

Aus der Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

Untersuchung von Hydrogelen hinsichtlich ihrer Eignung für die Kultivierung von Stammzellen

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck
Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von
Sandra Charlotte Walter (geb. Feldhoff)
Aus Bad Oldesloe

Lübeck 2017

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charli Kruse
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Jens Habermann
- Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2017
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.02.2017
-

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Grundlagen der Zellkultur <i>adhärent wachsender Zellen</i>	5
2.1.1. Adulte Stammzellen	6
2.1.2. Zellkultur: Zweidimensional vs. dreidimensional.....	7
2.1.3. 3D-Kultivierungsmethoden.....	9
2.2. <i>Matrixmaterialien/Hydrogele</i>	9
2.2.1. Biomaterialien	10
2.2.1.1. Fibrin.....	10
2.2.1.2. Seide	11
2.2.1.3. Alginat.....	12
2.2.1.3.1. <i>Kupplungsreaktion</i>	14
2.2.2. Synthetische Materialien.....	16
2.2.2.1. Novatach (Peptid-gekoppelte Alginat).....	16
2.2.2.2. Puramatrix	17
2.2.2.1. Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PolyDADMAC).....	17
2.2.2.2. Dextran-CD Hydrogel.....	17
2.3. <i>Bioreaktoren</i>	19
3. Zielsetzung	21
4. Material und Methoden.....	22
4.1. <i>Material</i>	22
4.1.1. Chemikalien	22
4.1.2. Verbrauchsmittel	24
4.1.3. Geräte	24
4.1.4. Software	25
4.1.5. Zellen.....	26
4.1.6. Medien	26
4.1.7. Lösungen	26
4.2. <i>Methoden</i>	30
4.2.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur	30

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.1.	Subkultivierung	30
4.2.1.2.	Kryokonservierung	30
4.2.1.3.	Auftauen kyrokonservierter Zellen.....	31
4.2.1.4.	Zellzählung	31
4.2.1.5.	Glucose-und Lactatwertbestimmung	31
4.3.	<i>Matrixmaterialien/Hydrogele</i>	33
4.3.1.	Fibrin	33
4.3.1.1.	Verkapselung von Zellen in einem Fibrin-Hydrogel.....	33
4.3.1.2.	Verkapselung von Zellen in einem Fibrin/Seiden-Hydrogel	33
4.3.2.	Seide.....	33
4.3.2.1.	Seidenzugabe ins Nährmedium.....	33
4.3.2.2.	Verkapselung von Zellen in einem Seidengel aus <i>Bombxy mori</i>	34
4.3.2.3.	Verkapselung von Zellaggregaten in einem Seidengel aus <i>Bombxy mori</i>	34
4.3.2.4.	Kultivierung von Zellen auf einem Seidenvlies aus <i>Antheraea pernyi</i>	35
4.3.3.	Alginat	35
4.3.3.1.	Einflussuntersuchung von calciumhaltigen Nährmedium auf die Zellvitalität	35
4.3.3.2.	Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus Alginat und Beschichtungen aus Gelatine und –Hydrolysat (+Zugabe ins Nährmedium)	36
4.3.3.3.	Verkapselung von Zellen in Alginathohlkapseln.....	37
4.3.3.4.	Verkapselung von Zellen in Alginatvollkapseln	37
4.3.3.5.	Degradierung von Alginatgelen.....	37
4.3.3.6.	Kupplungsreaktion von Alginat und Gelatine.....	38
4.3.3.6.1.	<i>Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus modifiziertem Alginat und Zugabe ins Nährmedium</i> 39	
4.3.3.6.2.	<i>Verkapselung von Zellen in Alginathohlkapseln</i>	40
4.3.3.6.3.	<i>Verkapselung von Zellen in Alginatvollkapseln</i>	40
4.3.3.6.4.	<i>Einfluss der Dialysedauer auf die Zellvitalität</i>	40
4.3.3.7.	Verkapselung von Zellen in Alginat/Polyamid-Gelen.....	41
4.3.3.7.1.	<i>Einflussuntersuchung von PA-Zugabe ins Nährmedium</i>	41
4.3.3.8.	Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus PolyDADMAC und Alginat	41
4.3.4.	Novatach (Peptid-gekoppelte Alginate)	42
4.3.4.1.	Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus Novatach	42
4.3.4.2.	Verkapselung von Zellen in Novatach-Hohlkapseln	42
4.3.4.3.	Verkapselung von Zellen in Novatach-Vollkapseln.....	42
4.3.4.4.	Degradierung von Novatach-Vollkapseln.....	43
4.3.5.	Puramatrix.....	43

Inhaltsverzeichnis

4.3.5.1.	Verkapselung von Zellen in Puramatrix-Hydrogelen	43
4.3.5.2.	Verkapselung von Zellen in Puramatrix/Alginat-Hydrogelen	43
4.3.6.	Dextran-CD-Hydrogel	44
4.3.6.1.	Verkapselung von Zellen in einem Dextran-CD-Hydrogel	44
4.3.6.2.	Degradierung eines Dextran-CD-Hydrogels	46
4.3.6.3.	Verkapselung von Zellen in einem Dextran-CD-Hydrogel mit Gelatine-Hydrolysat	46
4.3.6.4.	Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus Dextran-CD mit Gelatine-Hydrolysat	47
4.4.	<i>Analytische Methoden</i>	47
4.4.1.	Paraffin-Fixierung	47
4.4.2.	Kryofixierung	47
4.4.3.	Färbungen	48
4.4.3.1.	Van Gieson Färbung	48
4.4.3.2.	Far Red Färbung	48
4.4.3.3.	FDA/PI-Färbung	49
4.4.3.4.	FDA/HOECHST-Färbung	49
4.4.4.	Mikroskopie	50
4.4.4.1.	Raster-Elektronenmikroskopie (REM)	50
4.4.4.2.	Zeitraffer-Mikroskopie (<i>time lapse</i> -Mikroskopie)	50
4.4.4.3.	Konfokal-Mikroskopie (<i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie LSM)	50
4.4.4.4.	Röntgenmikroskopie (X-Ray-Mikroskopie)	50
4.4.5.	Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)	51
4.4.6.	Gel-Permeations-Chromatographie (<i>Size Exclusion Chromatography</i> SEC)	51
4.4.7.	TNBS-Assay	51
4.4.8.	Genomanalyse	53
4.4.8.1.	RNA-Isolierung	53
4.4.8.2.	RNA-Konzentrationsbestimmung	54
4.4.8.3.	Globale Expressionsanalyse	54
4.5.	<i>Bioreaktor</i>	55
5.	Ergebnisse	57
5.1.	<i>Biomaterialien</i>	57
5.1.1.	Fibrin	57
5.1.2.	Seide	62
5.1.2.1.	<i>Bombyx mori</i>	62
5.1.2.2.	<i>Antheraea pernyi</i>	68
5.1.3.	Alginat	73
5.1.3.1.	Charakterisierung der Kupplungsprodukte	92

Inhaltsverzeichnis

5.1.3.2.	Alginat und weitere Zusätze.....	95
5.2.	<i>Synthetische Materialien</i>	98
5.2.1.	Novatach (Peptid-gekoppelte Alginat)	99
5.2.2.	Puramatrix.....	106
5.2.2.1.	Puramatrix mit Alginat.....	109
5.2.3.	Dextran-CD-Hydrogel	110
5.3.	<i>Bioreaktor</i>	119
6.	Diskussion	123
6.1.	<i>Biomaterialien</i>	124
6.1.1.	Fibrin	124
6.1.2.	Seide.....	125
6.1.2.1.	Bombyx mori.....	125
6.1.2.2.	Antheraea pernyi.....	127
6.1.3.	Alginat	127
6.2.	<i>Synthetische Materialien</i>	131
6.2.1.	Novatach (Peptid-gekoppelte Alginat)	131
6.2.2.	Puramatrix.....	132
6.2.3.	Dextran-CD-Hydrogel	133
6.3.	<i>Bioreaktor</i>	135
7.	Fazit und Ausblick	137
8.	Literaturverzeichnis	138
9.	Anhang	I
9.1.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>I</i>
9.2.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>IV</i>
9.3.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>V</i>
9.4.	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	<i>VIII</i>
9.5.	<i>Wissenschaftliche Veröffentlichungen</i>	<i>IX</i>
9.6.	<i>Masterurkunde</i>	<i>X</i>
9.7.	<i>Zusätzliche Abbildungen und Tabellen</i>	<i>XI</i>
9.8.	<i>Danksagung</i>	<i>XVIII</i>

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Hydrogele hinsichtlich ihrer Eignung für die Kultivierung adhärent wachsender Stammzellen untersucht. Die Zellen sollten hierbei in einem geeigneten Hydrogel verkapselt, kultiviert und anschließend wieder aufgeschlossen werden. Ziel war es, einen zyklischen Bioreaktorprozess zu etablieren, mit dem es möglich ist, große Mengen adhärent wachsender Zellen zu kultivieren. Das Kapselmaterial muss hierfür biokompatibel sein, Haftungsstellen für die adhärent wachsenden Zellen enthalten, einfach in der Handhabung sein, eine hohe Verfügbarkeit und einen geringen Preis aufweisen und darüber hinaus unter zellkompatiblen Bedingungen degradierbar sein.

Es wurden je drei Biomaterialien und drei synthetische Materialien untersucht. Als Biomaterialien wurden Fibrin, Seide und Alginat verwendet. Fibrin, welches biokompatibel ist, Haftungsstellen aufweist, zell-degradierbar und einfach in der Handhabung ist, zeigte sich bezüglich Verfügbarkeit und Preis als ungünstiges Kultivierungssystem. Nichtsdestotrotz konnten die Zellen in diesem Kapselmaterial kultiviert und das Kapselmaterial charakterisiert werden. Seide erwies sich zwar als positiv was die Handhabung, den Preis und die Verfügbarkeit betrifft, allerdings sind keine oder zu wenig Haftungsstellen für die adhärent wachsenden Zellen vorhanden und die Degradierung der Seide ist nicht möglich.

Alginat, ein natürlich vorkommendes Polysaccharid, wurde zunächst ohne Modifizierung als Kapselmaterial verwendet. Es erwies sich als biokompatibel und es konnten auf einfachste Art und Weise Gele hergestellt und diese wieder abgebaut werden. Alginat ist zudem gut verfügbar und preiswert, einziges Defizit sind die nicht vorhandenen Haftungsstellen. Mit Hilfe der wässrigen Carbodiimid-Chemie wurden deshalb Gelatine-Reste kovalent an das Alginat-Gerüst gekoppelt. Die erfolgreiche Kupplung von Alginat und Gelatine erweiterte das Material um ausreichende Haftungsstellen für die adhärent wachsenden Zellen, so dass diese in Alginatkapseln erfolgreich kultiviert werden konnten.

Die synthetischen Materialien (Novamatrix, Puramatrix, Dextran-CD) zeichnen sich durch eine gute Biokompatibilität und einfachere Handhabung aus. In diese Materialien wurden synthetisch Haftungsstellen für die Zellen eingebaut, so dass diese für die Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen in Betracht gezogen werden konnten.

Novamatrix, ein Peptid-modifiziertes Alginat, zeigte sich prinzipiell als brauchbares Kapselmaterial, weist allerdings Defizite bezüglich Degradierbarkeit und Kosten auf. Auch Puramatrix, ein 16 Aminosäuren langes Peptid, erwies sich als geeignetes

Zusammenfassung

Kultivierungssystem, allerdings konnte dieses Material nicht degradiert werden und ist mit hohen Kosten verbunden. Das Dextran-CD-Hydrogel, welches ebenfalls Peptid-modifiziert war, zeigte die besten Eigenschaften zur Kultivierung der Zellen: Die Stammzellen konnten erfolgreich verkapselt, kultiviert und wieder aus den Kapseln herausgelöst werden. So konnte auch eine Machbarkeitsstudie in einem Rührkesselreaktor durchgeführt werden, der diese Ergebnisse bestätigte. Ein Nachteil ist allerdings der hohe Preis dieses Materials, da die Anwendung auf die Herstellung großer Zellmassen abzielt, konnte in dem Dextran-System nicht das optimale Material gefunden werden.

Einen zusammenfassenden Überblick über die positiven und negativen Eigenschaften der untersuchten Gelmaterialien gibt Tabelle 1. Als am besten geeignet erwies sich das modifizierte Alginat, da es alle erforderlichen Eigenschaften zur Vermehrung von Stammzellen aufwies (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammenfassende Tabelle der positiven (✓) und negativen (✗) Eigenschaften der untersuchten Gelmaterialien.

Hydrogel	Biokompatibel	Haftungsstellen	Handhabung	Verfügbarkeit	Degradierbarkeit	Preis	Zusatz
Fibrin	✓	✓	✓	✗	✓	✗	
Seide (<i>Bombyx mori</i>)	✓	✗	✓	✓	✗	✓	Gelatine Glycerin Fibrin
Seide (<i>Antheraea pernyi</i>)	✓	(✓)	✗	✓	✗	✓	<i>Bombyx mori</i> Gazefilter
Alginat	✓	✓	(✓)	✓	✓	✓	PA PolyDADMAC
Novamatrix	✓	✓	✓	✓	(✓)	✗	-
Puramatrix	✓	✓	✓	✓	✗	✗	Alginat
Dextran- CD	✓	✓	✓	✓	✓	✗	-

2. Einleitung

Die effiziente Vermehrung adhärent wachsender Zellen im großtechnischen Maßstab ist aktuell ein noch ungelöstes Problem. Erste Lösungsansätze verfolgten eine einfache Skalierung der *Monolayer*-Kulturen. Hierbei wurden beispielsweise mehrere Böden in ein großes Zellkultur-*Consumable* eingebracht, um die Wachstumsoberfläche zu vergrößern (z. B.: *Cell Factory, Roller Bottles*) (Rafiq, Brosnan, Coopman, Nienow, & Hewitt, 2013). Andere Ansätze beruhen auf der Verwendung von *Microcarriern*, 100 µm - 2 mm große Körper, auf deren Oberfläche die Zellen wachsen können (Rowley J, Abraham E, Campbell A, Brandwein H, 2012; Want, Nienow, Hewitt, & Coopman, 2012) oder Hohlfaser-Systemen (Sardonini & Wu, n.d.; Zeilinger et al., 2011).

Allerdings versucht keiner dieser Ansätze das eigentliche Problem zu lösen, dass der Vermehrung zu Grunde liegt und in seinem Wesen biologischer Natur ist: Adhärent wachsende Zellen wachsen nur in einem bestimmten Dichtebereich (Schmitz, 2007), welche sich in einer Flächendichte von etwa 500-50000 Zellen/cm² bewegt (Abbildung 1). Die meisten Zellen proliferieren unterhalb dieser Flächendichte nicht, weil die notwendige Zell-Zell-Kommunikation gestört ist. Andererseits proliferieren die Zellen auch nicht über einer Zelldichte, bei der sich die Zellen berühren (Kontaktinhibierung).

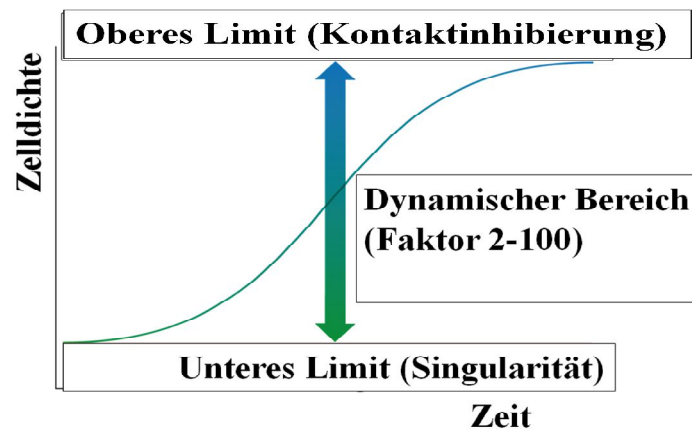


Abbildung 1: Entwicklung der Zelldichte adhärent wachsender Zellen. Der dynamische Bereich des Zellwachstums wird einerseits durch die Kontaktinhibierung, andererseits durch das Vereinzelungslimit der Zellen eingegrenzt.

Mit den auf dem Markt etablierten Methoden ist es allerdings nur möglich, Vermehrungsfaktoren von 10^2 zu erzielen. Für entsprechende Anwendungen in der regenerativen Medizin oder für Zellbanken wären allerdings Faktoren von 10^3 , für

Einleitung

Produktionszellen für Biomoleküle wären Faktoren von 10^4 und schließlich in der Ernährungs- oder Landwirtschaft wären Vermehrungsfaktoren von 10^6 notwendig.

Eine Lösung dieses Problems könnte eine Wachstumsoberfläche darstellen, die in der Lage ist mit den Zellen mitzuwachsen. Allerdings müsste die Oberflächenvergrößerung einem exponentiellem Wachstum folgen. Die technischen Möglichkeiten (z. B. *Microcarrier*), um dies zu umzusetzen sind derzeit sehr beschränkt. Bei der Verwendung von *Microcarriern*, steigt mit der Zahl der Festkörper und somit der Wachstumsoberfläche die Größe des Reaktors. Das Reaktorvolumen muss hierbei stetig vergrößert und somit der *Carrier*-Anzahl angepasst werden. Ein weiterer Nachteil ist der möglichst schonende Umgang mit den *Carriern*, da die Zellen auf den Festkörpern Scherr- und Prallkräften ausgesetzt sind. Für die Handhabung wäre eine Verwendung von Flüssigkeiten um einiges einfacher. Auch die Analyse der Zellen auf den Festkörpern ist nur unzureichend gewährleistet. Außerdem ist sowohl die Inokulation, als auch die Ernte der Zellen technisch schwierig umzusetzen (Rapoport, Voigt, & Feldhoff, 2013).

Die technische Lösung wurde in der Verwendung eines kapsel-basierten Bioreaktors gefunden, welcher im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und patentiert wurde (Rapoport et al., 2013).

Die Idee ist, einen zyklisch geführten Reaktorprozess zu implementieren, bei dem die Zellen im Inneren von Hydrogel-Kapseln vermehrt werden (Abbildung 2). Dadurch können die Zellen stets in der richtigen lokalen Dichte wachsen, obwohl global, das heißt, auf das Reaktorvolumen bezogen, mit sehr viel kleineren Startzellichten gearbeitet werden kann. Der zyklische Prozess umfasst im Groben folgende Einzelschritte:

- Vorlegen der Zellen in dem Gelbildner mit Adhäsionsstellen
- Eintropfen der Zellsuspension und Entstehung der Gelkapseln
- Expansion der Zellen in den Kapseln
- Auflösen der Kapseln und Freisetzen der Zellen
- Resuspendieren der Zellen in dem Gelbildner und Wiederherstellung der ersten Phase

Einleitung

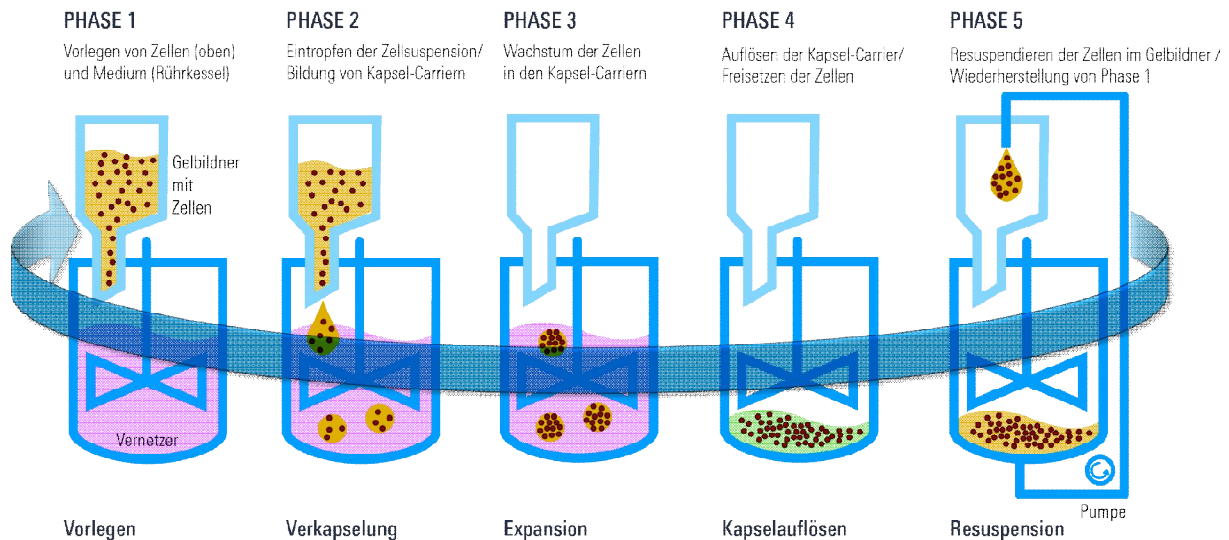


Abbildung 2: Zyklischer kapsel-basierter Bioreaktor zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen in Hydrogelen. Nach dem Vorlegen der einzelnen Komponenten (Phase 1), können die Zellen in den entsprechenden Gelen verkapselt (Phase 2), kultiviert (Phase 3) und wieder aufgelöst (Phase 4) werden. Nach der Resuspension der Zellen (Phase 5), werden diese wieder in die erste Phase eingeführt.

