cm) hat hingegen keine auffällige Veränderung der FF_a zur Folge.

In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle wurden für die Elektrofusion DE-Feldstärken von 500 bis 700 V/cm gewählt.

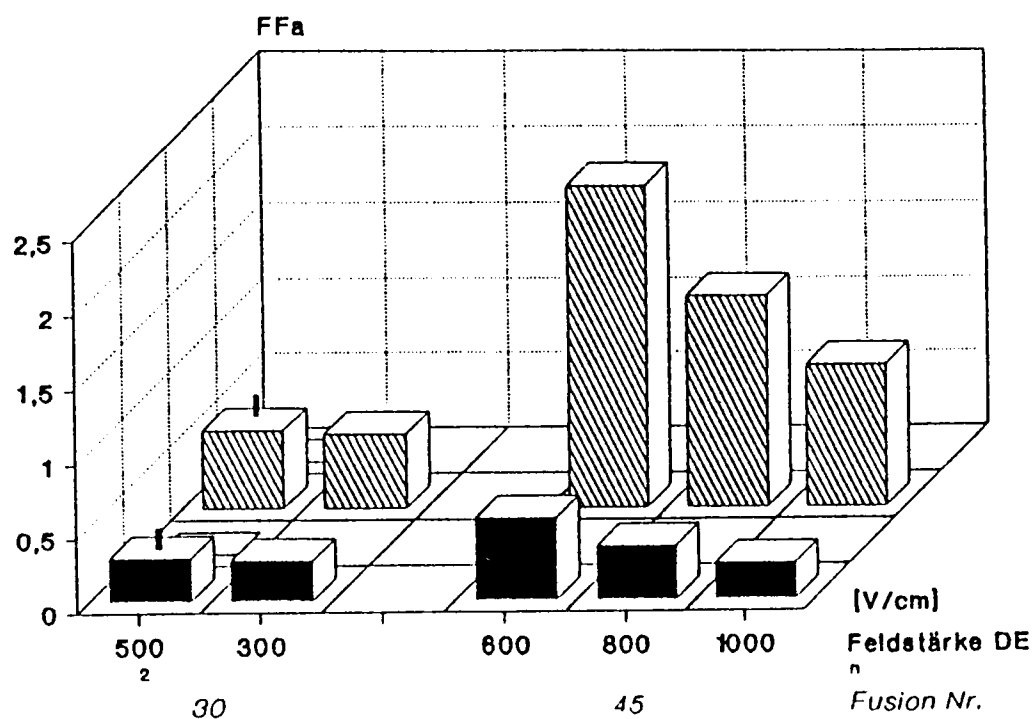


Abb. 14: Einfluß der Stärke des elektrischen Wechselfeldes auf die absolute Fusionsfrequenz

Vordere Balken stehen für die FF_a/M_i , hintere für die FF_a/M_y .

3.3.13. Einfluß der Dauer des Gleichstromimpulses auf die absolute Fusionsfrequenz

In 12 Fusionen wurde - unter Konstanthaltung der anderen, für die EF wesentlichen Parameter - die Länge des Gleichstromimpulses in bestimmten Grenzen variiert (0,7 bis 15 μ s). In Auswertung der FF_a kann man wiederum 3 Fallgruppen unterscheiden, mit Tendenz zur positiven und zur negativen Korrelation sowie eine Gruppe ohne klare Tendenz (Abb.15). Die Auswertung dieser Fallgruppen ergab, daß sie sich in den anderen Parametern nicht voneinander unterscheiden lassen konnten und die erfaßten Unterschiede nicht als eindeutige Folge unterschiedlicher Impulslängen gedeutet werden können.

Die erfolgreichste Teilfusion hinsichtlich der FF_a wurde mit einem Impuls von 8 μ s Dauer durchgeführt, aber auch Impulslängen von 3 μ s oder 10 μ s brachten ähnlich gute Fusionsfrequenzen.

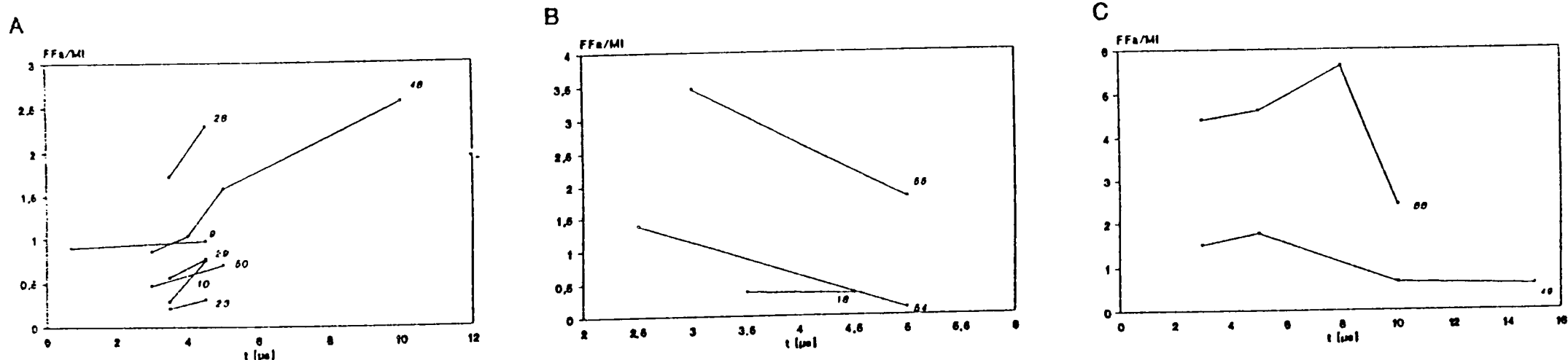


Abb.15: Trends der Fusionsfrequenz FF_a/M_i in 12 Elektrofusionsexperimenten, bei deren Teilfusionen die Zeitdauer des Gleichstromimpulses variiert wurde. 3 Fallgruppen mit steigender (A), fallender (B) und gleichbleibender bzw. unregelmäßiger (C) Tendenz der FF_a (Ziffern an den Kurven = Fusionsnummern)

3.3.14. Einfluß der Feldstärke des Gleichstromimpulses auf die absolute Fusionsfrequenz

In fünf Fusionen wurde untersucht, inwieweit die Feldstärke des d.c. Impulses für die FF_a von Bedeutung ist. Abb. 16 zeigt die Fusionsfrequenzen der jeweiligen Teilfusionen, in denen dieser Parameter variiert wurde. Die Werte für E lagen zwischen 4,2 und 10 kV/cm. Wie auch aus den Abbildungen 17A und 17B (lineare Regression) ersichtlich, besteht innerhalb des angegebenen Intervalls eine negative Korrelation zwischen der Feldstärke des Impulses und der absoluten Fusionsfrequenz.

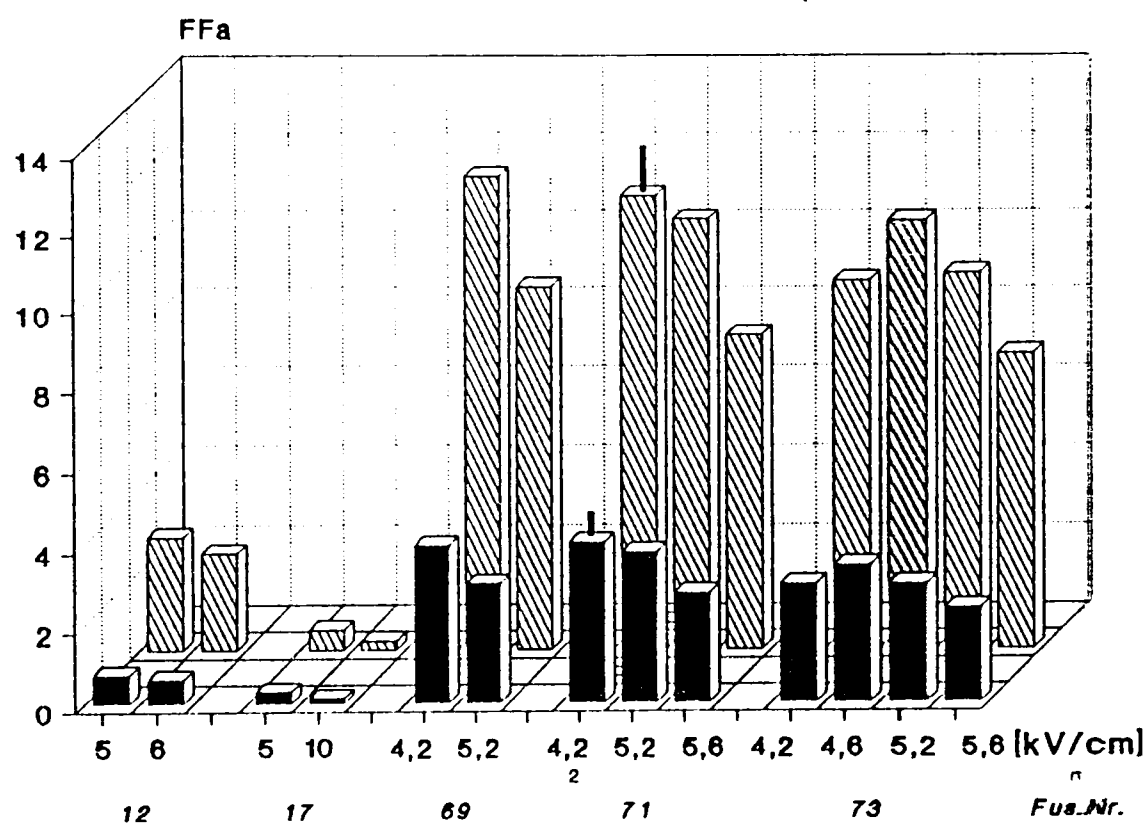


Abb. 16: Einfluß der Feldstärke des Gleichstromimpulses auf die absolute Fusionsfrequenz
Vordere Balken stehen für die FF_a/M_i , hintere für die FF_a/M_y .

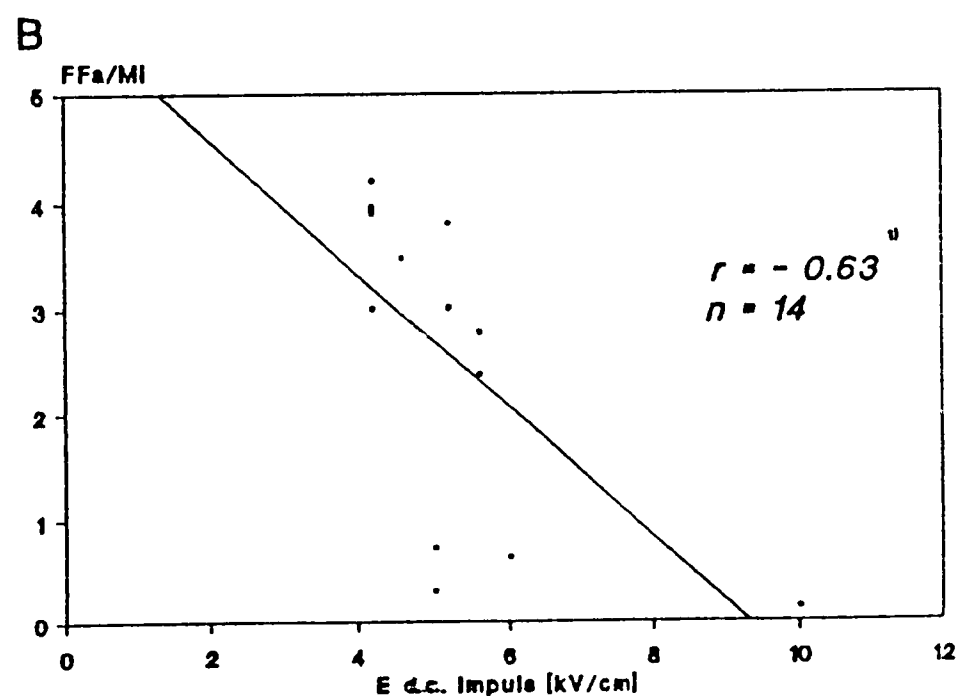
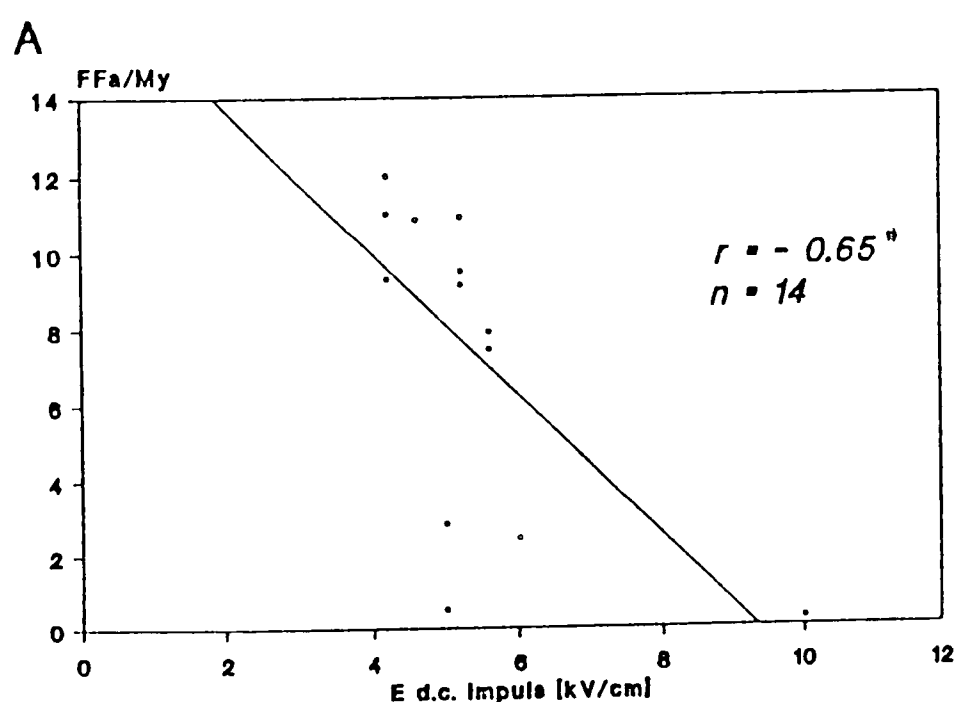


Abb. 17: Einfluß der Feldstärke des Gleichstromimpulses auf die FF_a bei Elektrofusion (A: Fusionsfrequenz, bezogen auf Myelomzellen
B: Fusionsfrequenz, bezogen auf Milzzellen)

1) signifikant bei $p = 0,05$

3.3.15. Einfluß der Anzahl der Gleichstromimpulse auf die absolute Fusionsfrequenz

Standardmäßig wurde der Gleichstromimpuls innerhalb der Fusionssequenz nur einmal appliziert. Davon abweichend, wurden in den entsprechenden Teilversuchen der Fusionen Nr. 11, 14, 18, 25 und 30 zwei Impulse hintereinander (mit dem zeitlichen Abstand von 1 s ausgelöst, wobei alle anderen elektrischen Parameter konstant gehalten wurden.

Dabei kam es stets zu einer mehr oder weniger deutlichen Verringerung der FF_a , wenn zwei Impulse appliziert wurden (Abb.18). Hingegen blieb die FF_a in den Teilfusionen der Fusion Nr. 24, bei denen der d.c. Impuls 2x bzw. 5x ausgelöst worden war, etwa konstant. (In diesem Versuch wurden biotinylierte Myelomzellen und Avidin-markierte Maus-Milzzellen entsprechend der Methode von WOJCHWSKI und SYTKOWSKI [1986; s. 2.8.2.] zur Fusion eingesetzt.) Bei einer Teilfusion des Versuchs Nr. 25 wurden der d.c. Impuls 2 mal appliziert (25/1), in einer zweiten Teilfusion 3 mal (25/2). Im ersten Fall wurden die fusionierten Zellen in IMDM ausplattiert, bei Versuch Nr. 25/2 hingegen in RPMI 1640. In beiden Fällen ist auch hier eine Abnahme der FF_a nach mehrmaliger Impulsapplikation feststellbar, unabhängig von der Tatsache, daß die FF_a im ersten Fall aufgrund des Medieneffektes (s. 3.3.8.) deutlich höher lag.

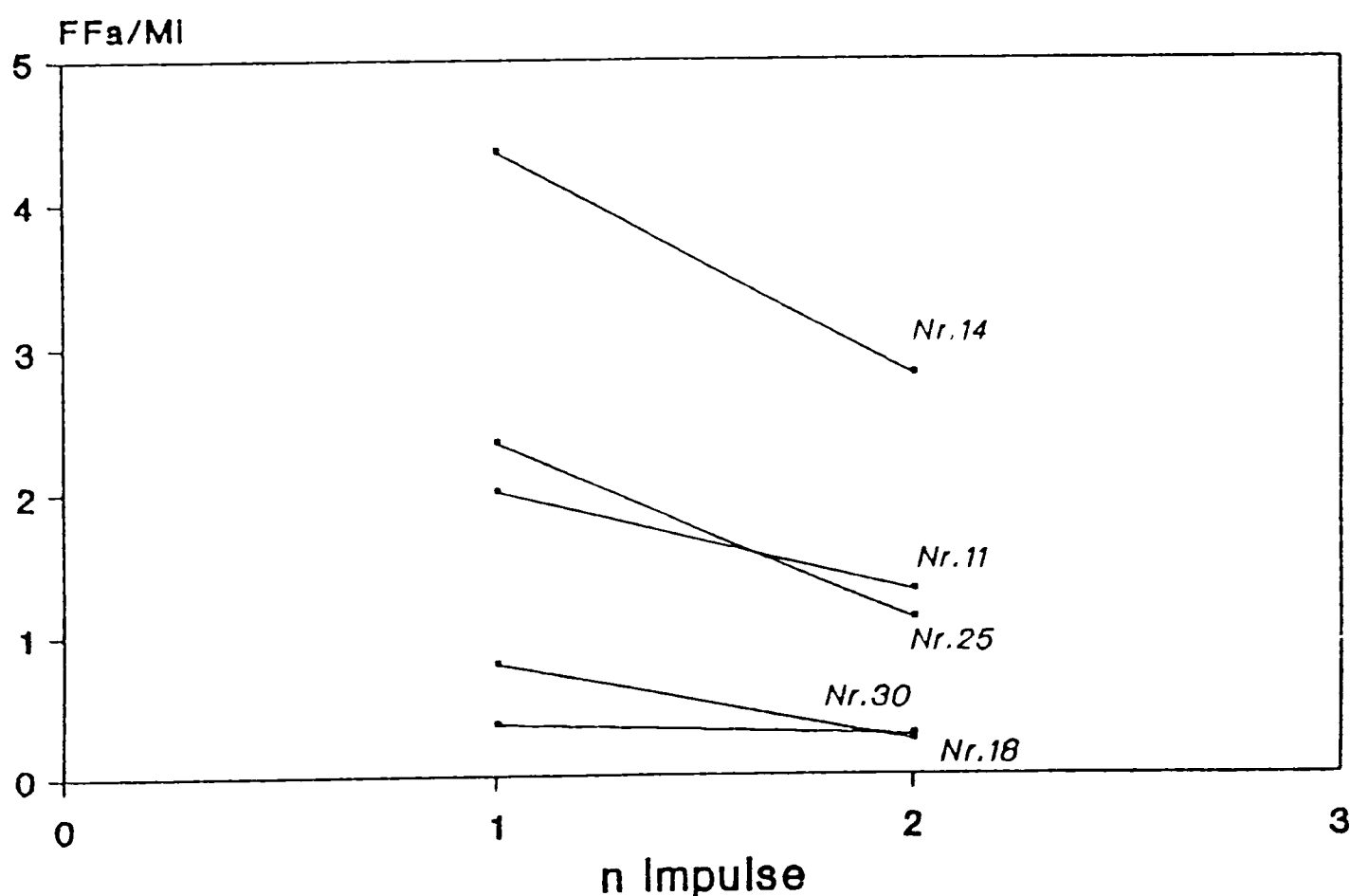


Abb.18: Trends der Fusionsfrequenz FF_a/Mi in 5 Elektrofusionsexperimenten, bei denen Teilfusionen mit einfacher oder doppelter Applikation des d.c. Impulses behandelt wurden (Ziffern an den Kurven = Fusionsnummern)

3.4. Versuche mit verschiedenen Kammertypen

Um für Elektrofusion eine Maßstabsverkleinerung zu erreichen, also die Zellzahl zu reduzieren, wurden Fusionsexperimente mit kleinen Suspensionsvolumina entweder in der Plattenkammer oder aber in Fusionskammern anderen Typs (wie unter 2.4.2. beschrieben) durchgeführt und ausgewertet.

3.4.1. Versuche mit kleinen Zellzahlen in der Plattenkammer

Abweichend von der normalerweise eingesetzten Zellmenge (50 - 100 x 10⁵ Zellen pro Kammerfüllung und Teilfusion bei einer Suspensionsdichte von 10⁵ Zellen/ μ l) wurden in den Fusionen Nr.25, Nr.37, Nr.41 und Nr.51 Teilfusionen mit stark reduzierten Zellzahlen durchgeführt, wobei nur 4 bis 11 x 10⁵ Zellen pro Ansatz eingesetzt wurden (s. Abb.19, durch Rahmen markierte Teilfusionen). Es kommt dabei zu keiner auffälligen Veränderung in den Werten für die FF_a, die im Falle der Fusion Nr.37 sogar höher liegen als die für die Teilfusionen mit höherer Zellzahl. Die sehr hohe FF_a/Mi bei Fusion Nr.51 erklärt sich daraus, daß nur 1,5 x 10⁵ Maus-Milzzellen pro Teilfusion verwendet wurden, hingegen 3 x 10⁵ Myelomzellen (P3-X63Ag8.653).

Die durch die Elektrofusion gebotene Möglichkeit der Verarbeitung relativ geringer Zellzahlen, erwies sich für folgende 3 Einsatzgebiete als nützlich:

1. Herstellung von Hybridomen aus kryokonservierten portionierten Milzzellen immunisierter Mäuse (Fusion Nr.32, s. Abschnitt 3.3.2. Abbn. 4A und 4B)
2. Erhöhung der FF_S durch Fusion fluoreszenzmarkierter und FACS-sortierter, Ag-positiver Milzzellen (Fusion Nr.51, s. Abschnitt 3.5.3.)
3. Herstellung von Hybrid-Hybridomen durch Fusion zweier unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Hybridomzelllinien mit nachfolgender FACS-Sortierung (Fusionen Nr.56, Nr.57, Nr.63, Nr.64 und Nr. 72, s. Abschnitt 3.6.)

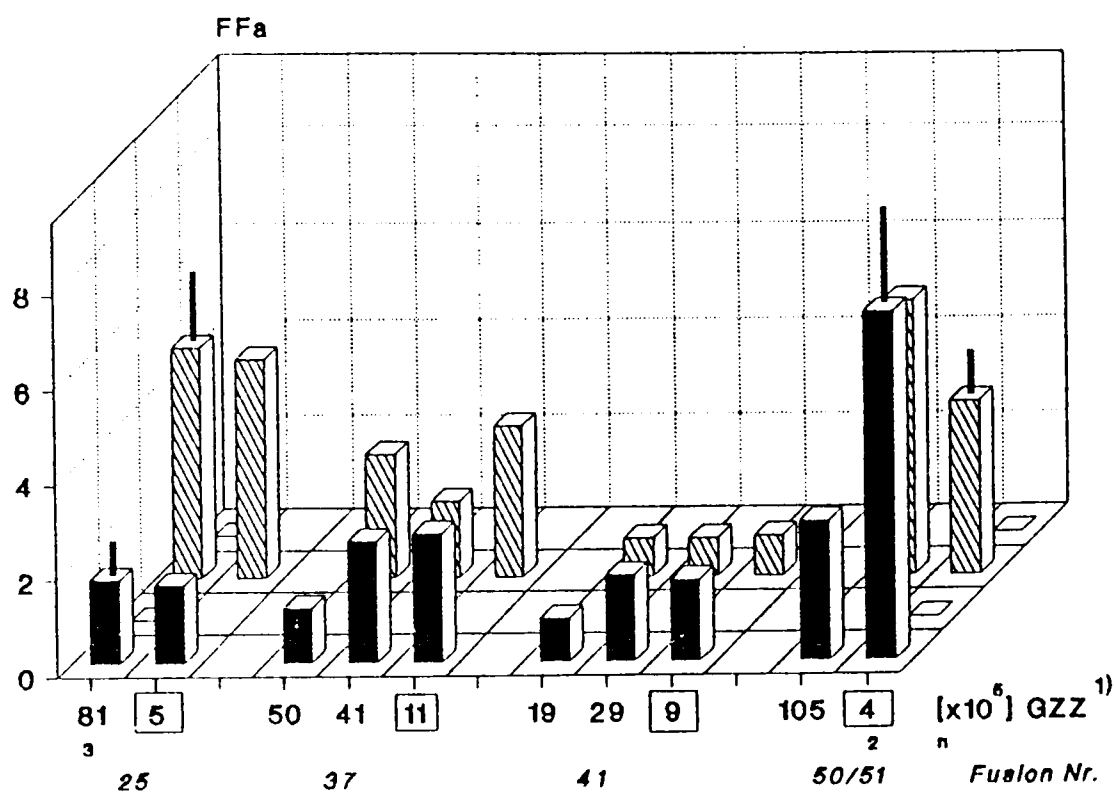


Abb. 19: Zellfusionen in der Plattenkammer mit reduzierten Zellzahlen

Vordere Balken stehen für die FF_a/Mi , hintere für die FF_a/My . Die umrahmten Werte geben jeweils die Teilfusion mit reduzierter Zellmenge an.