Dieser Prozess hat folgende Vorteile:

- Inokulation und Ernte der Zellen wird durch Verkapseln und Auflösen der Kapseln ersetzt
- Zellen befinden sich in lokaler Mikroumgebung, dadurch kann der Reaktor mit kleinen Start-Zellzahlen betrieben werden
- Mechanischer Schutz der Zellen durch die Kapseln, dadurch höhere Überlebensraten
- Zellwachstum in dreidimensionaler Umgebung, dadurch Erhalt der biologischen Funktion und Identität, sowie effiziente Ausnutzung des Reaktorvolumens

2.1. Grundlagen der Zellkultur adhärent wachsender Zellen

Die Kultivierung von Zellen außerhalb des Organismus wird als Zellkultur bezeichnet. Hierbei werden die Zellen in einem geeigneten Nährmedium gehalten. Je nach Art der Zellen, werden diese in Suspension oder als adhärent wachsende Kultur betrieben.

Adhärenz beschreibt in diesem Fall die Anheftung von Zellen an Oberflächen oder andere Zellen. Für die *in vitro*-Kultivierung dieser Zellarten ist die Zell-Substrat-Adhäsion unerlässlich. Bei diesem mehrstufigen Prozess spielen sowohl zweiwertige Kationen, als auch

Einleitung

extrazelluläre Matrixmoleküle wie Fibronectin oder Laminin eine entscheidende Rolle (Schmitz, 2007). Unspezifische Signalstoffe und Proteine binden an die Substratoberflächen. Es kommt zur Adsorption der negativ geladenen Zellen in Gegenwart zweiwertiger Kationen an die Oberfläche, der Kontakt wird durch Adhäsionsfaktoren der extrazellulären Matrix unterstützt. Die Zellanheftung erfolgt über die Bindung zelleigener Proteoglykane aus der extrazellulären Matrix (EZM), die an Peptidsequenzen (z. B. Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)) von Proteinen aus dem Medium binden. Steht den Zellen eine geeignete Oberfläche zur Verfügung kommt es nach der Bindung zur Ausbreitung der Zelle und zur anschließenden Proliferation.

Der umgekehrte Prozess wird *Detachment* genannt und meint das Ablösen der Zellen. Werden die Zellen beispielsweise in Zellkulturflaschen oder -schalen kultiviert, müssen diese nach Erreichen der Konfluenz (vollständige Bedeckung der Oberfläche) passagiert, das heißt auf Zellkulturflaschen mit größerer Wachstumsoberfläche gebracht werden, da es durch den Zell-Zell-Kontakt zu einer Wachstumsinhibierung kommt (Abbildung 1). Eine Behandlung mit der Serinprotease Trypsin sorgt für die Abspaltung der Peptidketten nach den Aminosäuren Lysin (Lys, K) und Arginin (Arg, R) und bewirkt dadurch das Ablösen der Zellen (Schmitz, 2007).

2.1.1. Adulte Stammzellen

In dieser Arbeit wurden Stammzellen aus dem exokrinen Teil des Pankreas adulter Ratten (*pancreatic stem cells*, PSCs) verwendet (Kruse et al., 2006). Adulte SC lassen sich aus verschiedenen Quellen und Organen, wie zum Beispiel dem Nabelschnurblut, dem Fettgewebe oder der Haut gewinnen (Lee et al., 2004; Rodriguez, Elabd, Amri, Ailhaud, & Dani, 2005; Toma, McKenzie, Bagli, & Miller, 2005). Die adulten SCs sind lebenslänglich vorhanden und vermitteln die gewebespezifische Regeneration und die Homöostase. Das Entwicklungspotential ist allerdings im Vergleich zu embryonalen Stammzellen (ESCs) reduziert: Die adulten SCs können in der Regel lediglich in verschiedene Zelltypen eines Gewebes differenzieren.

Ein Vorteil und damit potentiell Anwendungsgebiet der adulten SCs liegt in der Verwendung in therapeutischen Ansätzen. So können adulte SCs aus einem Patienten entnommen, evtl. behandelt oder therapiert und anschließend rücktransplantiert werden. In der Krebstherapie (Leukämie) ist dies derzeit Stand der Technik. Auch die regenerative Medizin

Einleitung

verfolgt ähnliche Strategien. Leider sind stammzellbasierte Therapien sehr kostenintensiv, wobei ein wesentlicher Kostentreiber die Vermehrungstechnologien darstellen.

2.1.2. Zellkultur: Zweidimensional vs. dreidimensional

Die Kultivierung von Zellen hatte ihren Ursprung in Form von Gewebe- und Organkultur zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts (Schmitz, 2007). Bis zum heutigen Zeitpunkt hat sich, was die Zellkultivierung betrifft, viel getan. Zahlreiche Entdeckungen und Entwicklungen haben bereits zur Veränderung und Verbesserung der Methodik beigetragen.

Die ersten Zellen außerhalb eines Organismus wurden im Jahre 1911 von Alexis Carrel in Form von Explantkulturen aus der Milz von Hunden kultiviert. Einige Tage nachdem die Gewebestücke in geronnenem Blutplasma kultiviert wurden, wuchsen Zellen aus und migrierten in das Hydrogel des geronnenen Plasmas (Carrel & Burrows, 1911) (Abbildung 3). Die ersten Zellkulturen wurden demnach als Hydrogel-Kultur betrieben. In diesem Sinne nimmt die vorliegende Arbeit den historischen Faden der Hydrogel-Kultur wieder auf und entwickelt ihn weiter.

Ein Ersatz des Blutplasmas wurde unter anderem von Renato Dulbecco gefunden bzw. verbessert, der es schaffte eine bis heute gültige Rezeptur löslicher Faktoren zu finden, die es möglich macht, Zellen auf harten Oberflächen, zunächst auf Glas und später auf Polystyrol, zu kultivieren.



Abbildung 3: Erste Kultivierung von Zellen *in vitro*. Die Kultivierung der adhären wachsenden Zellen erfolgt erstmals 1911 in Form von Explantkulturen in geronnenem Blutplasma (Carrel & Burrows, 1911).

Einleitung

Unter der zweidimensionalen (2D) Kultivierung versteht man das Wachstum der Zellen als *Monolayer* auf solchen harten Oberflächen, wie zum Beispiel Plastikoberflächen (Polystyrol, *Cell Factory*, *Roller Bottles*) (Rafiq et al., 2013). Die herkömmliche 2D-Zellkultur weist einige Nachteile und Limitierungen auf, die zum Tragen kommen, wenn eine größere Zellmenge kultiviert werden soll. Durch die begrenzte Wachstumsoberfläche ist die 2D-Kultur limitiert, da die meisten Zellen nur in bestimmten Dichtebereichen wachsen können (Schmitz, 2007). Die Grenzen der 2D-Kultivierung liegen auf der Hand. Die Zellen werden durch die sie umgebende Matrix stark beeinflusst (z.B. Kontaktinhibierung) (Jeanes, Maya-Mendoza, & Streuli, 2011; Lu et al., 2012; Purpura, Bratt-Leal, Hammersmith, McDevitt, & Zandstra, 2012) und die physiologischen Bedingungen werden im 2D-Modell nicht hinreichend nachgebildet.

Im Laufe der Zeit wurden viele Bemühungen unternommen, die einen Übergang von einer 2D zu einer dreidimensionalen (3D) Kultur ermöglichten. Das dreidimensionale Wachstum der Zellen kann durch entsprechende Matrices ermöglicht werden.

In einem 3D-Kultivierungssystem wird die *in vivo*-Situation der Zellen wesentlich besser simuliert, da die extrazelluläre Matrix beispielsweise mit *Scaffolds* aus Kollagen oder Hyaluronsäure nachgeahmt werden kann (Chen et al., 2012), (Pescosolido et al., 2011). Darüber hinaus können in das Kultivierungssystem für die Zellen essentielle Faktoren (Signalfaktoren, Adhäsionsfaktoren) oder Proteine und Nährstoffe eingebracht werden, um die Zellen lokal zu binden oder zu versorgen. Um allerdings standardisierte und geeignete 2D-Ersatz-Systeme zu verwenden, müssen Fragestellungen wie Reproduzierbarkeit und Kosten geklärt werden. Die Verwendung von Naturstoffen ist wegen der Reproduzierbarkeit durch biologische Varianz, sowie natürlich vorkommende Verunreinigungen, oft ungeeignet. Um diese Probleme zu lösen, könnte die Verwendung von halb- oder vollsynthetischen Materialien hilfreich sein, allerdings sind diesbezüglich häufig zell-inerte Systeme in Verwendung. Damit die Zellen, auf oder in diesen Materialien adhären, müssen diese entsprechend modifiziert werden. Dies kann in Form von RGD-Peptiden erfolgen. Diese Peptide sorgen für die Adhäsion der Zellen (Hersel, Dahmen, & Kessler, 2003; Hubbell, 1995), durch die Interaktion der zelleigenen Integrine mit den RGD-Einheiten (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984; Ruoslahti, 1996).

Sowohl in der regenerativen Medizin, als auch in der Grundlagenforschung wäre der Übergang zu einer 3D-Kultur nicht nur für die Zellvermehrung ein hilfreicher Schritt. Beispielsweise ist in der kosmetischen Industrie seit einigen Jahren die Verwendung von

humanen Haut-Äquivalenten Usus. Dies ist nicht nur der Übergang zu 3D-Modellen, sondern ersetzt ebenso Tierversuche (Rimann & Graf-Hausner, 2012).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein hoher Bedarf an standardisierten und validierten Verfahren zur 3D-Kultivierung besteht, dieser Bedarf bis zur Vollendung aber noch viele offene Fragen und Limitierungen aufweisen.

2.1.3. 3D-Kultivierungsmethoden

Generell kann bei den 3D-Kultivierungsmethoden zwischen träger- oder *scaffold*-basierten und –freien Systemen unterschieden werden. Zu den trägerlosen Methoden zählt unter anderem die *Hanging drop*-Kultivierung von Zellen. Hierbei werden die Zellen in einem hängenden Tropfen kultiviert und bilden Sphäroide (Foty, 2011). Häufiger werden allerdings trägerbasierte Kultivierungsmethoden verwendet. Zellen können auf *Carriern* unterschiedlicher Materialien kultiviert werden, in die sie je nach verwendetem Material hineinwachsen müssen. Dies wurde von Zorlutuna et al. mit Hilfe von modifizierten Polyestern und Polylaktiden für Fibroblasten und Epithelzellen durchgeführt (Zorlutuna, Tezcaner, & Hasirci, 2008). Yung Hsin et al. arbeiteten mit modifizierten Chitosan-Gelatine-*Scaffolds*, als Zell-*Carrier* für *Nucleus Pulposus* (Cheng et al., 2010). Vorteilhafter ist die Verkapselung von Zellen in einem geeigneten *Carrier*. Ein wesentlicher Vorteil ist hierbei, dass die Zellen während der Kultivierung vor mechanischen Beanspruchungen geschützt sind und dreidimensional in das Kultivierungssystem hineinwachsen können. Lutolf et al. zeigten im Rahmen der Knochen-Regeneration die Migration von humanen Fibroblasten in ein Polyethylenglycol-basiertes (PEG-basiertes) Hydrogel (Lutolf et al., 2003). Eine weitere Herausforderung stellt sich in der Analyse bzw. Rückgewinnung der verkapselten Zellen dar. Für die Rückgewinnung der Zellen ist es wünschenswert ein degradierbares Verkapselungsmaterial zu verwenden, welches möglicherweise auch von den Zellen selbst abgebaut werden kann. Diese Möglichkeit ist bei Fibrin gegeben, einem polymerisierten und zellverträglichen Eiweiß, das auch der Hauptbestandteil von Carrels ersten Kultivierungsprotokollen war (Rosas, 2011).

2.2. Matrixmaterialien/Hydrogele

Bei der Verwendung der Matrixmaterialien richtet sich die Auswahl nach der jeweiligen Anwendung bzw. Fragestellung. Grundsätzlich kann die Einteilung in Biomaterialien und

halb-/vollsynthetischen Materialien erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl synthetische, als auch nicht synthetische Materialien verwendet, auf die im Folgenden näher eingegangen wird. Fast alle verwendeten Materialien sind Hydrogele. Diese Gele zeichnen sich dadurch aus, dass sie ca. 99 % Wasser und ca. 1 % wasserunlösliche Polymere enthalten, die sich zu einem 3D-Netzwerk organisieren und das Wasser binden (Abbildung 4). Die Hydrogelbildung kann sowohl chemisch durch Verknüpfung der einzelnen Polymerstränge, als auch physikalisch, über elektrostatische, hydrophobe und Dipol/Dipol-Wechselwirkungen, erfolgen (Huglin, 1989).

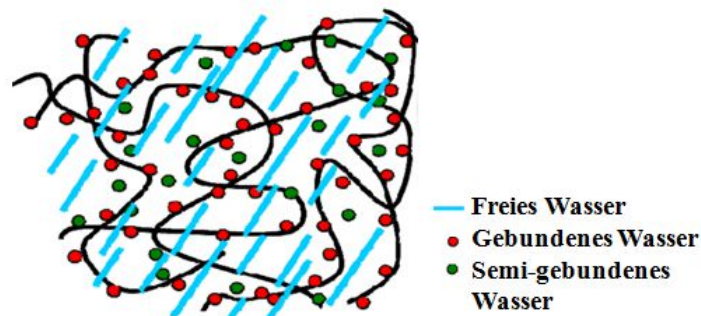


Abbildung 4: Struktur eines Hydrogels. Dargestellt ist das wasserunlösliche Polymer und das enthaltene Wasser, welches frei (blau), gebunden (rot) und semi-gebunden (grün) vorliegen kann (Pasqui, De Cagna, & Barbucci, 2012).

2.2.1. Biomaterialien

2.2.1.1. Fibrin

Fibrin ist ein Hauptbestandteil des Blutgerinnungssystems und befindet sich im humanen Blut in Form einer Vorstufe, als Fibrinogen. Das in der Leber synthetisierte Protein besteht aus einem Heterodimer (Shaikh et al., 2008). Während der Wundheilung kommt es mit Hilfe von Thrombin, einer Serin-Protease, zur Blutgerinnung. Thrombin wird wiederum aus Prothrombin gebildet. Nach der Abspaltung der Fibrinopeptide des Fibrinogens durch Thrombin kommt es zur Zusammenlagerung der einzelnen Fibrinogen-Ketten und somit zur Bildung eines stabilen 3D-Netzwerkes (Mosesson, 2005).

Fibrin bringt sowohl Biokompatibilität, als auch positive Oberflächeneigenschaften für die Zellen mit: Adhärent wachsenden Zellen ist es möglich, auf oder in Fibrinmatrices anzuheften und zu proliferieren (Shaikh et al., 2008). Fibrin wurde zahlreiche Male zu Forschungszwecken im Rahmen des *Tissue Engineering* verwendet. Wie bereits erwähnt,

wurde die erste Zellkultur ebenfalls in Form von Fibrin-Gelen durchgeführt (Carrel & Burrows, 1911). Acevedo et al. hatten Keratinozyten in Fibrin-Mikrokapseln zur Entwicklung eines mathematischen Modells für das Kapseldesign kultiviert (Acevedo et al., 2009) und Sahni et al. kultivierten Endothelzellen auf Fibrin- und Fibrinogen-beschichteten Oberflächen. Das Fibrin bzw. Fibrinogen wurde vorher mit dem Endothelwachstumsfaktor (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) verbunden, um das Zellwachstum zu stimulieren (Sahni & Francis, 2000).

2.2.1.2. Seide

Seide als Zellkultivierungsmatrix wird sowohl in Form von Material des Seidenspinners *Bombyx mori*, als auch des chinesischen Eichenseidenspinners *Antheraea pernyi* verwendet. Die Seidenmoleküle von *Bombyx mori* bestehen aus dem Eiweiß Fibroin und Sericin, einem wasserlöslichem Klebstoff (Kim et al., 2004). Fibroin enthält die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Alanin (A) in folgender Reihenfolge als repetitive Einheit: G-S-G-A-G-A. Aus den Fibroin-Molekülen bilden sich zunächst zeitabhängig Seidenaggregate, indem sich die α -helikalen *random-coiled*-Bereiche zusammenlagern. Daraus bilden sich anschließend antiparallele β -Faltblätter, welche wiederum ein unlösliches Hydrogel bilden. Diese Hydrogelbildung lässt sich sowohl über die Seidenkonzentration, der Ionenstärke, als auch durch Temperatur und den pH-Wert beeinflussen (Kim et al., 2004). Die Vorzüge des Seidenmaterials liegen sowohl in der Verfügbarkeit, als auch in der Handhabbarkeit (Altman et al., 2003). Außerdem scheint Seide die Zellanbindung und somit die Proliferation der Zellen zu unterstützen. Die Seide kann nur langsam enzymatisch degradiert werden (Cao & Wang, 2009). Wang et al. haben eine Methode zur Zellverkapselung entwickelt, bei der die Gelbildung ultraschall-induziert wird (Wang, Kluge, Leisk, & Kaplan, 2008).

Einleitung

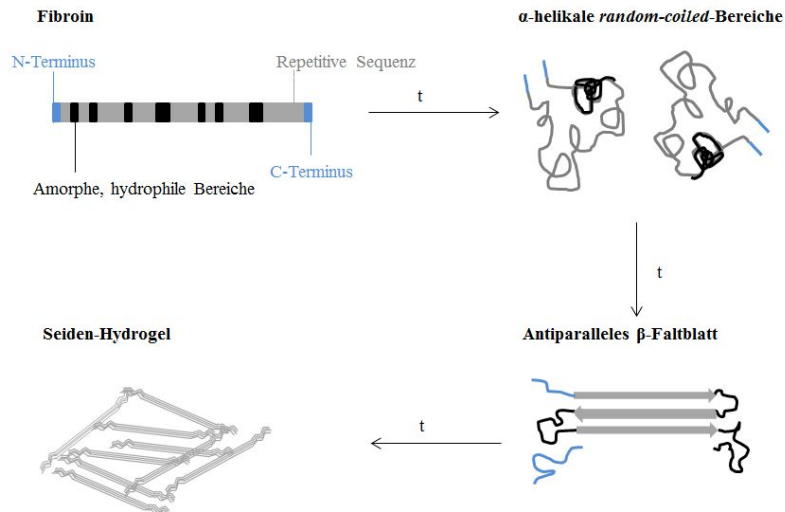


Abbildung 5: Entwicklung eines Seiden-Hydrogels aus Fibroin-Molekülen. Aus den Fibroin-Proteinen bilden sich zunächst zeitabhängig α -helikale *random-coiled* Bereiche. Aus den repetitiven Sequenzen (grau) bilden sich anschließend antiparallele β -Faltblätter, wobei sich die amorphen und hydrophilen Bereiche (schwarz) zusammenlagern. Schließlich entsteht ein unlösliches Seidengel (Gil, Spontak, & Hudson, 2005).

Die Seide des *Antheraea pernyi* besteht aus den Aminosäuren Glycin und Alanin und hat gegenüber der Seide von *Bombyx mori* den Vorteil, etwa alle 200 Aminosäuren ein RGD-Peptid zu enthalten (J. Qu, L. Xin, X. Xu, F. Zhang, B. Zuo, 2010). Diese Seidenart ist allerdings noch nicht gut erforscht (Yan, Zhao, Wu, Zhang, & Li, 2010). Die Handhabbarkeit und Gelierungseigenschaften dieser Seidenart sind ebenfalls komplexer. Kweon et al. mischten die Seide mit Chitosan, um so stabile Gel-Filme herzustellen (Kweon, Um, & Park, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben Hydrogelen auch Seidenvliese verwendet.

2.2.1.3. Alginat

Alginat bzw. Alginsäure ist ein Polysaccharid, welches aus den beiden Monomeren β -1,4-D-Mannuronsäure (MS) und α -1,4-L-Guluronsäure (GS) besteht. Die Monomere sind 1,4-glykosidisch verknüpft, sodass sich drei Arten von Block-Typen bilden können: MSMS-, GSGS-, GSMS-Block (Rees & Welsh, 1977). Alginat wird zum Beispiel von Braunalgen (*Phaeophyta*) oder von einigen Bakterienarten gebildet. Die Molmasse ist speziesabhängig und kann zwischen 20-60 kDa variieren. Eine Gelbildung erfolgt durch ionotrope Einlagerung von zweiwertigen Ionen, zum Beispiel mit Hilfe von Calcium-Ionen. Hierbei erfolgt eine Chelatisierung der Ionen in die GSGS-Blöcke des Alginats. Jedes Kation wird von vier Guluronat-Molekülen komplexiert. Zur Gelbildung bedarf es einer Mindestkettenlänge von 20

Einleitung

Monomeren. Das sich bildende Gel wird im Rahmen des „Eierkasten-Modell“ beschrieben (Abbildung 6).

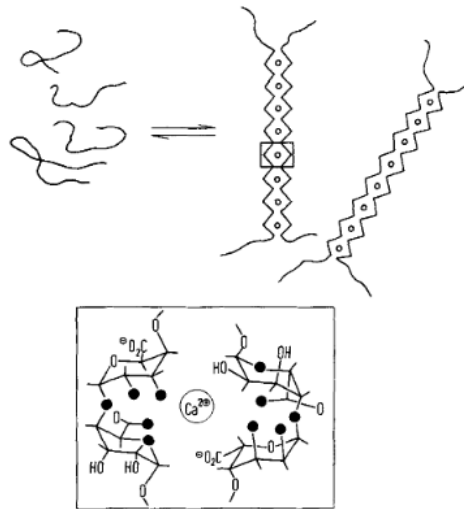


Abbildung 6: Gelierung von Alginaten durch Einlagerung von zweiwertigen Kationen. In die Guluronsäure-Monomere von Alginat können zweiwertige Kationen (zum Beispiel Ca^{2+}) eingelagert werden. Jeweils vier Zuckermomere chelatisieren hierbei ein Kation. Das so entstandene Gel kann durch Entzug der Kationen wieder aufgelöst werden (Rees & Welsh, 1977).

Aus den Mannuronsäure-Resten bilden sich Maschen, in denen Wassermoleküle eingelagert werden (Rees & Welsh, 1977). Die Stabilität der sich bildenden Gele ist abhängig von der Zuckerkonzentration, dem Anteil an Guluron-/Mannuronsäure, dem Molekulargewicht und dem verwendeten Kationen Barium (Ba^{2+}), Strontium (Sr^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}) und Calcium (Ca^{2+}). Die Bindungsstärken sind hierbei wie folgt (Smidsrød, 1974):

GSGS	$\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \gg \text{Mg}^{2+}$
MSMS	$\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \sim \text{Ca}^{2+} \sim \text{Mg}^{2+}$
MSGs	$\text{Ba}^{2+} \sim \text{Sr}^{2+} \sim \text{Ca}^{2+} \sim \text{Mg}^{2+}$

Die Kinetik der sich bildenden Gele kann über die Zugabe nicht gelierender Kationen (Natrium, Kalium) kontrolliert werden (Orive, Hernández, Gascón, & Pedraz, 2006).

Alginat wird bereits weitreichend in der Lebensmittelindustrie und im pharmazeutischen Bereich eingesetzt (Yang & Jr., 1999). Als Verkapselungsmaterial wird Alginat aufgrund seiner einfachen Handhabbarkeit oftmals verwendet. Es lassen sich Voll-oder Hohlkapseln (VK, HK) herstellen. Durch Eintropfen einer Calciumlösung in eine Alginatlösung entstehen

Einleitung

HK. Taucht ein Tropfen der Calciumlösung in die Alginatlösung ein, diffundieren die Ionen nach außen und initiieren die Gelbildung. Die Gelierung endet, sobald das Innere der Kapsel keine Ionen mehr aufweist. Da kein Alginat durch die Kapselwand hindurch diffundieren kann, bleibt das Innere der Kapsel flüssig: Eine Hohlkapsel ist entstanden. Der Innendurchmesser der HK entspricht dem Tropfendurchmesser der Calciumlösung. Bei der VK-Entstehung wird eine Alginat- in eine Calciumlösung eingetrofft. Die Calciumionen diffundieren in diesem Fall in den Alginattropfen hinein, bis die Gelierung abgeschlossen ist. Der Kugeldurchmesser entspricht dem Tropfendurchmesser (Henning, 2009).

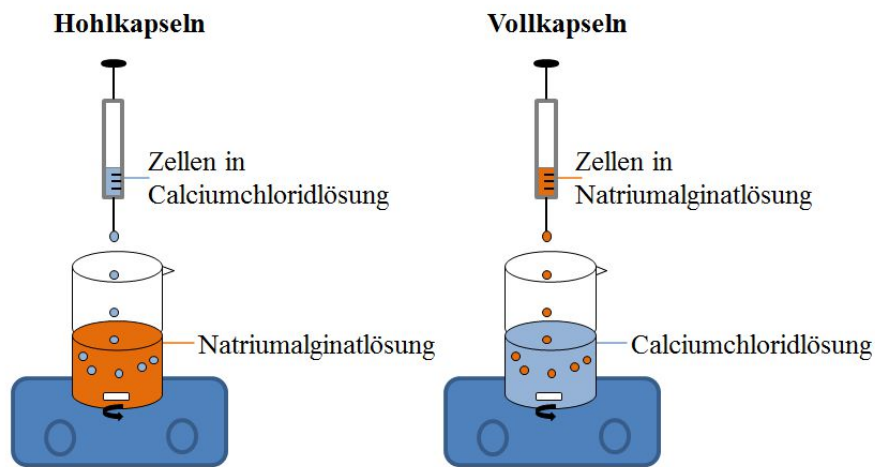


Abbildung 7: Herstellung von Hohl- und Vollkapseln aus Alginat und Calcium. Die Verkapselung von Zellen in Alginatgelen kann auf einfachem Weg unter Verwendung von Calciumchlorid- und Alginatlösungen erfolgen. Bei der Produktion von Hohlkapseln werden die Zellen in der Calciumlösung suspendiert und in eine Natriumalginatlösung eingetrofft. Die Vollkapselherstellung erfolgt genau andersherum (Henning, 2009).

2.2.1.3.1. Kupplungsreaktion

Um adhärent wachsende Zellen in oder auf Alginatgelen wachsen zu lassen, muss dieses entsprechend mit Zellbindungsmotiven modifiziert werden. Das kann über chemische kovalente Modifizierung erfolgen. Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Modifizierung von Alginat erfolgte mit Hilfe der wässrigen Carbodiimid-Chemie (J A Rowley, Madlambayan, & Mooney, 1999). Carbodiimide, in diesem Fall 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), vermitteln die Amidbindung zwischen der Carboxyfunktion des Alginats und der Aminofunktion des Zellbindungsmotivs, in diesem Fall Gelatine bzw. Gelatine-Hydrolysat. Die Kombination mit dem Co-Kupplungsreagenz N-Hydroxysulfosuccinimid (sulfo-NHS) führt zur Bildung eines semistabilen aminreaktivem

Einleitung

NHS-Esters, welcher nun mit der entsprechenden Aminofunktion reagieren kann (Abbildung 8) (Pu et al., 2009).

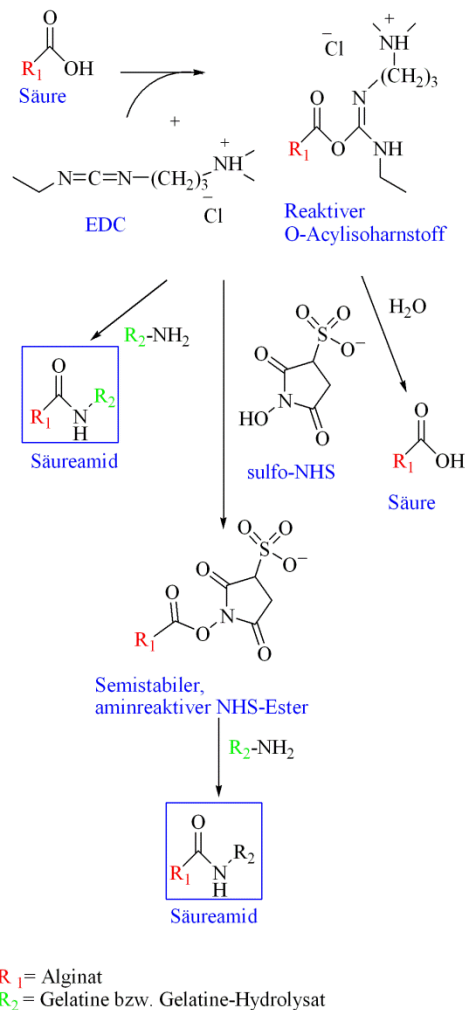


Abbildung 8: Kupplungsreaktion von Alginat und Gelatine mit Hilfe von Carbodiimid und sulfo-NHS.

Die Säurefunktion des Alginats kann entweder sofort mit dem Amin zu dem Säureamid reagieren, oder es reagiert zunächst mit dem Kupplungsreagenz EDC zu einem reaktiven Harnstoffderivat. Eine ablaufende Nebenreaktion führt mit der Aminofunktion der Gelatine zu dem Säureamid. Eine zweite unerwünschte Nebenreaktion führt mit Wasser zur Rückbildung des Harnstoffderivates hin zu der ursprünglichen Säurefunktion. Um die Reaktion zu dem gewünschten Produkt zu unterstützen, wird das Co-Kupplungsreagenz, sulfo-NHS, dem Reaktionsgemisch zugegeben, wodurch ein aminreaktiver Ester mit der Aminofunktion reagieren kann.

Um die bei dieser Reaktion ablaufende Nebenreaktion möglichst zu umgehen, kann alternativ zu sulfo-NHS die Verwendung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) hilfreich sein. In diesem Fall entsteht ein Aktivester, welcher mit dem Amin zum entsprechenden Amid weiterreagiert.

Einleitung

Das Ko-Kupplungsreagenz beschleunigt die Reaktion. Die gebildeten Aktivester sind sehr stabil.

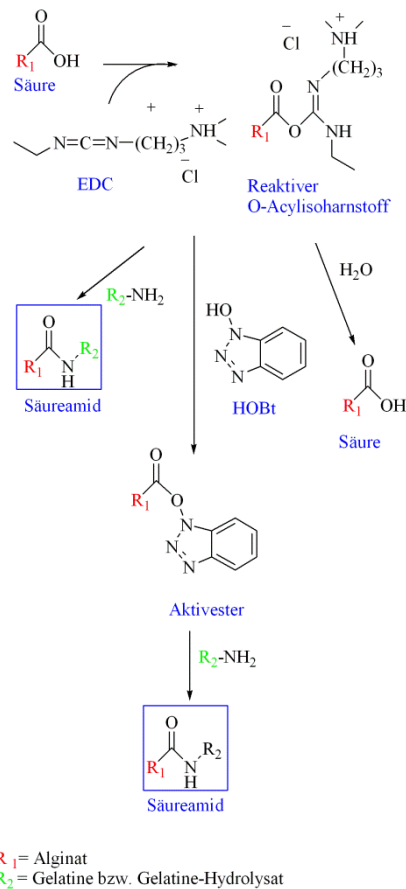


Abbildung 9: Kupplungsreaktion von Alginat und Gelatine mit Hilfe von Carbodiimid und HOBt. Die Kupplungsreaktion verläuft zunächst analog wie in Abbildung 6. Als Co-Kupplungsreagenz wird in diesem Fall aber HOBt eingesetzt, das eine Verstärkung der Reaktion über einen Aktivester nach sich zieht. Mit dem entsprechenden Amin wird so eine höhere Ausbeute des Säureamids erzielt.

2.2.2. Synthetische Materialien

2.2.2.1. Novatach (Peptid-gekoppelte Alginat)

Novatach ist ein halbsynthetisches Matrixmaterial der Firma Novamatrix. Hierbei wird Alginat (siehe Abschnitt 2.2.1.3 Alginat) mit einem Peptid modifiziert, an dem adhärent wachsende Zellen anheften können. Die Peptid-Sequenz variiert von Arginin-Glycin-Asparaginsäure- (RGD) zu Valin-Alanin-Prolin-Glycin (VAPG) oder Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Valin (REDV) –Motiven. Die Hydrogelbildung erfolgt analog zu unmodifizierten Alginaten.

2.2.2.2. Puramatrix

Puramatrix (PM) ist ein vollsynthetisches 16 Aminosäure langes Hydrogel der Firma BD Bioscience. Es besteht aus den Aminosäuren Arginin (Arg, R), Alanin (Ala, A) und Asparaginsäure (Asp, D) und wird mit RADA16 abgekürzt. PM dient zur Verkapselung von Zellen und bildet ein definiertes 3D-Netzwerk, welches je nach Bedarf mit bioaktiven Molekülen modifiziert werden kann. Die Hydrogelbildung erfolgt bei physiologischen Bedingungen durch das Vorhandensein von einfach geladenen Ionen. Es bilden sich definierte Poren mit einer Größe von 50-200 nm. Calvalcanti et al. untersuchten Zahnpulpa-Stammzellen in einem Puramatrix-Hydrogel. Sowohl das Wachstum, als auch die Differenzierung der Zellen wurde in diesem Gel unterstützt (Cavalcanti, Zeitlin, & Nör, 2013). Abu-Yousif et al. verkapselten Krebszellen in einem PM-Hydrogel und konnten diese so näher untersuchen (Abu-Yousif, Rizvi, Evans, Celli, & Hasan, 2009).

2.2.2.1. Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PolyDADMAC)

PolyDADMAC ist ein synthetisch hergestelltes Polymer, welches in der Papierindustrie verwendet wird. PolyDADMAC kann als entsprechendes Polykation in Zusammenhang mit Natriumcellulosesulfat als Polyanion stabile Kapseln bilden. Der entstandene Kern bleibt hierbei flüssig (Dautzenberg H, Loth F, Wagenknecht W, 1985; Lukanoff B, 1994). Palfi et al. verkapselten in PolyDADMAC-basierten Gelsystemen erfolgreich Säugerzellen, indem sie Tropfen aus Cellulosesulfat in Lösungen aus PolyDADMAC eintropfen ließen und die Verkapselungsparameter entsprechend anpassten (Merten, Dautzenberg, & Palfi, 1991). Die Immobilisierung von artifiziellem Gewebe in PolyDADMAC-Hydrogelen ist Grundlage der Arbeit von Dautzenberg et al., in der Konstrukte aus Chondrozyten-Polymeren hierin verkapselt wurden (Sittinger, Lukanoff, Burmester, & Dautzenberg, 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Verkapselungssystem aus PolyDADMAC und Alginat verwendet.

2.2.2.2. Dextran-CD Hydrogel

Dextrane sind verzweigte Polysaccharide, bestehend aus dem Monomer Glucose, welche aus Bakterien gewonnen werden können. Dextran-CD-Hydrogele (CD = *cell degradable*) werden von der Firma Cellendes vertrieben. Sie bestehen aus einem Maleimid-funktionalisiertem Dextran-Polymer und einem Thiol-funktionalisiertem *Crosslinker* (CL). Das Polymer hat den

Einleitung

Vorteil, dass es durch das Enzym Dextranase degradiert werden kann. Das Polymer ist zellinert, so dass die Zellen nicht an dieses binden können (Nuttelman, Mortisen, Henry, & Anseth, 2001). Der CL besteht vornehmlich aus PEG, das endständig über zwei Thiolgruppen verfügt. Außerdem beinhaltet der CL eine Peptid-Sequenz, welches eine Bindungsstelle für Matrixmetalloproteasen (MMPs) darstellt. Diese Bindungsstelle sorgt dafür, dass die Zellen durch ihre selber gebildeten MMPs Platz für neuen Wachstumsraum schaffen können. Das Gel ist demnach degradierbar (*cell-degradable* = CD). Die chemische Reaktion zur Bildung des Hydrogels läuft über die Bildung einer Thioetherbindung zwischen den SH-Gruppe des PEG und der Maleimid-Funktion des Dextrans unter physiologischen Bedingungen. Die Reaktion ist pH-abhängig und kann so gesteuert werden. Dem Gel können zusätzlich Bindungsliganden in Form von RGD-Peptiden zugesetzt werden, die ebenfalls kovalent an das Dextran-*Backbone* gebunden werden, um die Anheftung adhärent wachsender Zellen zu gewährleisten. Die Bindung erfolgt über eine Thiol-Funktion, die über Cystein dem Peptid angehängt wird. Außerdem können dem System noch weitere Matrix-Proteine zugefügt werden. Rimann et al. haben einen automatisierten Prozess zur Zellkultivierung in Dextran-basierten Hydrogelen entwickelt, in dem sie humane Dickdarmkrebszellen in den Gelen wachsen ließen (Rimann, Angres, Patocchi-Tenzer, Braum, & Graf-Hausner, 2014)

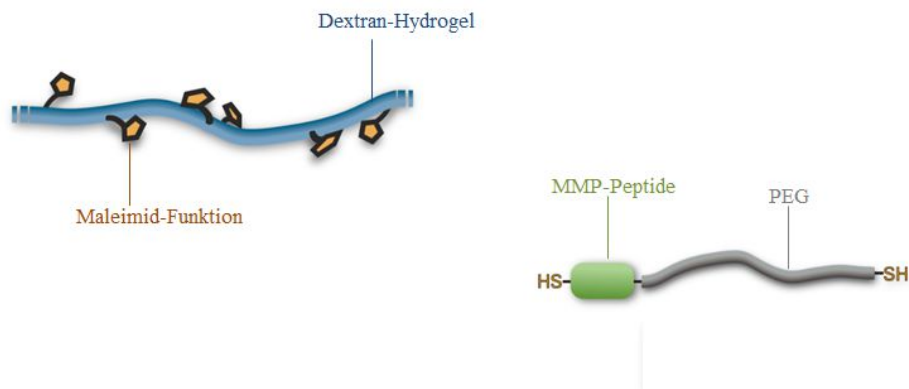


Abbildung 10: Dextranbasiertes Hydrogel der Firma Cellendes. Dargestellt sind die Bausteine zur Herstellung eines Hydrogels. Hauptbestandteil ist ein Dextran-Polymer, welches mit Maleimid-Gruppen funktionalisiert wurde. Die Verlinkung der Polymerketten erfolgt über die Maleimid-Funktionen mit den Thiol-Gruppen des Linker-Moleküls. Der Linker besteht vornehmlich aus PEG, beinhaltet aber zusätzlich MMP-Peptid-Schnittstellen, die von den zelleigenen MMPs abgebaut werden können (Cellendes, 2012).

2.3. Bioreaktoren

Ideale Reaktoren werden je nach Betriebsweise in diskontinuierlichen Batch-Betrieb (Rührkesselreaktor) oder kontinuierlich betriebene Reaktoren (Rührkessel, Strömungsrohr) unterschieden. Der Rührkesselreaktor (*stirred tank reactor*, STR) ist mit einem Einsatz von 95 % der am meisten verwendete Reaktor. Beim idealen STR sind an allen Orten im Reaktor die gleichen Edukt-/Produktkonzentrationen und physikalischen Bedingungen. Dieses Reaktorsystem wird z.B. für Flüssigkeiten oder Lösungen verwendet (Chmiel, 2011), sowie sogenannte Einweg-"bag"-Reaktoren, die mittels "wave"-Durchmischung betrieben werden.

Ein Bioreaktor (Fermenter) wird als abgegrenzter Raum verstanden, in dem es durch Anwesenheit verschiedener Komponenten zur Stoffumsetzung der selbigen kommt. Hierbei muss eine homogene Mischung im gesamten Reaktorraum gewährleistet sein, damit es nicht zu lokalen Unterschieden an z.B. Nährstoffen, *waste*-Produkten der Zellen, Temperatur oder Gasmolekülen kommt. Für jede spezifische Fragestellung müssen diesbezüglich die Prozessparameter optimiert und der geeignete Bioreaktor ausgewählt werden. Neben den STR, gibt es außerdem Vibrationsmischer, Schlaufenreaktoren (SR), Wirbelschichtreaktoren, Festbett- und Membranbioreaktoren (Chmiel, 2011). Für die Kultivierung von Zellen wird je nach Art des Zellwachstums (Suspension, adhärent wachsend) das Reaktorsystem angepasst. Bei der Kultur im STR ist darauf zu achten, dass eine mögliche physikalische Schädigung der scherempfindlichen Zellen ausgeschlossen wird, Konzentrationsgefälle durch schlechte Mischungen verhindert werden und eine möglichst optimale Durchmischung von Gas- und Flüssigphase erreicht wird (Marks, 2003). Bei Wirbelschichtreaktoren beispielsweise werden Zellen als Aggregate oder in porösen Partikeln durch Einströmung mit Nährmedium in der Schwebe gehalten. Ein Beispiel hierfür ist die Verwendung eines Verax[®]-Reaktors, in dem Runstadler et al. Zellen in Kollagen kultivierten (Runstadler et al., 1990). Eine weitere Kultivierungsform findet im Festbettreaktor statt. Hierbei werden Zellen auf Trägermaterialien kultiviert und der Reaktor mit Nährmedien durchströmt. Beispiele für Festbettreaktoren sind die von der Firma Zellwerk vertriebenen Reaktorsysteme.

Die Kultivierung von Zellen in Bioreaktoren kann als *batch*, *fed-batch* oder kontinuierlich betrieben werden (Chmiel, 2011). Im *batch*-Betrieb werden alle Komponenten, die zur Kultivierung notwendig sind, vorgelegt und bis zum Ende der Kultivierung nicht mehr verändert. Durch seine kontaminationsarme Prozessführung wird diese Art der Kultivierung

Einleitung

vielfach eingesetzt. Beim *fed-batch*-Betrieb werden während der gesamten Kultivierung bestimmte Nährmedien zugeführt, sodass eine längere Kultivierung durch Zugabe neuer Nährstoffe und Minimierung wachstumslimitierender Faktoren erreicht wird. Beim kontinuierlichem Prozess werden sowohl frisches Nährmedium zu- und verstoffwechselte Medien abgeführt. Das Volumen und die Bedingungen im Reaktor bleiben hierbei konstant (Chmiel, 2011). Die meisten Bioreaktoren für die Zellvermehrung werden als *fed-batch*-Reaktoren betrieben.

Die Inokulation des Reaktors mit Zellen stellt eine große Herausforderung dar, da dieser Schritt sehr anfällig für Kontaminationen ist. Die Zellen beginnen nach dem Animpfen exponentiell zu wachsen und gehen in eine stationäre Phase über, nachdem es zu Limitierungen (Nährstoffe, Wachstumsfläche etc.) gekommen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein optimierter und anwendungsangepasster kontinuierlicher STR verwendet (siehe 4.5).

3. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit verfolgt zwei Ziele: Erstens, die Suche und Erforschung eines geeigneten Hydrogels für die Vermehrung adhärent wachsender Zellen. Hierbei muss deutlich unterschieden werden, zwischen der 3D-Zellkultur zum Nachbilden von Geweben und der 3D-Zellkultur für eine effiziente Kultivierung der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf letzteres fokussiert. Das eingesetzte Hydrogel sollte folgende Eigenschaften aufweisen:

1. Biokompatible Vernetzung in Gegenwart von Zellen
2. Die Zellen sind im Gel vital und vermehrungsfähig
3. Das Material muss unter physiologischen Bedingungen abbaubar sein

Im Rahmen dieser Arbeit werden sowohl synthetische Materialien, als auch Biomaterialien verwendet.