1) GZZ: Gesamtzellzahl pro Teilfusion und Kammerfüllung (Myelomzellen und Milzzellen)

3.4.2. Versuche mit der Objektträgerkammer

In den Fusionen Nr. 58, 59, 60 und 61 wurde jeweils parallel zu den Teilfusionen mit der Standard-Plattenkammer eine Teilfusion mit der Objektträgerkammer durchgeführt. Aufgrund der veränderten Feldbedingungen (inhomogenes Feld, Elektrodenabstand nur 0,2 mm statt 0,5 mm bei der Plattenkammer) mußten die elektrischen Parameter am Gerät efg01 neu eingestellt werden. Dazu dienten Vorversuche, bei denen irrelevante Milzzellen eingesetzt wurden. Bei diesen Vorversuchen sowie bei den eigentlichen Fusionen konnte der Fusionserfolg direkt mikroskopisch eingeschätzt und Parameter wie Dielektrophorese- oder Impulsspannung bei Bedarf korrigiert werden.

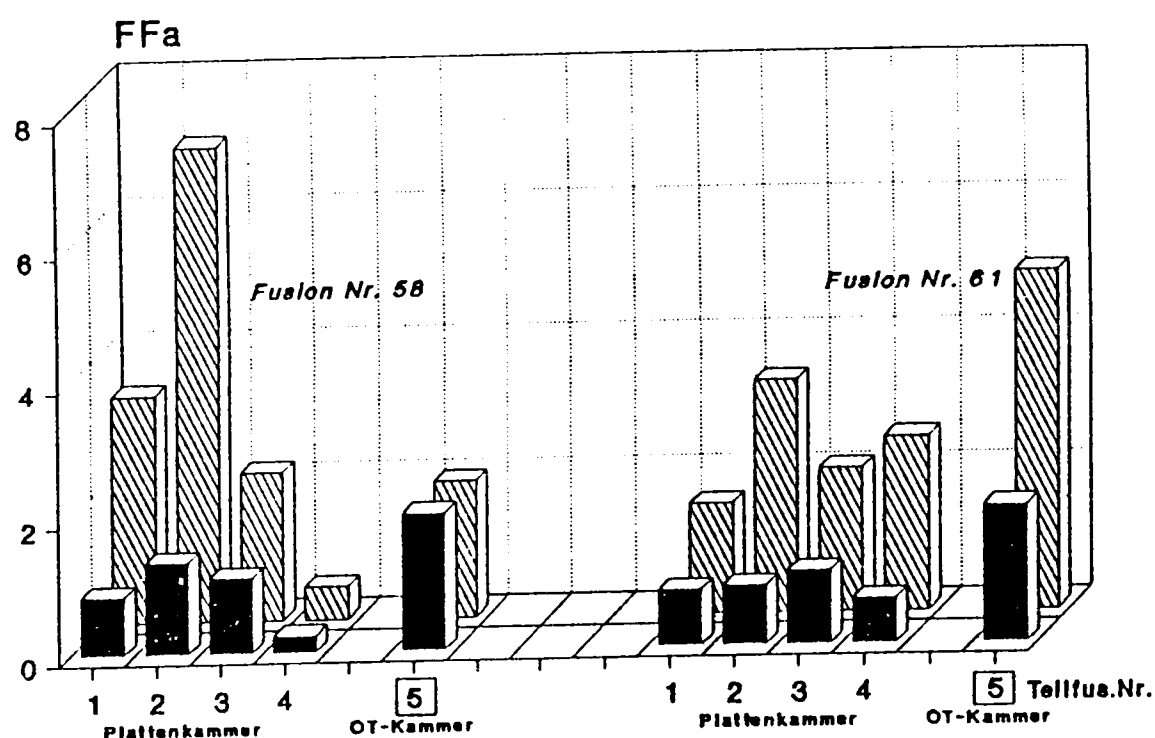


Abb. 20: Zellfusionen mit der Objektträgerkammer

Vordere Balken stehen für die FF_a/Mi , hintere für die FF_a/My . Die durch Einrahmung markierten Teilfusionen sind jeweils diejenigen, die mit der Objektträgerkammer durchgeführt wurden.

Die Versuche in den Fusionen Nr.59 und Nr.60 waren aufgrund von Infektionen nicht auswertbar. Die FF_a der Versuche in den Fusionen Nr.58 und Nr.61 sind - zusammen mit den Werten für die Teilfusionen in der Plattenkammer - in Abb.20 dargestellt.

3.4.3. Versuche mit der Mäanderkammer nach KATENKAMP

Die Versuche, Hybridome mit Hilfe dieses Kammertyps und unter Einsatz sehr geringer Zellzahlen zu erzeugen, blieben erfolglos. Nach Vorversuchen mit Myelomzellen und irrelevanten Milzzellen, bei denen diejenigen Feldbedingungen gesucht wurden, die unter mikroskopischer Beobachtung zur Zellfusion führten, wurden in Fusion Nr. 84 - parallel zu den 3 Teilfusionen mit der Plattenkammer - zwei Teilfusionen in der Mäanderkammer durchgeführt. Die dabei eingesetzte Zellzahl lag bei jeweils 5×10^4 ; das Verhältnis Milz- : Myelomzellen (P3-X63Ag8.653) betrug 1:2. Genutzt wurden die Kammerareale mit Elektrodenabständen von 100 und 200 μm , die Zelldichte der Suspension betrug etwa $5 \times 10^3/\mu\text{l}$. Trotz gut zu beobachtender Zellfusionen nach Dielektrophorese und d.c. Impuls kam es nach Ausplattieren der fusionierten Zellen in HAT-Medium nicht zum Hybridomwachstum. In den parallel durchgeführten Standardfusionen mit der Plattenkammer hingegen wuchsen Hybridome in relativ hoher Frequenz (s. Tab. 3, Fusion Nr.84). Die vergleichsweise hohen Feldstärken (s. Tab. 6), die gewählt werden mußten, damit Zellfusionen auftraten, waren bedingt durch die Inhomogenität des elektrischen Feldes (geringe Schichtdicke der Elektroden im Vergleich zum Zelldurchmesser).

Tabelle 6: Fusionsbedingungen der Teilfusionen mit der Mäanderkammer (Fusion Nr. 84)

	Teilfusion Nr. 4	Teilfusion Nr. 5
Elektrodenabstand	200 μm	100 μm
DE Feldstärke	1,5 kV/cm	2,1 kV/cm
DE Dauer	15 s	15 s
Impulsdauer	1 x 8 μs	1 x 8 μs
Impulsstärke	10,5 kV/cm	9,0 kV/cm
Zellzahl	5×10^4	5×10^4
Fusionsprodukte (mikroskopisch)	+	++
Klone nach HAT	keine	keine

3.5. Versuche zur Erhöhung der spezifischen Fusionsfrequenz

3.5.1. Avidin-Biotin-Methode nach LO et al. (1984)

Bei dieser Variante der Ag-spezifischen Zellfusion wird das Ag nicht direkt chemisch an die Myelomzellen gebunden, sondern vermittelt durch das Avidin-Biotin-System. Ein Konjugat aus zur Immunisierung eingesetztem Ag und Avidin dient als gleichsam bifunktionelles Verbindungselement zwischen den Ag-spezifischen Milzzellen und den Myelomzellen, welche vorher biotinmakiert werden.

Es wurde eine Fusion nach diesem Prinzip durchgeführt, wobei als Ag humanes IgD_{Di} (Myelomprotein) diente und das Ag-Avidin-Konjugat - in Abweichung von der Originalmethode - mittels SPDP-Methode (s. 2.7.1.) hergestellt wurde.

In Abb.21 sind die absoluten und spezifischen Fusionsfrequenzen dieser Fusion (Nr.19) dargestellt, und vergleichend dazu die Werte für die parallel durchgeführte Fusion mit Milzzellen derselben Maus, bei welcher kein antigenspezifischer Adhäsions-schritt vorgenommen wurde (Fusion Nr.20).

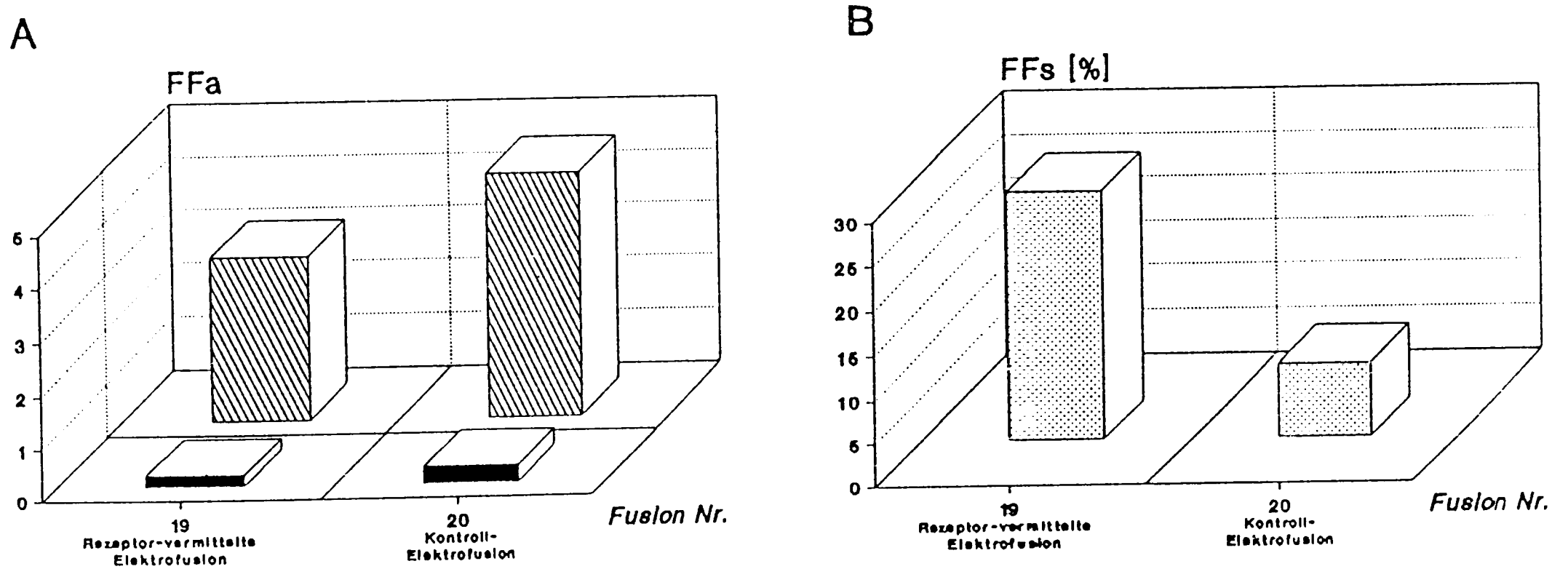


Abb. 21: Antigenvermittelte Elektrofusion nach LO et al. (1984) mittels Ag-Avidin-Konjugat und biotinylierter Myelomzellen

A: Absolute Fusionsfrequenzen bei Ag-vermittelter Fusion (Nr.19) und bei Kontrollfusion mit Milzzellen derselben Maus ohne Ag-spezifische Zytoadhärenz (Nr.20)

Vordere Balken stehen für die $FF_{a/Mi}$, hintere für die $FF_{a/My}$.

B: Spezifische Fusionsfrequenz der beiden Fusionen

Einerseits ist die FF_a bei der Ag-vermittelten Elektrofusion etwas geringer als jene bei der Kontrollfusion (Abb.21A), evtl. infolge der kürzeren DE-Dauer (1 s statt 10 s beim Kontrollversuch). Andererseits ist bei Betrachtung der FF_s ein deutlicher Effekt zu registrieren, da der Anteil Ag-positiver Klone von 8 % auf 28 % steigt, also um mehr als das 3fache. Das ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß es zu bevorzugten Zellfusionen zwischen Myelomzellen und Ag-spezifischen B-Lymphozyten gekommen ist.

3.5.2. Avidin-Biotin-Brückenmethode nach WOJCHOWSKI und SYTKOWSKI (1986)

Nach dieser Methode, die sich von der vorher beschriebenen nur insofern unterscheidet, daß die Ag-spezifische Zytoadhärenz nicht über das Ag-Avidin-Konjugat, sondern über Avidin (oder Streptavidin) als Brücke zwischen biotinyliertem Ag und biotinylierten Myelomzellen vermittelt wird, wurden die Teilfusionen der Elektrofusionen Nr. 6 und Nr.9 (Ag: AP) sowie der Fusion Nr.24 (Ag: IgE-Myelomprotein) durchgeführt.

Die erfolgreiche Haptenisierung wurde durch einen ELISA (s. 2.7.2.) bestätigt.

In beiden Versuchen blieb das Hybridomwachstum nach der Rezeptor-vermittelten Elektrofusion vollständig aus, während in der Kontrollfusion (Nr.9) ohne Ag-spezifische Zytoadhärenz Klone aufwuchsen.

Da eine zytotoxische Wirkung des Antigens AP nicht ausgeschlossen werden kann, wurde ein weiterer Versuch mit dem Ag IgE_{ND} (humanes Myelomprotein) unternommen (Fusion Nr. 24, Kontrolle ohne Ag-spezifische Zytoadhärenz: Fusion Nr. 23). In Auswertung dieser Versuche wurde festgestellt, daß es unter Anwendung der beschriebenen Methode zur immunspezifischen Kopplung der beiden Fusionspartner nicht zu einer Steigerung der FF_s kam. Die Werte sowohl für die absolute als auch für die spezifische Fusionsfrequenz liegen sogar etwas unter den für die Kontrollfusion (Nr.23) ermittelten.

3.5.3. Fusion mit FACS-sortierten Milzzellen

In Fusion Nr.51 (Antigen R-PE) wurde versucht, die FF_S durch eine Anreicherung der Milzzellsuspension an Ag-spezifischen Lymphozyten zu erhöhen. Diese Anreicherung erfolgte durch eine Zellsortierung im FACS, wobei das Ag selbst als Fluorochrom diente und eine Markierung der entsprechenden Lymphozyten bewirkte. Diese Membranfluoreszenz konnte nachgewiesen werden, indem ein Aliquot der R-PE-markierten (s. 2.6.3.) Milzzellsuspension fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurde. Es waren sowohl fluoreszenzmarkierte Lymphozyten (Ag-Rezeptoren) als auch in geringer Zahl Makrophagen, die Aggregate von R-PE phagozytiert hatten, nachzuweisen.

Die Sortierfenster wurden so festgelegt, daß eine Population von Milzzellen erfaßt wurde, die die rot fluoreszierenden (Abb.22, Quadrant 3), großen und stark strukturierten (Abb.22, Quadranten 1 bzw. 4) Zellen beinhaltet.

Nach der Sortierung unter sterilen Bedingungen konnten 3×10^5 sortierte Zellen mit 6×10^5 Myelomzellen (P3-X63Ag8.653) gemischt und wie unter 2.4.5.1. beschrieben in der Plattenkammer fusioniert werden (Suspensionsvolumen $5 \mu\text{l}$).

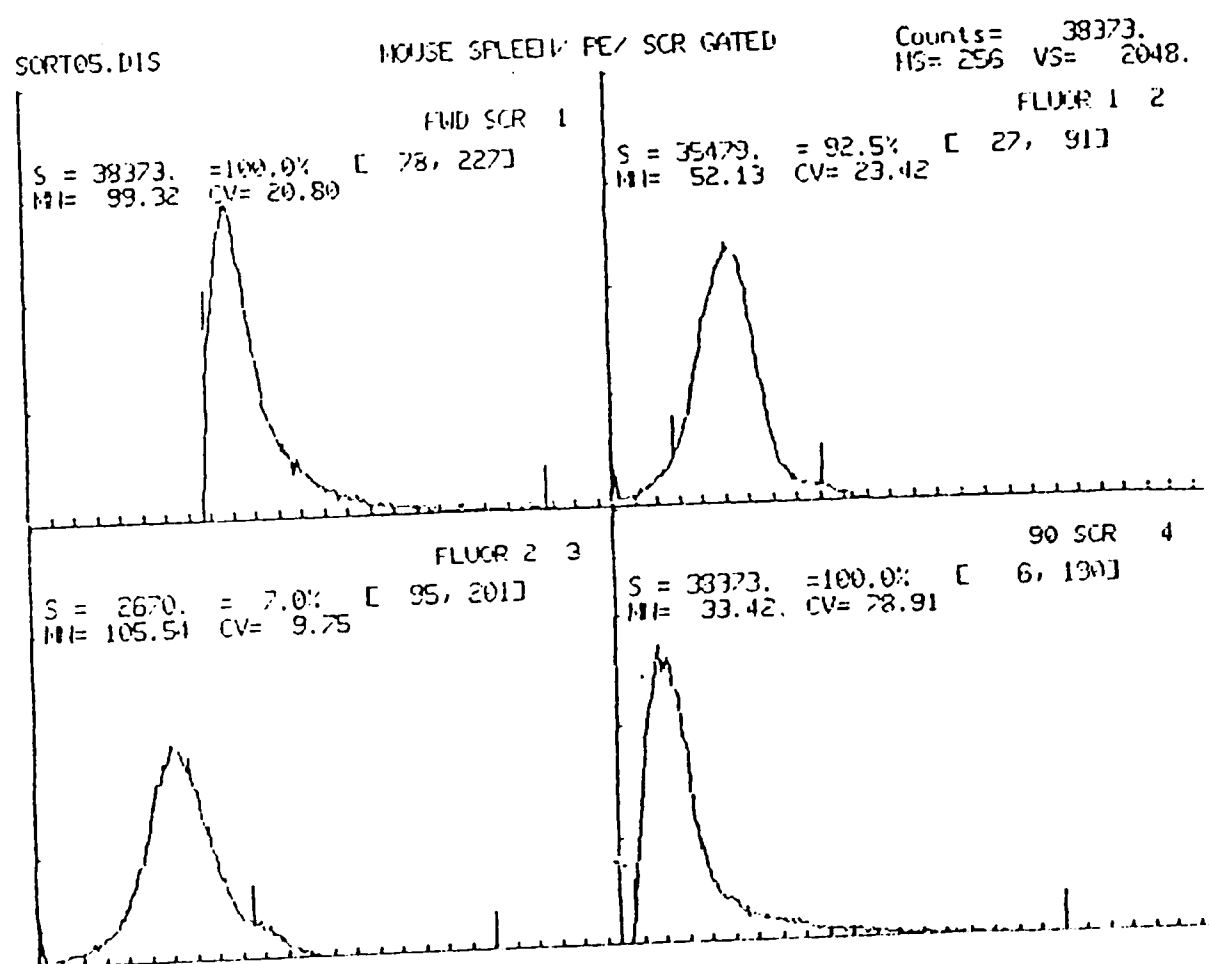


Abb. 22: FACS-Profil zur Sortierung der Ag-positiven (R-PE bindenden) Milzzellen für Fusion Nr.51

Nach der HAT-Selektion wuchsen im Ergebnis dieser Elektrofusion 22 Hybridome, von denen 13 im ELISA positiv reagierten ($FF_S = 59,1 \%$). Den Vergleich mit der Kontrollfusion (Fusion Nr.50: Milzzellen derselben Maus, aber nicht FACS-sortiert) zeigt Abb.23.

Es wird deutlich, daß eine Erhöhung der FF_s (Faktor 8,1) aufgrund der Anreicherung von Ag-bindenden Milzzellen stattgefunden hat (s. Abb. 23B). Bei der FF_a (s. Abb. 23A) ist der Wert -bezogen auf die Gesamtzellzahl- für Fusion Nr. 51 ebenfalls leicht erhöht (Faktor 2,3 - bezüglich des Mittelwertes der FF_a der jeweiligen Teilfusionen), was auf die sehr hohe $FF_{a/Mi}$ zurückzuführen ist. Diese wiederum ist Folge des numerischen Zellzahlverhältnisses (Myelom- : Milzzellen) von 0,5.

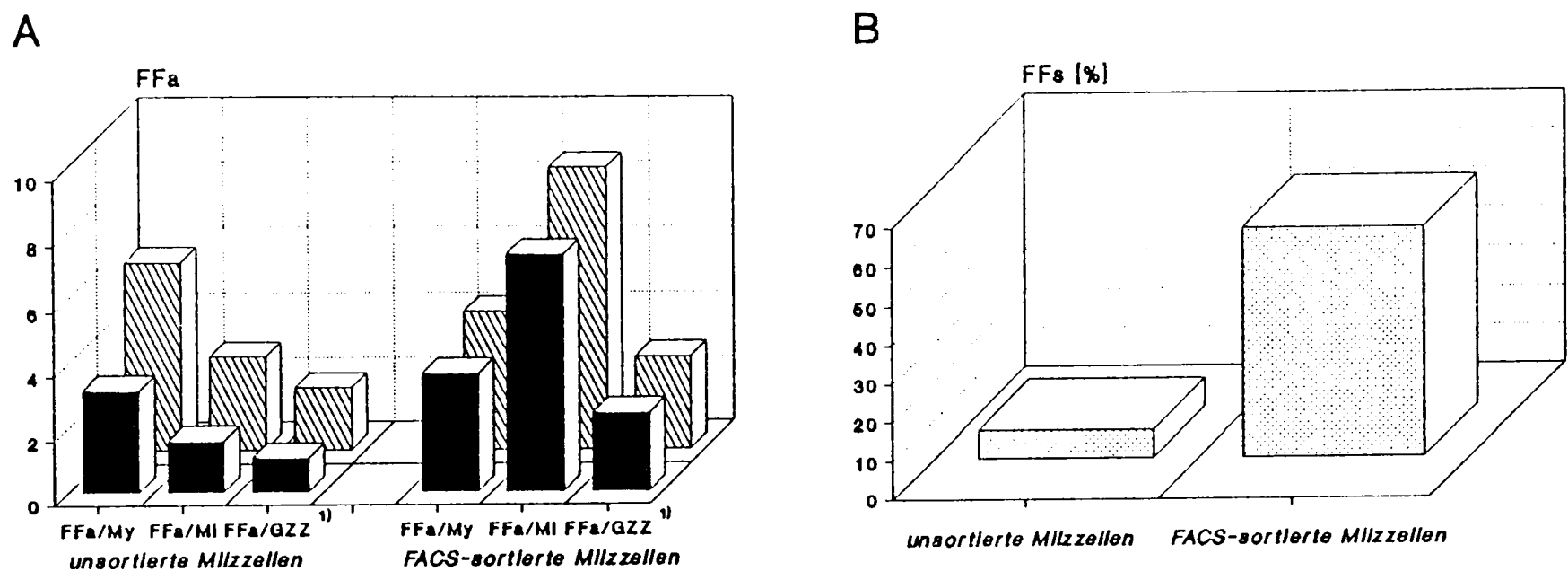


Abb. 23: Absolute (A) und spezifische (B) Fusionsfrequenzen bei Elektrofusion mit FACS-sortierten Milzzellen (Fusion Nr. 51) und entsprechender Kontrollfusion mit unsortierten Milzzellen der gleichen Maus (Fusion Nr. 50). Vordere Balken stehen für die mittlere FF_a , die hinteren für die FF_a der jeweils besten Teilfusion.

1) $FF_{a/GZZ}$ = absolute Fusionsfrequenz, bezogen auf Gesamtzellzahl (Hybridome/ 10^5 Myelom- + Milzzellen)

3.6. Elektrofusionen zur Herstellung von Hybrid-Hybridomen, die bispezifische Antikörper produzieren

Die Fusionen Nr. 56, Nr. 57, Nr. 63, Nr. 64 und Nr. 72 hatten zum Ziel, AK mit einer Doppelspezifität für einerseits R-PE und andererseits für definierte Membran-Antigene von humanen Lymphozyten herzustellen (bispesifische AK). Die Ausgangszelllinien waren die unter 2.3.4. näher charakterisierten Anti-Lymphozyten-Hybridome

H-BL-TP 3b (Fusionen Nr. 56 und Nr. 63)

H-BL-TS 8/2 (Fusionen Nr. 64 und Nr. 72)

H-BL-IgM/11 (Fusion Nr. 57).