Im zweiten Teil der Arbeit soll basierend auf dem gefundenem Hydrogel ein Kapsel-Bioreaktorsystem entwickelt werden, mit welchem die verkapselten Zellen kultiviert werden können. Die Vorteile eines solchen Systems sind unter anderem: Einfache Inokulation und Ernte der Zellen, kleine initiale Zellzahl und mechanischer Schutz vor Scher- und Prallkräften während des Kultivierungsprozesses.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Firma
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC·HCl)	Roth, Deutschland
1-Hydroxybenzotriazol-Hydrat (HOBt)	Roth, Deutschland
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Deutschland, Deutschland
3-D Life Dextran-CD Hydrogel Kit	Cellendes, Deutschland
3-D Life RGD Peptide	Cellendes, Deutschland
Alcianblau 8GX	Sigma-Aldrich, Deutschland
Alginat (High <i>Molecular weight</i> (MW))	Sigma-Aldrich, Deutschland, Deutschland
Alginat (low MW)	Sigma-Aldrich, Deutschland, Deutschland
Amphotericin	Lonza, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Gibco, Deutschland
Di-Natriumhydrogencarbonat	Roth, Deutschland
Di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Roth, Deutschland
D-Mannitol	Merk Millipore, Deutschland
Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Gibco, Deutschland
Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i> (DMEM), solid	Sigma-Aldrich, Deutschland, Deutschland
Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Gibco, Deutschland
Eosin G	Roth, Deutschland
Essigsäure	Roth, Deutschland
Ethanol	Roth, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Deutschland
Euparal	Roth, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Österreich
Fibrinogen	Calbiochem, Deutschland
Fluorescindiacetat (FDA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Gelatine (Rinderhaut Typ A, 225 Bloom)	Hahn, Deutschland
Gelatine (Rinderhaut Typ B, 225 Bloom)	Hahn, Deutschland
Gelatine (Schweinehaut Typ A, 300 Bloom)	Sigma-Aldrich, Deutschland, Deutschland
Gelatine (Schweinehaut Typ A, 90-110 Bloom)	Sigma-Aldrich, Deutschland, Deutschland

Material und Methoden

Gelatine-Hydrolysat Solugel 5000	PB Gelatins, Deutschland
Gelatine-Hydrolysat Solugel P/400	PB Gelatins, Deutschland
Gentamycin	Biochrom, Deutschland
Glycerin	Biochrom, Deutschland
Glycin	Biomol, Deutschland
Hämalaun (Mayer)	Roth, Deutschland
Hämatoxylin	Medite, Deutschland
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Roth, Deutschland
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Roth, Deutschland
HOECHST 33342	Invitrogen, USA
L-Arginin-Monohydrochlorid	Roth, Deutschland
LIVE/DEAD Fixable Far Red Dead Cell Stain Kit	Molecular Probes-Life technologies, Deutschland
Maulbeerseide (<i>Bombyx mori</i>)	AG Materials, Deutschland
Methanol	Roth, Deutschland
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Deutschland
N-Hydroxysulfosuccinimidnatriumsalz (sulfo-NHS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Novatach MVG GRGDSP	FMC BioPolymer AS d/b/a NovaMatrix, Norwegen
Paraffin	Thermo Scientific, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich
Periodsäure (1 %)	Roth, Deutschland
Polyamid (2200, 3200 Glaskugelgefüllt (GF))	EOS, Deutschland
Polydiallyldimethylammoniumchlorid (35 %) (PolyDADMAC)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Puramatrix	BD Bioscience, Deutschland
Reagenz A (Lysepuffer)	Chemometec, Dänemark
Reagenz B (Stabilisierungspuffer)	Chemometec, Dänemark
Resorcin-Fuchsin-Lösung	Roth, Deutschland
<i>RNeasy Plus Mini Kit</i>	Qiagen, Deutschland
Salzsäure	Roth, Deutschland
Schiff'sches Reagenz	Roth, Deutschland
Sucrose	Roth, Deutschland
Thrombin	Calbiochem, Deutschland
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Holland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth, Deutschland
Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Österreich
Tussahseide (<i>Anthereae pernyi</i>)	AG Materials, Deutschland
Wolframtophosphorsäure (<i>Phosphotungstic acid</i> , PTA)	Roth, Deutschland

Xylol	Roth, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland

4.1.2. Verbrauchsmittel

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmittel.

Verbrauchsmittel	Firma
Alufolie	Roth, Deutschland
CoolCell-Box	Biocision, USA
Deckgläser	Thermo Scientific, USA
Dialyseklammern	Roth, Deutschland
Dialyseschlauch (<i>Molecular weight cut-off</i> (MWCO): 3500,50000)	Roth, Deutschland
Falkons (15/50 ml)	Sarstedt, Deutschland
Gazefilter	Lechleiter, Deutschland
Hydrophobe Zellkulturplastik	Eppendorf, Deutschland
Kanülen	Braun, Deutschland
Klinge Gefriermikrotom C35 Type	Feather, Japan
Kryoröhrchen 20	TPP, Schweiz
Multiwell-Zellkulturplatten (6, 12, 24, 96)	Techno Plastic Products, Schweiz
Multiwellplatten (schwarz, 96-Well)	Greiner bio-one, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße (Eppis)	Sarstedt, Deutschland
Serologische Pipetten	BD Biosciences, Deutschland
Spritze (1/5/50 ml)	Braun, Deutschland
SuperFrost plus-Objektträger	Menzel, Deutschland
Zellkammer Cellometer	Peqlab Biotechnology, Deutschland
Zellkulturflaschen (25/75/150 cm ²)	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten (96-,24-Well)	TPP, Schweiz

4.1.3. Geräte

Tabelle 4: Verwendete Geräte.

Geräte	Firma
Äkta Purifier 10	GE Healthcare Life Science, Deutschland
Analysewaagen	Sartorius, Deutschland
Bechergläser (Glas)	Schott Duran, Deutschland
Bechergläser (Plastik)	VWR, Deutschland
Brutschrank	Binder, Deutschland

Material und Methoden

Cellometer Vision	Peqlab Biotechnology, Deutschland
ClarioStar	BMG Labtech, Deutschland
CoolCell®	Biocision, USA
DASbox	Dasgip, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axiovert 40 C	Zeiss, Deutschland
Durchlichtmikroskop Axiovert A1	Zeiss, Deutschland
Elektronenmikroskop EVO MA 35	
Entwässerungsautomat Microm STP 120	Thermo Scientific, USA
Färbeautomat Leica ST 5020	Leica, Deutschland
Gefriermikrotom Microm HM 560	Thermo Scientific, USA
Gefriertrockner VaCo 2-II E	Zirbus, Deutschland
Konfokal-Mikroskop 710	Zeiss, Deutschland
Kühlschrank (4, -20 Grad)	Liebherr, Deutschland
Magnetrührer RTC Basic	IKA, Deutschland
Nanodrop-Spektrophotometer NanoDrop 1000	PaqLab, Deutschland
NMR-Spektrometer mit Kryo-Probenkopf CP-TCI 500	Bruker Avance, Deutschland
Nukleinsäureaufreinigungsroboter QIAcube	Qiagen, Deutschland
Paraffineinbettungsautomat Microm EC 3502 T	Thermo Scientific, USA
pH-Meter Lab 850	Schott Instruments,
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Röntgenmikroskop Versa 510	Zeiss, Deutschland
Rührfisch	Roth, Deutschland
Sonotrode	Bandelin Sonopuls, Deutschland
Time-lapse Mikroskop Olympus IX81	Zeiss, Deutschland
Ultraschallbad	Elma, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Deutschland
Werkbank	Kojair, Finnland
YSI 2700 Select	Kreienbaum, Deutschland
Zentrifuge 8504 R	Eppendorf, Deutschland

4.1.4. Software

Tabelle 5: Verwendete Software.

Software	Firma
AxioVision Rel. 4.8	Zeiss, Deutschland
CS Chem Draw Pro	CambridgeSoft Corporation, USA
Mars 5.20R2, Version 1.12	BMG labtech, Deutschland
Mendeley Desktop, Version 1.11	Mendeley, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Deutschland
SigmaPlot 10.0.1.25	Systat, USA
Topsin 3.1	Bruker, Deutschland

Material und Methoden

Unicorn 5.11	GE Healthcare Life Science, Deutschland
TXM3CViewer	Zeiss, Deutschland
XMReconstructor-Come Beam-10	Zeiss, Deutschland

4.1.5. Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden adhärent wachsende Stammzellen aus dem exokrinen Teil des Pankreas adulter Ratten (*pancreatic stem cells*, PSCs) verwendet (Kruse et al., 2006). Diese Zelllinie ist besonders robust und hat eine hohe Proliferationsrate. Für die Genomchipanalyse wurden Pankreaszellen aus der Maus verwendet (Frahm, 2015).

4.1.6. Medien

10 % DMEM	DMEM 10 % (v/v) FKS 1 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin
10 % DMEM+Ca	0,5 oder 0,1 % (w/v) Calciumchlorid-Dihydrat Ad A. dest. (<i>Aqua destillata</i>)
Einfriermedium	10 % (v/v) Dimethylsulfoxid 90 % (v/v) FKS

4.1.7. Lösungen

Alcianblau	1 % (w/v) Alcianblau 3 % (v/v) Essigsäure (konz.) pH = 2,5 Ad A. dest.
Alginate (low MW)	2 % (w/v) Alginate (low MW) Ad 10 % DMEM

Material und Methoden

Alginate (high MW)	2 % (w/v) Alginate (high MW) Ad A. dest.
Calciumchlorid	2 % (w/v) Calciumchlorid-Dihydrat Ad A. dest. oder 10 % DMEM
10X CB-Puffer	1 g/l Glucose 0,05 mol/l HEPES 5 mmol/l Kaliumchlorid 0,01 mol/l Natriumchlorid 0,02 mol/l Natriumdihydrogenphosphat 0,02 g/l Phenolrot
Eosin	1 % (v/v) Eosin 0,5 µl konz. Essigsäure Ad 1 ml A. dest.
FDA/PI	8 µg FDA (5 mg/ml in Aceton) 10 µg PI (2 mg/ml in A. dest.) 1 ml DMEM
Fibrinogen-Puffer	4,5 g Glycin 1,5 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 3,5 g Natriumchlorid 0,08 g Calciumchlorid-Dihydrat 10 g L-Arginin-Monohydrochlorid Ad 500 ml A. dest.
Hämalaun (Mayer)	1g Hämatoxilin 0,2 g Natriumjodat 50 g Kalialaun

Material und Methoden

	50 g Chloradhydrat 1 g Zitronensäure Ad 1 l A. dest.
HOECHST	0,1 mg HOECHST 1 ml 10 % DMEM
MES	0,2 M MES 0,3 M Natriumchlorid pH = 6,5 Ad A. dest.
NaHCO ₃	0,1 M NaHCO ₃ pH = 8,5 Ad A. dest.
Novatachlösung	1,25 % (w/v) Novatach Ad 10 % DMEM
PBS	138 mM Natriumchlorid 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat 2,7 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
PFA+Ca ²⁺	4 % (w/v) PFA 10 % (w/v) Sucrose 2 % (w/v) Calciumchlorid-Dihydrat Ad A. dest.
PI	2 mg PI 1 ml A. dest.
PTA	1 % (w/v) PTA

Material und Methoden

	Ad A. dest.
Pikrofuchsinlösung	1 g Pikrofuchsin 16,6 g Pikrinsäure 1 l A. dest.
PolyDADMAC-Lösung	1 % (w/v) PolyDADMAC Ad A. dest.
Puramatrixlösung	1 % (w/v) Puramatrix Ad A. dest.
SDS	10 % (w/v) SDS Ad A. dest
20 % Sucroselösung	20 % (w/v) Sucrose Ad A. dest
10 % Sucroselösung	10 % (w/v) Sucrose Ad A. dest
Thrombinpuffer	10 g D-Mannitol 3 g Natriumchlorid 0,84 g Natriumacetat 3 g Calciumchlorid-Dihydrat 3 g FKS Ad 500 ml A. dest.
TNBS	5 % (v/v) TNBS Ad Methanol
10x Trypsin-EDTA	5 mg/ml Trypsin 2,2 mg/ml EDTA

Material und Methoden

Ad PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)

1x Trypsin-EDTA 1 % (v/v) 10x Trypsin-EDTA
 9 % (v/v) PBS

Weigert A 20 g Hämatoxilin-Monohydrat
 1 l A. dest.

Weigert B 5 g Eisennitrat
 11,2 g Salzsäure (25 %)
 1 l A. dest.

4.2. Methoden

4.2.1. Allgemeine Methoden der Zellkultur

4.2.1.1. Subkultivierung

Die Zellen wurden in 10 % DMEM kultiviert. Waren die Zellen konfluent gewachsen, erfolgte eine Subkultivierung. Hierfür wurde das Kultivierungsmedium von den Zellen entfernt und einmal mit PBS gespült. Anschließend wurde je nach Kultivierungsgefäß eine geeignete Menge (so dass der Zellrasen vollständig bedeckt war) 1x Trypsin auf die Zellen gegeben und bei 37 °C im Brutschrank für zwei Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen durch leichtes Klopfen an das Kultivierungsgefäß. Das Enzym wurde durch die Zugabe der doppelten Menge 10 % DMEM inhibiert. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml-Falkon wurde dieses bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 180 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend von dem Pellet entfernt und die Zellen in 10 % DMEM resuspendiert und in ein geeignetes Kultivierungsgefäß überführt.

4.2.1.2. Kryokonservierung

Sollten die konfluent gewachsenen Zellen kryokonserviert werden, wurden diese wie bei der Subkultivierung beschrieben (4.2.1.1) abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriermedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und in einer CoolCell[®]-Box mit

einer kontrollierten Abkühlrate von 1 °C/Minute bei -80 °C für mindestens 24 h gelagert und anschließend in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -159°C langzeitgelagert.

4.2.1.3. Auftauen kryokonservierter Zellen

Sollten kryokonservierte Zellen erneut in Kultur genommen werden, wurden diese bei 37 °C aufgetaut und mit 10 % DMEM versetzt. Um das Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für fünf Minuten bei 180 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in dem entsprechenden Volumen 10 % DMEM resuspendiert und in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt.

4.2.1.4. Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe des Cellometers der Firma Peqlab Biotechnology, welches in der Lage ist, fluoreszierende Zellkerne zu detektieren und auszuzählen. Hierfür wurden 50 µl resuspendierter Zellen mit 50 µl Reagenz A (Lysepuffer) versetzt, um die Kerne der Zellen zugänglich zu machen. Es folgte die Zugabe von 50 µl Reagenz B (Stabilisierungspuffer). Anschließend wurden 0,5 µl Propidiumiodid zur Anfärbung der Zellkerne zu der Suspension gegeben. 20 µl dieser Färbelösung wurden nun in die Zählkammer gegeben und mit Hilfe des Cellometers detektiert und mit einer internen Software ausgezählt.

4.2.1.5. Glucose-und Lactatwertbestimmung

Die Analyse der Stoffwechselaktivität der Zellen erfolgte mit Hilfe des Gerätes YSI 2700 Select der Firma Kreienbaum. An zwei Membranen ist entweder das Enzym Glucose- oder Lactat-Oxidase immobilisiert. Die Enzyme katalysieren die Verstoffwechslung von Glucose (1) und Lactat (2), dabei entsteht Wasserstoffperoxid. Dieses wird an einer Anode umgesetzt, der entstehende Strom kann gemessen und auf die Konzentration von Glucose bzw. Lactat zurückgeschlossen werden (siehe Abbildung 11).

Material und Methoden

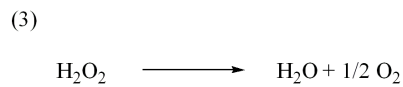
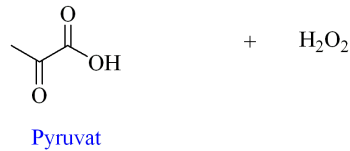
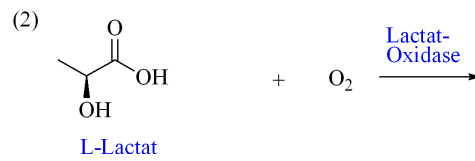
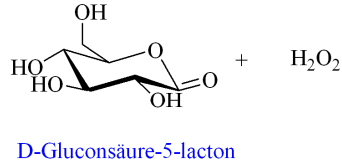
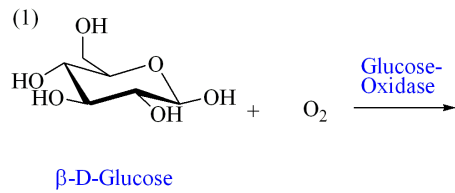


Abbildung 11: Umsetzung von Glucose und Lactat mittels Glucose- und Lactat-Oxidase. In Reaktion (1) ist die Umsetzung von $\beta\text{-D-Glucose}$ und Sauerstoff zu D-Gluconsäure-5-lacton und Wasserstoffperoxid unter Zuhilfenahme des entsprechenden Enzyms dargestellt. Analog dazu ist in Reaktion (2) die Umwandlung von L-Lactat und Sauerstoff zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid mit Hilfe der Lactat-Oxidase gezeigt. Das Wasserstoffperoxid kann anschließend weiter oxidiert (Reaktion (3)), der resultierende Strom gemessen und daraus die Konzentration der Edukte bestimmt werden.

Für die Bestimmung der Glucose- und Lactatwerte wurde den zu untersuchenden Proben je $50 \mu\text{l}$ aus dem Kultivierungsmedium entnommen und am YSI vermessen. Die Proben wurden jeweils auf Medium ohne Zellen normiert.

4.3. Matrixmaterialien/Hydrogele

4.3.1. Fibrin

4.3.1.1. Verkapselung von Zellen in einem Fibrin-Hydrogel

Zur Herstellung von Gelen aus Fibrin wurden Thrombin und Fibrinogen der Firma Calbiochem verwendet. Fibrinogen wurde in dem entsprechenden Fibrinogen-Puffer verdünnt (25 mg/ml) und Thrombin in Thrombin-Puffer (35 U/ml). Die zu verkapselnden Zellen (PSCs) wurden wie in 4.2.1.1 beschrieben vorbereitet und eine Zellzahl von 10^6 Z/ml mit dem Thrombinpuffer eingestellt. Der Zellsuspension wurde anschließend Thrombin zugefügt und gemischt. Je 5 μ l der Zellsuspension wurden auf eine hydrophobe Oberfläche gegeben und mit je 5 μ l der Fibrinogenlösung gemischt. Die Polymerisation erfolgte bei 37 °C für 1 h im Brutschrank. Anschließend wurden die Gele in 12-Multiwells überführt und mit je 1 ml 10 % DMEM überschichtet.

4.3.1.2. Verkapselung von Zellen in einem Fibrin/Seiden-Hydrogel

Für ein Gel aus Fibrin und Seide wurde zunächst analog zu der Verkapselung von Zellen (PSCs) in einem Fibrin-Hydrogel (4.3.1.1) verfahren. Es wurde zusätzlich sterile Seidenlösung (*Bombyx mori*) wie in 4.3.2.2 beschrieben sonifiziert und je 100 μ l Seidenlösung mit 100 μ l Zellsuspension versetzt. Die weitere Gelherstellung erfolgte wie in 4.3.2.2 beschrieben.

4.3.2. Seide

Die Seidenlösung aus Maulbeerseide wurde von der Firma AG Materials bezogen. Zur Sterilisierung der Lösung wurde diese für 15 Minuten bei 90 °C im Wasserbad erhitzt.

4.3.2.1. Seidenzugabe ins Nährmedium

Um den Einfluss der Seide auf die Zellproliferation zu untersuchen wurde dem Kultivierungsmedium 1 bzw. 2 % (v/v) Seidenlösung (*Bombyx mori*) zugegeben. Hierzu wurden die Zellen (PSCs) zunächst, wie in 4.2.1.1 beschrieben, enzymatisch von dem

entsprechenden Zellkulturgefäß gelöst und in 12-Multiwells mit 10 % DMEM oder 10 % DMEM + Seide kultiviert. Um die Stoffwechselaktivität der Zellen zu analysieren wurden wie in 4.2.1.5 beschrieben, die Glucose- und Lactatgehalte der Medien analysiert. Außerdem wurden, wie in 4.2.1.4 beschrieben, die Zellzahlen bestimmt.

4.3.2.2. Verkapselung von Zellen in einem Seidengel aus *Bombxy mori*

Für die Verkapselung von Zellen (PSCs) in Seidengelen wurde die Seidenlösung nach dem Sterilisieren mit pulverförmigem DMEM (0,0135 g/ml) und NaHCO₃ (0,0037 g/ml) versetzt. Die zu verkapselnden Zellen wurden, wie in 4.2.1.1 beschrieben, enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und mit der gewünschten Zellzahl ($5 \cdot 10^7$ Z/ml) in 10 % DMEM resuspendiert. 1 ml Seidenlösung wurden anschließend mit Hilfe einer Sonotrode für 20 Sekunden und mit 30 % Ultraschallleistung sonifiziert (Wang et al., 2008). Es wurden dann 100 µl FKS und 10 µl Zellsuspension zu der Seidenlösung gegeben und diese in ein geeignetes Zellkulturgefäß überführt. Nachdem die Gele ausgegärt waren, wurden diese mit 10 % DMEM mit Gentamycin (10 µg/ml) und Amphotericin (10 µg/ml) versetzt. Um die Geleigenschaften zusätzlich zu verbessern wurden der Seidenlösung (0,6-1,8 %) vor der Behandlung mit Ultraschall sowohl Gelatine (1-4 %), als auch Glycerin (8-28 %) zugesetzt.

4.3.2.3. Verkapselung von Zellaggregaten in einem Seidengel aus *Bombxy mori*

Die Zellaggregate wurden hergestellt, indem PSCs solange in einem Zellkulturgefäß kultiviert wurden, bis sich aus einem *Monolayer* die entsprechenden Aggregate durch dreidimensionales Wachstum gebildet hatten. Einer Seidenlösung mit Gelatine- und Glycerinzusatz wurde wie in 4.3.2.2 beschrieben DMEM und NaHCO₃ zugesetzt und sonifiziert. Die Seidenlösung wurde zur Beschichtung von 12-Multiwellplatten und Verkapselung der Zellen verwendet. Für die Beschichtung wurde die Seidenlösung in die Multiwells gegeben und für 12 h bei 37 °C geliert.

Die Aggregate wurden mit einer Pipette (10-100 µl) vom Zellrasen gelöst und auf die beschichteten Multiwells überführt (je fünf Aggregate pro Well). Anschließend wurde die Seidenlösung, wie in 4.3.4.2 beschrieben, sonifiziert und auf die Zellen gegeben. Nachdem die Gele ausgegärt waren, wurden diese mit 10 % DMEM mit Gentamycin (10 µg/ml) und Amphotericin (10 µg/ml) versetzt.

4.3.2.4. Kultivierung von Zellen auf einem Seidenvlies aus *Antheraea pernyi*

Um die Eignung der Tussahseide auszutesten, wurde die Seide in Form von Vliesen verwendet. Das Vlies wurde auf die gewünschte Größe zugeschnitten und für 1 h bei 110 °C sterilisiert. Die Zellen (PSCs) wurden, wie in 4.2.1.1 beschrieben, enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und mit der gewünschten Zellzahl ($5 \cdot 10^7$ Z/ml) in 10 % DMEM mit Gentamycin (10 µg/ml) und Amphotericin (10 µg/ml) resuspendiert und auf die Vliese pipettiert.

Um die Besiedlung der Zellen auf dem Vlies zu optimieren, wurden diese (siehe 4.3.2.2) nach entsprechender Behandlung mit Ultraschall in Seidenlösung (*Bombyx mori*) resuspendiert und auf die Vliese gegeben.

Eine zweite Besiedlungshilfe bestand in der Verwendung von Gazefiltern. Hierzu wurden die Zellen, wie in 4.2.1.1 beschrieben, enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und mit der gewünschten Zellzahl ($4 \cdot 10^6$ Z/ml) in 10 % DMEM resuspendiert. Je 500 µl der Zellen wurden anschließend auf sterile Gazefilter in je 1 Well eines 6-Multiwells pipettiert und 5 h im Brutschrank inkubiert, damit die Zellen an die Gazefilter anhaften konnten. Anschließend wurde 10 % DMEM auf die Zellen gegeben. In 1 Well eines 6-Multiwells wurde ein steriles Tussahvlies gelegt, der besiedelte Gazefilter darauf gelegt und anschließend wieder ein Seidenvlies auf die Gazefilter aufgebracht. Um die Vliese und Filter zu befestigen, wurden entsprechend autoklavierte Plastikringe in die Multiwells gelegt. Nach 24 h Kultivierungsdauer wurden die Vliese und Filter zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen enzymatisch (siehe 4.2.1.1) von der Kultivierungsfläche gelöst und ausgezählt.

4.3.3. Alginat

Die Kultivierung von Zellen (PSCs) in Alginatgelen erfolgte unter Verwendung einer Polymerlösung (Alginsäurenatriumsalz) und einer Vernetzlerlösung (Calciumchlorid-Dihydrat).

4.3.3.1. Einflussuntersuchung von calciumhaltigen Nährmedium auf die Zellvitalität

Um auszutesten, ob die Zugabe von Calcium in das Nährmedium zur Stabilisierung der Alginatgele einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hat, wurden Zellen sowohl in 10 % DMEM mit und ohne Calciumzugabe (0-0,1 % (w/v)) kultiviert und hinsichtlich

Stoffwechselaktivität und Zellwachstum untersucht. Hierzu wurden die Zellen (siehe 4.2.1.1) enzymatisch vom Zellkulturgefäß abgelöst und die Zellzahl bestimmt bzw. eingestellt ($3 \cdot 10^6$ Z/ml). Die Zellen wurden sieben Tage kultiviert.

4.3.3.2. Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus Alginat und Beschichtungen aus Gelatine und –Hydrolysat (+Zugabe ins Nährmedium)

Um auszutesten, ob die Zellen prinzipiell auf Alginatgelen adhären und proliferieren können, wurden diese auf 2D-Gelschichten kultiviert. Hierzu wurden jeweils 50 µl der jeweiligen Alginatlösung in ein Multiwell einer 24-Multiwellplatte pipettiert und mit 2 % Calciumchloridlösung (10 % DMEM) versetzt. Nach 1 Minute wurden die Multiwells mit 500 µl 2 % Calciumchloridlösung (10 % DMEM) aufgefüllt und 15 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Anschließend konnten die Zellen (siehe 4.2.1.1) enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und in der entsprechenden Zellzahl auf die Gele aufgebracht werden. Kultiviert wurden die Zellen in 10 % DMEM+Ca²⁺ (0,5-0,1 % (w/v)).

Um auszutesten, ob die Zellen prinzipiell auf Beschichtungen aus Gelatine und –Hydrolysat wachsen können, wurden folgende Gelatine-Arten ausgetestet:

Tabelle 6: Verwendete Gelatine-Arten.

Gelatine	Firma
(A) Schweinehaut Typ, A, 90-110 Bloom	
(B) Schweinehaut Typ, A, 300 Bloom	Sigma-Aldrich
(C) Rinderhaut Typ, B, 225 Bloom	
(D) Rinderhaut Typ, A, 225 Bloom	Hahn
(E) Gelatine-Hydrolysat Solugel P/400	PB Gelatins
(F) Gelatine-Hydrolysat Solugel 5000	

Pro Gelatine-Art wurden die Oberflächen einer 24-Multiwellplatte mit 1-10 % (w/v) Gelatinelösung beschichtet und bei 37 °C für 30 Minuten gelagert. Die Zellen wurden wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und in der entsprechenden Zellzahl auf die Gele aufgebracht. Kultiviert wurden die Zellen in 10 % DMEM und 10 % DMEM +Ca²⁺ (0,5-0,1 % (w/v)).

Außerdem wurde der Einfluss von Gelatine-Hydrolysat-Zugabe im Nährmedium untersucht. Hierzu wurde in 10 % DMEM oder 10 % DMEM +Ca²⁺ (0,5-0,1 % (w/v)) 0,4 % (v/v) Gelatinelösung gegeben. In diesem Nährmedium wurden die Zellen wie vorher beschrieben kultiviert.

4.3.3.3. Verkapselung von Zellen in Alginathohlkapseln

Für die Verkapselung von Zellen in Alginatgelen wurden die Zellen, wie in 4.2.1.1 beschrieben, enzymatisch vom Zellkulturgefäß abgelöst und die Zellzahl bestimmt bzw. eingestellt ($3 \cdot 10^6$ Z/ml). Die Zellen wurden in 2 % Calciumchloridlösung resuspendiert und in eine Spritze oder Pipette überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die entsprechende Polymerlösung (2 % Alginatlösung) eingetrofft, wobei die Eintropfhöhe auf etwa 5 cm eingestellt wurde, die Kapseln wurden für 15 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Die so entstandenen Hohlkapseln wurden nach abgeschlossener Polymerisierung mit A. dest. gewaschen und in 10 % DMEM+Ca²⁺ überführt und kultiviert (Henning, 2009). Um die Geleigenschaften zusätzlich zu optimieren, wurde dem Alginat vor der Gelherstellung Gelatine (1-4 % (w/v)) beigemischt.

4.3.3.4. Verkapselung von Zellen in Alginatvollkapseln

Für die Verkapselung von Zellen in Alginatgelen wurden die Zellen, wie in 4.2.1.1 beschrieben, enzymatisch vom Zellkulturgefäß abgelöst und die Zellzahl bestimmt bzw. eingestellt ($3 \cdot 10^6$ Z/ml). Die Zellen wurden in 2 % Alginatlösung resuspendiert und in eine Spritze oder Pipette überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die entsprechende Vernetzerlösung (2 % Calciumchloridlösung) eingetrofft, wobei die Eintropfhöhe auf etwa 5 cm eingestellt wurde und für 15 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Die so entstandenen Vollkapseln wurden nach abgeschlossener Polymerisierung mit A. dest. gewaschen und in 10 % DMEM+Ca²⁺ überführt und kultiviert (Henning, 2009).

4.3.3.5. Degradierung von Alginatgelen

Zur Degradierung von Alginatgelen wurden Natriumcitrat und EDTA verwendet. Diese Komplexbildner entziehen den Alginatgelen das immobilisierte Calcium, so dass sich die Gele auflösen. Je nach Calciummenge wurde mit einer Endkonzentration im Medium

zwischen 0,05-0,15 M (Citrat) bzw. 0,1-0,2 M (EDTA) gearbeitet. Nach Zugabe der Degradierungslösung wurde 15-30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

4.3.3.6. Kupplungsreaktion von Alginat und Gelatine

Um das Alginat mit Gelatine bzw. Gelatine-Hydrolysat kovalent zu verbinden wurde eine wässrige Carbodiimid-Chemie verwendet (J A Rowley et al., 1999).

Zunächst wurden Alginat und Gelatine in dem entsprechenden Puffer unter Rühren gelöst. Anschließend wurden das Kupplungsreagenz, sowie das entsprechende Ko-Kupplungsreagenz zu dem Reaktionsgemisch gegeben. Die Edukte und Kupplungsreagenzien wurden wie in Tabelle 7 dargestellt variiert.

Tabelle 7: Verwendung verschiedener Edukte und Kupplungsreagenzien für die kovalente Verknüpfung von Alginat und Gelatine.

Edukte		Kupplungsreagenz	Ko-Kupplungsreagenz
Alginat	Gelatine		
Low MW	Gelatine (siehe Tabelle 6)	EDC	Sulfo-NHS
High MW	Gelatine-Hydrolysate (Solugel 5000, P/400) FKS	EDC·HCl	HOBT

Außerdem wurden die Verhältnisse der Edukte verändert und optimiert (Tabelle 8).

Tabelle 8: Eduktverhältnisse zur kovalenten Verknüpfung von Alginat und Gelatine.

Alginat:Gelatine Gewichts%	Alginat:EDC* Mol%	EDC:HOBT Mol%	EDC:sulfo- NHS Mol%
1:1	5:1	1:2	4:3
1:2	10:1	1:1	2:1
1:3	7:2		1:2
1:4	7:20		20:1
1:5			
1:6			
1:7			
1:8			

1:9
1:10
1:20
1:30
1:40
1:50

*bezogen auf das Alginat-Monomer

Im Laufe der Kupplungsversuche wurden die Versuchsbedingungen wie folgt variiert:

- Versuchstemperatur (0-25 °C)
- Puffer (A. dest oder MES)
- Reaktionsdauer (30 Min- 24 h)
- pH-Wert (neutral – basisch)

Die Reinigung des entstandenen Produktes erfolgte mit Hilfe einer Dialyse. Diese wurde ebenfalls in ihrer Dauer variiert (0-5 Tage) und gegen A. dest. mit 0,1 mmol EDTA durchgeführt. Der Puffer wurde zwei Mal am Tag gewechselt. Die verwendeten Dialyseschläuche besaßen *molecular weight cut-offs* (MWCO) von 3500 und 50000 Da. Die Trocknung erfolgte mit Hilfe einer Lyophilie. Anschließend wurden die modifizierten Alginat bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Um auszutesten, ob die Zellen auf oder in den Gelen anheften und proliferieren konnten, wurden die gefriergetrockneten Alginat in 10 % DMEM oder A. dest. gelöst.

4.3.3.6.1. Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus modifiziertem Alginat und Zugabe ins Nährmedium

Um auszutesten, ob die modifizierten Alginat einen negativen Einfluss auf die Zellanheftung und Proliferation hatten, wurden die Alginat dem Nährmedium zugesetzt oder Zellkulturgefäße zuvor mit diesen beschichtet. Zur Beschichtung wurden je 200 µl 2 % (w/v) Alginatlösung in 24-Multiwellplatten pipettiert und für 15 Minuten bei 37 °C beschichtet. Anschließend konnten die Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und in der entsprechenden Zellzahl auf die Gele aufgebracht werden. Kultiviert wurden

die Zellen in 10 % DMEM. Wie in 4.2.1.4 und 5 beschrieben, wurde die Zellvitalität der Zellen bestimmt.

Zusätzlich wurde einigen Alginatproben vor der Gelbildung NaHCO_3 (0,0037 g/ml) zugesetzt, um die Geleigenschaften für die Zellen zu verbessern.

4.3.3.6.2. Verkapselung von Zellen in Alginathohlkapseln

Für die Verkapselung von Zellen in modifizierten Alginatgelen wurden die Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß abgelöst und die Zellzahl bestimmt bzw. eingestellt ($3 \cdot 10^6$ Z/ml). Die Zellen wurden in 2 % Calciumchloridlösung resuspendiert und in eine Spritze oder Pipette überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die entsprechende Polymerlösung (2 % Alginatlösung) eingetrofft, wobei die Eintropfhöhe auf etwa 5 cm eingestellt wurde und für 15 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Die so entstandenen Hohlkapseln wurden nach abgeschlossener Polymerisierung mit A. dest. gewaschen und in 10 % DMEM+Ca²⁺ überführt und kultiviert.

4.3.3.6.3. Verkapselung von Zellen in Alginatvolkapseln

Für die Verkapselung von Zellen in modifizierten Alginatgelen wurden die Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß abgelöst und die Zellzahl bestimmt bzw. eingestellt ($3 \cdot 10^6$ Z/ml). Die Zellen wurden in 2 % Alginatlösung resuspendiert und in eine Spritze oder Pipette überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend in die entsprechende Vernetzerlösung (2 % Calciumchloridlösung) eingetrofft, wobei die Eintropfhöhe auf etwa 5 cm eingestellt wurde und für 15 Minuten bei 37 °C polymerisiert. Die so entstandenen Vollkapseln wurden nach abgeschlossener Polymerisierung mit A. dest. gewaschen und in 10 % DMEM+Ca²⁺ überführt und kultiviert.

4.3.3.6.4. Einfluss der Dialysedauer auf die Zellvitalität

Um auszutesten, ob die Dialysedauer zur Reinigung der modifizierten Alginatgelen einen Einfluss auf die Zellanheftung und Proliferation von PSCs hatten, wurden die null bis sieben Tage dialysierten Alginatgelen dem Nährmedium zugesetzt oder Zellkulturgefäße zuvor mit diesen beschichtet. Zur Beschichtung wurden je 200 µl 2 % (w/v) Alginatlösung in 24-Multiwellplatten pipettiert und für 15 Minuten bei 37 °C beschichtet. Anschließend konnten die Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und in der

entsprechenden Zellzahl auf die Gele aufgebracht werden. Kultiviert wurden die Zellen in 10 % DMEM.

Außerdem wurde der Einfluss von Alginat-Zugabe ins Nährmedium untersucht. Hierzu wurden in 10 % DMEM 0,4 % (v/v) Alginatlösung gegeben. In diesem Nährmedium wurden die Zellen wie vorher beschrieben kultiviert.

4.3.3.7. Verkapselung von Zellen in Alginat/Polyamid-Gelen

Um die Alginatgele mit möglichen Anheftungsstellen für die Zellen zu versehen, wurde den Gelen Polyamid-Pulver (PA 2200 und 3200 GF) der Korngröße 40-60 µm zugefügt. Hierzu wurden je 1 ml Alginat- und modifizierter Alginatlösung mit 10 mg PA-Pulver versetzt. Die weitere Durchführung erfolgte analog zu 4.3.3.2.

4.3.3.7.1. Einflussuntersuchung von PA-Zugabe ins Nährmedium

Zur Untersuchung, ob die Zugabe von PA in das Nährmedium zur Verbesserung der Alginatgele einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hat, wurden Zellen in 10 % DMEM+Ca²⁺ kultiviert und hinsichtlich der Stoffwechselaktivität untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß abgelöst und die Zellzahl bestimmt bzw. eingestellt ($3 \cdot 10^6$ Z/ml). Die Zellen wurden sieben Tage kultiviert.

4.3.3.8. Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus PolyDADMAC und Alginat

Um zu analysieren, ob die Zellen prinzipiell auf Alginatgelen mit PolyDADMAC adhären und proliferieren können, wurden diese auf 2D-Gelschichten kultiviert. Hierzu wurden jeweils 50 µl der jeweiligen Alginatlösung in ein Multiwell einer 24-Multiwellplatte pipettiert und mit 50 µl 2 % Calciumchloridlösung (10 % DMEM)/1 % (w/v) PolyDADMAC versetzt. Nach 1 Minute wurden die Multiwells mit 500 µl 2 % Calciumchloridlösung (10 % DMEM) aufgefüllt und 15 Minuten bei 37 ° C polymerisiert. Anschließend konnten die Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und in der entsprechenden Zellzahl auf die Gele aufgebracht werden. Kultiviert wurden die Zellen in 10 % DMEM+Ca²⁺ (0,1 % (w/v)).

4.3.4. Novatach (Peptid-gekoppelte Alginat)

4.3.4.1. Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus Novatach

Aus dem lyophilisierten Alginat Novatach MVG GRGDSP wurde mit 10 % DMEM eine 1,25 % (w/v) Lösung hergestellt. Je 50 μ l der Alginatlösung wurde mit je 50 μ l 2 % (w/v) Calciumlösung in einem Well einer 24-Multiwellplatte überschichtet und nach einer Minute mit je 500 μ l der Calciumlösung bedeckt. Nach 15 Minuten Gelierungszeit bei 37 °C wurden die Gele einmal mit A. dest. gewaschen und die entsprechenden Zellen (PSCs), wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst, zentrifugiert und in 10 % DMEM oder 10 % DMEM+Ca²⁺ (0,1 % (w/v)) resuspendiert und auf die Gele gegeben. Die Zellzahl betrug $3 \cdot 10^6$ Z/ml.

4.3.4.2. Verkapselung von Zellen in Novatach-Hohlkapseln

Aus dem lyophilisierten Alginat Novatach MVG GRGDSP wurde mit 10 % DMEM eine 1,25 % (w/v) Lösung hergestellt. Die zu verkapselnden Zellen (PSCs) wurden nach dem enzymatischen Ablösen (siehe 4.2.1.1) von dem jeweiligen Zellkulturgefäß und Zentrifugieren in 2 % (w/v) Calciumlösung (10 % DMEM) resuspendiert. Die Zellzahl betrug $3 \cdot 10^6$ Z/ml. 25 μ l der Zellsuspension wurden in Wells einer 96-Multiwellplatte mit je 50 μ l der Alginatlösung pipettiert und für 10 Minuten bei 37 °C gelagert. Die so entstandenen Kapseln wurden mit A. dest. gewaschen und in 10 % DMEM oder 10 % DMEM+Ca²⁺ (0,5 % (w/v)) kultiviert.

4.3.4.3. Verkapselung von Zellen in Novatach-Vollkapseln

Aus dem lyophilisierten Alginat Novatach MVG GRGDSP wurde mit 10 % DMEM eine 1,25 % (w/v) Lösung hergestellt. Die zu verkapselnden Zellen (PSCs) wurden nach dem enzymatischen Ablösen (siehe 4.2.1.1) von dem jeweiligen Zellkulturgefäß und Zentrifugieren in der Alginatlösung resuspendiert. Die Zellzahl betrug $3 \cdot 10^6$ Z/ml und die Alginatendkonzentration 0,63 % (w/v). Die Zellsuspension wurde in einer 2 % (w/v) Calciumlösung (10 % DMEM) aufgenommen und mit Hilfe einer Pipette (10-100 μ l) in die Alginatlösung eingetropf (n = 5). Nach einer Gelierungszeit von 10 Minuten bei 37 °C wurden die so entstandenen Kapseln mit A. dest. gewaschen und in 10 % DMEM oder 10 % DMEM+Ca²⁺ (0,5 % (w/v)) kultiviert.

4.3.4.4. Degradierung von Novatach-Vollkapseln

Um die Vollkapseln wieder zu degradieren, wurden diese in einer 0,05 M Citratlösung (10 % DMEM) für 10 Minuten inkubiert und anschließend mechanisch mit einer Pipette durch Auf- und Abpipettieren vollständig degradiert. Die Zellen (PSCs) wurden bei 180 g zentrifugiert, in 10 % DMEM resuspendiert und in dem entsprechenden Zellkulturgefäß wieder ausgesät.