Der Anti-R-PE-Klon

H-BL-PE/34

diente in allen Fällen als Fusionspartner.

Die Markierung der Zellen erfolgte vor der Fusion unter sterilen

Bedingungen mit R-PE als Rot-Markierung der Anti-R-PE-Hybridomzellen sowie mit ZAM/FITC als Grünmarkierung der Anti-Lymphozytenmembran-Ag-Hybridomzellen (Fusionen Nr.63, Nr.64 und Nr.72). In den Fusionen Nr. 56 und Nr.57 wurde anstelle von ZAM/FITC Avidin/FITC verwendet, nachdem die Hybridomzellen laut 2.6.1. biotinyliert worden waren. Die erfolgte Markierung konnte am Fluoreszenzmikroskop bestätigt werden. Nach der Zellfusion unter Standardbedingungen wurden die fusionierten Zellen resuspendiert und im FACS sortiert. Dabei wurde das Sortierfenster auf die Population der doppeltmarkierten Zellen, die die Fusionsprodukte zwischen den beiden Hybridomen einschloß, gelegt und mindestens 750 Zellen (Fusion Nr.56, Teilfusion 2), maximal 4000 Zellen (Fusion Nr.72, Teilfusion 2) sortiert (s. Abb.24).

Nach Aussaat und Anwachsen der Klone (ohne HAT-Selektion) konnten die Zellkulturüberstände auf ihre Spezifität getestet werden. Das erfolgte für die Anti-R-PE-Aktivität in einem ELISA. Außerdem wurde getestet, ob die entsprechenden Hybridomzellen Rezeptoren für R-PE an ihrer Membran besitzen, sich also mit R-PE markieren lassen. Für die Anti-Lymphozyten-Aktivität kam die Methode der indirekten Immunfluoreszenz am FACS zum Einsatz. Die Bispezifität der untersuchten Klone ließ sich ebenfalls am FACS in einer Zweischritt-Technik testen, wobei PBL im ersten Schritt mit den Zellkulturüberständen und in einem zweiten Schritt mit einer R-PE-Lösung inkubiert wurden. Eine mit dieser Technik nachweisbare Markierung von Lymphozyten läßt auf das Vorhandensein von bispezifischen AK schließen.

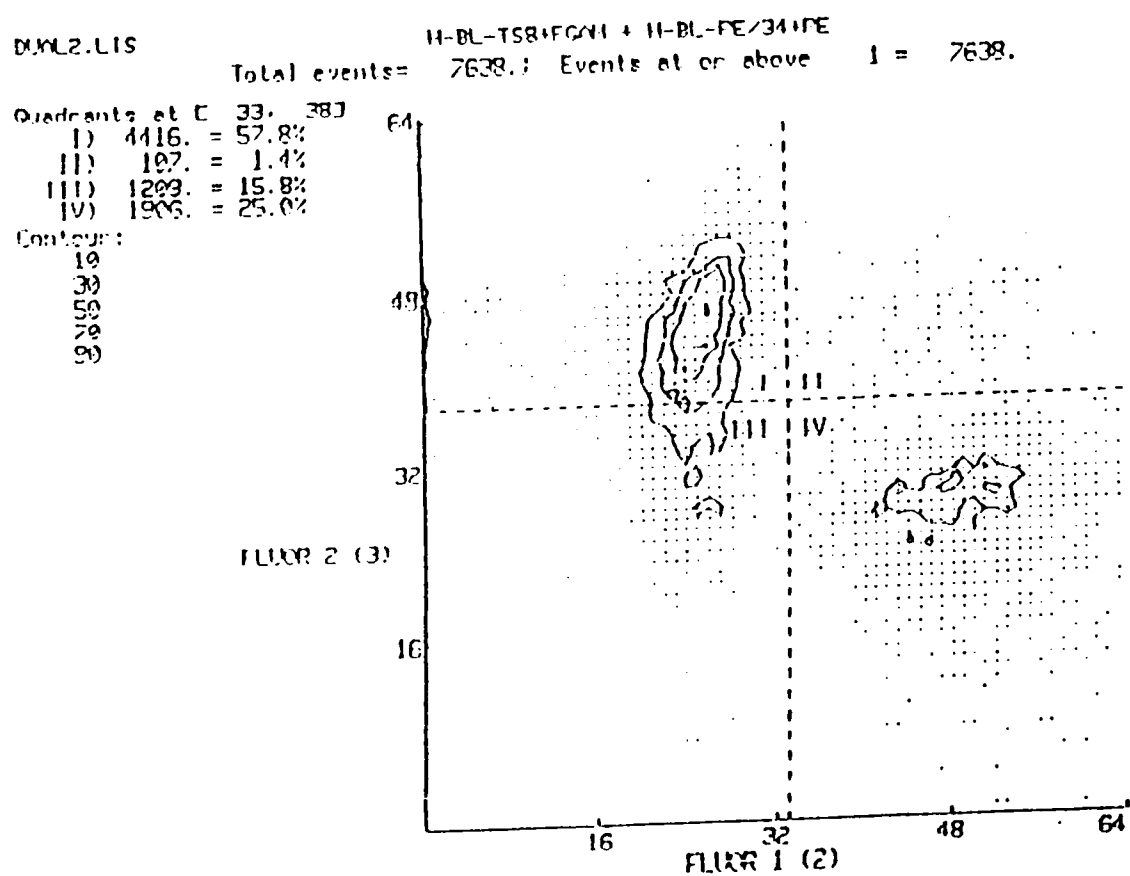


Abb. 24: FACS-Profil zur Sortierung der doppeltmarkierten Fusionsprodukte nach Fusion Nr.72

Die im Quadranten II gelegenen, doppelt fluoreszenzmarkierten Zellen wurden sortiert und ausplattiert

Abszisse: Grünfluoreszenz (H-BL-TS 8/2 + ZAM/FITC)

Ordinate: Rotfluoreszenz (H-BL-PE/34 + R-PE)

In Auswertung der 5 durchgeführten Fusionen zur Herstellung von Anti-PBL/Anti-R-PE - Hybrid-Hybridomen konnten insgesamt 3 Klone etabliert und charakterisiert werden, deren sezernierte AK Doppelspezifität aufwiesen, d.h. sowohl an Membranantigene auf PBL als auch an R-PE banden, und die auch Bispezifität als Ausdruck von AK-Hybriden im entsprechenden Test zeigten. In Tabelle Nr. 7 sind die Eigenschaften dieser Hybrid-Hybridome zusammengefaßt.

Tabelle 7: Charakterisierung der drei etablierten Hybrid-Hybridome

Hybrid-Hybridom Nr.	1	2	3
Bezeichnung	H-BL-T.B2	H-BL-T.D6	H-BL-T.D11
Fusion Nr.	57	57	72
Spezifität	IgM/R-PE	IgM/R-PE	CD8/R-PE
R-PE-ELISA	+	+	+
indirekte IF (PBL-Ag)	+	+	+
Membranmarkierung der Hybridomzellen mit R-PE	+	+	+
Bispezifitätstest (IF)	+	+	<u>+</u> ¹⁾
Morphologie	großzellig ²⁾	großzellig	großzellig

1) relativ schwache, schnell ausbleichende Fluoreszenz in der Fluoreszenzmikroskopie

2) Zellen der Hybrid-Hybridome deutlich größer als die der Parentalzelllinien H-BL-PE/34 und H-BL-IgM/11 bzw. H-BL-TS 8/2

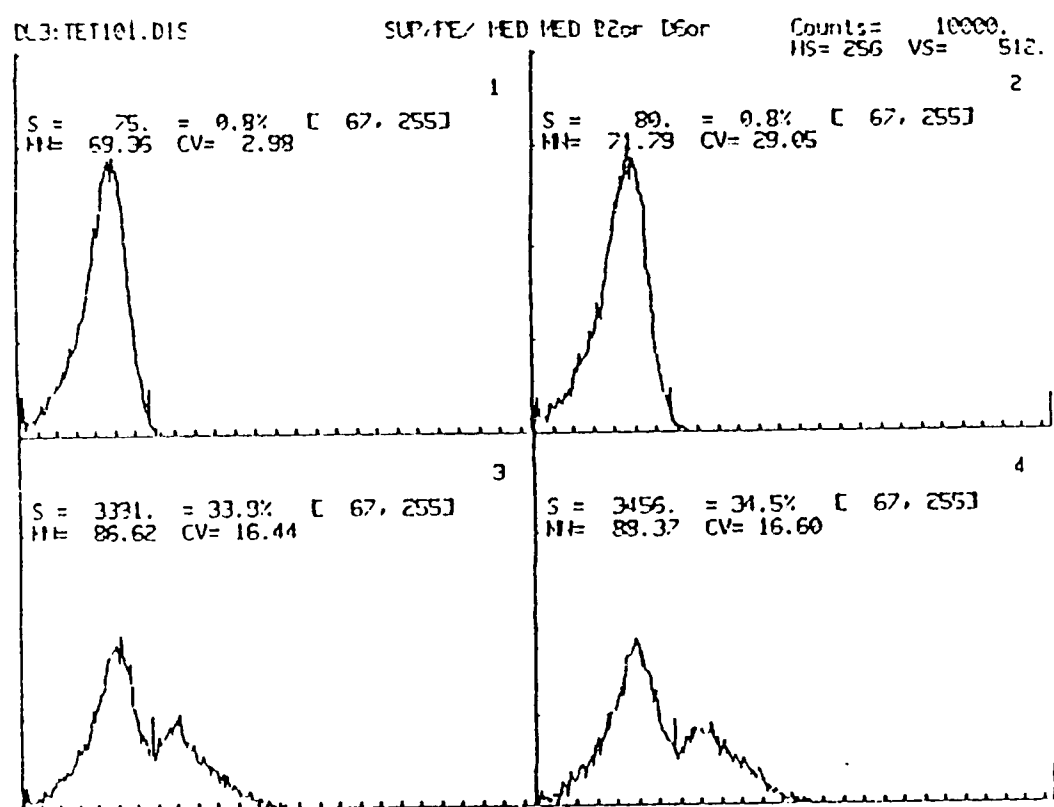


Abb. 25: FACS-Profile der bispezifischen AK BL-T.B2 und BL-T.D6 mit humanen Tonsillenzellen: Zweischnitt-Technik (Zellkulturüberstände / R-PE), gezeigt wird die Verteilung der Rotfluoreszenz
 Quadranten 1,2: Mediumkontrollen
 Quadrant 3: BL-T.B2
 Quadrant 4: Bl-T.D6

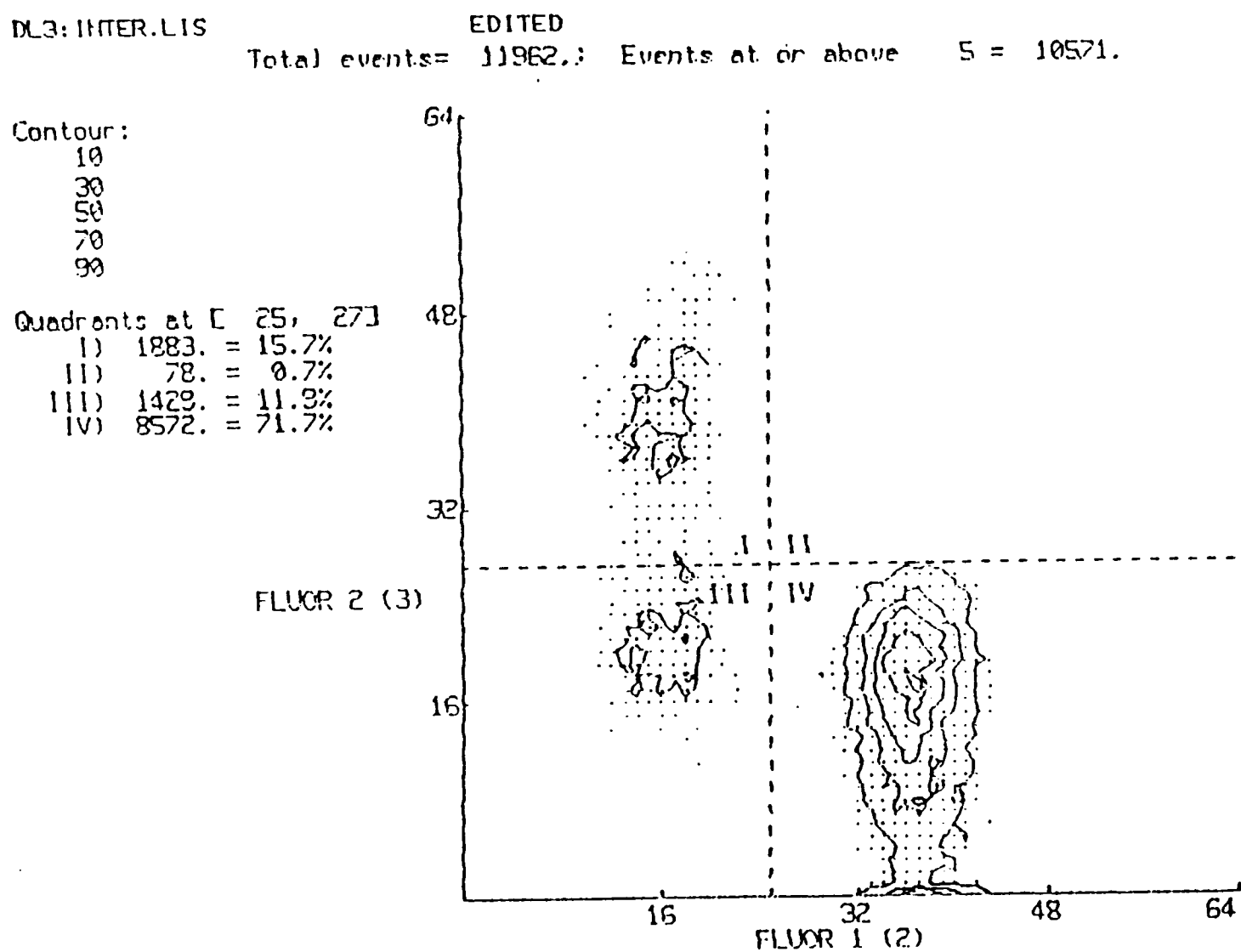


Abb. 26: Doppelmarkierung von PBL mit BL-T.D6 + R-PE (Rotfluoreszenz) und mit BL-TP 3b, direkt FITC-markiert (Grünfluoreszenz)
 Ordinate: Rotfluoreszenz
 Abszisse: Grünfluoreszenz

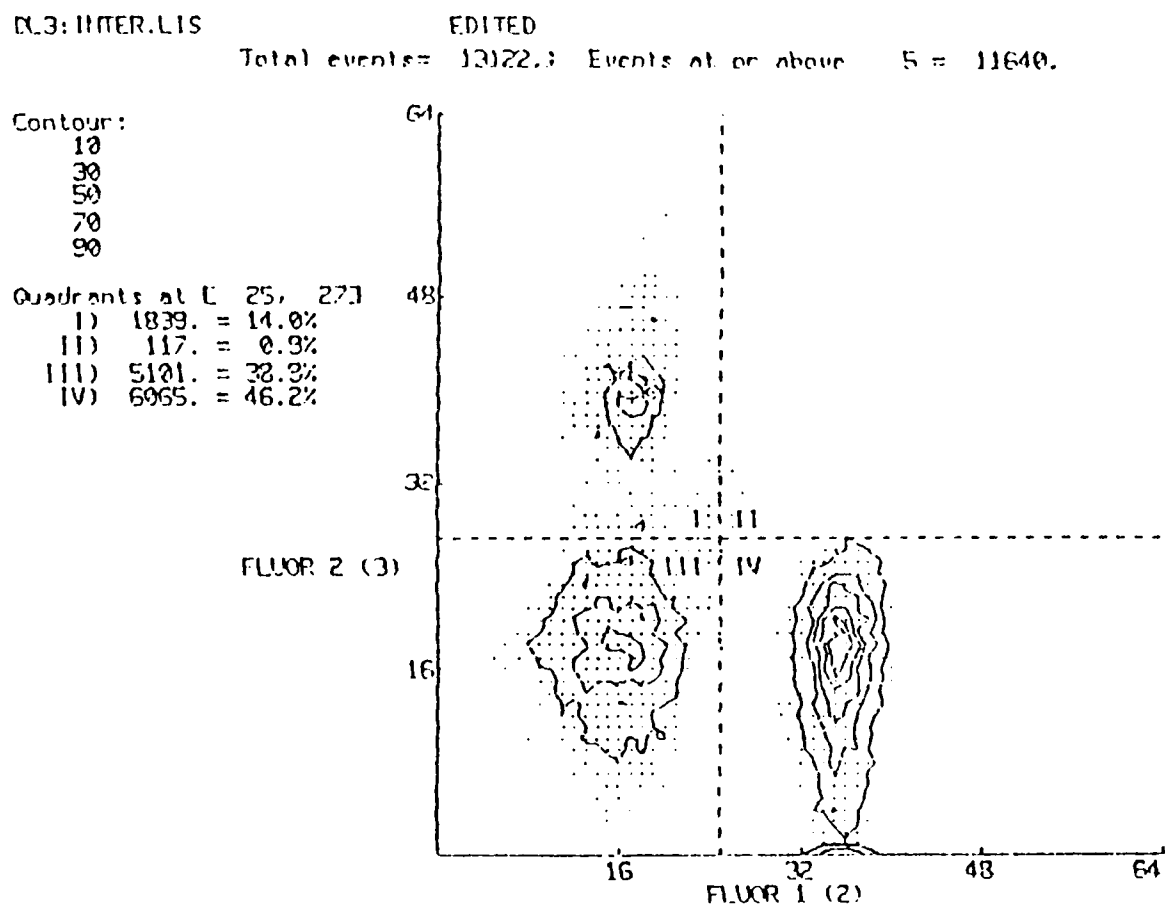


Abb. 27: Doppelmarkierung von PBL mit BL-T.D6 + R-PE (Rotfluoreszenz) und mit BL-TH 4, direkt FITC-markiert (Grünfluoreszenz)
Ordinate: Rotfluoreszenz
Abszisse: Grünfluoreszenz

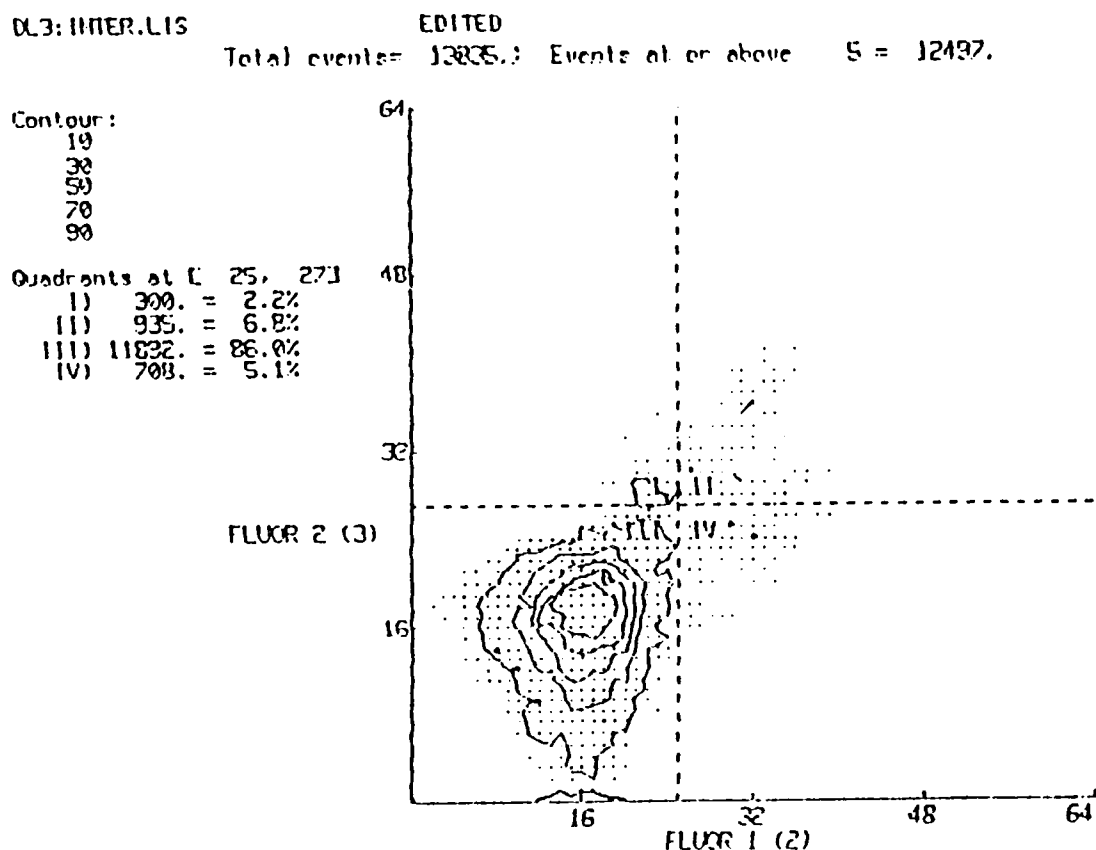


Abb. 28: Doppelmarkierung von PBL mit BL-T.D6 + R-PE (Rotfluoreszenz) und mit BL-IgM/11, FITC-markiert (Grünfluoreszenz)
Ordinate: Rotfluoreszenz
Abszisse: Grünfluoreszenz
Quadrant II: doppeltmarkierte Zellen

Wie die FACS-Profile an humanen Tonsillenzellen (Abb.25) und insbesondere die Ergebnisse der Doppelmarkierungen mit T-Zell-Markern wie CD3 und CD4 (jeweils direkt FITC-markiert, s. Abbn. 26 und 27) zeigen, sind die Hybrid-Hybridome H-BL-T.B2 und H-BL-T.D6 gut geeignet, die IgM-tragende B-Zell-Population der PBL zu erfassen und zu markieren. Abb. 28 (Doppelmarkierung mit dem FITC-gekoppelten mAK BL-IgM/11) belegt die Anti-IgM-Spezifität des Hybrid-Antikörpers aufgrund der gut nachweisbaren Population der doppeltmarkierten Lymphozyten im Quadranten II. Weniger geeignet für Doppelmarkierungsversuche ist der Hybrid-AK

BL-T.D11, da durch ihn zwar die Rotfluoreszenz der PBL im Vergleich zu den PBS-Kontrollen deutlich nach rechts verschoben wird, er aber andererseits nicht das typische CD8-Profil innerhalb der PBL zeigt.

3.7. Fotografische Dokumentation von Zellhybriden nach Elektrofusion

In Abbildung 29 werden typische Fusionsprodukte aus murinen Myelom- und Milzzellen gezeigt. Die Aufnahmen wurden etwa 2 bis 3 Minuten nach dem Gleichstromimpuls gemacht. Die Abrundung dieser Fusionsprodukte ist in Abhängigkeit von dem Ausmaß der Membranveränderungen, die nach dem elektrischen Breakdown auftreten, innerhalb von 5 bis 20 Minuten abgeschlossen.