4.3.5. Puramatrix

4.3.5.1. Verkapselung von Zellen in Puramatrix-Hydrogelen

Die 1 % (w/v) Puramatrixlösung (10 mg/ml) der Firma BD Bioscience wurde vor jeder Verwendung für 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend bei 180 g für eine Minute zentrifugiert, um die Viskosität zu erniedrigen und entstandene Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurde die gewünschte Konzentration (5 bzw. 2,5 mg/ml) mit 20 % (w/v) sterilfiltrierter Sucroselösung eingestellt. Die zu verkapselnden Zellen (PSCs) wurden wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch vom Zellkulturgefäß gelöst und nach dem Zentrifugieren in 10 % (w/v) Sucroselösung resuspendiert. Es wurde die doppelte Zellzahl der Endkonzentration eingestellt (Endkonzentration: $1 \cdot 10^6$ Z/ml). Es folgte ein weiterer Waschschritt der Zellen mit 10 % (w/v) Sucroselösung. Anschließend wurden je 25 µl Puramatrix/Sucroselösung mit 25 µl Zellen/Sucrosesuspension gemischt und in ein Well einer 96-Multiwellplatte gegeben (n = 3). Die Gelbildung wurde durch Zugabe von 100 µl 10 % DMEM induziert, wobei das Medium langsam in das Well pipettiert wurde. Zur pH-Äquilibrierung wurden nach 30 und 50 Minuten 2/3 -3/4 des Mediums ersetzt. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Hydrogel kultiviert.

4.3.5.2. Verkapselung von Zellen in Puramatrix/Alginate-Hydrogelen

Um eine Gelmischung aus Puramatrix und Alginate herzustellen, wurden 50 µl 8 % (w/v) Alginatelösung (low MW) und 50 µl 1 % (w/v) Puramatrixlösung (10 mg/ml) zusammengegeben. Die Zellen (PSCs) wurden ebenfalls in 10 % (w/v) Sucroselösung resuspendiert (Endkonzentration: $1 \cdot 10^6$ Z/ml) und einmal mit der Sucroselösung gewaschen. 100 µl Puramatrix/Alginatelösung wurden mit 100 µl Zellen/Sucrose-Suspension gemischt. Die Gelbildung erfolgte auf drei Arten. Im ersten Fall (Eintropfen) wurden je 30 µl der

Gelierungsmasse in ein Well einer 24-Multiwellplatte ($n = 3$) mit $500 \mu\text{l}$ 2 % (w/v) Calciumchloridlösung eingetrofft. Im zweiten Fall (Überschichten) wurden je $30 \mu\text{l}$ der Gelierungsmasse in ein Well einer 24-Multiwellplatte ($n = 3$) pipettiert und mit $500 \mu\text{l}$ 2 % (w/v) Calciumchloridlösung überschichtet. Im dritten Fall wurden die Zellen nach dem Waschschrift in einer Mischung aus 20 % (w/v) Sucrose- und 1 % (w/v) Puramatrixlösung resuspendiert. In je drei Multiwells einer 24-Multiwellplatte wurden $25 \mu\text{l}$ einer 1 % (w/v) Alginatlösung (low/high MW) vorgelegt. Auf die Alginattropfen wurden anschließend je $25 \mu\text{l}$ der Zellsuspension gegeben, gemischt und nach einer Minute Wartezeit mit $500 \mu\text{l}$ 2 % (w/v) Calciumchloridlösung überschichtet. Bei allen drei Herstellungsarten wurde nach einer Gelierungszeit von 15 Minuten die entstandenen Gele in ein anderes Well mit $500 \mu\text{l}$ 10 % DMEM+Ca²⁺ (+ 0,05 % (w/v) Calciumchlorid) umgesetzt. Dem Kultivierungsmedium wurde Gentamycin ($10 \mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Die pH-Äquilibrierung und Medienwechsel erfolgten analog zu den Puramatrixgelen.

Zur Herstellung der Hohlkapseln aus Puramatrix-/Alginat-Mischungen wurden in Multiwells einer 24-Multiwellplatte ($n = 3$) $250 \mu\text{l}$ einer 8 % (w/v) Alginatlösung (low MW) mit $250 \mu\text{l}$ Puramatrixlösung gemischt, so dass die Endkonzentration des Alginats bei 4 % und der Puramatrixlösung bei 5 bzw. 2,5 mg/ml lag. Die Zellen wurden wie in 4.2.1.1 beschrieben enzymatisch abgelöst und in 10 % (w/v) Sucroselösung und 2 % (w/v) Calciumchloridlösung resuspendiert, einmal gewaschen und in dem gleichen Medium wieder aufgenommen. Je $25 \mu\text{l}$ ($n = 4$) der Zellsuspension wurden in die Multiwells mit der Puramatrix-/Alginatlösung eingetrofft und nach 15 Minuten in neue Wells mit je $500 \mu\text{l}$ 10 % DMEM+Ca²⁺ (+ 0,05 % (w/v) Calciumchlorid) überführt und kultiviert.

4.3.6. Dextran-CD-Hydrogel

4.3.6.1. Verkapselung von Zellen in einem Dextran-CD-Hydrogel

Bei der ersten Verwendung des dextranbasierten Hydrogelsystems wurden die einzelnen Komponenten wie in Tabelle 9 beschrieben nach den Angaben des Herstellers vorbereitet.

Tabelle 9: Vorbereitung der einzelnen Komponenten zur Herstellung des dextranbasierten Hydrogelsystems.

Komponente	Prozedur	Konzentration [mmol/l]
Mal-Dextran	Auf Raumtemperatur bringen Anzentrifugieren Mit 175µl A. dest. versetzen 5 Minuten auf Eis lagern Vortexen und anzentrifugieren	30
Crosslinker (CL)	Auf Raumtemperatur bringen Anzentrifugieren Mit 188 µl A. dest. versetzen 5 Minuten auf Eis lagern Vortexen und anzentrifugieren	20
Thioglycerol	Mit 402 µl A. dest. versetzen	3
CB-Puffer (pH=7,2)		
RGD-Peptide	Mit 322 µl A. dest. versetzen	3

Die zu verkapselnden Zellen (PSCs) wurden mit 10 % DMEM auf eine Konzentration von $3 \cdot 10^6$ Z/ml eingestellt. Die Verkapselung und Gelbildung erfolgte wie folgt:

- A. dest., CB-Puffer, Mal-Dextran (Volumen siehe Tabelle 10) zusammengeben und mischen
- RGD-Peptide und Thioglycerol (Volumen siehe Tabelle 10) hinzugeben und mischen
- 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- CL (Volumen siehe Tabelle 10) auf die Oberfläche eines geeigneten Zellkulturgefäßes geben
- Zellsuspension (Volumen siehe Tabelle 10) zu der Dextranmischung geben und mischen
- Gesamtes Volumen in eine Pipette aufnehmen und auf den vorgelegten CD-Link geben
- Inkubation über eine Minute

Tabelle 10: Mastermix zur Herstellung eines dextran-basierten Hydrogels.

Komponente	Volumen 1x (Mastermix) [μl]	Endkonzentration
A. dest.	1,5	
10x CB-Puffer	2,5	1x
Mal-Dextran	5	5 mmol/l
RGD-Peptide	5	0,5 mmol/l
Thioglycerol	5	0,5 mmol/l
Zellsuspension	5	5·10 ⁵ Z/ml
CL	6	4 mmol/l
	= 30	

Die auf diese Art hergestellten Gele wurden anschließend mit 10 % DMEM überschichtet und kultiviert. Zusätzlich wurden Dextran-Gele ohne Zugabe von RGD-Peptiden hergestellt. Das fehlende Volumen wurde durch Thioglycerol ersetzt.

4.3.6.2. Degradierung eines Dextran-CD-Hydrogels

Die Degradierung der Gele erfolgte mit Hilfe des Enzyms Detranase (350 U/ml) aus *Chaetomium gracile*, welches das Polymer Dextran abbaut. Das Gel wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und war anschließend degradiert. Die Zellen (PSCs) konnten nun für weitere Versuche verwendet werden.

4.3.6.3. Verkapselung von Zellen in einem Dextran-CD-Hydrogel mit Gelatine-Hydrolysat

Die Herstellung erfolgte analog zu der Verkapselung von Zellen in einem Dextran-CD-Hydrogel ohne Gelatine-Hydrolysat. Im Unterschied dazu wurde in diesem Fall statt der RGD-Peptide (siehe Tabelle 10) 5 μl 2 % (w/v) Hydrolysatlösung (Endkonzentration: 1 mM) zu dem Mastermix gegeben.

4.3.6.4. Aussaat von Zellen auf 2D-Gelschichten aus Dextran-CD mit Gelatine-Hydrolysat

Um auszutesten, ob die Zellen (PSCs) grundsätzlich auf Dextran-Gelen mit Gelatine-Hydrolysat adhären und proliferieren können, wurden diese auf 2D-Gelschichten ausgesät. Die Gele wurden wie in 4.3.6.1 beschrieben hergestellt, mit dem Unterschied, dass die Zellen nachträglich auf die Gele gegeben und nicht verkapselt wurden.

4.4. Analytische Methoden

4.4.1. Paraffin-Fixierung

Für die Paraffin-Fixierung wurden Zellen in Alginat wie in 4.3.3.3 und 4 beschrieben verkapselt. Die Kapseln wurden 1x mit A. dest. gewaschen und mit PFA+Ca²⁺ 1 h bei 4 °C fixiert. Das PFA wurde anschließend entfernt und die Kapseln für 10 Sekunden mit 1 % (w/v) Alcianblaulösung gefärbt und mit A. dest. gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit dem Entwässerungsautomaten Microm STP 120 entwässert und mit Hilfe des Paraffineinbettungsautomaten Microm EC 3502 T in Paraffin eingebettet. Mit dem Gefriermikrotom Microm HM 560 wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf *SuperFrost plus*-Objektträger überführt und bei Raumtemperatur gelagert wurden.

4.4.2. Kryofixierung

Für die Kryofixierung wurden Zellen in Fibrin wie in 4.3.1.1 und Zellen in Puramatrix-Gelen wie in 4.3.5.1 beschrieben verkapselt. Die Kapseln wurden 1x mit PBS gewaschen und mit PFA 1 h bei 4 °C fixiert. Das PFA wurde anschließend entfernt und die Kapseln für 10 Sekunden mit Eosin G gefärbt und mit PBS gewaschen. Des Weiteren wurden Zellen in Alginat wie in 4.3.3.3 und 4 und Zellen in Novatach-Gelen wie in 4.3.4.3 beschrieben verkapselt. Die Kapseln wurden 1x mit A. dest. gewaschen und mit PFA+Ca²⁺ 1 h bei 4 °C fixiert. Das PFA wurde anschließend entfernt und die Kapseln für 10 Sekunden mit Eosin G (Alginat) bzw. 1 % (w/v) Alcianblaulösung gefärbt und mit A. dest. gewaschen. Zellen in Dextran-CD-Gelen wurden wie in 4.3.1.1 beschrieben verkapselt und wie in 4.4.3.4 beschrieben mit HOECHST/FDA gefärbt. Die Kapseln wurden 1x mit A. dest. gewaschen und mit PFA 1 h bei 4 °C fixiert.

Anschließend wurden die Proben in Alu-Förmchen mit Tissue-Tek überführt. Das Tissue-Tek wurde bei -80 °C für mindestens 24 h durchgefroren. Mit dem Gefriermikrotom wurden 20 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf *SuperFrost plus*-Objektträger überführt und bei -20 °C gelagert wurden.

4.4.3. Färbungen

4.4.3.1. Van Gieson Färbung

Die Fibrin-Kryoschnitte sollten mit einer Van Gieson Färbung angefärbt werden. Diese Färbung wird zur Darstellung von elastischen Fasern verwendet und setzt sich aus einer Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert, sowie einer Pikrofuchsinlösung nach van Gieson zusammen. Kerne werden schwarz-braun und Kollagen sowie Bindegewebe rot angefärbt. Das Färbeprotokoll war wie folgt:

Tabelle 11: Van Gieson Färbeprotokoll.

Vorgang	Zeit [Minuten]
1x A. dest. spülen	1
Weigert A+B (1:1)	5
Bläuen mit fließendem Leitungswasser	10
Pikrofuchsinlösung	2
A. dest.	1
Ethanol (100 %)	1
Ethanol (100 %)	1
Ethanol (100 %)	1
Xylol	1

Die angefärbten Schnitte wurden mit Euparal eingedeckt. Die Färbung erfolgte am Färbeautomat Leica ST 5020. Die Proben wurden lichtmikroskopisch analysiert.

4.4.3.2. Far Red Färbung

Der Farbstoff Far Red bindet an extra- und intrazelluläre Amidgruppen. Der Farbstoff wurde 1:1000 in PBS verdünnt. In 1 ml Farbstofflösung wurden die Seidenvliese (4.3.2.4) überführt

und für 30 Minuten bei 5 °C unter Lichtausschluss gefärbt. Es folgten zwei Waschschriffe für je 5 Minuten mit PBS. Die Proben wurden am LSM untersucht. Die Anregung lag bei 633 nm und die Emission bei 660-680nm.

4.4.3.3. FDA/PI-Färbung

FDA ist membrangängig und färbt lebende Zellen an. Zelleigene Esterasen spalten Acetat von FDA unter Verwendung von Energie ab. Fluorescein leuchtet bei Verwendung des entsprechenden Lichtes grün. Die Anregungswellenlänge von FDA beträgt 490 nm und die Emission 515 nm. PI ist nicht membrangängig und interkaliert in die DNA (*Desoxyribonucleic acid*). Dies geschieht nur bei toten Zellen mit beschädigten Membranen. Unter Verwendung des entsprechenden Lichtes erscheinen die Zellkerne rot. Die Anregungswellenlänge von PI beträgt 535 nm und die Emission 617 nm.

Zu 5 ml Kultivierungsmedium ohne FKS und Antibiotikum wurden 8 µl FDA-Lösung (5 mg/ml in Aceton) gegeben. Anschließend wurden 25 µl PI-Lösung (2 mg/ml in A. dest.) hinzugegeben. Die Färbung wurde für die Zellen in modifizierten Alginatgelen (4.3.3.6.3), und den unmodifizierten Alginatgelen (4.3.3.4) verwendet. Hierzu wurde die Färbelösung auf die Gele gegeben und am Konfokal-Mikroskop (Alginat) mikroskopiert.

4.4.3.4. FDA/HOECHST-Färbung

Der Farbstoff HOECHST 33342 ist ein membrangängiges Molekül, welches DNA in lebenden und toten Zellen blau anfärben kann. Die Anregungswellenlänge von HOECHST betrug 495 nm und die Emission 519 nm.

Mit HOECHST/FDA sollten Zellen in Dextran-CD-Gelen gefärbt werden. Die Gele wurden wie in 4.3.6.1 beschrieben hergestellt und anschließend mit HOECHST (0,1 mg/ml in 10 % DMEM) für 30 Minuten bei 37 °C gefärbt. Anschließend wurden die Gele zwei Mal mit PBS und ein Mal mit A. dest. gewaschen. FDA ($8 \cdot 10^{-3}$ mg/ml in A. dest.) wurde danach auf die Gele gegeben, ein paar Sekunden inkubiert und wieder entfernt. Die Analyse erfolgte am Konfokal-Mikroskop.

Mit HOECHST/FDA wurden außerdem Zellen in modifizierten Alginat-Gelen gefärbt. Die Gele wurden wie in 4.3.3.6.2 und 3 beschrieben hergestellt und anschließend mit FDA ($8 \cdot 10^{-3}$ mg/ml in A. dest.) für ein paar Sekunden gefärbt und anschließend wieder entfernt.

HOECHST (0,1 mg/ml in 10 % DMEM) wurde für 30 Minuten bei 37 °C auf den Gelen gelassen und auch während des Mikroskopierens am Konfokal-Mikroskop nicht entfernt.

4.4.4. Mikroskopie

4.4.4.1. Raster-Elektronenmikroskopie (REM)

Die zu untersuchenden Proben wurden zunächst auf ein Deckgläschen (rund, 22 mm) aus Glas mittels *Dip-coating* aufgebracht. Hierzu wurden je zwei sterile Deckgläschen in ein 50 ml-Falkon mit 35 ml steriler Seidenlösung für 3 Minuten beschichtet und für mindestens 24 h bei 37 °C getrocknet. Die Proben wurden auf Aluminiumplättchen platziert und mit Gold besputtert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem Elektronenmikroskop (Zeiss EVO MA 25) am IFEM in Hamburg.

4.4.4.2. Zeitraffer-Mikroskopie (*time lapse*-Mikroskopie)

Für die *time lapse*-Mikroskopie wurden die zu untersuchenden Proben (4.3.4.2) mit dem *Time-lapse* Mikroskop Olympus IX81 mikroskopiert. Diese Mikroskopie besitzt den Vorteil, dass sich die Proben in einer Inkubationskammer befinden, in der 37°C und 5 % CO₂ herrschen. Die Beobachtungsdauer betrug vier bzw. fünf Tage. Während dieser Zeit wurde alle 30 Minuten eine Aufnahme gemacht. Der Positionsabstand betrug 5 µm.

4.4.4.3. Konfokal-Mikroskopie (*Laser-Scanning*-Mikroskopie LSM)

Mit der Konfokal-Mikroskopie wurden fluoreszenzgefärbte Proben mikroskopiert. Hierbei wurde die entsprechende Wellenlänge eingestellt. Ein Vorteil des LSM ist das Vorhandensein einer Lochblende im Strahlengang, wodurch Licht außerhalb der Schärfenebene blockiert wird. Es werden so Bilder mit hohem Kontrast und erhöhter Präzision erzeugt.

4.4.4.4. Röntgenmikroskopie (X-Ray-Mikroskopie)

Die X-Ray-Spektroskopie wurde verwendet, um Zellen in Hydrogelen hinsichtlich makroskopischer Gelbeschaffenheit und mikroskopischer Zellverteilung zu untersuchen. Die Aufnahmen wurden mit einem Xradia 510 Versa der Firma Zeiss gemacht. Die Rekonstruktion der Daten erfolgte mit der Software XMReconstructor-Come Beam-10 und die Darstellung der rekonstruierten Daten mit der Software TXM3DViewer 1.2.7. Bevor die

Proben analysiert werden konnten, wurden diese für 1 h bei Raumtemperatur mit PFA fixiert, ein Mal mit A. dest oder PBS gewaschen und mit 1 % (w/v) PTA in Wasser gefärbt (Metscher, 2009). Die Messung der Probe erfolgte in wässriger Umgebung.

4.4.5. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie)

Um zu überprüfen, ob die Kupplung der Alginat mit der Gelatine (4.3.3.6) erfolgreich war, sollten die modifizierten Produkte NMR-spektroskopisch untersucht werden. Hierzu wurden sowohl die Produkte, als auch die Edukte in A. dest. bzw. A.dest + 10 % (v/v) D₂O gelöst und auf eine Konzentration von 15-20 mM eingestellt. Die Messung erfolgte an einem NMR-Spektrometer mit Kryo-Probenkopf CP-TCI bei 500 MHz der Firma Bruker Avance am chemischen Institut der Universität Lübeck. Die Spektrenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software Topspin 3.1 der Firma Bruker.

4.4.6. Gel-Permeations-Chromatographie (*Size Exclusion Chromatography* SEC)

Eine weitere Methode, zur Überprüfung der chemischen Kupplung zwischen Alginat und Gelatine war die Verwendung der SEC. Hierzu wurden sowohl die Produkte, als auch die Edukte in A. dest. bzw. A.dest + 10 % (v/v) D₂O gelöst und auf eine Konzentration von 15-20 mM eingestellt. Die Messung erfolgte an einem Äkta *Purifier* 10 mit einem UV-Detektor am chemischen Institut der Universität Lübeck. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software ist Unicorn 5.11.. Nach der ersten Messung wurden die Proben ein zweites Mal mittels Dialyse (MWCO 50 kDa) gereinigt und abermals vermessen.

4.4.7. TNBS-Assay

Als dritte Methode zur Überprüfung, ob die Modifizierung der Alginat (4.3.3.6) erfolgreich war, wurde der TNBS-*Assay* durchgeführt. TNBS ist in der Lage mit primären Aminen zu reagieren und orangefarbende Produkte zu bilden (Abbildung 12).

Material und Methoden

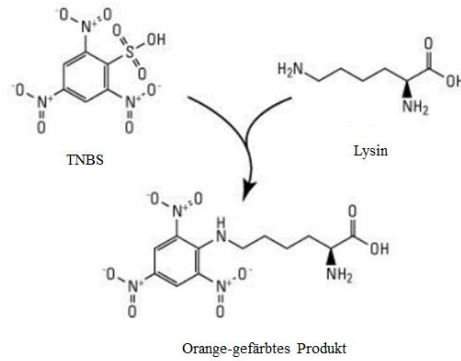


Abbildung 12: TNBS-Assay zur Detektion primärer Amine. Der TNBS-Assay wurde zur Analyse der modifizierten Alginat verwendet.

Das Protokoll des Assays sah wie folgt aus (Bubnis & Ofner, 1992):

- **Verwendete Lösungen:**
 - 0,1 M NaHCO₃ (pH = 8,5)
 - 5 % (v/v) TNBS in Methanol
 - 10 % (w/v) SDS in dest. Wasser
 - 1 M HCl
- **Vorbereitung der Proben:**

Tabelle 12: Verwendete Proben für den TNBS-Assay.