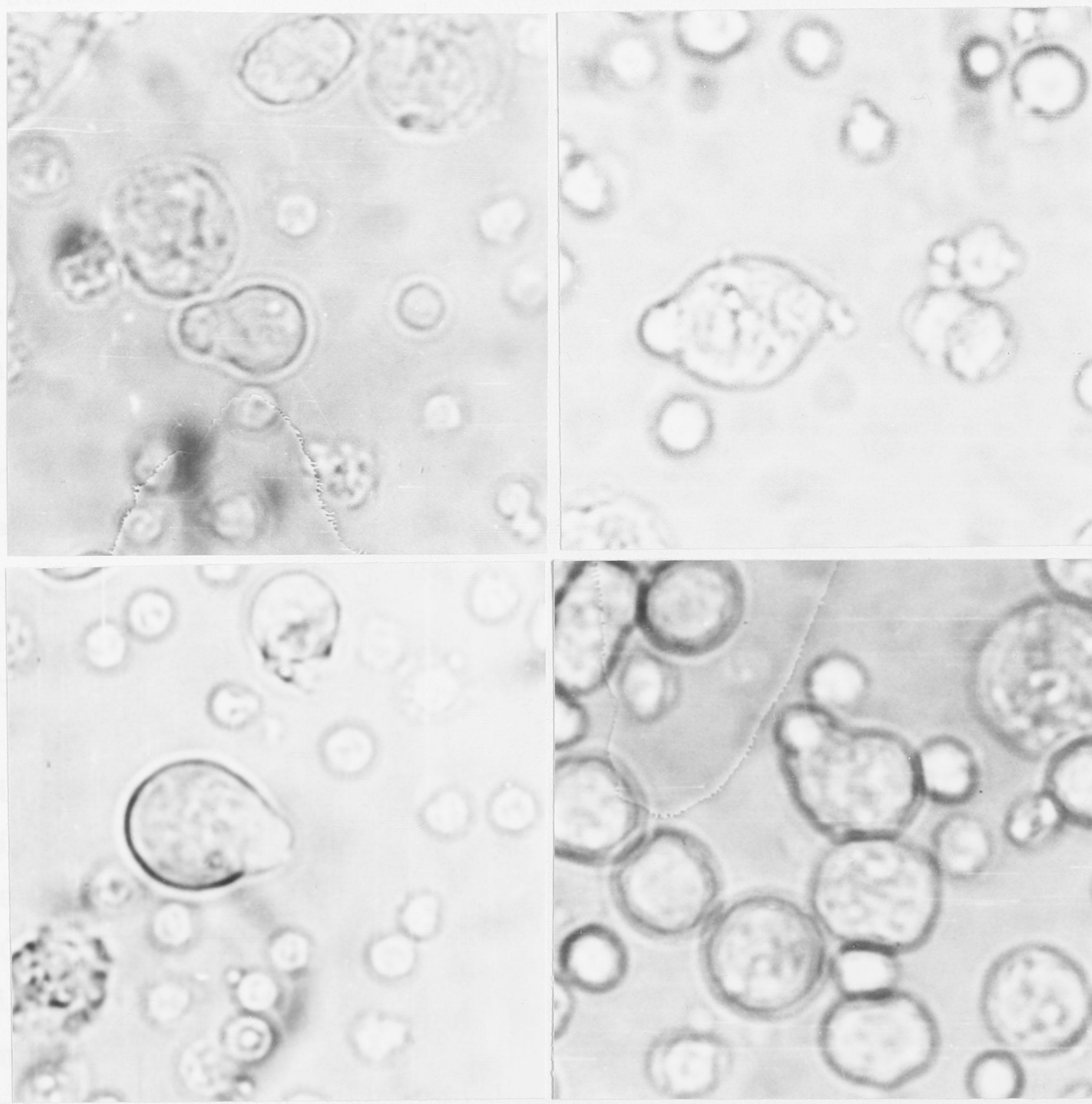


Abb.29: Fusionsprodukte (Pfeile) von murinen Myelom- und Milzzellen etwa 2 bis 3 min nach Applikation des Gleichstromimpulses (Vergrößerung ca. 700fach)

4. DISKUSSION

Die Fusion zweier verschiedener Zelltypen mit dem Ziel, in den resultierenden Hybriden die Eigenschaften der Parentalzellen zu konservieren, ist das generelle Prinzip der Hybridomtechnik. Die virale Transformation des B-Lymphozyten als Alternative, insbesondere bei der Herstellung humaner mAK, ist demgegenüber von untergeordneter Bedeutung. Als fusionsvermittelnde Agentien kommen fusogene Viren, z.B. das Sendai-Virus (KÖHLER und MILSTEIN 1975) oder neuerdings das vesicular stomatitis virus (NAGATA et al. 1991a, NAGATA et al. 1991b), chemische Verbindungen und physikalische Faktoren in Betracht. Außerdem kann es sowohl in vivo als auch in vitro zu Spontanfusionen zwischen gleichen oder unterschiedlichen Zelltypen kommen. Dafür stehen als Beispiele die Myoblastenfusion bei der Herausbildung der Muskelzellen sowie Beobachtungen aus dem Bereich der Hybridomtechnik (BANKERT et al. 1977; VERSCHOOR et al. 1990).

Die mit Abstand am weitesten verbreitete Methode zur Fusionierung ist die der Inkubation der Zellen in einer PEG-Lösung definierter Reinheit und Konzentration. Sie ist allerdings mit einigen Unzulänglichkeiten behaftet, wie der wechselnden Qualität der PEG-Chargen und der Schwierigkeit, kleine Zellmengen fusionieren zu können. Außerdem ist die Fusionsfrequenz, obgleich der spontanen und viralen Membranfusion deutlich überlegen, für einige Anwendungsgebiete noch zu gering (z.B. Fusionen mit humanen, präselektierten B-Zellen).

Als Alternative zur PEG-Fusion erwies sich die durch elektrische Felder vermittelte Zellfusion, die zuerst von SENDA et al. (1979) beschrieben wurde. Mehrere Arbeiten befassen sich mit den Möglichkeiten, die diese Methode für die Hybridomtechnik bietet. Dabei steht häufig der Vergleich der Fusionsfrequenzen mit denen aus PEG-Fusionen im Mittelpunkt. Darüber hinaus wurden Schritte in Richtung einer Ag-spezifischen Kopplung der Fusionspartner mit dem Ziel, höhere Raten an spezifischen mAK zu erzielen, unternommen.

Fast alle Autoren konstatieren, unabhängig von dem exakten Fusionsprotokoll und den Modifikation bei den physikalischen und chemischen Parametern, eine Steigerung der absoluten Fusionsfrequenz bei Anwendung der Elektrofusion gegenüber der PEG-Methode.

KARSTEN et al. (1985) sowie auch OHNISHI et al. (1987) geben für die Erhöhung der FF_a bei murinen Hybridomen den Faktor 10 an, während FOUNG und PERKINS (1989) für humane Hybridome eine Steigerung um das 11- bis 14-fache beschreiben. KATENKAMP et al. (1989) fanden die FF_a nur um das 3fache erhöht, hingegen konnten KARSTEN et al. (1988) eine bis zu 33-fache und VAN DUIJN et al. (1989) sogar eine 80-fache Erhöhung der Fusionsfrequenz bei murinen Hybridomen feststellen. Auch GRAVEKAMP et al. (1986) erreichten mit der Methode der Elektrofusion "beträchtlich mehr" humane T-Zell-Hybridome unter Verwendung der T-Lymphomzelllinie HSB-2 als mit PEG. Lediglich BROWN et al. (1986) geben an, daß die Methode der Elektrofusion gegenüber der PEG-Technik nicht als eindeutig vorteilhafter einzustufen ist. BLANCHER et al. (1991) konstatierten zwar niedrigere absolute Fusionsfrequenzen, dafür aber einen höheren Anteil von spezifischen Klonen.

Die aus unseren Ergebnissen stammenden Werte von 13,6 bzw. 19,9 für die mittlere Steigerung der FF_a/M_i (je nach Berechnung unter Zugrundelegung aller oder nur der besten Teilfusionen) differieren somit nur unwesentlich von den Literaturangaben (s. 3.2. Tab.5).

In den Arbeiten von KARSTEN et al. (1985 und 1988) wird darauf hingewiesen, daß die FF_s bei EF und PEG-Fusion vergleichbar sind, ebenfalls solche wesentlichen Parameter wie Klonierbarkeit, AK-Titer, Isotypverteilung, Stabilität der Antikörperproduktion, Transplantierbarkeit und Kryopräservierung. Auffällig waren nur die Unterschiede im frühen Wachstumsverhalten, d.h. Klone, die aus Elektrofusionen resultieren, erscheinen signifikant früher (schon 3 bis 4 Tage nach der Fusion). Diese Aussagen KARSTEN's, die auch mit den Ergebnissen von TRAWINSKI (1985) und GLASER (1989b) übereinstimmen, können von uns in jeder Hinsicht bestätigt werden. Obwohl exakte Vergleiche zwischen dem Anteil der "positiven" Klone bei EF bzw. bei PEG-Fusionen nicht gemacht wurden, so liegen doch die Werte für die FF_s aus den Elektrofusionen (s. Tab. 1-3) in dem Bereich, der erfahrungsgemäß auch für PEG-Fusionen zutrifft. BLANCHER et al. (1991), die eine deutlich höhere FF_s bei Elektrofusionen feststellten, begründen diese Erscheinung mit der Tatsache, daß größere Lymphozyten (also z.B. Ag-stimulierte B-Blasten) unter ihren gewählten elektrischen Bedingungen bevorzugt mit Myelomzellen fusionieren. Diese Ab-

hängigkeit von der Zellgröße ergibt sich aus der Gleichung

$$V = 1,5 * r * E * \cos \alpha ,$$

wobei V das generierte Membranpotential ist (entscheidend für das elektrische Breakdown und damit die Membranfusion), r der Zellradius, E das angelegte äußere elektrische Feld und α der Winkel zwischen dem normalen Vektor eines gegebenen Punktes auf der Zellmembran und der Richtung des äußeren Feldvektors (ZIMMERMANN et al. 1990). BLANCHER et al. (1991) arbeiteten mit der relativ geringen Feldstärke von $1,5 \text{ kVcm}^{-1}$ für den d.c. Impuls und ohne dielektrophoretische Sammlung der Zellen vor Fusion. Die Restriktion der Zellfusion auf Ag-stimulierte B-Zellen wäre mit den genannten Parametern stärker ausgeprägt als bei Elektrofusionen mit höheren Feldstärken bzw. bei PEG-Fusion. Nach unseren Erfahrungen zeigte sich bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Fusionsprodukte (bei Werten von $4-5 \text{ kVcm}^{-1}$) keine bevorzugten Zellpaare aus Myelomzelle und Lymphoblast, sondern es dominierten Fusionsprodukte aus 2 oder mehreren Myelomzellen. Paarungen von Myelomzellen mit großen bzw. kleinen Lymphozyten traten etwa gleich häufig auf.

Das steht im Einklang mit dem Ergebnis, daß keine Korrelation zwischen dem Anteil der Blasten in der Milzzellsuspension und der erreichten spezifischen Fusionsfrequenz besteht (s.3.3.5. Abb.7).

Die oben erwähnte Beobachtung, daß die aus der EF hervorgegangenen Klone früher proliferieren, kann von uns bestätigt werden. Wahrscheinlich hängt diese Erscheinung damit zusammen, daß der toxische Effekt des PEG, der evtl. länger andauert, bei der Elektrofusion wegfällt, die Zellen sich also schneller erholen und zu teilen beginnen.

Gleichfalls waren keine Unterschiede hinsichtlich der Stabilität der AK-Synthese der Hybridome festzustellen. Segreganten kommen gelegentlich vor, jedoch nicht häufiger als bei Klonen, die aus PEG-Fusionen hervorgegangen sind.

Von wesentlicher Bedeutung ist der Befund, daß es eine deutliche Korrelation zwischen den Fusionsfrequenzen der jeweils parallel ausgeführten PEG- und Elektrofusionen gibt (s.Abb.2). Zwei Interpretationsmöglichkeiten bieten sich an:

1. Die eingesetzten Zellen (Myelom- oder Milzzellen) sind der Grund für den Erfolg der Fusion, denn die Zellsuspensionen wurden in der Regel geteilt und gleichzeitig für beide Fusionstechniken eingesetzt. Das bedeutet, die Zellen befanden sich in gleicher Kondition (Wachstumsphase der Myelomzellen; Immunisierungsstatus der Tiere, Anteil an B-Lymphoblasten) und limitieren in beiden Fusionstechniken die Rate an Hybridomen.
2. Die konkret zum Zeitpunkt der Fusion und in der unmittelbaren post-fusion Periode herrschenden Zellkulturbedingungen (Medium, Wasser, Feederlayer) waren gleich. Da die Zellsuspensionen nach der Elektro- bzw. PEG-Fusion identisch behandelt wurden, wirkte sich der Zellkulturfaktor für beide Techniken gleichermaßen positiv bzw. negativ aus.

Der zweiten Variante ist aufgrund unserer Erfahrungen der Vorzug zu geben: Sehr hohe Vitalität der Myelomzellen bzw. hoher Blastenanteil in der Milz gehen bei der Elektrofusion - zumindest innerhalb des angegebenen Intervalls - nicht unbedingt mit einer hohen Fusionsfrequenz einher.

Die Versuche, die auf eine Parameteroptimierung der Elektrofusion abzielten, sollen im folgenden interpretiert werden.

Die erste untersuchte Größe ist das numerische Verhältnis von Milzzellen zu Myelomzellen im Fusionsansatz. Dabei geht man davon aus, daß die Trefferrate im Sinne von Myelomzelle x Milzzelle - Fusionen von diesem Parameter bestimmt wird. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die der Elektrofusion vorgeschaltete dielektrophoretische Zellsammlung nicht nur ein Zufallsprozess ist, sondern beispielsweise auch von der Zellgröße abhängt. Ungeachtet dessen kann man ein experimentell zu bestimmendes Optimum annehmen. Die Angaben aus der Literatur hierzu sind sehr verschieden und Aussagen über den realen Effekt des Zellzahlverhältnisses selten. Die Verhältniszahlen schwanken von 50:1 (Milz- : Myelomzellen, BROWN et al. 1986) bis zu 1:3 (also dreifacher Überschuß an Myelomzellen; TRAWINSKI 1985).

PETERS (1990) geht bei der PEG-Fusion von einem Verhältnis von 1:1 aus, bezogen auf mikroskopisch identifizierbare Milzlymphoblasten. Bezogen auf die Gesamtzahl der Milzlymphozyten werden Literaturwerte zitiert, die in der Spanne von 10:1 bis 1:2 lie-

gen. In den Publikationen, die zum Thema Herstellung von Hybridomen durch Elektrofusionstechnik erschienen sind, wird ein jeweils konstantes Verhältnis der Fusionspartner angegeben, nur in den Arbeiten von TRAWINSKI (1985) und von FOUNG et al. (1990) wird dieser Parameter variiert. Die Fusionsfrequenzen bei TRAWINSKI (1985) lassen allerdings keinen Trend hinsichtlich ihrer Beeinflussung durch das Zellzahlverhältnis erkennen. Hingegen weisen FOUNG et al. (1990) darauf hin, daß diese Größe Einfluß auf die Fusionsfrequenz hat. Bei einem Verhältnis von 1:2 (doppelte Menge an Myelomzellen) liegt der Wert für die FF deutlich höher als bei 1:1 bzw. 2:1 (doppelte Menge an Lymphozyten). Demgegenüber wird in den anderen Arbeiten ausschließlich von einem Überschuß an Milzzellen (bzw. Human-PBL) oder aber von gleichen Zellzahlen ausgegangen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang der Befund aus Fusion Nr. 51, bei welcher FACS-sortierte Milzzellen zum Einsatz kamen. Hier lag das numerische Verhältnis bei 1:2 (Milz- : Myelomzellen). Trotzdem konnten, neben der Steigerung der spezifischen FF, auch sehr hohe FF_a erzielt werden (s. Tabelle 2), für die FF_a/Mi sogar den absolut höchsten Wert (8,7). Inwieweit das eine Folge des Zellzahlverhältnisses oder eher einer Anreicherung von Ag-positiven B-Blasten, die potentiell gute Hybridombildner sind, darstellt, muß hier dahingestellt bleiben. Die dazugehörige "Zufalls"fusion Nr. 50, bei der ein Zellzahlverhältnis von 2:1 gewählt wurde, erbrachte geringere FF_a . Trotzdem ist mit unseren Daten kein deutlicher Zusammenhang zwischen dem numerischen Zellzahlverhältnis und den Fusionsfrequenzen (s. Abb. 3).

Es kann von Vorteil sein, wenn ein Teil der Milzzellsuspension für spätere Fusionen kryokonserviert wird, da beim Elektrofusionsansatz meist nicht alle Zellen in einem Experiment verarbeitet werden können. Nach MARUSICH (1988) bringt ein vorheriges Einfrieren der Zellen sogar mit sich, daß die nachfolgenden Fusionen mit diesen Zellen erfolgreicher verlaufen als ohne diese Vorbehandlung. Unsere Ergebnisse (s. Abb. 4) können diesen Befund nicht bestätigen. Unbestritten ist, daß die Zellmembranen durch den Einfrier- und Auftauprozess belastet werden, was entweder zum Zelltod, aber möglicherweise auch zu einer höheren Fusogenität der Zellen führen kann (MARUSICH 1988).

Eine der Zellfusion vorhergehende Abtrennung der toten Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation ist aufgrund der Tatsache,

daß jene die DE stören können, sicher von Vorteil. Da nur zwei Fusionen (Nr.16 und Nr.17) ohne eine solche Separation durchgeführt wurden, ist eine gesicherte Aussage aus den vorliegenden Fusionsfrequenzen nicht möglich.

MARUSICH (1988) erzielte bei PEG-Fusionen mit kryokonservierten Zellen auch ohne Dichtegradientenschritt gute Fusionsfrequenzen.

Bereits in einem frühen Stadium der methodischen Entwicklung der Elektrofusion wurde die proteolytische Vorbehandlung (Pronase, Dispase) der Zellen als fusionsbegünstigend diskutiert (ZIMMERMANN et al. 1981, OHNO-SHOSAKU und OKADA 1984). VIENKEN und ZIMMERMANN (1982) erklären den positiven Effekt der Proteasen damit, daß die entstehenden reinen Lipidareale innerhalb der Membran diese gegen hohe elektrische Feldstärken schützen sollen. Dagegen stellen OHNO-SHOSAKU und OKADA (1989) die enzymatische Wirkung in den Vordergrund, da Proteasenhemmer den fusionsbegünstigenden Effekt nivellierten. Dagegen stehen wiederum die Befunde von TRAWINSKI (1985), der zwar eine höhere primäre Fusionsfrequenz bei Pronasezugabe feststellt, aber auch bei Inkubation in 0,25 mg Rinderserumalbumin /ml, was auf einen unspezifischen Schutzeffekt gegenüber den Membranen durch unspezifische Proteinanlagerung hindeutet.

GLASER et al. (1989b) stellte eine irreversible Schädigung der Zellen fest, wenn Pronase E während des Impulses anwesend war, zumindest bei Impulszeiten größer als 8 μ s. Eine Vorbehandlung mit Pronase hingegen erhöhte die Fusionsfrequenz, wie das auch von den meisten Autoren, die Proteasen verwendeten, bestätigt wird (KARSTEN et al. 1985, ABEL et al. 1986, OHNISHI et al. 1987, STENGER et al. 1988, VAN DUIJN 1989). Demgegenüber stehen die Arbeiten von BROWN et al. (1986), TSONEVA et al. (1988) sowie von SEIDEL und FIEBIG (1989a), die keine Steigerung der absoluten Fusionsfrequenz konstatierten. Interessant ist in dieser Hinsicht auch der Befund von KATENKAMP et al. (1989), der zwar mit einer Maus-Myelomzelllinie (FO) unter Einwirkung von Pronase eine höhere Rate an Hybridomen erzielte, nicht aber bei Verwendung der Myelomzellen P3-X63Ag8.653.

IGARASHI und BANDO (1990) untersuchten, allerdings bei PEG-Zellfusionen, die Wirkung der Neuraminidase in der Zellvorbehandlung auf die Fusionseffizienz und stellten ebenfalls eine höhere Ausbeute an Hybridomen im Vergleich zu Kontrollfusionen fest, was als Folge der Abspaltung der Sialinsäurereste und der damit

verbundenen Begünstigung des interzellulären Kontaktes interpretiert werden kann.

Unsere Ergebnisse bezüglich des Pronase-Effektes sind nicht eindeutig (s. Abb. 5), jedoch kann nicht von einer klar positiven Wirkung des Enzyms gesprochen werden. Da es fast immer aufgrund von Agglutinationen zum Zellverlust kam, wurde in den letzten Elektrofusionen auf eine proteolytische Vorbehandlung verzichtet. Die höchsten FF_a wurden in Fusionsansätzen ohne Pronase erreicht.

Die Vitalität der Myelomzellen als Fusionspartner ist eine Größe, die in der Literatur nur eine geringe Rolle spielt. Die Empfehlung, Zellen im exponentiellen Wachstum (log-Phase) zu verwenden (FIEBIG 1984, PETERS 1990), impliziert eine hohe Vitalität der Suspension, jedoch fehlen exakte Untersuchungen dazu. Unsere Ergebnisse weisen aus, daß der Parameter des Totzellanteiles, den wir mittels Trypanblau-Ausschlußtest ermittelten, keinen signifikanten Einfluß auf die FF_a hat. Jedoch scheint ein Trend in Richtung auf eine positive Korrelation zu bestehen, wenn alle Fusionsexperimente unabhängig von den Einzelversuchen analysiert werden. Dabei ist einschränkend zu vermerken, daß diese Aussage nur für die untersuchte Bandbreite von 60 - 98 % Vitalität gemacht werden kann. Außerdem ist die Wertigkeit des Trypanblau-tests in Rechnung zu stellen, der nur die Permeabilität der Zellmembran erfaßt und andere Parameter, die auch die Qualität der Zellsuspension bestimmen (z.B. Zellzyklus) nicht. Es bieten sich hier weitergehende Experimente in Richtung einer Zyklussynchronisation an, wie sie bei MIYAHARA et al. (1984) für die PEG-Fusion als erfolgreich beschrieben wurden.

Eine weiterer Faktor, dessen Einfluß auf die FF_a sowie auf die FF_s untersucht wurde, ist der Anteil der Blasten in der zur Fusion eingesetzten Milzzellsuspension. Dieser Wert wurde mikroskopisch durch Auszählen der großen, blastenähnlichen Zellen bestimmt. Ein subjektiver Fehler durch Verwechslungen mit Makrophagen/Monozyten war damit immer gegeben.

In Auswertung der Ergebnisse (s. 3.3.6.) ist festzustellen, daß sowohl die absolute wie auch die spezifische Fusionsfrequenz zumindest nicht primär von der Rate der Blasten in der Milzzellpopulation abhängen. In Anbetracht der mehrdimensionalen Beeinflussung des Fusionserfolges ist es sicher zu einfach, von einer hohen Raten an Lymphoblasten auf eine hohe FF schließen zu wol-

len. Wir konnten damit auch nicht die Ergebnisse von STÄHLI et al. (1980) bestätigen, die einen klaren Einfluß des Anteils an "großen Zellen" auf die spezifische Effizienz bei PEG-Fusionen feststellen konnten.

In der Regel kann auf Feederzellen insbesondere während der Selektions- und Anwachsphase der Hybridome nicht verzichtet werden, da diese Zellen Lymphokine sezernieren (u.a. Interleukin 1, Interleukin 6; BAZIN und LEMIEUX 1989), welche das Anwachsen der Hybridzellklone begünstigen. Wir verwendeten als Feederzellen murine histokompatible Peritonealmakrophagen sowie als Alternative Mausmilzzellen. Die Tatsache, daß unter Verwendung von Makrophagen die FF_a deutlich höher ausfiel als bei Einsatz von Milzzellen, weist darauf hin, daß der konditionierende Effekt der Makrophagen stärker ist als der der Milzzellen. Außerdem kommt den Makrophagen eine Funktion als Phagozyten bei der Beseitigung von toten Zellen, die die Kulturbedingungen verschlechtern könnten, zu. Da die Verdopplung der Makrophagendichte in Fusion Nr. 54 nur zu einer unwesentlichen Erhöhung der Fusionsfrequenz führte, ist dieser Parameter offenbar weniger bedeutsam als die Wahl der Feederzellart.

Nach LANE et al. (1988) bestimmt auch der Aktivierungszustand der Peritonealmakrophagen, induziert durch Injektionen verschiedener Substanzen vor dem Entnehmen der Zellen, die wachstumsfördernde Wirkung: FREUND's Inkomplettes Adjuvans sowie Pristan als unspezifische Entzündungsreize sind demnach die stärksten Aktivatoren, die im Vergleich mit nichtstimulierten Peritonealzellen eine deutlichen Steigerung der FF_a bewirken.

Unsere Ergebnisse betreffend die Vorreinigung der mononukleäre Zellen aus der Milzzellsuspension, belegen den positiven Effekt der Dichtegradientenzentrifugation bei kryokonservierten Zellen zur Abtrennung toter Zellen. Auch bei frischen Milzzellen war eine geringe Steigerung der Fusionsfrequenz bei Anwendung von Trennmedium höherer Dichte (1,086) zu verzeichnen. Dieser Vorteil wird allerdings durch den Umstand relativiert, daß es bei diesem Trennschritt in der Regel zu Zellverlusten kommt.

KARSTEN et al. (1985) setzen die Milzzellsuspension vor der Fusion einem osmotischen Schock aus, um die Erythrozyten daraus zu entfernen, während die gleichen Autoren später auch eine Ficoll-Visotrast-Dichtegradientenzentrifugation bevorzugen (KARSTEN

et al. 1988). In den meisten Experimenten zur Herstellung muriner mAK mittels EF wird von der kompletten Milzzellpopulation inklusive Erythrozyten ausgegangen oder ein Inkubationsschritt mit isotonischer Ammoniumchloridlösung vorangestellt, um die Erythrozyten zu lysieren (VIENKEN und ZIMMERMANN 1982, VIENKEN und ZIMMERMANN 1985, STENGER et al. 1988, SCHMITT et al. 1989, VAN DUIJN et al. 1989, TOMITA und TSONG 1990).

Unsere Ergebnisse, die den differenzierten Einfluß der Zellkulturmedien auf die FF_a betreffen (s. 3.3.8.: Abb. 10), stimmen gut mit den Befunden von LONG et al. (1988) überein: auf DMEM basierende Medien, zu denen auch IMDM gehört, werden gegenüber RPMI 1640 als vorteilhaft eingeschätzt. Andere Autoren versuchten erfolgreich, auf RPMI 1640-Grundlage durch Zusätze wie β -ME (LANE et al. 1988), Eisenzitrat (anstelle von Transferrin, KOVAR 1988) oder Maus-Aszites (SP2/0-induziert, STEWART und FULLER 1989) die absolute Fusionsfrequenz zu steigern. STEWART und FULLER (1989) berichten auch über eine 3,6 bis 4,8fache Erhöhung des Anteils Ag-spezifischer Klone unter Einsatz von 2,5 % Aszites anstelle von FKS. Der erforderliche FKS-Gehalt im Medium als einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren kann nach LEE et al. (1989) in Abhängigkeit von der initialen Zelldichte gewählt werden und z.B. bei einer Suspensionsdichte von 1×10^6 /ml bis auf 0 reduziert werden.

Wesentlich für den Erfolg der Elektrofusion mit vorhergehender dielektrophoretischer Sammlung der Zellen ist ein geeignetes niedrigkonduktives Fusionsmedium. Dieses wird in den meisten Fällen von einer isotonen Zuckerlösung (Saccharose, Glukose, Inosit, Mannit oder Sorbit) gebildet. Ausnahmen beschreiben TRAWINSKI (1985) und KATENKAMP et al. (1989), wobei die Elektrofusion in normalem Zellkulturmedium vorgenommen wurde. Der Zellkontakt wurde durch Zentrifugation realisiert und die Zellen praktisch im Zellpellet fusioniert. Im Gegensatz zu TRAWINSKI, der mit dieser Methode erfolgreich Hybridome herstellte, fanden KATENKAMP et al. (1989), daß die Fusion im normalen Wachstumsmedium nicht zu lebensfähigen Hybridomen führt.

In unseren Versuchen mit einer isotonen Saccharoselösung (ohne weitere Zusätze) konnten zwar Fusionsprodukte festgestellt werden, jedoch wuchsen keine Hybridome, während parallel durchgeführte Ansätze mit dem F1-Medium erfolgreich waren. Im allgemeinen wer-

den den Zuckerlösungen noch in geringen Konzentrationen Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen beigefügt und über Phosphatpuffer bzw. Histidin der pH-Wert justiert. Die Art des Zuckers scheint dabei, in Übereinstimmung mit den Befunden von TRAWINSKI (1985) von zweitrangiger Bedeutung zu sein (s. Abb. 11). Es gibt keine wesentlichen Unterschiede in der FF_a unter Verwendung von auf Inosit bzw. auf Mannit basierendem Fusionsmedium. Hingegen sinkt die FF_a bei Verwendung von F3 (schwach hypoton, Histidin-gepuffert) ab, während STENGER et al. (1988) mit diesem Medium eine Verbesserung der Fusions-effizienz erzielten. Auch SCHMITT und ZIMMERMANN (1989), FOUNG et al. (1990) sowie ZIMMERMANN et al. (1990) erreichten mit stark hypoosmolaren Zuckerlösungen (75 mosm Sorbit) höhere Fusionsfrequenzen als mit isoosmolaren (300 mosm) Lösungen. Die Autoren erklären das mit einer erhöhten Membranpermeabilität infolge des osmotischen Stresses. Da die Volumenzunahme der Zellen unter hypoosmolaren Bedingungen eine Reduzierung der Feldstärke des d.c. Impulses erfordert, läßt sich der positive Effekt der niedrigen Osmolarität auch auf eine insgesamt höhere Vitalität der Zellsuspension nach dem Feldimpuls zurückführen.

Da für die erfolgreiche Elektrofusion von Zellen vorhergehender Zellkontakt Voraussetzung ist, sind für die Parameteroptimierung auch die elektrischen Daten der Dielektrophorese von Interesse. Die Werte für die Frequenz des Wechselfeldes werden in der Literatur mit minimal 800 kHz (TRAWINSKI 1985, PRATT et al. 1987) bis maximal 5,0 MHz (GRAVEKAMP 1985) angegeben. Nach unseren Ergebnissen erscheint die Frequenz von 2 MHz als optimal, 1 MHz brachte etwas geringere Fusionsfrequenzen und eine DE-Frequenz von 500 kHz bewirkt einen starken Abfall der FF_a . Bei diesem Wert kommt es offenbar nur eingeschränkt zur dielektrophoretischen Wanderung der Zellen und damit nicht zum nötigen Zell-Zell-Kontakt (s. Abb. 12, Fusion Nr. 50). Es tritt stattdessen das Phänomen der Elektrorotation auf (ARNOLD und ZIMMERMANN 1982), das die Zelladhärenz verhindert. TRAWINSKI (1985) konstatierte innerhalb der Spanne 0,8 und 1,5 MHz bei sonst gleichen Fusionsbedingungen keine Abhängigkeit der FF von der Wechselfeldfrequenz, unterhalb von 0,8 MHz jedoch wurden keine Fusionsprodukte mehr festgestellt.

Die DE-Spannung wird solange angelegt, bis es zur Bildung von Zellketten kommt, die minimal aus 2 Zellen bestehen können. Wel-

che Zeit das erfordert, hängt nach TRAWINSKI (1985) von der Amplitude des Wechselfeldes ab. Während bei einer Feldstärke von 100 V/cm erst nach 60 s die Kettenbildung abgeschlossen wurde, reichten bei einem Wert von 660 V/cm bereits 10 s dafür aus. Die Literaturdaten hierzu streuen von 5 s bei 1 kV/cm (ABEL et al. 1987) bis zu 60 s bei 250 V/cm (TSONEVA et al. 1988). Die meisten Werte liegen zwischen 10 und 30 s. Unsere Untersuchungen zur Abhängigkeit der FF_a von der DE-Dauer ergaben, daß innerhalb der Spanne 5 bis 20 s keine eindeutige Abhängigkeit besteht (bei einer Frequenz von 2 MHz und einer Feldstärke von 600 V/cm). TRAWINSKI (1985) hält eine generelle zellschädigende Wirkung der Dielektrophorese für erwiesen (Proliferationshemmung), weswegen er auf Alternativen zum Erlangen des Zell-Zell-Kontaktes orientiert.

Die elektrische Feldstärke zum Erreichen der DE muß einerseits ausreichend hoch sein, damit es überhaupt zur Zellansammlung kommt, andererseits bewirken zu hohe Feldstärken eine Verformung der einzelnen Zellen (Elongation der Zellkörper), die eine irreversible Schädigung nach sich zieht. Nach TRAWINSKI (1985), der Feldstärken von 40 - 660 V/cm untersuchte, soll die Zerstörung der Zellen im Wechselfeld bereits bei Feldstärken über 220 V/cm beginnen, was aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden kann. Unterhalb von 40 V/cm wurde von TRAWINSKI keine DE beobachtet. Die in der Literatur angegebenen Werten liegen meist beträchtlich über 220 V/cm, im Mittel um 400 V/cm. Der Minimumwert von 90 V/cm wurde von OHNISHI et al. (1987) angegeben, der Maximalwert von 1,2 kV/cm stammt von KARSTEN et al. (1985) sowie von PAQUE und MILLER (1989).

Unsere Experimente zur Wichtung dieses Parameters lassen eher darauf schließen, daß die Fusionsfrequenzen kaum Abhängigkeit von der Feldstärke des Wechselfeldes innerhalb eines Bereiches von etwa 300 bis 800 V/cm zeigen. Oberhalb von 800 V/cm geht die FF_a jedoch deutlich zurück, bedingt durch Zellschädigung während der DE (s. Abb. 14).

Die Bedeutung des Parameters Impulsdauer wurde innerhalb der Spanne 0,7 - 15 μ s (d.c., Rechteckimpuls) untersucht. Dabei zeigte sich, daß offenbar in diesem Bereich die Dauer des Impulses eher eine untergeordnete Rolle spielt. Das stimmt mit den Aussagen von GLASER et al. (1989a) überein, die innerhalb des Be-

reiches von 3 bis 30 μs kein scharfes Optimum für Impulslänge und -stärke fanden, allerdings für bestimmte Kombinationen Impulsdauer : Feldstärke sehr hohe Fusionsfrequenzen (z.B. 4 μs und 2,2 bis 7 kV/cm). In unseren Fusionsexperimenten wurden sehr hohe, d.h. über den Durchschnittswerten von 3,74 und 1,48 für die $FF_{a/My}$ bzw. $FF_{a/Mi}$ liegende Fusionsfrequenzen sowohl mit Impulsen von 3, 5, 8 bzw. 10 μs Dauer erzielt (Fusionen Nr. 48 und Nr.66). Die Literaturangaben zu diesem Parameter schwanken zwischen 5 μs (KARSTEN et al. 1985) und 100 μs (BLANCHER et al. 1991), liegen aber in der Regel bei 10 bis 20 μs . Eine Ausnahme hierzu stellt der Wert von 600 μs für den Fusionsimpuls bei TAKAHASHI et al. (1990) dar, dabei ist zu berücksichtigen, daß es sich hierbei um einen a.c. Impuls ($f = 10$ kHz; $E = 12$ kV/cm) ohne vorhergehende DE handelt.

HEWISH und WERKMEISTER (1989) setzten statt des üblichen Rechteckimpulses einen Impuls mit exponentiellem Abfallen der Feldstärke ein. Die von ihnen ausgetesteten Werte von 10 bis 50 μs Impulsdauer korrelierten nicht mit der Vitalität der so behandelten NS-1 Myelomzellen.

Nach TRAWINSKI (1985) verursachen Impulslängen oberhalb von 60 μs verstärkt Zelltod infolge irreversibler Membranschädigungen (irreversibles elektrisches Breakdown). Im Gegensatz hierzu fanden BLANCHER et al. (1991) das Optimum hinsichtlich der Hybridomaausbeute bei einer Parameterkombination von 100 μs Dauer, 1,5 kV/cm Feldstärke, 5 Rechteckimpulse. Eine Reduzierung der Impulsdauer auf 50, 20 oder 10 μs führte nach Angaben dieser Autoren zu einem deutlichen Rückgang der Fusionsfrequenz.

Gleiche Wertigkeit wie die Pulsdauer besitzt auch die Feldstärke des Impulses, die ebenfalls einen Kompromiß zwischen dem gewünschten Effekt auf die Membraneigenschaften (reversibles elektrisches Breakdown) einerseits und einer möglichst geringen Beeinflussung der Zellvitalität andererseits darstellt.

Hierbei besteht nach unseren Ergebnissen eine negative Korrelation zwischen Feldstärke und FF_a (s.Abb. 17), zumindest für den untersuchten Bereich von 4,2 kV/cm bis 10 kV/cm. Die höchsten Fusionsfrequenzen wurden bei Feldstärken von 4,2 kV/cm ermittelt. Auch der Großteil der Werte aus der Literatur liegt im Bereich von etwa 4 kV/cm. Extremwerte sind 7,7 kV/cm (PRATT et al. 1987) bzw. 0,5 kV/cm (BLANCHER et al. 1991).

TRAWINSKI (1985) stellte fest, daß bei Impulsen > 5 kV/cm zwar

bis zu 30 % der Zellen physisch fusionieren, aber auch bis zu 70 % der Zellen zerstört werden und z.T. sehr große Fusionsprodukte aus mehreren Zellen bestehende Fusionsprodukte entstehen, die nicht lebensfähig sind.

In den Versuchen von STENGER et al. (1988) zeigte sich eine Abhängigkeit des Optimalwertes für die Feldstärke vom verwendeten Fusionsmedium: Wurden die Konzentrationen der zweiwertigen Ionen im Fusionsmedium (Ca^{++} , Mg^{++}) auf ein Fünftel reduziert, verschob sich das Optimum von 3,2 kV/cm auf 2,2 bis 2,8 kV/cm.

GLASER et al. (1989b) schätzten für das Maussystem mit X63-Ag8.653-Zellen eine Feldstärke von 3,3 kV/cm (bei Impulszeiten von 3-30 μs) als am effektivsten ein, während SCHMITT et al. (1989) bei Elektrofusionen mit SP2/0-Ag14 die höchsten Fusionsfrequenzen bei 2 kV/cm erzielten. Möglicherweise variieren auch die Membraneigenschaften der einzelnen Myelomzelllinien, so daß sich hier Unterschiede für die einzelnen elektrischen Parameter ergeben können. Dagegen steht, daß die von STENGER et al. (1988) ermittelte optimale Feldstärke sowohl für P3-X63Ag8.653 als auch für SP2/0-Ag14 - Zellen zutreffend ist. Die Parameter für die elektrische Feldstärke müssen verändert werden, wenn hypoosmolares Fusionsmedium verwendet wird. Der vergrößerte Zellradius bewirkt, daß Impulse mit niedriger Stärke den gleichen Effekt haben wie Impulse höherer Feldstärke in isoosmolarem Milieu (SCHMITT und ZIMMERMANN 1989).

Neben Dauer und Feldstärke steht als dritte kritische Größe des Gleichstromimpulses die Anzahl (ein- oder mehrmalige Applikation). Die diesbezüglichen Ergebnisse (s. Abb. 18) belegen, daß bei den verwendeten Impulsen (4-5 kV/cm; 3-8 μs) eine Wiederholung des Pulses eher eine negative Wirkung hat, d.h. daß der Anteil der durch den Fusionsimpuls geschädigten Zellen steigt und damit die FF_a sinkt. In allen Versuchen, in denen parallel 1x bzw. mehrfach (2-5x) gepulst wurde, war stets die Teilfusion am erfolgreichsten, bei welcher nur 1 Impuls appliziert wurde.

Vergleichende Untersuchungen zum Einfluß der Impulsanzahl liegen u.a. von TRAWINSKI (1985) vor. Danach fusionieren bei Applikation von nur 1 oder 2 Impulsen 1-3 % der Zellen (primäre Fusionsfrequenz), während nach 3maligem Applizieren bereits 5-10 % der Zellen fusionieren. Mehr als 3 aufeinanderfolgende d.c. Impulse führten zur Zellzerstörung ($E = 4,5 \text{ kV/cm}$; $t = 10 \mu\text{s}$).

Hingegen sind die Fusionsfrequenzen bei ZIMMERMANN et al. (1990)

nach 3maliger Pulsapplikation (mit 1 s Intervall) etwas niedriger als nach nur einem Impuls (im System Maus x Maus/Mensch - Heterohybridom).

HEWISH und WERKMEISTER (1989) stellten eine eindeutige negative Korrelation zwischen der Anzahl der Impulse und der Zellvitalität der Myelomzellen (P3-NS1-Ag4-1) fest, unabhängig von der Feldstärke ("exponential decay" Impulse mit $E = 250$ bis 1000 kV/cm). BLANCHER et al. (1990) untersuchten bezüglich der Impulsanzahl nur 5maliges bzw. 10maliges Applizieren mit jeweils 1 s Intervall. Dabei war ersteres deutlich erfolgreicher, bei Impulswerten von $E=1,5$ kV/cm und $t=100$ μ s.

Wie die Versuche zur Maßstabsverkleinerung mit der Plattenkammer belegen, können problemlos Volumina bis herab zu 5 μ l Zellsuspension - unter Beibehaltung der Dichte von 1×10^5 Zellen/ μ l - verarbeitet werden, ohne daß es zu einem signifikanten Abfall in der Fusionsfrequenz kommt (Abb.19). Die Limitierung erfolgt hier durch den Umstand, daß nach Einfüllen von weniger als 5 μ l keine Flüssigkeitsbrücke zwischen den Elektroden mehr ausgebildet wird (für eine Distanz von $0,5$ mm). Eine weitere Reduzierung wäre evtl. mit dem Einsatz eines Spacers geringerer Dicke denkbar.

Die Reduktion der Zellzahl durch Verringerung des Suspensionsvolumens in der Plattenkammer wurde ausgenutzt, um FACS-präselektierte (Ag-positive) Milzzellen mit Myelomzellen zu fusionieren. Hierbei wurde eine Zellmenge von $1,5 \times 10^5$ Milzzellen und 3×10^5 Myelomzellen eingesetzt.

Versuche mit der Objektträgerkammer zeigen ebenfalls, daß das scaling-down in der Elektrofusion nicht mit einem Abfall in der Fusions-effizienz einhergeht. Obwohl der Kammertyp erheblich von der Plattenversion abweicht (inhomogene Feldbedingungen!), liegen die damit erzielten Fusionsfrequenzen in denselben Größenordnungen wie jene, die mit der Plattenkammer erzielt wurden bzw. liegen noch über diesen (s. Abb. 20).

Die Zelldichte mußte jedoch für diese Versuche um den Faktor 10 reduziert werden, um eine gute mikroskopische Beobachtbarkeit zu gewährleisten.

Aufgrund einiger Nachteile (Sterilitätsprobleme, Verluste beim Bergen der Zellen) wurde der Typ der Objektträger-Fusionskammer jedoch nicht in größerem Maßstab bei den nachfolgenden Fusionen mit reduzierter Zellzahl eingesetzt.

Die Fusionsexperimente mit der Mäanderkammer nach KATENKAMP waren zwar insofern erfolgreich, daß im Mikroskop Zellfusionen stattfanden, aber andererseits resultierten aus diesen Versuchen keine Klone. Aufgrund der ungünstigen Kammergeometrie (zu geringe Elektrodenschichtdicke in Relation zum Zellradius) mußten relativ hohe Feldstärken eingesetzt werden, damit es zur Membranfusion an den Kontaktstellen der dielektrophoretisch gesammelten Zellen kam (s.Tab.9). Daraus folgten wahrscheinlich in größerem Ausmaß irreversible Membranschädigungen. Zu umgehen wäre dieser negative Effekt durch Veränderungen in der Gestaltung der Kammer durch Einarbeiten von Vertiefungen zwischen den Elektrodenkämmen in den Ausmaßen des Zellradius, um die Zellen optimal im elektrischen Feld zu positionieren.

Über erfolgreiche Hybridisierungen mit Hilfe von Fusionskammern vom Mäandertyp berichteten bisher nur FÖRSTER und EMEIS (1985) mit Hefeprotoplasten sowie KATENKAMP et al. (1989) mit Protoplasten des Pilzes *Trichoderma reesei*. In der Literatur zur Elektrofusion von lymphoiden Zellen wurde die Verwendung der Mäanderkammer noch nicht beschrieben. Hier dominiert neben dem Typ der Plattenkammer (KARSTEN et al. 1985, ABEL et al. 1986, MANGOLDT et al. 1987, FORTIER et al. 1988, SEIDEL und FIEBIG 1989b, KATENKAMP et al. 1989, VAN DUIJN et al 1989, BLANCHER et al. 1991) die Helixkammer nach SCHNETTLER et al. (1984). Sie wurde mit Erfolg von VIENKEN und ZIMMERMANN (1985), TSONEVA et al. (1988), FOUNG und PERKINS (1989), SCHMITT et al. (1989a), TALBOT und HALLÉE (1989), ZIMMERMANN et al. (1990) sowie von FOUNG et al. (1990) zur Herstellung sowohl muriner als auch humaner Hybridome eingesetzt. Daneben haben noch die BTX-Kammer in Koaxial-Bauart (GLASSY und HOFFMANN 1985, PRATT et al. 1987, PAQUE und MILLER 1989) sowie die Objektträgerkammer mit parallel gespannten Platindrähten (BISCHOFF et al. 1982, GRAVEKAMP et al. 1985) eine gewisse Bedeutung erlangt. Etwas von den üblichen Typen abweichende Kammerkonstruktionen sind die auf einer modifizierten Feinmeßschraube beruhende Kammer nach GLASER et al. (1989a, 1989b) und die Fusionskammer nach TAKAHASHI et al. (1990), bei welcher eine Kombination von Plattenelektrode und abgerundeter Stabelektrode vorliegt (inhomogene Feldbedingungen).

Optimierung innerhalb des Prozesses Hybridomtechnik orientiert nicht nur auf eine hohe absolute, sondern vor allem auf eine hohe spezifische Fusionsfrequenz. Um diese zu erhöhen, sind prinzi-

piell zwei Wege gangbar. Der erste verläuft über eine Effektivierung der Immunisierung, d.h. der Anteil Ag-positiver B-Zellen innerhalb der Gesamtmilz Zellpopulation wird dadurch erhöht, daß es zu einer verstärkten klonalen Expansion in den lymphoiden Organen kommt. Diese Art der Effektivierung kann z.B. über eine gezielte Hyperimmunisierung, über adoptiven Transfer von Milzzellen (FOX et al. 1984) oder über neue Applikationstechniken (z.B. intralial, SPITZ et al. 1984) erreicht werden.

Der zweite Weg setzt zeitlich später, nach der Immunisierung, an und beruht auf einer Anreicherung der Ag-reaktiven Zellen durch verschiedene Manipulationen vor der Zellfusion.

Zur zweiten Variante gehört die rezeptorvermittelte Elektrofusion nach LO et al. (1984), die von mehreren Autoren eingesetzt und auch variiert wurde. In der Originalversion werden die Myelomzellen Biotin-markiert und die Milzzellen mit einem Antigen-Avidin-Konjugat inkubiert. Anschließend werden die Fusionspartner zusammen inkubiert und ohne DE durch elektrische d.c. Impulse fusioniert. Die damit erreichte FF_s betrug 100 %. Diese Ag-spezifische Zytoadhärenz und Fusion ließ sich auch im PEG-System nachweisen (REASON et al. 1987) sowie mit der Methode der Laser-Fusion (WIEGAND et al. 1987). Auch in einer neueren Arbeit (TOMITA und TSONG 1990), in welcher mit dieser Avidin-Biotin-Technik verfahren wurde, bestätigte sich die Erhöhung des Anteils von Ag-positiven Hybridomen.

Die hier vorliegenden Ergebnisse belegen eine deutliche Steigerung der FF_s um mehr als das Dreifache, erreichen jedoch nicht den Maximalwert von 100 % (Abb.21B). Das läßt sich einmal durch unspezifische Bindungen des IgD-Avidin-Konjugates auch an andere, nicht Ag-positive B-Lymphozyten erklären, zum anderen ist in Betracht zu ziehen, daß es auch zu Spontanfusionen im Zellgemisch kommen kann bzw. daß auch während der kurzen Zeitspanne von 1 s, innerhalb derer die HF angelegt wurde, schon vereinzelt zur DE kommen kann. In deren Folge werden dann auch solche Zellen fusioniert, die nicht vorher immunchemisch gekoppelt wurden.

In der zweiten Version, der Avidin-Biotin-Brückentechnik nach WOJCHOWSKI und SYTKOWSKI (1986), ist der chemische Konjugationsschritt ersetzt worden durch die vorhergehende Biotinylierung des Antigens. Das spezifische Adhären der beiden Zelltypen wird dann durch die Bindung von Streptavidin an sowohl die biotinylierte Myelomzelle als auch an das biotinylierte Antigen realisiert, welches wiederum an das Oberflächen-Ig des spezifischen

Lymphozyten bindet. Die mittels dieser Modifikation erzielte FF_S lag ebenfalls bei 100 %.

Im Unterschied dazu konnte aus den hier vorgelegten Ergebnissen nicht auf eine Erhöhung der FF_S unter Anwendung dieser Methode geschlossen werden, sondern es kam zu einer geringfügigen Verringerung. Obwohl die Biotinmarkierung sowohl der Myelomzellen als auch des Antigens erfolgreich nachgewiesen werden konnte, kam es offenbar nicht zu einer bevorzugten Fusion der Ag-positiven Milzzellen. Der Grund dafür ist unklar, liegt aber möglicherweise darin, daß durch die Modifikation des Antigens mit Biotin auch IgE-spezifische Epitope so verändert wurden, daß sie nicht mehr von den IgE-spezifischen Lymphozyten erkannt werden konnten.