Alginat-Gelatine (AG)	(A) 0,002 g auf 10 ml 0,1 M NaHCO ₃
(1) 200 µg/ml AG	(1) 200 µl (A)
(2) 150 µg/ml AG	(2) 150 µl (A) + 50 µl NaHCO ₃
(3) 100 µg/ml AG	(3) 100 µl (A) + 100 µl NaHCO ₃
(4) 50 µg/ml AG	(4) 50 µl (A) + 150 µl NaHCO ₃
→je 3x	
Gelatine	(A) 0,002 g auf 10 ml 0,1 M NaHCO ₃
(1) 200 µg/ml Gelatine	(1) 200 µl (A)
(2) 150 µg/ml Gelatine	(2) 150 µl (A) + 50 µl NaHCO ₃
(3) 100 µg/ml Gelatine	(3) 100 µl (A) + 100 µl NaHCO ₃
(4) 50 µg/ml Gelatine	(4) 50 µl (A) + 150 µl NaHCO ₃
→je 3x	

Material und Methoden

Alginat	(A) 0,002 g auf 10 ml 0,1 M NaHCO ₃
(1) 200 µg/ml Alginat	(1) 200 µl (A)
(2) 150 µg/ml Alginat	(2) 150 µl (A) + 50 µl NaHCO ₃
(3) 100 µg/ml Alginat	(3) 100 µl (A) + 100 µl NaHCO ₃
(4) 50 µg/ml Alginat	(4) 50 µl (A) + 150 µl NaHCO ₃
→je 3x	

- 4 µl TNBSA-Stammlösung + 1996 µl NaHCO₃ verdünnen
- 100 µl TNBSA zu der 200 µl der jeweiligen Probe geben und gut mischen
- 2 h bei 37 °C inkubieren lassen
- 100 µl SDS/50 µl HCl zu jeder Probe geben (stoppt Reaktion; stabilisiert das Produkt)
- 3 x 100 µl in 96-Well pipettieren, Absorption bei 335 nm messen

Als *Blank* wurde 300 µl NaHCO₃/100 µl SDS/50 µl HCl verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte mit dem ClarioStar der Firma BMG Labtech und die Auswertung mit der Software MARS.

4.4.8. Genomanalyse

Für die Genomanalyse wurden adulte Stammzellen aus dem exokrinen Pankreas männlicher Mäuse verwendet (Frahm, 2015).

4.4.8.1. RNA-Isolierung

Für die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) der Zellen, wurden diese auf Gelen aus Fibrin und Seide (*Bombyx mori*) kultiviert. Die Herstellung der Gele erfolgte wie in 4.3.2.2 und 4.3.1.1 beschrieben. Die Zellen wurden zunächst mit Lysispuffer und 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol behandelt und aufgeschlossen. Die Isolierung der RNA wurde mit dem *RNeasy Plus Mini Kit* Nukleinsäure-Aufreinigungs-Roboter *QIAcube* der Firma Qiagen durchgeführt.

4.4.8.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop 1000 bestimmt. In 2 µl Probe wurden bei 260 nm (Absorptionsmaximum Nukleinsäuren) die optische Dichte (OD) bestimmt, aus welcher die Konzentration berechnet wurde. Die Reinheit wurde durch die Messung bei 280 nm (Absorptionsmaximum Proteine) überprüft, welche sich aus dem Verhältnis aus OD₂₆₀ und 280 zusammensetzt. Der Reinheitsgrad sollte bei 2,0 liegen.

4.4.8.3. Globale Expressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse wurde von der Firma AROS Applied Biotechnology (Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Die Reaktionseffizienz der Markierung wurde mit Hilfe einer exogenen eukaryotischen Poly-A RNA Kontrolle als Sensitivitätsindikator der Proben RNA zugesetzt, unter Einsatz des Poly-A RNA *Control Kits*. Es folgte die Umschreibung der RNA in cDNA mittels einer reversen Transkription und einer T7-Polymerase. Die Template RNA wurde mit RNase H degradiert. Die neue cDNA wurde als Vorlage für die folgende Transkription mit einer T7-RNA-Polymerase verwendet. Es folgte ein Reinigungsschritt mit anschließender Umschreibung der cRNA in cDNA. Dies lief unter Verwendung zufälliger Primer und dUTPs, sowie dNTPs, ab. Hierzu wurde das Ambion[®] *WT Expression Kit* verwendet. Der Einsatz von Uracil statt Thymin diente der späteren Fragmentierung der DNA. Diese erfolgte mit der Uracil DNA Glykosylase (UDG), welche spezifisch die entsprechende N-glykosidische Bindung spaltet. Die Apurine/Apyrimidine Endonuclease 1 (APE 1) spaltet das Phosphodiester-Rückgrat der DNA an Positionen ohne Purin- oder Pyrimidinbasen. So entsteht eine 3'-Hydroxy- und eine 5'-Deoxyribose unter Verwendung des *WT terminal Labeling Kits*. Mit einer Deoxyribonukleotidyltransferase (TdT) erfolgte eine terminale Markierung, in dem Biotin Allonamid Triphosphat an das 3'-terminale Ende der DNA angeknüpft wurde. Die markierten DNA-Fragmente wurden zusammen mit Hybridisierungskontrollen an den *Chip Mouse Gene 1.1 ST Array Plate* mit Hilfe von Oligonukleotiden angebracht. Es folgte eine Denaturierung, ein Waschschriff und die Färbung mit Hilfe von Streptavidin (Ambion[®] *WT Expression Kit*). Die photometrische Analyse wurde mit einem GeneTitan[®] Multi-Channel Instrument durchgeführt.

Die Normalisierung der Daten erfolgte durch eine Quantilnormalisierung. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein Zweistrichproben T-test mit ungleichen Varianzen durchgeführt. Die daraus entstandenen p-Werte wurden mit der Bonferroni-Methode

analysiert. Bei einem Fc-Wert (*fold change*) von $2 < x < 0,5$ ($p < 0,05$) wurde die Änderung als signifikant gewertet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Igor Pro.

4.5. Bioreaktor

Die im Rahmen dieser Arbeit gestellte Fragestellung zielte nicht nur auf das Finden eines geeigneten Gelmaterials zur Kultivierung adhärent wachsender Stammzellen ab, sondern beschäftigte sich ebenso mit der Suche nach einem geeigneten Reaktorsystems. Der schematische Ablauf der Kultivierung ist in Abbildung 2 dargestellt.

Für die Machbarkeitsstudie wurde das Gelsystem Dextran-CD der Firma Cellendes verwendet. Als Reaktorsystem wurde mit dem vollautomatisierten STR DASbox der Firma Dasgip gearbeitet. Während der Kultivierung wurde der pH-Wert auf 7,4, der O₂-Gehalt auf 30 % (Luftkompressor), die Temperatur auf 37 °C und die Rührleistung auf 80 rpm eingestellt. Der pH-Wert wurde über den CO₂-Gehalt geregelt. Der allgemeine Ablauf der Machbarkeitsstudie war wie folgt:

1. Zyklus

Start: 10 Kapseln

- (A) 1 Kapsel Analyse (T0)
- (B) 2 Kapseln Kontrolle Brutschrank → 5 Tage Kultivierung
→ 2 Kapseln Analyse
- (C) 7 Kapseln Reaktor → 5 Tage Kultivierung
→ 2 Kapseln Analyse
→ 5 Kapseln auflösen und neu verkapseln

2. Zyklus

Start: 10 Kapseln (aus 1. Zyklus)

- (A) 1 Kapsel Analyse (T0)
- (B) 2 Kapseln Kontrolle Brutschrank → 5 Tage Kultivierung
→ 2 Kapseln Analyse
- (C) 7 Kapseln Reaktor → 5 Tage Kultivierung
→ 2 Kapseln Analyse

Material und Methoden

→ 5 Kapseln Reserve

Die Herstellung der Kapseln erfolgte analog zu 4.3.6. Zur Analyse der Kapseln wurde die Zellzahl (4.2.1.4) bestimmt und eine FDA/HOECHST-Färbung (4.4.3.4) durchgeführt.

5. Ergebnisse

Die Suche nach einem geeigneten Material für die Kultivierung adhärent wachsender Zellen wurde systematisiert, indem sie nach synthetischen Materialien und Biomaterialien unterteilt wurde. Ziel war es, ein Material zu finden, welches alle wichtigen Kennzeichnungen (Biokompatibilität, Haftungsstellen, Handhabung, Verfügbarkeit, Degradierbarkeit) mit sich bringt, die die Zellen für die Proliferation benötigen.

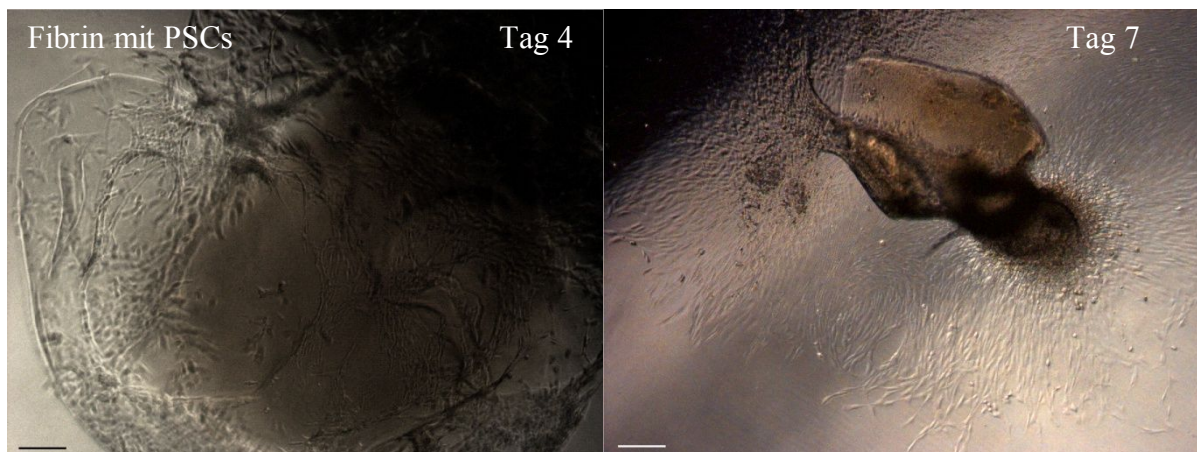
5.1. Biomaterialien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Biomaterialien verwendet und hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit als Verkapselungsmaterial untersucht. Allen Materialien ist gemeinsam, dass sie zwar einerseits chargenabhängigen Schwankungen unterliegen, aber, mit Ausnahme von Fibrin, hochverfügbar und preiswert sind.

5.1.1. Fibrin

Fibrin liegt als Vorstufe im Blut vor und ist somit biokompatibel. Ein Nachteil ist allerdings die geringe Verfügbarkeit und somit der hohe Preis des Materials.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellen durch Suspension in der Serin-Protease Thrombin und Zusammengabe mit Fibrinogen verkapselt (Abbildung 13).



Ergebnisse

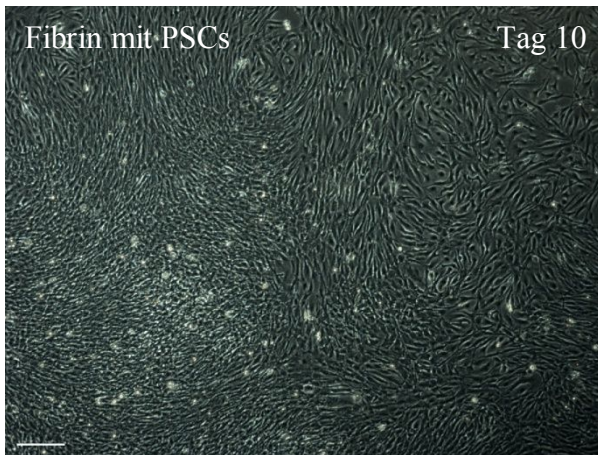
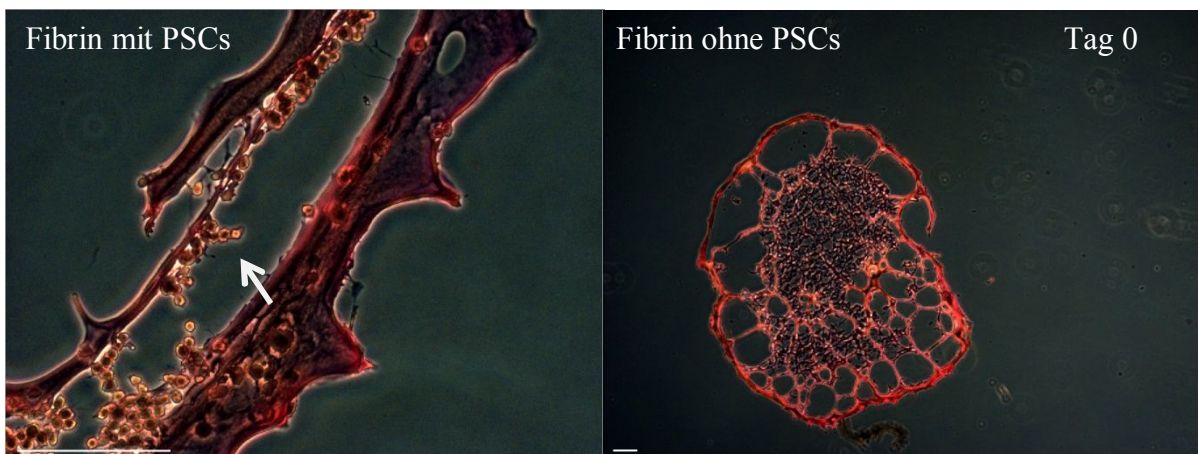


Abbildung 13: Kultivierung von PSCs, die in Fibrinkapseln kultiviert wurden. Die Zellen wurden vier bis zehn Tage kultiviert. Maßstab = 200 μm .

Die in Fibrin verkapselten Zellen waren an Tag vier adhären und proliferierten (Abbildung 13, Tag 4). Die Zellen waren darüber hinaus in der Lage das Fibrin zu degradieren, sodass an Tag zehn das Gel komplett abgebaut war.

Zur Charakterisierung der inneren Gelstruktur und Aufklärung der Zelllokalisierung innerhalb des Gels, wurden Kryoschnitte aus Fibrinkapseln mit und ohne PSCs angefertigt und mit der Van Gieson-Färbung gefärbt (Abbildung 14).



Ergebnisse

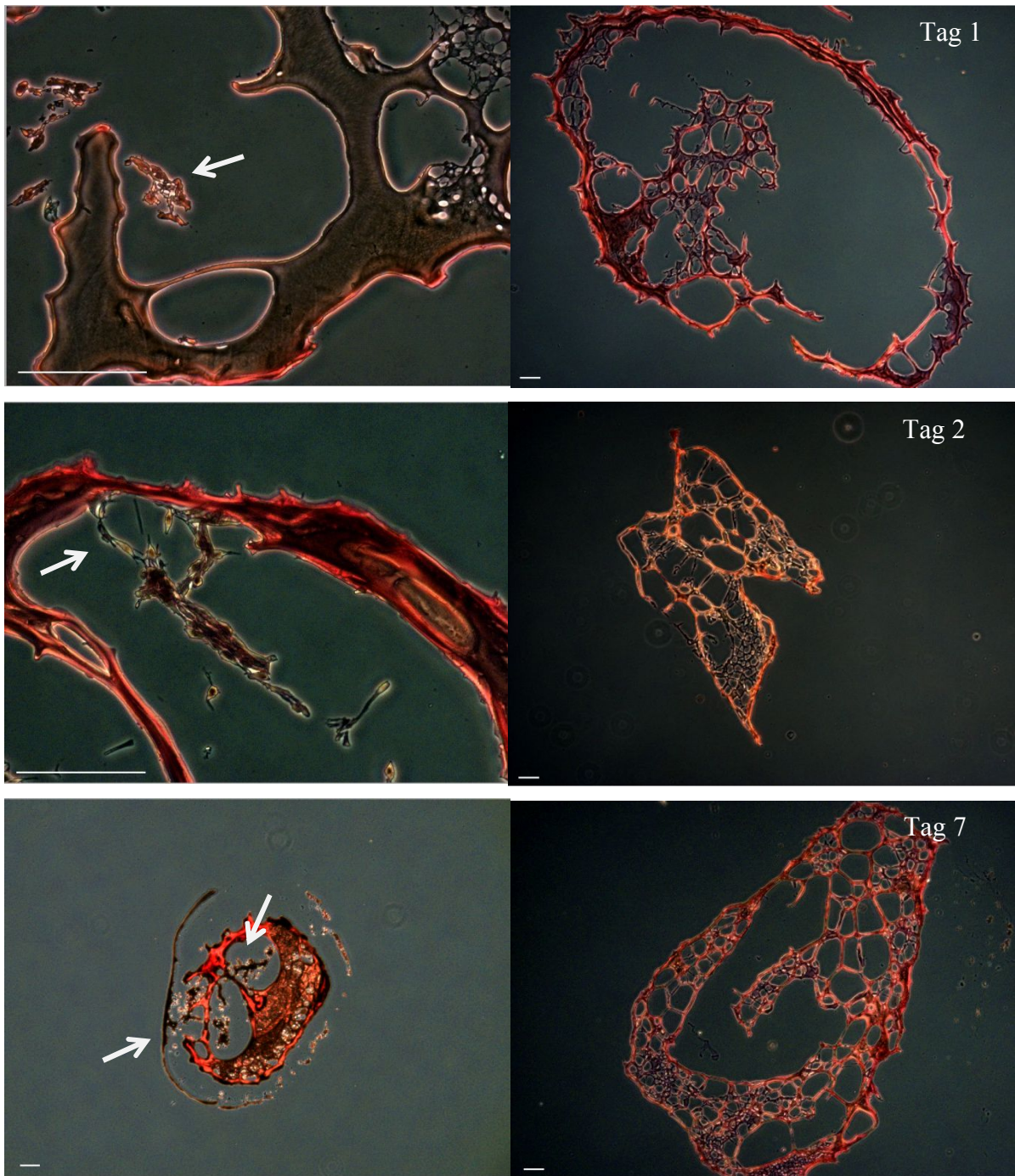


Abbildung 14: Dünnschnitte der Van Gieson-Färbung der Fibrinkapseln mit und ohne PSCs. An den Tagen null, eins, zwei und sieben wurden die Kapseln mit und ohne Zellen untersucht. Die Zellen (weiße Pfeile) sind in braun und die Fibrinmatrix in rot zu sehen. Maßstab = 100 µm.

Die Zellen in den Fibrinkapseln waren an Tag null abgekugelt (Abbildung 14, Tag 0, weißer Pfeil), das heißt nicht adhären. Mit zunehmender Kultivierungsdauer waren immer mehr adhären Zellen (Abbildung 14, Tag 2, weißer Pfeil) zu sehen. An Tag sieben war die Fibrinmatrix deutlich komprimiert und die Zellen aus dem Gel migriert (Abbildung 14, Tag 7,

Ergebnisse

weißer Pfeil). Die Probe ohne Zellen veränderte sich bis Tag 7 nicht (Abbildung 14, Fibrin ohne PSCs, Tag 0-7). Außerdem wurde deutlich, dass die Zellen vornehmlich in Poren von ca. 50-500 μm Durchmesser lokalisiert waren (Abbildung 14, Tag 0-7).

Da die Kosten hoch und die Verfügbarkeit von Fibrin gering waren, wurden Mischgele aus Seide und Fibrin hergestellt (Abbildung 15).

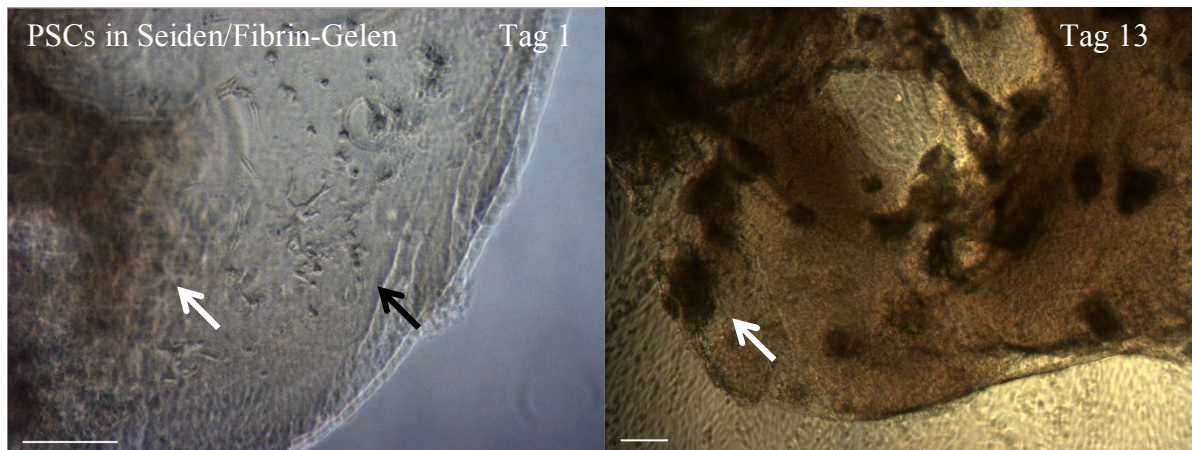


Abbildung 15: PSCs in Gelen aus Seide und Fibrin. Die Zellen wurden bis zu 13 Tage in dem Gel kultiviert. Maßstab = 200 μm .

Die Mischung aus Fibrin und Seide führte zu inhomogenen Gelen, in denen Bereiche aus Seide (Abbildung 15, Tag 1, weißer Pfeil) und Fibrin (Abbildung 15, Tag 1, schwarzer Pfeil) vorlagen. In den Fibrinbereichen konnten die Zellen adhären und proliferieren (Abbildung 15, Tag 1, schwarzer Pfeil). An Tag 13 (Abbildung 15, Tag 13, weißer Pfeil) hatten sich Aggregate gebildet.