Bereits von den beschriebenen Avidin-Biotin-Methoden zur Ag-spezifischen Kopplung waren es BANKERT et al. (1980) sowie KRANZ et al. (1980), die Versuche zur Ag-spezifischen Zellfusion vornahmen. Ersteren gelang es, das entsprechende Ag bzw. Hapten in die Membran der Myelomzellen einzubauen, ohne daß deren Vitalität beeinflußt wurde. Nach Koinkubation dieser Zellen und Milzlymphozyten einer mit dem entsprechenden Ag (Dextran bzw. Phthalat-KLH) immunisierten Maus konnten (ohne PEG oder andere Fusogene!) Hybridome gewonnen werden. Dabei lag die FF_S um den Faktor 3,1 bis 4,6 höher als bei den Vergleichsfusionen mit PEG. KRANZ et al. (1980) beschreiben einen ähnlichen Fusionsansatz: FITC-markierte Myelomzellen wurden mit Milzzellen von Mäusen, die mit FITC-KLH immunisiert worden waren, koinkubiert und anschließend nach Standardvorschrift mittels PEG fusioniert. Der Anteil FITC-positiver Klone stieg gegenüber Kontroll-PEG-Fusionen um das 2,5fache. BLANCHER et al. (1991), die im Prinzip das gleiche Modell nutzten (FITC-markierte Myelomzellen und mit FITC-BSA immunisierte Maus-Milzzellen), aber mit elektrischen Feldimpulsen statt mit PEG fusionierten, stellten hingegen keinen Effekt auf die FF_S fest (46 % positive Klone beim Immunotargeting, 45 % bei den Fusionen ohne Haptenisierung der Myelomzellen).

Eine modifizierte Variante der Rezeptor-vermittelten Elektrofusion mit Lektinen stellen FORTIER et al. (1988) vor. Das von ihnen verwendete Ag, Mannoproteine aus *Candida albicans*, besitzt genauso wie die SP2/0-Ag14 Myelomzellen Bindungsstellen für Con A. In Vorbereitung der Ag-spezifischen Fusion wurden die Myelomzellen in Con A und die Milzzellen des immunisierten Tieres in

der entsprechenden Ag-Lösung inkubiert. Nach dem Vermischen der beiden Zellsuspensionen bildeten sich, vermittelt durch Con A, Zellpaare zwischen SP2/0 und denjenigen Lymphozyten aus, die das Ag gebunden hatten. Die spezifische Fusionsfrequenz lag nur bei 24 %, was darauf hindeutet, daß durch das Lektin auch ohne Vermittlung des Antigens Myelomzell-Milzzell-Paare entstanden sind.

BARALD und WESSELS (1984) fraktionierten Milzzellen von mit Neuronen aus dem Ciliarganglion immunisierten Mäusen auf der Grundlage ihrer Adhäsivität gegenüber einer Kultur der zur Immunisierung verwendeten Zellen. Nach PEG-Fusion der einzelnen Milzzellpopulationen ergab sich, daß die Teilfusionen mit den am stärksten adhärierenden (nur mit Trypsin wieder ablösbaren) Lymphozyten die höchste FF_S und diejenigen mit nicht adhärierenden Lymphozyten die mit Abstand niedrigste FF_S aufwiesen.

Im Gegensatz zu den bisher angeführten Methoden zur Präselektierung von Milzzellen stellen OSSENDORP et al. (1989) eine "postfusion" - Methode zur Anreicherung von Ag-spezifischen Hybridomzellen vor. Dabei wurden die Zellen nach der (PEG-)Fusion nicht ausplattiert, sondern in HAT-Medium in eine 75 cm² - Flasche ausgesät. Aus diesem Zellpool wurden anschließend mit Hilfe von Ag-beschichteten magnetischen Beads (Dynal) diejenigen Zellen separiert, die Ag-positiv waren. Dabei gelang den Autoren eine 300fache Anreicherung von antigenspezifischen Zellen. Prinzipiell wäre diese Methode auch als ein Präselektionsschritt einsetzbar, um eine fast 100%ig Ag-positive Lymphozytenpopulation für die Zellfusion zur Verfügung zu haben.

In diese Denkrichtung ordnen sich auch die hier vorgestellten Ergebnisse von Elektrofusionen mit FACS-sortierten Milzzellen ein (3.5.4.), wobei das Modell insofern etwas vereinfacht wurde, als daß das Ag selbst (R-PE) aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften nach seiner Bindung an Ag-positive Milzzellen detektiert werden konnte und nicht erst (fluoreszenz-)markiert werden mußte.

Die Tatsache, daß nicht alle auf diese Art hergestellten Klone an R-PE banden, läßt sich einmal damit begründen, daß die gewählten Sortierbedingungen bezüglich der Rotfluoreszenz keine 100%ig reine Zellpopulation ergeben konnten, sondern diese sicher auch nichtfluoreszierende B-Lymphozyten enthielt. Zum anderen können auch infolge frühzeitiger Chromosomensegregation Klone die Fähigkeit zur AK-Synthese bzw. -Sekretion verloren haben, was dann

insgesamt die FF_s reduziert. Die ermittelte Steigerung der FF_s um den Faktor 8,1 gegenüber einer Kontrollfusion ohne Präselektion beweist jedoch die prinzipielle Eignung der FACS-Sortierung zur Effektivierung der Hybridomtechnik, vor allem in Verbindung mit der durch die Elektrofusion ermöglichten Maßstabsverkleinerung im Fusionsansatz. Prinzipiell ist dieser Ansatz auch auf nicht primär fluoreszierende Antigene ausdehnbar, z.B. durch deren FITC-Markierung.

Die aus diesen Experimenten hervorgegangenen mAK BL-PE/20 und BL-PE/34 waren einerseits in Form von PE-anti-PE-Komplexen in Analogie zur PAP-Technik nach STERNBERGER (1974) zur Markierung und Doppelmarkierung von Humanleukozyten mittels muriner Erstantikörper, in ähnlicher Art und Weise wie von GUY et al. (1988) und WOGNUM et al. (1987) beschrieben, geeignet. Andererseits konnten die entsprechenden Hybridomzellen, da diese selbst R-PE banden, aufgrund ihrer Rotfluoreszenz leicht detektiert werden, was sich in weiteren Fusionsexperimenten zur Herstellung von Hybrid-Hybridomen als sehr vorteilhaft erwies (s. 3.6.).

Die Herstellung solcher Hybrid-Hybridome war Inhalt einer Reihe von Fusionsexperimenten, die die Möglichkeiten der Elektrofusion auch auf diesem Gebiet sondieren sollten. Selektionsstrategie war die Sortierung der doppeltfluoreszierenden Zellhybride nach der Fusion, basierend auf der Komplementierung von Fluoreszenzeigenschaften der markierten Parentalzelllinien (Doppelfluoreszenz nach KARAWAJEW et al. 1987, KARAWAJEW et al. 1988, KOOLWIJK et al. 1988, SHI et al. 1991).

Der eigentliche Vorteil des Versuchsansatzes besteht darin, daß einerseits die Markierung des Fusionspartner Anti-R-PE sehr einfach durch die Inkubation der Zellen in einer R-PE-Lösung realisierbar ist, andererseits die resultierenden bispezifischen AK auf die gleiche Art und Weise R-PE-markiert werden können, ohne daß eine kovalente Bindung notwendig ist. Der zweite Fusionspartner (Hybridom mit Spezifität gegen Lymphozyten-Membran-Ag) konnte ebenfalls relativ einfach FITC-markiert werden, entweder in einer Zweischnitt-Technik nach Biotinylierung der Membranproteine und nachfolgender Inkubation in Avidin-HRP, oder in einer Einschnitt-Technik mit ZAM-FITC (Markierung des Membran-Ig der Hybridomzellen).

Als besonders günstig erwies sich auch, daß bereits die ungereinigten Zellkulturüberstände der Hybrid-Hybridome die Doppelspezi-

fität aufweisen und für entsprechende Fluoreszenzmarkierungsversuche geeignet sind. Offenbar reicht der Anteil der "echten" Hybridmoleküle, der nur einen geringen Anteil neben den anderen, durch Leicht-/Schwerkettenkombinationen beider Spezifitäten entstandenen Molekülen aus, um im Test auf Bispezifität (Zelloberflächen-Ag / Tetratom-Überstand / R-PE-Lösung) nachgewiesen zu werden. In der Regel müssen die bispezifischen AK erst aus der Mischpopulation isoliert werden.

Wie die Abbn. 26 und 27 zeigen, lassen sich insbesondere die bispezifischen mAK BL-T.B2 und BL-T.D6 (Anti-IgM x Anti-R-PE) in Kombination mit direkt FITC-markierten T-Zell-Ak gut für Doppelmarkierung humaner PBL einsetzen, während der mAK T.D11 (Anti-CD8 x Anti-R-PE) diesbezüglich weniger geeignet ist. Möglicherweise ist hier der Anteil echter bispezifischer AK im Zellkulturüberstand zu gering und die inhibitorische Wirkung der monospezifischen mAK, die aufgrund ihrer Bivalenz eine höhere Affinität zum CD8-Epitop haben, tritt stärker in Erscheinung als bei den erstgenannten Hybrid-Antikörpern.

Neben der traditionellen Anwendung bispezifischer mAK in der Immunhistochemie (MILSTEIN und CUELLO 1983, SURESH et al. 1986, KENIGSBERG et al. 1990) und beim Aufbau von Enzymimmunoassays (KARAWAJEW et al. 1987, TAKAHASHI und FULLER 1988, GÖRÖG et al. 1989, KARAWAJEW et al. 1988, DE LAU et al. 1989, TADA et al. 1989) treten in letzter Zeit auch andere Anwendungsgebiete in der medizinischen Grundlagenforschung in den Vordergrund. Die Begünstigung der Fibrinolyse durch AK mit der Doppelspezifität für Fibrin und Plasminogenaktivatoren (KUROKAWA et al. 1990), das Targeting von T-Zell-Effektormechanismen gegenüber Tumorzellen vermittelt bispezifischer AK mit Bindungsstellen für T-Zell-Antigene und Tumor-assoziierte Epitope (STAERZ und BEVAN 1986, MÖLLER und REISFELD 1991, GARCIA DE PALAZZO et al. 1990, VAN DIJK et al. 1991, DEMANET et al. 1991) und die T-Zell-Aktivierung über einen Hybrid-AK (anti-CD3 x anti MHC class I) in Abwesenheit eines zweiten Signals (ROOSNEK et al. 1990) stehen dafür als Beispiele. Klinische Bedeutung könnten u.a. auch solche bispezifischen AK gewinnen, die im Sinne von Immuntoxinen neben der Spezifität für ein Tumor-assoziiertes Ag Pharmaka wie Methotrexat (PIMM et al. 1990), Vinblastin (SMITH et al. 1990), die A-Kette des Ricin-Toxins (EMBLETON et al. 1991) oder ein radioaktiv markiertes

Chelat (BOSSLET et al. 1991) binden können. Einen gentechnisch hergestellten bispezifischen mAK (Transfektom-AK) mit Bindungsstellen für CD3 einerseits und das HIV-Ag gp120 andererseits (variable Region ersetzt durch CD4-Sequenzen), der die effektive Lyse der infizierten Zellen durch CD8-Lymphozyten vermittelt, stellten BERG et al. (1991) vor.

Die hier vorgestellten Tetradome mit Doppelspezifität für R-PE und Lymphozytenmembran-Ag sind in zweierlei Hinsicht von Interesse. Erstens gibt es bislang keine Angaben in der Literatur darüber, daß Hybrid-Hybridome auf dem Wege der Elektrofusion hergestellt worden sind. Zweitens wurde mit den vorgestellten AK die Möglichkeit gegeben, mittels immunologischer Kopplung des Fluorochroms unter Umgehung der chemischen Konjugation bestimmte Lymphozytenmembran-Ag mit R-PE zu detektieren und u.a. auch Doppelmarkierung von Zellpopulationen zu realisieren.

Für das Humansystem ist in vielen Fällen die Elektrofusion die Methode der Wahl, da hier bei Einsatz nur sehr geringer Zellzahlen sehr hohe Fusionsfrequenzen erforderlich sind. Z.B. erreichten FOUNG et al. (unter hypoosmotischen Bedingungen) eine Fusionsfrequenz von 5×10^{-3} , d.h. die Fusion von nur 1000 EBV-transformierten B-Zellen ergab 5 vitale Human-Hybridome. Der Anteil der Ag-positiven Lymphozyten innerhalb der PBL wird meist relativ niedrig liegen, so daß erst Anreicherungsschritte über den FACS oder die Magnetbead-Technik vorgeschaltet werden müssen. Diese Separationen, wie auch die In-vitro-Immunisierung als Alternative resultieren aber letztlich, verglichen mit der Lymphozytenpopulation der Mausmilz, in kleinen verfügbaren Zellmengen. Diese müssen dann sehr effektiv weiterverarbeitet werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Elektrofusionsmethode für die Hybridomtechnik eine wesentliche methodische Bereicherung darstellt. In einigen Anwendungsbereichen wie der Fusion kleiner, präselektierter Zellpopulationen, ist sie die Methode der Wahl. Darüber hinaus liegen ihre Vorteile im Vergleich mit der PEG-vermittelten Zellfusion in den unter optimalen Bedingungen höheren Fusionsfrequenzen sowie - aufgrund der Unabhängigkeit von bestimmten Chargen chemischer Substanzen - in ihrer besseren Standardisierbarkeit und Zuverlässigkeit.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Möglichkeiten der durch elektrische Feldimpulse vermittelten Zellfusion für die methodische Optimierung und Erweiterung der Hybridomtechnik zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden parallel Fusionsexperimente mit der herkömmlichen, PEG-vermittelten Hybridisierungsmethode durchgeführt und bezüglich der Fusionsfrequenzen ausgewertet. Damit sollte die Effizienz der Elektrofusion im Vergleich zur PEG-Fusion bestimmt werden. Die Versuche zur Elektrofusion wurden in einzelne Teilfusionen aufgeteilt, in welchen einige als wesentlich erachtete Parameter gezielt variiert wurden. Die Analyse der dadurch erzielten Effekte sollte eine Aussage über die Wertigkeit der einzelnen Parameter ermöglichen und damit zu einem Fusionsprotokoll, welches für die Herstellung muriner monoklonaler Antikörper optimale Vorgaben enthält, führen. Weiterhin sollte eine Maßstabsverkleinerung des Systems erreicht werden, um in weiterführenden Versuchen mit geringen Zellzahlen arbeiten zu können. Zu diesem Zweck wurden auch prinzipiell unterschiedlich aufgebaute Elektrodenkammern in die Versuchsreihen aufgenommen. Um nicht nur die absolute Fusionsrate zu erhöhen, sondern auch die spezifische, wurden zwei Strategien verfolgt. Die erste bestand in der rezeptorvermittelten Elektrofusion in Kombination mit der Avidin-Biotin-Technik, die zweite in der Präselektion der Antigen-positiven Lymphozyten aus der Milzzellpopulation mit Hilfe der automatischen Zytofluorimetrie. In Weiterführung dieser Experimente war auch der Einsatz der fluoreszenzaktivierten Zellsortierung nach der Elektrofusion von Hybridomzellen verschiedenen Spezifitäten (Hybrid-Hybridome) vorgesehen, wobei eine Valenz der bispezifischen Antikörper ein fluoreszierendes Antigen (R-Phycoerythrin) binden sollte. Die sich daraus ableitenden Möglichkeiten der Detektion von Zellmembran-Antigenen als Alternative zu den Verfahren mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten sollten in Markierungs- bzw. Doppelmarkierungsexperimenten aufgezeigt und eingeschätzt werden.

In Auswertung der Fusionsexperimente erwies sich die absolute Fusionsfrequenz bei den Elektrofusionen um den Faktor 5,76 (be-

zogen auf Anzahl eingesetzter Myelomzellen) bzw. um den Faktor 13,58 (bezogen auf Anzahl eingesetzter Milzzellen) höher als bei den vergleichbaren PEG-Fusionen.

Die lineare Korrelation (signifikant bei $p = 0,05$) zwischen den Fusionsfrequenzen der jeweils parallel durchgeführten PEG- und Elektrofusionen weist darauf hin, daß für den Erfolg beider Methoden ein oder mehrere gemeinsame Parameter entscheidend sind.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese limitierenden Größen entweder in den allgemeinen Zellkulturbedingungen (u.a. bestimmt durch Art des Kulturmediums, Wasser, FKS-Charge, Feederzelllayer) und/oder in der Qualität der zur Fusion eingesetzten Zellen liegen. Dabei ist letztere mit unseren Methoden (Trypanblau-Vitalitätstest, mikroskopische Bestimmung des Blastenanteils) nicht erfaßbar gewesen. Hingegen ist eine Beeinflussung der absoluten Fusionsfrequenz durch die Faktoren Zellkulturmedium und Feederzellen deutlich nachweisbar. Bei Verwendung von kryokonservierten Milzzellen für die Elektrofusion ist durch eine Anreicherung der lebenden mononukleären Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation eine Verbesserung zu erreichen.

Keinen oder einen nur unbedeutenden Effekt auf die Fusionsfrequenz (gemessen als Anzahl der Hybridome pro Anzahl eingesetzter Zellen) haben das numerische Verhältnis der Fusionspartner und die proteolytische Vorbehandlung der Myelomzellen.

Die Parameter der Elektrofusion selbst, i.e.S. die des angelegten Wechselfeldes zum Erreichen der Dielektrophorese und des applizierten Gleichstromimpulses für das reversible elektrische Breakdown sind in ihrer Bedeutung für den Fusionserfolg differenziert zu betrachten. Für die Frequenz des Wechselfeldes wurde ein Optimum von 2 MHz festgestellt. Die Zeitdauer des Anlegens der Dielektrophoresespannung ist innerhalb des Bereiches von 5 - 20 s nicht kritisch, es besteht aber mit der Verlängerung der Zeiten ein Trend zur negativen Korrelation mit der absoluten Fusionsfrequenz. Feldstärken größer als 800 V/cm für das Wechselfeld bewirken einen deutlichen Rückgang der Fusionsfrequenz.

Für den Gleichstromimpuls ist der Wert der Zeitdauer im untersuchten Meßbereich von 0,7 bis 15 μ s keine die absolute Fusionsfrequenz determinierende Größe. Hingegen wurde für die Feldstärke

des Impulses eine signifikante negative Korrelation ($p=0,05$) zur Fusionsfrequenz innerhalb der untersuchten Werte von 4,2 bis 10 kV/cm festgestellt. Die ein- oder mehrmalige Wiederholung der Pulsapplikation führte zu keiner Verbesserung der Fusions-effizienz, sondern im Gegenteil zu einer geringfügigen Reduzierung, die wahrscheinlich die Folge von Temperaturerhöhung im System mit nachfolgender Zellzerstörung ist.

Sowohl eine Reduzierung des Suspensionsvolumen unter Nutzung der Standard-Plattenkammer bei konstanter Zelldichte, als auch die Nutzung eines anderen Kammertyps (Objektträger-Kammer) erlaubten eine Maßstabsreduzierung bis zu einer Gesamtzellzahl von 5×10^{-5} bzw. bis zu 1×10^{-5} . Damit ist die erfolgreiche Fusion von relativ geringen Zellzahlen, etwa nach FACS-Sortierung und ähnlichen Präselektionsschritten möglich, was besonders im Hinblick auf Human-Hybridome wesentlich ist.

Elektrofusionen mit der Mäanderkammer waren insofern erfolglos, als daß aus den Fusionsprodukten keine vitalen Hybridome aufwachsen; die noch nicht ausgereifte Konstruktion der Kammergeometrie führte wahrscheinlich zu einer nicht ausreichenden primären Fusionsfrequenz.

Die Versuche zur Erhöhung der spezifischen Fusionsfrequenz durch antigenspezifische Zytoadhärenz und nachfolgende Elektrofusion waren in einem Fall (mit einem Ag-Avidin-Konjugat) erfolgreich: Der Anteil Ag-spezifischer Klone war um das mehr als 3fache erhöht. In den Experimenten unter Nutzung der Avidin-Biotin-Brückentechnik konnte hingegen keine erhöhte Rate an "positiven" Klonen festgestellt werden.

FACS-sortierte Milzzellen einer immunisierten Maus, die das fluoreszierende Antigen R-Phycoerythrin (R-PE) gebunden hatten, wurden mittels Elektrofusion im kleinen Maßstab mit P3-X63Ag8.653-Myelomzellen fusioniert. Der Anteil der Ag-bindenden Hybridome an der Gesamtzahl der entstandenen Klone betrug 59,1 %. In Relation zur Kontrollfusion mit nicht-sortierten Milzzellen lag damit die spezifische Fusionsfrequenz um mehr als das 8fache höher. Diese Methode könnte in dieser (etwa unter Anwendung FITC-markierter Antigene) oder in abgewandelter Form (z.B. bei Nutzung der

Magnetbead-Technik) zu einer realen Effektivierung der Hybridomtechnik beitragen.

Das aus dieser antigenspezifischen Fusion hervorgegangene, für das Fluorochrom R-PE spezifische Hybridom H-BL-PE/34 wurde mit anderen Hybridomen elektrofusioniert, die Spezifitäten für humane Lymphozyten-Membranantigene besaßen. Für die Selektion der bispezifische monoklonale Antikörper produzierenden Hybridhybridome wurde die Doppelfluoreszenz der Fusionsprodukte ausgenutzt, nachdem die Fusionspartner mit R-PE bzw. FITC-markiertem Anti-Maus-Immunglobulin markiert worden waren.

Zwei Hybrid-Hybridome mit einer Doppelspezifität gegen R-PE und humanes IgM sowie ein Hybrid-Hybridom mit Doppelspezifität gegen R-PE und das humane CD8-Antigen konnten etabliert werden. Dabei konnte die Bispezifität der Antikörper schon im Zellkulturüberstand ohne Abtrennung der anderen Antikörpervarianten nachgewiesen werden. Diese bispezifischen Antikörper konnten erfolgreich für Doppelfluoreszenz-Experimente in Kombination mit direkt FITC-markierten Antikörpern gegen das zweite nachzuweisende Membranantigen eingesetzt werden. Sie stellen somit eine günstige Alternative zu direkt PE-markierten Antikörpern dar.

Die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit sind gleichsam Argumente für den verstärkten Einsatz der elektrisch vermittelten Zellfusion für die Herstellung monoklonaler Antikörper. Höhere absolute Fusionsfrequenz, Standardisierbarkeit zumindest der elektrischen Fusionsparameter, die Möglichkeit der Fusionierung kleinerer Zellmengen, der favorisierte Einsatz bei Antigen-spezifischen Fusionen und nicht zuletzt die unmittelbare mikroskopische Kontrolle des Fusionsprozesses sind die Vorteile der Elektrofusion, die deren Bedeutung für die Hybridomtechnik belegen.

6. LITERATUR

- ABEL, H., STOLLEY, P., DREYER, G., WALTHER, I. and JUNGE, C. :
Hybridoma cells produced by electrofusion in a homogeneous electric field.
Acta Biotechnol. 6 (1986) 287-291.
- ABEL, H., STOLLEY, P., DREYER, G., WALTHER, I., SEIDEL, B., HANDSCHACK, W., SCHWARZ, K., PLATZER, C., GRÖBEL, C., KARSTEN, U. and MICHEEL, B.: Hybridoma technique by means of electrofusion - a concise experience report.
studia biophysica 119 (1987) 67-68.
- ABEL, H., STOLLEY, P., DREYER, G., WALTHER, I., HANDSCHACK, W., SCHWARZ, K., PLATZER, C., GRÖBEL, C., KARSTEN, B., MICHEEL, B. and SEIDEL, B.: Hybridoma production by means of electrofusion - an experimental report.
Bioelectrochem. Bioenerg. 19 (1988) 173-177.
- ABRAMS, P.G., KNOST, J.A., CLARKE, G., WILBURN, S. , OLDHAM, R.K. and FOON, K.A. : Determination of the optimal human cell lines for development of human hybridomas.
J. Immunol. 131 (1983) 1201-1204.
- AGUILA, H.L., POLLOCK, R.R., SPIRA, G. and SCHARFF, M.D. : The production of more useful monoclonal antibodies. 2. The use of somatic cell genetic and recombinant DNA technology to tailor-make monoclonal antibodies.
Immunol. Today 7 (1986) 380-383.
- ARNOLD, K., HERRMANN, A., GAWRISCH, K. and PRATSCH, L. : Mechanisms of PEG-induced fusion.
studia biophysica 110 (1985) 135-141.

- ARNOLD, K., HERRMANN, A., GAWRISCH, K. and PRATSCH, L. : Water-mediated effects of PEG on membrane properties and fusion. In: Molecular mechanisms of membrane fusion. Eds. OHKI, S., DOYLE, D., FLANAGAN, T.D., HUI, S.W. and MAYHEW, E., New York: Plenum Publishing Company 1988.
- ARNOLD, W.M. and ZIMMERMANN, U. : Rotating-field-induced rotation and measurement of the membrane capacitance of single mesophyll cells of *Avena sativa*. *Z. Nat.forsch.* 37C (1982) 908-915.
- BANKERT, R.B., DESSOYE, D. and POWERS, L. : Antigen-promoted cell fusion: antigen-coated myeloma cells fuse with antigen-reactive spleen cells. *Transplant. Proc.* 12 (1980) 443-446.
- BARALD, K.F. and WESSELS, N.K. : Differential antigen adhesivity used to select spleen cells for the production of monoclonal antibodies to embryonic neurons. *J. Immunol. Meth.* 73 (1984) 1-15.
- BAZIN, R. and LEMIEUX, R. : Increased proportion of B cell hybridomas secreting monoclonal antibodies of desired specificity in cultures containing macrophage-derived hybridoma growth factor. *J. Immunol. Meth.* 116 (1989) 245-249.
- BERG, D., SCHUMANN, I. and STELZNER, A. : Electrically stimulated fusion between myeloma cells and spleen cells. *studia biophysica* 94 (1983) 101-102.
- BERG, H. : Fusion of blastomeres and blastocysts of mouse embryos. *Bioelectrochem. Bioenerget.* 9 (1982) 223-228.

- BERG, J., LÖTSCHER, E., STEIMER, K.S., CAPON, D.J., BAENZIGER, J., JÄCK, H.-M. and WABL, M. : Bispecific antibodies that mediate killing of cells infected with human immunodeficiency virus of any strain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 4723-4727.
- BERTSCHE, U., MADER, A. and ZIMMERMANN, U. : Nuclear membrane fusion in electrofused mammalian cells.
Biochim. Biophys. Acta 939 (1988) 509-522.
- BESSLER, W., SUHR, S., BÜHRING, H.J., MULLER, C.P., WIESMÜLLER, K.H., BECKER, G. and JUNG, G.: Specific antibodies elicited by antigen covalently linked to a synthetic adjuvant.
Immunobiology 170 (1985) 239-244.
- BISCHOFF, R., EISERT, R.M., SCHEDEL, I., VIENKEN, J. and ZIMMERMANN, U. : Human hybridoma cells produced by electro-fusion.
FEBS Lett. 147 (1982) 64-68.
- BLANCHER, A., CALVAS, P., CONTE, P. and TEISSIE, J. : Electric field-induced hybridomas - targeting by immunological and physical methods.
Bioelectrochem. Bioenerget. 25 (1991) 295-306.
- BOSSLET, K., STEINSTRÄESSER, A., HERMENTIN, P., KUHLMANN, L., BRUYNCK, A., MAGERSTAEDT, M., SEEMANN, G., SCHWARZ, A. and SEDLACEK, H.H. : Generation of bispecific monoclonal antibodies for two phase radioimmunotherapy.
Br. J. Cancer 63 (1991) 681-686.
- BOULIANNE, G.L., HOZUMI, N. and SHULMAN, M.J.. : Production of functional chimaeric mouse/human antibody.
Nature 312 (1984) 643-646.

- BROWN, S.M., AHKONG, Q.F., SAGE, A.D. and LUCY, J.A. : Electrically induced cell fusion in the production of monoclonal antibodies.
Biochem. Soc. Trans. 14 (1986) 297-298.
- CAPPARELLI, R., DEL SORBO, G. and IANNELLI, D. : Goat-mouse hybridomas secreting goat immunoglobulins.
Hybridoma 9 (1990) 149-155.
- CARLSSON, J., DREVIN, H. and AXEN, R. : Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation.
Biochem. J. 173 (1978) 723-737.
- CIANFRIGLIA, M., NUTI, M., TURCHI, V., BARCA, S., TOMBESI, M., MORRONE, S., CENCIARELLI, C. and NATALI, P.G. : High frequency production of hybridomas secreting antibodies to cell antigens.
Hybridoma 6 (1987) 673-677.
- DE LAU, W.B.M., HEIJE, K., NEEFJES, J.J., OOSTERWEGEL, M., ROZEMULLER, E. and BAST, B.J.E.G. : Absence of preferential homologous H/L chain association in hybrid hybridomas.
J. Immunol. 146 (1991) 906-914.
- DE LAU, W.B.M., VAN LOON, A.E., HEIJE, K., VALERIO, D. and BAST, B.J.E.G. : Production of hybrid hybridomas based on HAT^S-neomycin^r double mutants.
J. Immunol. Meth. 117 (1989) 1-8.
- DEMANET, C., BRISSINK, J., VAN MECHELEN, M., LEO, O. and THIELEMANS, K. : Treatment of murine B cell lymphoma with bispecific monoclonal antibodies (anti-idiotypic x anti-CD3).
J. Immunol. 147 (1991) 1091-1097.

- EDWARDS, P.H.W., SMITH, C.M., NEVILLE, A.M. and O'HARE, M.J. : A human-human hybridoma system based on the fast growing mutant of the ARH-77 plasma cell leukemia-derived line.
Eur. J. Immunol. 12 (1982) 641-648.
- EMBLETON, M.J., CHARLESTON, A., ROBINS, R.A., PIMM, M.V. and BALDWIN, R.W. : Recombinant ricin toxin A chain cytotoxicity against carcinoembryonic antigen expressing tumour cells mediated by a bispecific monoclonal antibody and its potentiation by ricin toxin B chain.
Br. J. Cancer 63 (1991) 670-674.
- FIEBIG, H. : Herstellung monoklonaler Antikörper durch Zellfusion (Hybridomtechnik).
In: Immunologische Arbeitsmethoden. Hrsg. FRIEMEL, H., Jena: Gustav Fischer Verlag 1984, S.36-47.
- FÖRSTER, E. and EMEIS, C.C. : Quantitative studies on the viability of yeast protoplasts following dielectrophoresis.
FEMS Microbiol. Lett. 26 (1985) 65-69.
- FORTIER, B., HOPWOOD, V. and POULAIN, D. : Electric and chemical fusions for the production of monoclonal antibodies reacting with the in-vivo growth phase of *Candida albicans*.
J. Med. Microbiol. 27 (1988) 239-245.
- FOUNG, S.K.H. and PERKINS, S. : Electric field-induced cell fusion and human monoclonal antibodies.
J. Immunol. Meth. 116 (1989) 117-122.
- FOUNG, S.K.H., PERKINS, S., KAFADAR, K., GESSNER, P. and ZIMMERMANN, U. : Development of microfusion techniques to generate human hybridomas.
J. Immunol. Meth. 134 (1990) 35-42.

- FOX, P.C., BERENSTEIN, E.H. and SIRAGANIAN, R.S. : Enhancing the frequency of antigen-specific hybridomas.
Eur. J. Immunol. 11 (1984) 431-433.
- GALFRE, G., HOWE, S.C., MILSTEIN, C., BUTCHER, G.W. and HOWARD, J.C. : Antibodies to major histocompatibility complex antigens produced by hybrid cell lines.
Nature 266 (1977) 550-552.
- GARCIA DE PALAZZO, I., GERCEL-TAYLOR, C., KITSON, J. and WEINER, L.M. : Potentiation of tumor lysis by a bispecific antibody that binds to CA19-9 and the Fc gamma receptor expressed by human large granular lymphocytes.
Cancer Res. 50 (1990) 7123-7128.
- GEFTER, M.L., MARGULIES, D.H. and SCHARFF, M.D. : A simple method for polyethyleneglycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells.
Somatic Cell Genet. 3 (1977) 231-236.
- GLASER, R.W., JAHN, S. and GRUNOW, R. : Electrofusion of human B-cell hybridomas. Influence of some physical and chemical factors on hybridoma yield.
studia biophysica 130 (1989a) 201-204.
- GLASER, R.W., JAHN, S. and GRUNOW, R. : Development of specific human mab's by a small scale electrofusion technique: the influence of some physical and chemical factors on hybridoma yield of human peripheral blood lymphocytes x CB-F7 fusions.
Allergie Immunol. 35 (1989b) 123-132.
- GLASSY, M.C., HANDLEY, H.H., HAGIWARA, H.H. and ROYSTON, I.: UC 729-6, a human lymphoblastoid B-cell line useful for generating antibody secreting human-human hybridomas.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 (1983) 6327-6331.

GLASSY, M. : Creating hybridomas by electrofusion.

Nature 333 (1988) 579-580.

GLASSY, M.C. and HOFMANN, G.A. : Optimization of electro-cell fusion parameters in generating human-human hybrids with UC 729-6.

Hybridoma 4 (1985) 63.

GÖRÖG, G., GANDOLFI, A., PARADISI, G., ROLLERI, E., KLASSEN, E., DESSI, V., STROM, R. and CELADA, F. : Use of bispecific hybrid antibodies for the development of a homogeneous enzyme immunoassay.

J. Immunol. Meth. 123 (1989) 131-140.

GRATECOS, D., ASTIER, M. and SEMERIVA, M. : A new approach to monoclonal antibody production. In vitro immunization with antigens on nitrocellulose using Drosophila myosin heavy chain as an example.

J. Immunol. Meth. 104 (1987) 169-178.

GRAVEKAMP, C., BOL, S.J.L., HAGEMEIJER, A. and Bolhuis R.L. : Production of human T-cell hybridomas by electrofusion.

In: Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies. Eds. ENGELMAN, E.G., FOUNG, S.K. and LARRICK, J., (1985) S.323-339.

GRAVEKAMP, C., SANTOLI, D., VREUGDENHIL, R., COLLARD, J.G. and BOLHUIS, R.L.H. : Efforts to produce human cytotoxic T-cell hybridomas by electrofusion and PEG fusion.

Hybridoma 6 (1987) 121-133.

GRIMM, H. und RECKNAGEL, R.-D.: Grundkurs Biostatistik.

1.Aufl. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag 1985. S.100-102.

GROVES, D.J., MORRIS, B.A., TAN, K., DE SILVA, M. and CLAYTON, J.: Production of an ovine monoclonal antibody to testosterone by an interspecies fusion.

Hybridoma 6 (1987) 71-76.

- GRUNOW, R., JAHN, S., PORSTMANN, T., KIESSIG, S.S., STEINKELLNER, H., STEINDL, F., MATTANOVICH, D., GÜRTLER, L., DEINHARDT, F., KATINGER, H. and VON BAEHR, R.: The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7.
J. Immunol. Meth. 106 (1988) 257-265.
- GUY, K., CHRICHTON, D.N. and ROSS, J.A. : Indirect immunofluorescence labelling with complexes of phycoerythrin and monoclonal anti-phycoerythrin-antibodies (PEAPE complexes).
J. Immunol. Meth. 112 (1988) 261-266.
- HEWISH D.R. and WERKMEISTER, J.A. : The use of an electroporation apparatus for the production of murine hybridomas.
J. Immunol. Meth. 120 (1989) 285-289.
- IGARASHI, M. and BANDO, Y. : Enhanced efficiency of cell hybridization by neuraminidase treatment.
J. Immunol. Meth. 135 (1990) 91-93.
- JACOB, H.-E., FÖRSTER, W., WEBER, H. and BERG, H. : Electric field effects on single cells.
V. International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics Weimar, September 3-9, 1979, Poster F7, Abstractband S.121.
- JOHNSON, R.T. and RAO, P.N. : Mammalian cell fusion: Induction of PCC in interphase nuclei.
Nature 226 (1970) 717-722.
- JONAK, Z. and KENNETT, R. : Immortality by transfection.
Immunol. Today 4 (1983) 58.
- KAO, K.M. and MICHAYLUK, M.R. : A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts.
Planta 115 (1974) 355-367.

- KARAWAJEW, L., MICHEEL, B., BEHSING, O. and GAESTEL, M. : Bi-specific antibody-producing hybrid hybridomas selected by a fluorescence activated cell sorter.
J. Immunol. Meth. 96 (1987) 265-270.
- KARAWAJEW, L., BEHSING, O., KAISER, G. and MICHEEL, B. : Production and ELISA application of bispecific monoclonal antibodies against fluorescein isothiocyanate (FITC) and horseradish peroxidase (HRP).
J. Immunol. Meth. 111 (1988) 95-99.
- KARSTEN, U. and RUDOLPH, M. : Monoclonal antibodies against tumour-associated antigens: mycoplasma as a major technical obstacle and its possible circumvention by azaserine selection medium.
Arch. Geschwulstforsch. 55 (1985) 305-310.
- KARSTEN, U., PAPSDORF, G., ROLOFF, G., STOLLEY, P., ABEL, H., WALTHER, I. and WEISS, H. : Monoclonal anti-cytokeratin antibody from a hybridoma clone generated by electrofusion.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 21 (1985) 733-740.
- KARSTEN, U., STOLLEY, P., WALTHER, I., PAPSDORF, G., WEBER, S., CONRAD, K., PASTERNAK, L. and KOPP, J. : Direct comparison of electric field-mediated and PEG-mediated cell fusion for the generation of antibody producing hybridomas.
Hybridoma 7 (1988) 627-633.
- KATENKAMP, U., JACOB, H.-E., KERNS, G. and DALCHOW, E. : Hybridization of *Trichoderma reesei* protoplasts by electrofusion.
Bioelectrochem. Bioenerget. 22 (1989) 57-68.
- KATENKAMP, U., SCHUMANN, I. and WOLF I. : Contributions to the use of electrofusion for generation of hybridoma cells.
studia biophysica 130 (1989) 205-210.

- KEARNEY, J.F., RADBRUCH, A., LIESEGANG, B. and RAJEWSKY, K. : A mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybridoma cell lines.
J. Immunol. 123 (1979) 1548-1558.
- KENIGSBERG, R.L., SEMENENKO, F.M. and CUELLO, A.C. : Development of a bi-specific monoclonal antibody for simultaneous detection of rabbit IgG and horseradish peroxidase: Use as a general reagent in immunocytochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay.
J. Histochem. Cytochem. 38 (1990) 191-198.
- KNUTTON, S. and PASTERNAK, C.A.: The mechanism of cell-cell fusion
Trends Biol. Sci. 4 (1979) 220-223.
- KÖHLER, G. and MILSTEIN, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity.
Nature 256 (1975), 495-497.
- KÖHLER, G., HOWE, C.S. and MILSTEIN, C. : Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines.
Eur. J. Immunol. 6 (1976) 292-303.
- KOOLWIJK, P., ROZEMULLER, E., STAD, R.K., DE LAU, W.B.M. and BAST, B.J.E.G. : Enrichment and selection of hybrid hybridomas by percoll density gradient centrifugation and fluorescent-activated cell sorting.
Hybridoma 7 (1988) 217-225.
- KOVAR, J. : Growth-stimulating effect of ferric citrate on hybridoma cells: characterization and relation to transferrin function.
Hybridoma 7 (1988) 255-263.

- KOZBOR, D., LAGARDE, A.E. and RODER, J.C. : Human hybridomas constructed with antigen-specific EBV-transformed lines.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 6651-6655.
- KRAMER, I., VIENKEN, K., VIENKEN, J. and ZIMMERMANN, U.:
Magneto-electrofusion of human erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 772 (1984) 407-410.
- KRANZ, D.M., BILLING, P.A., HERRON, J.N. and VOSS, E.W. : Modified hybridoma methodology: antigen-directed chemically mediated cell fusion.
Immunol. Commun. 9 (1980) 639-651.
- KRAUS, G., LADUSCH, M. und STRACHE, R.-R. : Einfache Präparation von R-Phycoerythrin aus der Rotalge *Ceramium rubrum* (Huds. 1762).
Allergie Immunol. 33 (1987) 117-120.
- KUBIAK, J.Z. and TARKOWSKI, A.K. : Electrofusion of mouse blastomeres.
Exp. Cell Res. 157 (1985) 561-566.
- KUPPER, H., BEHN, I. und FIEBIG, H. : Einsatz monoklonaler Antikörper in der Immunhistologie.
Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-nat.wiss. Reihe 33 (1984) 677-681.
- KUROKAWA, T., IWASA, S. and KAKINUMA, A. : Enhancement of fibrinolysis by bispecific monoclonal antibodies reactive to fibrin and plasminogen activators.
Thromb. Res. Suppl. X (1990) 83-89.
- LANE, R.D., RENNO, W., NEPOMUCENO, V., SCHAFFER, C. and MELLGREN, R.L. : The influence of stimulated peritoneal feeder cells and mitogens upon antibody secreting hybridomas.
Hybridoma 7 (1988) 289-299.

- LANG, K. : Mycoplasmen und Zellkulturen.
Biol. unserer Zeit 15 (1985) 52-61.
- LEE, M.L., HUARD, T.K. and PALSSON, B.O. : Effect of serum concentration on hybridoma cell growth and monoclonal antibody production at various initial cell densities.
Hybridoma 8 (1989) 369-375.
- LIESEGANG, B., RADBRUCH, A. and RAJEWSKY, K. : Isolation of myeloma variants with predefined variant surface immunoglobulin by cell sorting.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (1978) 3901-3905.
- LITTLEFIELD, J.W. : Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants.
Science 145 (1964) 709-710.
- LO, M.M.S., TSONG, T.Y., CONRAD, M.K., STRITTMATTER, S.M., HESTER, L.D. and SNYDER, S.H. : Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion.
Nature 310 (1984) 792-794.
- LONG, W.J., PALOMBO, A., SCHOFIELD, T.L. and EMINI, E.A. : Effects of culture media on murine hybridomas: definition of optimal conditions for hybridoma viability, cellular proliferation, and antibody production.
Hybridoma 7 (1988) 69-77.
- MANGOLDT, D., SCHUMANN, I. and STELZNER, A. : Hybridome production by electrofusion.
Allergie Immunol. 33 (1987) 63-64.
- MARUSICH, M.F. : Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes.
J. Immunol. Meth. 114 (1988) 155-159.

- MENG, Y.G. and TRAWINSKI, J. : Identification of mouse J chain in human IgM produced by an electrofusion-derived mouse-human heterohybridoma.
J. Immunol. 141 (1988) 2684-2687.
- MICHEEL, B., JANTSCHKEFF, P., BÖTTGER, V., SCHARTE, G., KAISER, G., STOLLEY, P. and KARAWAJEW L. : The production and radio-immunoassay application of monoclonal antibodies to fluorescein isothiocyanate (FITC).
J. Immunol. Meth. 111 (1988) 89-94.
- MILSTEIN, C. and CUELLO, A.C. : Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry.
Nature 305 (1983) 537-540.
- MIYAHARA, M., NAKAMURA, H. and HAMAGUCHI, Y. : Colcemid treatment of myeloma prior to cell fusion increases the yield of hybridomas between myeloma and splenocyte.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 124 (1984) 903-908.
- MÖLLER, S.A. and REISFELD, R.A. : Bispecific-monoclonal-antibody-directed lysis of ovarian carcinoma cells by activated human T lymphocytes.
Cancer Immunol. Immunother. 33 (1991) 210-216.
- MÜLLER, C.E. and RAJEWSKI, K. : Isolation of immunoglobulin class switch variants from hybridoma lines secreting anti-idiotypic antibodies by sequential sublining.
J. Immunol. 131 (1983) 877-881.
- NAGATA, S., YAMAMOTO, K., UENO, Y., KURATA, T. and CHIBA, J. : Production of monoclonal antibodies by the use of pH-dependent vesicular stomatitis virus-mediated cell fusion.
Hybridoma 10 (1991a) 317-322.

- NAGATA, S., YAMAMOTO, K., UENO, Y., KURATA, T. and CHIBA, J. :
Preferential generation of monoclonal IgG-producing hybridomas
by use of vesicular stomatitis virus-mediated cell fusion.
Hybridoma 10 (1991b) 369-378.
- NEUMANN, E., SCHAEFER-RIDDER, M., WANG, Y. and HOFSCHEIDER, P.H.:
Gene transfer into mouse myeloma cells by electroporation in
high electric fields.
EMBO J. 1 (1982) 841-845.
- NORDAN, R.P. and POTTER, M. : A macrophage-derived factor re-
quired by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro.
Science 233 (1986) 566-569.
- ÖSTBERG, L. and PURSCH, E. : Human x (mouse x human) hybridomas
stably producing human antibodies.
Hybridoma 2 (1983) 361-367.
- OHNISHI, K., CHIBA, J., GOTO, Y. and TOKUNAGA, T. : Improvement
in the basic technology of electrofusion for generation of
antibody-producing hybridomas.
J. Immunol. Meth. 100 (1987) 181-189.
- OHNO-SHOSAKU, T. and OKADA, Y. : Role of proteases in electro-
fusion of mammalian cells.
In: Electroporation and Electrofusion in Cell Biology. Eds.
NEUMANN, E., SOWERS, A.E. and JORDAN, C.A., New York: Plenum
Publishing Corporation 1989, S.193-202.
- OHNO-SHOSAKU, T. and OKADA, Y. : Facilitation of electrofusion
of mouse lymphoma cells by the proteolytic action of proteases.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 120 (1984) 138-143.
- OSSENDORP, F.A., BRUNING, P.F., VAN DEN BRINK, J.A.M. and DE
BOER, M. : Efficient selection of high affinity B cell hybri-
domas using antigen-coated magnetic beads.
J. Immunol. Meth. 120 (1989) 191-200.

- PALMER, D.K. and JONES, C. : Production of chinese hamster monoclonal antibody to a human cell-surface antigen using a hamster-human somatic cell hybrid as antigen.
Hybridoma 5 (1986) 249-253.
- PAQUE, R.E. and MILLER, R.M. : Monoclonal anti-idiotypic antibodies regulate the expression of virus-induced murine myocarditis.
Infect. Immun. 57 (1989) 2864-2871.
- PETERS J.H. : Zellfusion zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern der Maus.
In: Monoklonale Antikörper. Herstellung und Charakterisierung. Hrsg. PETERS, J.H. und BAUMGARTEN, H., Berlin Heidelberg New York: Springer Verlag 1990, S.150-157.
- PIMM, M.V., ROBINS, R.A., EMBLETON, M.J., JACOBS, E., MARKHAM, A.J., CHARLESTON, A. and BALDWIN, R.W. : A bispecific monoclonal antibody against methotrexate and a human tumour associated antigen augments cytotoxicity of methotrexate-carrier conjugate.
Br. J. Cancer 61 (1990) 508-513.
- POHL, H.A. and CRANE, J.S. : Dielectrophoresis of cells.
Biophys. J. 11 (1971) 711-727.
- PRATT, M., MIKHALEV, A. and GLASSY, M.C. : The generation of Ig-secreting UC 729-6 derived human hybridomas by electrofusion.
Hybridoma 6 (1987) 469-477.
- RAYBOLDT, T.J.G., CRONCH, C.F., MCDUGALL, C.J. and WATTS, T.C. : Bovine-murine hybridoma that secretes bovine monoclonal antibodies of defined specificity.
Am. J. Vet. Res. 46 (1985a) 426-427.

- RAYBOULDT, T.J.G., WILLSON, P.J., MCDUGALL, C.J. and WATTS, T.C.:
A porcine-murine hybridoma that secretes porcine monoclonal
antibodies of defined specificity.
Am. J. Vet. Res. 46 (1985b) 1768-1769.
- REASON, D., CARMINATI, J., KIMURA, J. and HENRY, C. : Directed
fusion in hybridoma production.
J. Immunol. Meth. 99 (1987) 253-257.
- ROOSNEK, E., TUNNAcliffe, A. and LANZAVECCHIA, A. : T cell acti-
vation by a bispecific anti-CD3/anti-major histocompatibility
complex class I antibody.
Eur. J. Immunol. 20 (1990) 1393-1396.
- ROSEN, A., GERGALY, P., JONDAL, M., KLEIN, G. and BRITTON, S. :
Polyclonal Ig production after Epstein-Barr virus infection of
human lymphocytes in vitro.
Nature 267 (1977) 52-54.
- RÜKER, F., LIEGL, W., MATTANOVICH, D., REITER, S., HIMMLER, G.,
JUNGBAUER, A. and KATINGER, H. : Electroporative gene trans-
fer (electrotransfection): a method for strain improvement of
animal cells.
Bioelectrochem. Bioenerget. 17 (1987) 253-257.
- SAMOILOVICH, S.R., DUGAN, C.B. and MACARIO, A.J.L. : Hybridoma
technology: new developments of practical interest.
J. Immunol. Meth. 101 (1987) 153-170.
- SANCHEZ-MADRID, F., SZKLET, P. and SPRINGER, T.A. : Stable
hamster-mouse hybridomas producing IgG and IgM hamster mono-
clonal antibodies of defined specificity.
J. Immunol. 130 (1983) 309-312.
- SCHMITT J.J. and ZIMMERMANN, U. : Enhanced hybridoma production
by electrofusion in strongly hypo-osmolar solutions.
Biochim. Biophys. Acta 983 (1989) 42-50.

- SCHMITT, J.J., ZIMMERMANN, U. and GESSNER P. : Electrofusion of osmotically treated cells. High and reproducible yields of hybridoma cells.
Naturwissenschaften 76 (1989a) 122-123.
- SCHMITT, J.J., ZIMMERMANN, U. and NEIL G.A. : Efficient generation of stable antibody forming hybridoma cells by electrofusion.
Hybridoma 8 (1989b) 107-115.
- SCHNETTLER, R., ZIMMERMANN, U. and EMEIS, C.C. : Large-scale production of yeast hybrids by electrofusion.
FEMS Microbiol. Lett. 24 (1984) 81-85.
- SEIDEL, B. und FIEBIG, H. : Die Elektrofusion - eine effektive Methode in der Hybridomtechnik.
Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-nat.wiss. Reihe 38 (1989a) 241-249.
- SEIDEL, B. and FIEBIG, H. : Electrofusion as a tool in hybridoma technique - comparison with the PEG - technique.
studia biophysica 130 (1989b) 197-200.
- SEIFERT, M. : Untersuchungen zur Herstellung und Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Differenzierungsantigene humaner B-Lymphozyten.
Dissertation A an der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig, 1989.
- SENDA, M., TAKEDA, J., ABE, S. and NAKAMURA, T. : Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation.
Plant Cell Physiol. 20 (1979) 1441-1443.
- SHI, T., EATON, A.M. and RING, D.B. : Selection of hybrid hybridomas by flow cytometry using a new combination of fluorescent vital stains.
J. Immunol. Meth. 141 (1991) 165-175.

- SHIVAROVA, N., GRIGOROVA, R., FÖRSTER, W., JACOB, H.-E. and BERG, H.:
Fusion of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by high electric
field pulses.
Bioelectrochem. Bioenerget. 11 (1983) 181-185.
- SHULMAN, M., WILDE, C.B. and KÖHLER, G. : A better line for
making hybridomas secreting specific antibodies.
Nature 267 (1978) 269-271.
- SMITH, W., GORE, V.A., BRANDON, D.R., LYNCH, D.N., CRANSTONE,
S.A. and CORVALAN, J.R.F. : Suppression of well-established
tumour xenografts by a hybrid-hybrid monoclonal antibody and
vinblastine.
Cancer Immunol. Immunother. 31 (1990) 157-163.
- SPITZ, M., SPITZ, L., THORPE, R. and EUGUI, E. : Intrasplenic
primary immunization for the production of monoclonal anti-
bodies.
J. Immunol. Meth. 70 (1984) 39-43.
- STÄHLI, C., STAEHELIN, T., MIGGIANO, V., SCHMIDT, J. and HÄRING,
P.: High frequencies of antigen-specific hybridomas: depen-
dence on immunization parameters and prediction by spleen cell
analysis.
J. Immunol. Meth. 32 (1980) 297-304.
- STAERZ, U.D. and BEVAN, M.J. : Hybrid-hybridoma producing a
bispecific monoclonal antibody that can focus effector T-cell
activity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 1453-1457.
- STENGER, D.A., KUBINIEC, R.T., PURUCKER, W.J., LIANG, H. and HUI,
S.W. : Optimization of electrofusion parameters for efficient
production of murine hybridomas.
Hybridoma 7 (1988) 505-518.

STERNBERGER, L.A. : Immuncytochemistry.

In: Foundation of immunology series. Eds. OSLER, A. and WEISS, L., New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs 1974.

STEWART, S.S. and FULLER, S.A. : Enhancement of hybridoma production by medium supplemented with murine ascitic fluid.

J. Immunol. Meth. 123 (1989) 45-53.

STOPPER, H., ZIMMERMANN, U. and NEIL, G.A. : Increased efficiency of transfection of murine hybridoma cells with DNA by electroporation.

J. Immunol. Meth. 109 (1988) 145-151.

SURESH, M.R., CUELLO, A.C. and MILSTEIN, C. : Advantages of bispecific hybridomas in one-step immunocytochemistry and immunoassays.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7989-7993.

SUZUKI, M., TAMIYA, E., MATSUOKA, H., SUGI, M. and KARUBE, I. : Electrical stimulation of hybridoma cells producing monoclonal antibodies to cAMP.

Biochim. Biophys. Acta 889 (1986) 149-155.

TADA, H., TOYODA, Y. and IWASA, S. : Bispecific antibody-producing hybridoma and its use in one-step immunoassays for human lymphotoxin.

Hybridoma 8 (1989) 73-83.

TAKAHASHI, M. and FULLER, S.A. : Production of murine hybridomas secreting bispecific monoclonal antibodies for use in urease-based immunoassays.

Clin. Chem. 34 (1988) 1693-1696.

TAKAHASHI, Y., SUZUKI, K., NIIMURA, T., KANO, T. and TAKASHIMA, S. : A production of monoclonal antibodies by a simple electrofusion technique induced by AC pulses.

Biotechnol. Bioeng. 37 (1991) 790-794.

- TALBOT B.G. and HALLEE, J. : Anti-idiotypic response to selected neutralizing monoclonal antibodies generated against adenovirus type 2 fiber.
Intervirology 30 (1989) 313-322.
- TOMITA, M. and TSONG, T.Y. : Selective production of hybridoma cells: antigenic-based pre-selection of B-lymphocytes for electrofusion with myeloma cells.
Biochim. Biophys. Acta 1055 (1990) 199-206.
- TRAWINSKI, J. : Fusion lymphoider Zellen mit Hilfe elektrischer Felder.
Dissertation A an der Fakultät für Theoretische Medizin der Universität Ulm, 1985.
- TSONEVA, I., PANOVA, I., DOINOV, P., DIMITROV, D.S. and STRAHILOV, D. : Hybridoma production by electrofusion: monoclonal antibodies against the Hc antigens of Salmonella.
studia biophysica 125 (1988) 31-35.
- TYPLT, H. : Experimente zur Produktion monoklonaler Antikörper gegen Antigenstrukturen humaner Mammakarzinomzellen.
Dissertation A an der Sektion Biowissenschaften der Karl-Marx-Universität Leipzig, 1986.
- VAN DIJK, J., ZEGVELD, S.T., FLEUREN, G.J. and WARNAAR, S.O. : Localization of monoclonal antibody G250 and bispecific monoclonal antibody CD3/G250 in human renal-cell carcinoma xenografts: relative effects of size and affinity.
Int. J. Cancer 48 (1991) 738-743.
- VAN DUIJN, G., LANGEDIJK, J.P.M., DE BOER, M. and TAGER J.M. : High yields of specific hybridomas obtained by electrofusion of murine lymphocytes immunized in vivo or in vitro.
Exp. Cell Res. 184 (1989) 463-472.

- VAN MEEL, F.C.M., STEENBAKKERS, P.G.A. and OOMEN, J.C.H. : Human and chimpanzee monoclonal antibodies.
J. Immunol. Meth. 80 (1985) 267-276.
- VERSCHOOR, J.A., BOSHOFF, C.H., COETZEE, L., VAN WYNGAARDT, S. and VISSER, L. : Spontaneous fusion between splenocytes and myeloma cells induced by bacterial immunization.
Hybridoma 9 (1990) 511-518.
- VIENKEN, J. and ZIMMERMANN, U. : Electric field-induced fusion: electro-hydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high yield.
FEBS Lett. 137 (1982) 11-13.
- VIENKEN, J. and ZIMMERMANN, U. : An improved electrofusion technique for production of mouse hybridoma cells.
FEBS Lett. 182 (1985) 278-280.
- VIENKEN, J., ZIMMERMANN, U., ZENNER, H.P., COAKLEY, W.T. and GOULD, R.K. : Electro-acoustic fusion of erythrocytes and of myeloma cells.
Biochim. Biophys. Acta 820 (1985) 259-264.
- WEBER, E. : Grundriß der biologischen Statistik.
9.Aufl. Jena: Gustav Fischer Verlag 1986, S.184-190.
- WEBER, H., FÖRSTER, W., BERG, H. and JACOB, H.-E. : Parasexual hybridisation of yeasts by electric field stimulated fusion of protoplasts.
Curr. Genet. 4 (1981) 165-168.
- WIEGAND-STEUBING, R., CHENG, S., WRIGHT, W.H., NUMAJIRI, Y. and BERNS, M.W. : Laser induced cell fusion in combination with optical tweezers: the laser cell fusion trap.
Cytometry 12 (1991) 505-510.

- WIEGAND, R., WEBER, G., ZIMMERMANN, K., MONAJEMBASHI, S., WOLFRUM, J. and GREULICH, K.-O. : Laser-induced fusion of mammalian cells and plant protoplasts.
J. Cell Sci. 88 (1987) 145-149.
- WOGNUM, A.W., THOMAS, T.E. and LANSDORP, D.M. : Use of tetrameric antibody complexes to stain cells for flow cytometry.
Cytometry 8 (1987) 366-371.
- WOJCHOWSKI, D.M. and SYTKOWSKI, A.J. : Hybridoma production by simplified avidin-mediated electrofusion.
J. Immunol. Meth. 90 (1986) 173-177.
- YARMUSH, M.L., GATES III, F.T., WEISFOGEL, D.R. and KINDT, T.J. : Identification and characterization of rabbit-mouse hybridomas secreting rabbit immunoglobulin chains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 2899-2903.
- ZIMMERMANN, U. and PILWAT, G. : The relevance of electric-field induced changes in the membrane structure to basic membrane research of chemical therapeutics and diagnosis.
Sixth International Biophysical Congress Kyoto, September 3-9, 1978; Abstract IV-19(H), S.140.
- ZIMMERMANN, U., GESSNER, P., SCHNETTLER, R., PERKINS, S. and FOUNG, S.K.H. : Efficient hybridization of mouse-human cell lines by means of hypo-osmolar electrofusion.
J. Immunol. Meth. 134 (1990) 43-50.
- ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. and RICHTER, H.-P. : Electric-field-stimulated fusion: increased field stability of cells induced by pronase.
Naturwissenschaften 68 (1981) 577-579.
- ZIMMERMANN, U., PILWAT, G. and RIEMANN, F. : Reversible electric breakdown of cell membranes by electrostatic fields.
Z. Nat.forsch. 29C (1974) 304-305.

7. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

<u>Abbildungen</u>	Seite
Abb. 1: Absolute Fusionsfrequenzen bei parallel durchgeführten PEG- und Elektrofusionen	47
Abb. 2: Korrelation zwischen den Fusionsfrequenzen der parallel durchgeführten Elektro- und PEG-Fusionen	47
Abb. 3: Trends der Fusionsfrequenz FF_a in 11 Elektrofusionsexperimenten, bei deren Teilfusionen das numerische Zellzahlverhältnis variiert wurde.	49
Abb. 4: Absolute Fusionsfrequenzen bei Elektrofusionen, die mit kryokonservierten und aufgetauten Mausmilzzellen durchgeführt wurden	50
Abb. 5: Einfluß von Pronasevorbehandlung der Myelomzellen auf die FF_a	51
Abb. 6: Einfluß der Vitalität der Myelomzellen auf die absolute Fusionsfrequenz bei der Elektrofusion	52
Abb. 7: Einfluß des Blastenanteils an der Milzzellpopulation auf die spezifische Fusionsfrequenz FF_s bei der Elektrofusion	54
Abb. 8: Einfluß des "feeder cell layer" auf die absoluten Fusionsfrequenzen bei Elektrofusion	55
Abb. 9: Absolute Fusionsfrequenzen in parallel durchgeführten Elektrofusionen mit unseparierten bzw. separierten Mausmilzzellen	56
Abb. 10: Absolute Fusionsfrequenzen bei Elektrofusionen nach Ausplattieren in unterschiedlichen Zellkulturmedien	57
Abb. 11: Einfluß verschiedener Fusionsmedien (F_1 , F_2 , F_3) auf die absoluten Fusionsfrequenzen bei Elektrofusion	58
Abb. 12: Einfluß der Frequenz des elektrischen Wechselfeldes auf die absolute Fusionsfrequenz	59
Abb. 13: Trends der Fusionsfrequenz FF_a/M_i in 12 Elektrofusionsexperimenten, bei deren Teilfusionen die Zeitdauer des Anlegens der DE-Spannung variiert wurde	60
Abb. 14: Einfluß der Stärke des elektrischen Wechselfeldes auf die absolute Fusionsfrequenz	61
Abb. 15: Trends der Fusionsfrequenz FF_a/M_i in 12 Elektrofusionsexperimenten, bei deren Teilfusionen die Zeitdauer des Gleichstromimpulses variiert wurde.	61
Abb. 16: Einfluß der Feldstärke des Gleichstromimpulses auf die absolute Fusionsfrequenz	62
Abb. 17: Einfluß der Feldstärke des Gleichstromimpulses auf die FF_a bei Elektrofusion	62

Abb. 18:	Trends der Fusionsfrequenz FF_a/M_i in 5 Elektrofusionsexperimenten, bei denen Teilfusionen mit einfacher oder doppelter Applikation des d.c. Impulses behandelt wurden	63
Abb. 19:	Zellfusionen in der Plattenkammer mit reduzierten Zellzahlen	65
Abb. 20:	Zellfusionen mit der Objektträgerkammer	65
Abb. 21:	Antigenvermittelte Elektrofusion nach LO et al. (1984) mittels Ag-Avidin-Konjugat und biotinylierter Myelomzellen	67
Abb. 22:	FACS-Profil zur Sortierung der Ag-positiven (R-PE bindenden) Milzzellen für Fusion Nr.51	69
Abb. 23:	Absolute und spezifische Fusionsfrequenzen bei Elektrofusion mit FACS-sortierten bzw. unsortierten Mausmilzzellen	70
Abb. 24:	FACS-Profil zur Sortierung der doppeltmarkierten Fusionsprodukte nach Fusion Nr.72	71
Abb. 25:	FACS-Profile der bispezifischen AK BL-T.B2 und BL-T.D6 mit humanen Tonsillenzellen	73
Abb. 26:	Doppelmarkierung von PBL mit BL-T.D6 + R-PE und mit BL-TP 3b, direkt FITC-markiert	73
Abb. 27:	Doppelmarkierung von PBL mit BL-T.D6 + R-PE und mit BL-TH 4, direkt FITC-markiert	74
Abb. 28:	Doppelmarkierung von PBL mit BL-T.D6 + R-PE und mit BL-IgM/11, FITC-markiert	74
Abb. 29:	Fusionsprodukte von murinen Myelom- und Milzzellen etwa 2 bis 3 min nach Applikation des d.c. Impulses	75

Tabellen

Tab.1-3:	Zusammenfassende Darstellung der Fusionsfrequenzen der durchgeführten Elektrofusionen zur Herstellung von murinen Hybridomen (Teil 1-3)	42-44
Tab. 4:	Fusionsfrequenzen der parallel durchgeführten Elektro- und PEG-Fusionen	45
Tab. 5:	Mittelwerte der Quotienten aus den vergleichbaren Fusionsfrequenzen von Elektro- und PEG-vermittelten Fusionen	46
Tab. 6:	Fusionsbedingungen der Teilfusionen mit der Mäanderkammer	66
Tab. 7:	Charakterisierung der drei etablierten Hybrid-Hybridome	72

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Bodo Schmidt

Magdeburg, im Dezember 1991

Herrn Prof. Dr. habil. H. Fiebig danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die zahlreichen die Arbeit an diesem Thema befördernden Diskussionen.

Bei Prof. Dr. sc. Dr. h.c. H. Ambrosius möchte ich mich an dieser Stelle bedanken für die Möglichkeit, die Experimente zu dieser Arbeit im Rahmen eines Delegationungsvertrages in seinem Bereich durchführen zu können sowie für sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeiten.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Bereiches Tierphysiologie und Immunbiologie sowie bei den Kollegen des handwerklich-technischen Bereiches der Sektion, ohne deren Unterstützung in materieller und ideeller Hinsicht wesentliche Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Im besonderen bin ich Frau Dr. Ingrid Behn, Frau Dr. Undine Hommel, Frau Gabriele Baumbach sowie Frau Ute Blank zu Dank für ihre Hilfe in der täglichen Laborpraxis verpflichtet.

Des weiteren danke ich Herrn Dipl.-Biol. M. Ladusch für die Arbeiten am Zellsorter sowie für die anregenden und fruchtbaren Diskussionen.

Nicht zuletzt gilt meine Dank den Kollegen vom Zentralinstitut für Molekularbiologie, insbesondere Prof. H. Abel, Dr. P. Stolley und Dr. U. Karsten, bei denen ich einen Teil der Experimente durchführen konnte und die mir bei der Beschaffung der Gerätetechnik behilflich waren.

Thesen zur Dissertation A

Untersuchungen zum Einsatz der Elektrofusionstechnik für die Herstellung von Lymphozytenhybridomen unter besonderer Berücksichtigung der Methodenoptimierung und -erweiterung

Dem Wissenschaftlichen Rat der Universität Leipzig
eingereicht von

Dipl.-Biol. Bertolt Seidel

angefertigt an der
Universität Leipzig
Sektion Biowissenschaften
Bereich Tierphysiologie und Immunbiologie

Dezember 1991

Die Hybridomtechnik hat in der biomedizinischen Grundlagenforschung weitverbreitete Anwendung gefunden. Neben die traditionellen Anwendungsbereiche für Antikörper in der Diagnostik tritt in zunehmendem Maße die therapeutische Nutzung monoklonaler Antikörper auf dem Gebiet der Immuntherapie von Tumoren und der Immunsuppression nach Organtransplantationen.

Aus der Bedeutung, die die monoklonalen Antikörper in diesem Zusammenhang gewonnen haben, resultiert das Interesse an der Verbesserung und Effektivierung ihrer Herstellung und damit verbundener methodischer Erweiterungen. Das trifft auch auf Entwicklungen zu, welche die Basismethode der Hybridomtechnik, die Fusion von antikörperproduzierenden Zellen mit Zellen einer permanent wachsenden Linie, betreffen. Eine der innovativen Methoden ist die durch elektrische Feldimpulse vermittelte Zellfusion.

Die Versuche, auf denen die vorliegende Dissertation basiert, wurden vor dem Hintergrund eines relativ breiten Meinungsspektrums bezüglich der Parameter, die bei der Elektrofusion lymphoider Zellen als wesentlich bzw. limitierend angesehen werden, und in der Absicht, die methodischen Möglichkeiten der Elektrofusion auszuschöpfen, durchgeführt.

1. Die Technik der elektrisch vermittelten Zellfusion ist eine Alternative zur Herstellung von Lymphozyten-Hybridomen. Diese Hybridome unterscheiden sich von den mittels chemischer oder viraler Fusogene erzeugten Hybridzellklonen prinzipiell nicht. Aufgrund der Tatsache, daß bei der Elektrofusion der toxische Einfluß des Polyethylenglykols eliminiert ist, beginnt die Proliferation bereits zu einem früheren Zeitpunkt.
2. Unter Verwendung des Standardprotokolls für Elektrofusionsexperimente, welches die dielektrophoretische Sammlung der zu hybridisierenden Zellen in einem hochfrequenten elektrischen Wechselfeld, die Applikation eines Gleichstromimpulses bestimmter Spannung und Zeitdauer zum Erreichen des elektrischen Breakdown und eine nachfolgende zweite Zuschaltung der Hochfrequenz umfaßt, lassen sich mit guter Reproduzierbarkeit murine Hybridome erzeugen.
3. In einer Serie von Elektrofusionen ($n = 59$) zur Herstellung von murinen Hybridomen wurde die mittlere absolute Fusionsfrequenz als Ausdruck der entstandenen Hybridzellklone je 10^5 eingesetzter Zellen mit 3,74 bzw. 4,87 (bezogen auf Myelom- bzw. Milzzellen) ermittelt. Maximalwerte waren 16,85 Klone/ 10^5 Myelomzellen und 8,70 Klone/ 10^5 Milzzellen.

4. Parallel durchgeführte Experimente ($n = 33$), in denen gleiches Zellmaterial mit Polyethylenglykol (PEG) bzw. mit elektrischen Feldimpulsen fusioniert wurde, ergaben signifikant höhere absolute Fusionsfrequenzen bei den Elektrofusionen. Der Steigerungsfaktor betrug im Mittel 5,8 unter Zugrundelegung der Anzahl eingesetzter Myelomzellen bzw. 13,6 bezogen auf die Anzahl eingesetzter Milzzellen.
5. Die signifikante Korrelation, die zwischen den Werten für die absolute Fusionsfrequenz bei Elektro- bzw. PEG-Fusion in den Parallelexperimenten festgestellt wurde, weist auf die Abhängigkeit dieser Größe von einem gemeinsamen Systemparameter hin. Dieser ist entweder innerhalb der allgemeinen Zellkulturbedingungen oder in den zur Fusion eingesetzten Zellen beiden Typs zu suchen.
6. Unter den Parametern, die nicht die elektrische Behandlung der Zellsuspension selbst betreffen, haben Qualität des "feeder cell layer" und der Typ des Zellkulturmediums während der Selektion entscheidenden Einfluß auf den Fusionserfolg. Eine der Fusion vorhergehende Separierung der mononukleären Zellen aus der Gesamtmilzzellpopulation beeinflusst hingegen die absolute Fusionsfrequenz nur unwesentlich.
7. Kein Effekt auf die Fusionsfrequenz ist bei Variation peripherer Größen wie dem numerischen Zell-Zell-Verhältnis und bei proteolytischer Vorbehandlung der Zellen feststellbar. Auch für Parameter der Fusionspartner selbst wie die Vitalität der Myelomzellsuspension und der Anteil von Blasten innerhalb der Milzzellpopulation konnte kein direkter Zusammenhang mit der absoluten Fusionsfrequenz nachgewiesen werden.

8. Die Dielektrophorese ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Elektrofusion nach dem Standardverfahren. In diesem Zusammenhang sind Frequenz und Stärke des Wechselfeldes wesentliche Größen innerhalb des Gesamtprozesses. Feldstärken über 800 V/cm sowie Frequenzen unterhalb 1 MHz bewirken eine drastische Reduzierung der absoluten Fusionsfrequenz, während die Zeitdauer des Anlegens der Dielektrophoresespannung eine geringere Bedeutung hat.
9. Innerhalb des Bereiches von 4,2 bis 10,0 kV/cm besteht eine signifikante negative Korrelation zwischen Feldstärke des fusionsinduzierenden Gleichstromimpulses und absoluter Fusionsfrequenz. Die Zeitdauer des Impulses ist im untersuchten Meßbereich von 0,7 bis 15,0 μ s keine die absolute Fusionsfrequenz determinierende Größe; die wiederholte Applikation des Impulses führt zu keiner Steigerung der Fusionsrate.
10. Eine Maßstabsverkleinerung der Elektrofusion im Sinne einer Reduktion der eingesetzten Zellzahl bis auf 1 bis 5×10^5 ist sowohl durch Verringerung des Suspensionsvolumens als auch durch den Einsatz einer Mikroammer ohne Absinken der Fusions-effizienz realisierbar.
11. Es ist möglich, die spezifische Fusionsfrequenz im Sinne einer Anreicherung von antigenspezifischen Hybridomen mittels Elektrofusion zu erhöhen. Experimente, die die Antigenvermittelte Zytoadhärenz unter Anwendung des Avidin-Biotin-Affinitätssystems ausnutzten, führten zu einer Steigerung der spezifischen Fusionsfrequenz um den Faktor 3,5.
12. Eine alternative Variante der Antigen-spezifischen Zellfusion stellt die Elektrofusion nach Sortierung der antigenbindenden Milzzellen mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters (FACS) dar. Sie führte zu einer spezifischen Fusionsfrequenz von 59,1 %, was gegenüber dem Wert für die parallel durchgeführte Kontrollfusion ohne Sortierung (7,3 %) eine Erhöhung um den Faktor 8,1 bedeutet.

13. Bispezifische Antikörper produzierende Hybrid-Hybridome können durch Elektrofusion von Hybridomzellen verschiedener Spezifitäten hergestellt werden. Hybridhybridome mit Doppelspezifität gegen R-Phycoerythrin und Membranantigene von Humanlymphozyten lassen sich über die Doppelfluoreszenz der Fusionsprodukte nach Fluoreszenzmarkierung der Parental-Hybridomzellen im Zellsorter selektieren.
14. Die von den Hybrid-Hybridomen H-BL-T.B2, H-BL-T.D6 und bedingt auch die von H-BL-T.D11 sezernierten bispezifischen Antikörper eignen sich zur fluoreszenzoptischen Detektion von Membran-IgM bzw. dem CD8-Molekül auf Humanlymphozyten mittels R-Phycoerythrin. Sie sind bereits ohne Aufreinigung als Zellkulturüberstände verwendbar und in Kombination mit direkt markierten Antikörpern anderer Spezifität für Doppelmarkierungen in Leukozytensuspensionen geeignet.