Abschließend wurde eine Genomanalyse von Zellen durchgeführt, welche auf Fibrin-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden. Um die Zellen mit dem Standard (Frahm, 2015) vergleichen zu können, wurden Pankreaszellen aus der Maus verwendet.

Ergebnisse



Abbildung 16: Veränderte Genexpression von Zellen, die auf Fibrin-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden. Abgebildet ist die Differenz im Vergleich zu Zellen, die auf herkömmlicher Zellkulturoberfläche kultiviert wurden. Hochregulierte Gene sind in rot, runterregulierte Gene sind in grün und unveränderte Gene sind in weiß dargestellt.

Die Änderung der Genexpression von Zellen, die auf Fibrin-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden, war im Vergleich zu den Zellen, die auf herkömmlichen Oberflächen kultiviert wurden ebenfalls eher gering: Von den über 30000 untersuchten Genen waren 34 signifikant ($p \leq 0,05$; $0,5 \geq F_c \geq 2$) hoch- und 36 signifikant runterreguliert. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Kultivierung von Zellen auf Seiden-beschichteten Oberflächen zu einer nur unwesentlich veränderten Genexpression der Zellen führte (Frahm, 2015).

Somit konnten in dieser Arbeit Carrel's Ergebnisse wiederholt und im Rahmen der Aufgabe detaillierter verstanden werden. Aus den Ergebnissen wurde eine Agenda abgeleitet, um nach Materialien zu suchen, die preiswerter und besser verfügbar sind. Zu den Hauptpunkten der Agenda gehört insbesondere die neue Erkenntnis, dass das Gel innere Oberfläche, Poren, aufweisen muss, damit Zellen sich effizient in ihm vermehren können.

5.1.2. Seide

5.1.2.1. *Bombyx mori*

Es wurden Seidengele des Seidenspinners *Bombyx mori* verwendet. Aus dieser Seide werden unter anderem auch Textilien gefertigt.

Die Gelherstellung der Seidengele erfolgt durch Sonifikation, das heißt unter Zuhilfenahme von Ultraschall. Um die prinzipielle Biokompatibilität der Seide zu untersuchen, wurde dem Nährmedium zunächst 1 oder 2 % (w/v) Seide zugesetzt und die Zellvitalität untersucht (Abbildung 17).

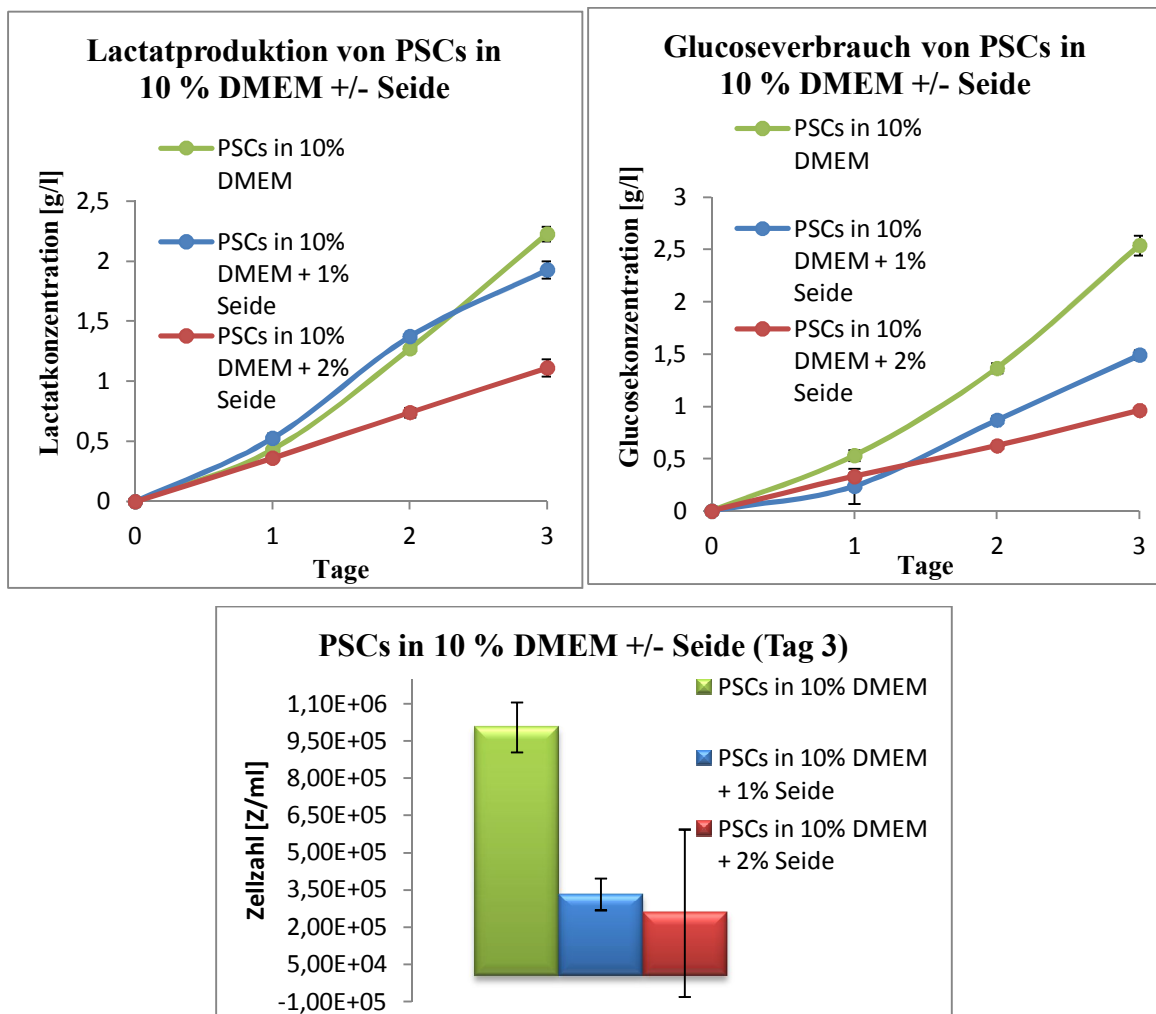


Abbildung 17: Vitalitätsuntersuchung der in Medium mit Seiden-Zugabe kultivierten PSCs. Die Lactatproduktion und der Glucoseverbrauch wurden an den Tagen null bis drei untersucht. Zusätzlich wurde die Zellzahlentwicklung an Tag drei analysiert (n = 3, SEM).

Ergebnisse

Abbildung 17 zeigt, dass die Lactatproduktion der Zellen die in Medium mit 1 (blau) bzw. 2 % (w/v) (rot) Seide kultiviert wurden im Gegensatz zu dem Medium ohne Zugabe teilweise erniedrigt war. Die Ergebnisse der Untersuchung des Glucoseverbrauchs zeigten vergleichbares. Der negative Einfluss der Seide auf die Vitalität der Zellen zeigte sich am deutlichsten an Tag drei. Das Gel wurde hinsichtlich der Eignung als Verkapselungsmaterial untersucht. Hierzu wurden der Seidenlösung verschiedene Anteile an Gelatine und Glycerin zugesetzt. Glycerin sollte dafür sorgen, dass sowohl eine weniger dichte Gelstruktur entstand und innere Oberflächen vorhanden war, als auch für eine Störung der β -Faltblatt-Strukturen. Gelatine sollte die Geleigenschaften insofern verbessern, als dass mögliche Haftmotive für die adhären wachsenden Zellen vorhanden waren. In Abbildung 18 sind die ausgetesteten Zusammensetzungen aus Seide, Gelatine und Glycerin dargestellt.

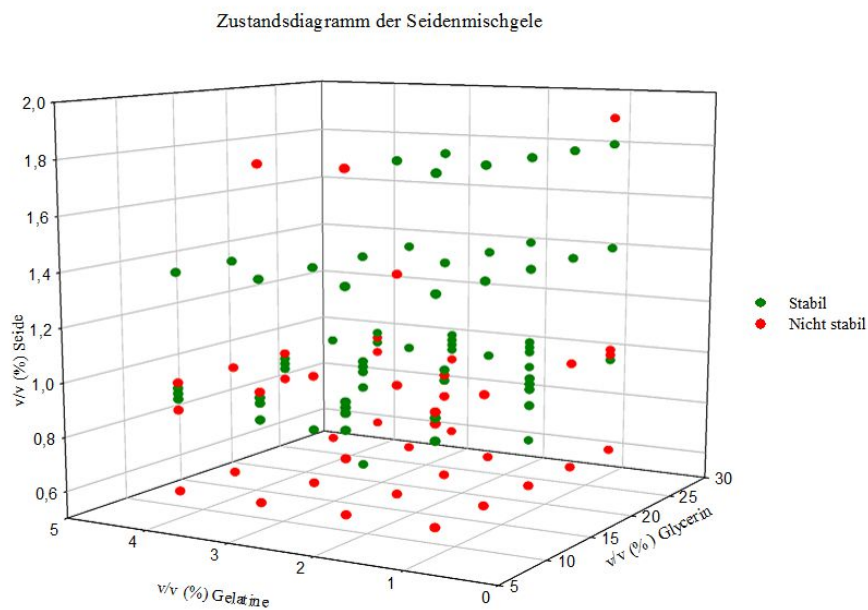
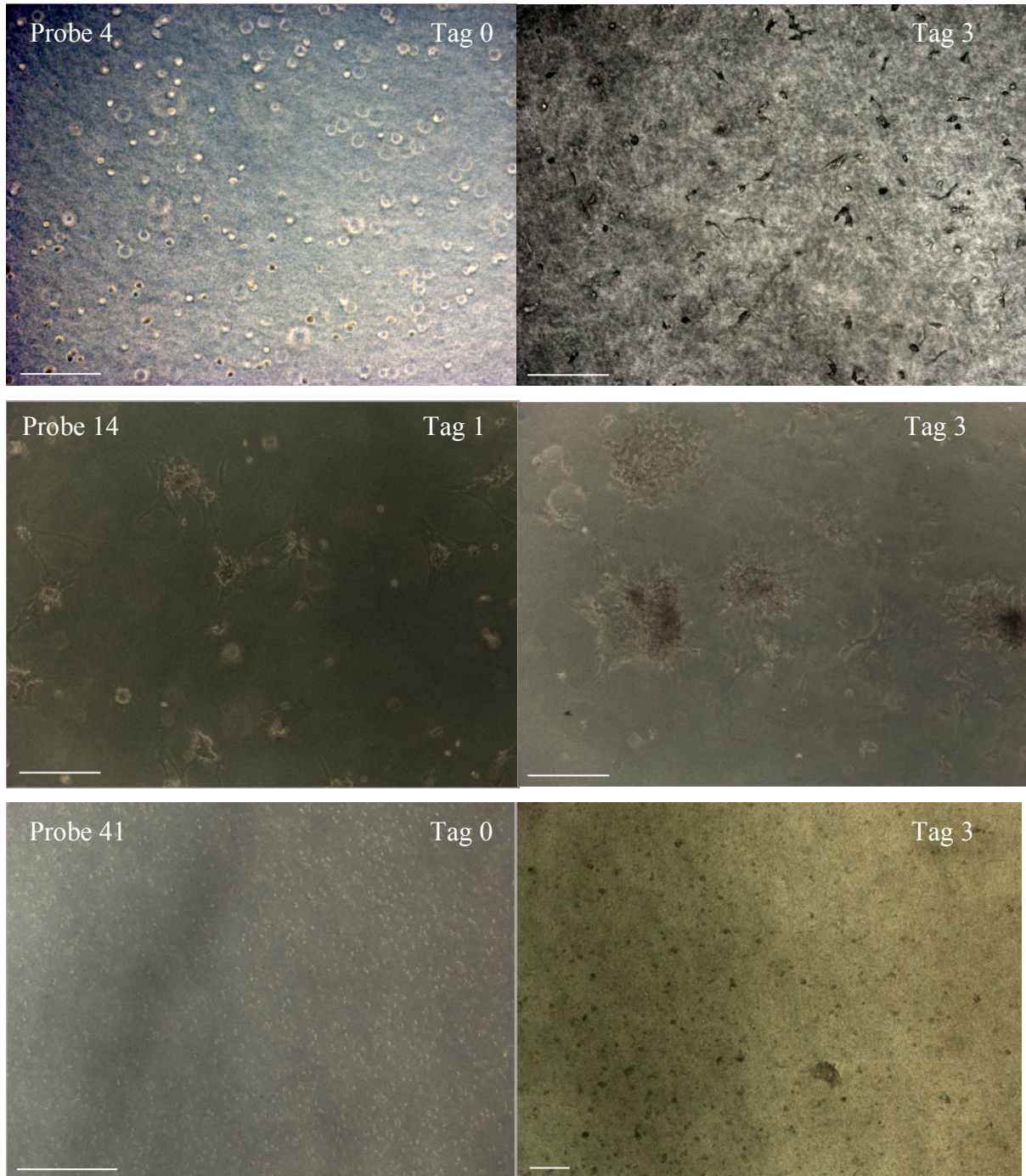


Abbildung 18: Zustandsdiagramm der Mischgele aus Seide und Glycerin bzw. Gelatine. Dargestellt sind die Gele, die über mindestens sieben Tage stabil (grün) bzw. nicht stabil (rot) waren.

In Tabelle 19 (siehe Anhang) sind neben der Zusammensetzung der Seidengele außerdem die Gelierungszeit, sowie die Stabilität über mindestens sieben Tage dargestellt. Es stellte sich heraus, dass mit zunehmendem Seidengehalt die Gelierungszeit der Gele abnahm. Mit zunehmendem Gehalt an Glycerin und Gelatine und abnehmendem Gehalt an Seide wurden die Gele außerdem instabiler. Teilweise wurden die Gele nicht fest (-) bzw. konnte die

Ergebnisse

Gelierungszeit nicht bestimmt werden (n.b.). Aus Abbildung 18 wurde deutlich, dass sich mit zunehmenden Gehalt an Seide zusehends stabilere Gele bildeten. In Abbildung 19 sind ausgewählte Proben dargestellt.



Ergebnisse

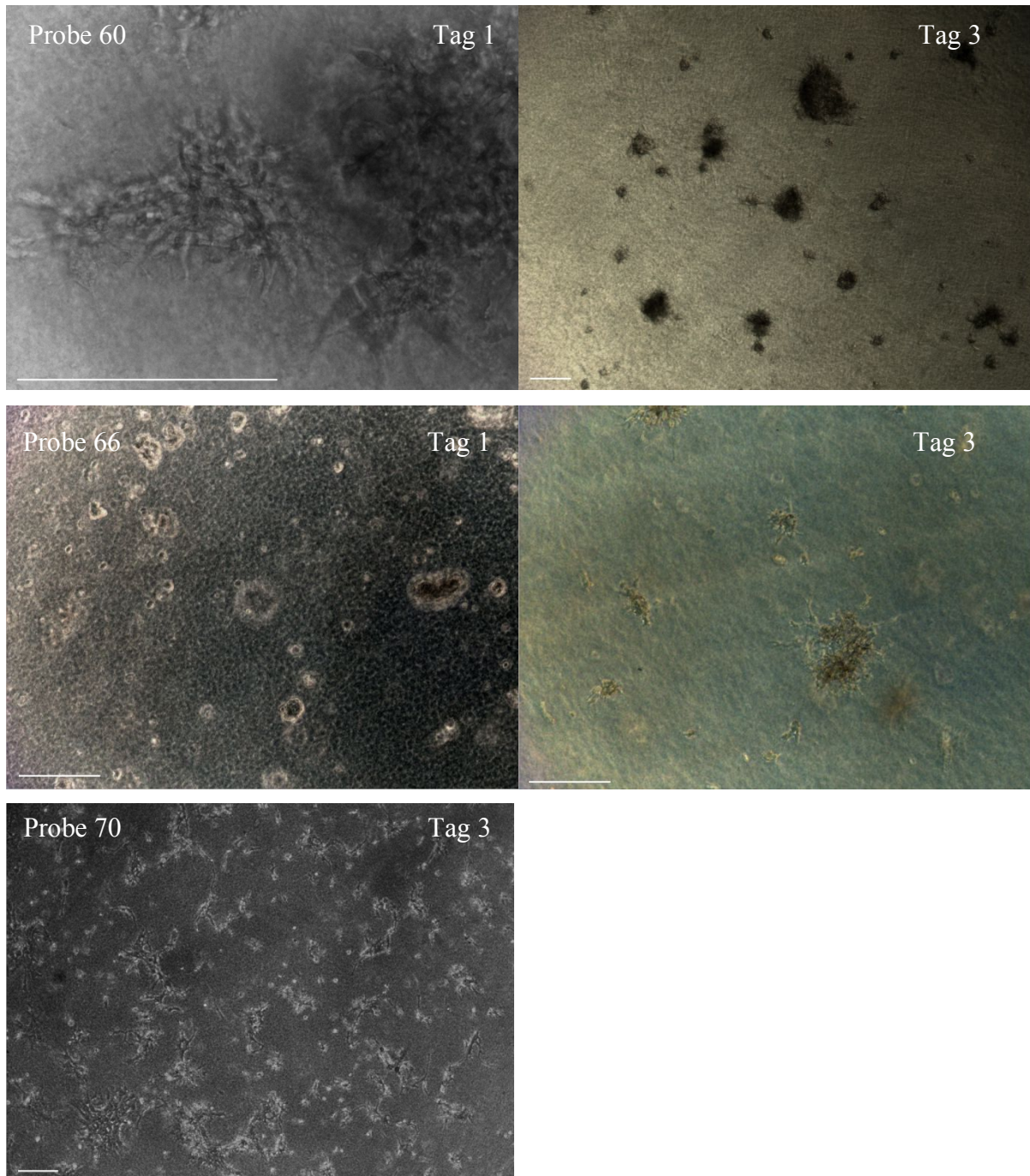


Abbildung 19: PSCs in ausgewählten Seidengelen an den Tagen null bzw. eins und drei. Die Zellen wurden in den Seidengelen mit Glycerin-/Gelatine-Zugabe (Tabelle 13) verkapselt und an Tag null bzw. eins und drei optisch analysiert. Maßstab = 200 μm .

In den Gelen 4 und 41 zeigten sich an Tag drei keine adhärenen Zellen. Der Seidengehalt in den Gelen betrug 1,8 (4) bzw. 1,4 % (w/v) (41). Der Gehalt an Gelatine war in beiden Gelen mit 1 % (w/v) sehr gering, was möglicherweise zur Folge hatte, dass die Zellen nicht-adhären waren. In den Gelen 60, 66 (3 % (w/v) Gelatine) und 70 (2 % (w/v) Gelatine) sind adhärenen Zellen zu sehen. Der Seidengehalt betrug bei diesen Gelen 1 (60), 0,8 (66) bzw. 0,9 % (w/v)

Ergebnisse

(70). In den Gelen mit dem geringsten Seidengehalt (66, 70) blieben die Zellen an Tag drei teilweise adhären und bildeten keine Aggregate (60). Um auszuschließen, dass durch das relativ dicht gepackte Gel keine Zellkommunikation der Einzelzellen möglich war und es dadurch zur gestörten Proliferation kam, wurden Zellen im Verbund in Form von Aggregate in die Gele eingebracht (Abbildung 20).

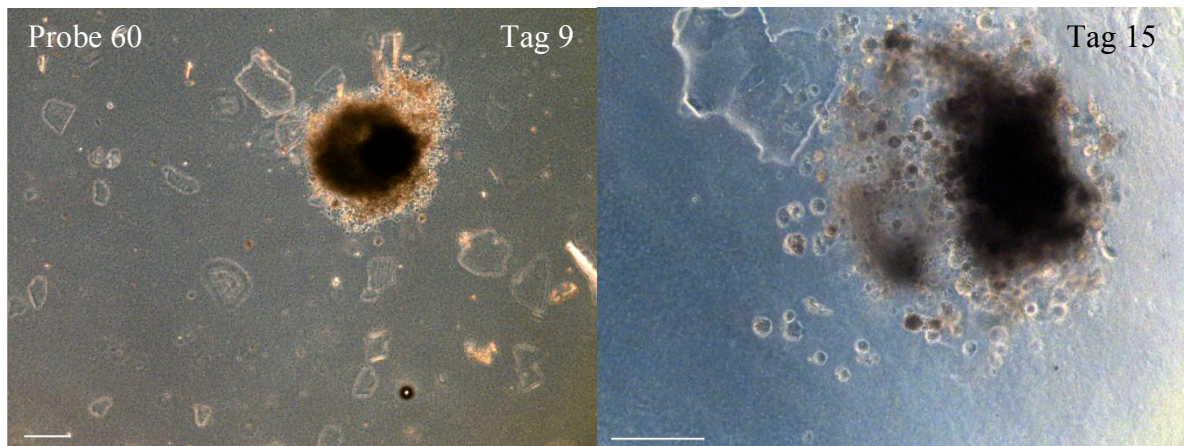


Abbildung 20: PSCs als Aggregate im Seidengel Nr. 60. Dargestellt sind die Gele an den Tagen 9 und 15. Maßstab = 200 μm .

Nach 15 Tagen in Kultur zeigten sich noch keine adhären Zellen in den Gelen. Die Zellkommunikation wurde durch die Verwendung von Zellen im Verbund nicht erhöht. Es wurde außerdem mittels Zeitraffer-Mikroskopie untersucht, ob die Zellen in den Gelen beweglich waren bzw. wo die Zellen über einen Zeitraum von drei Tagen lokalisiert waren.

Ergebnisse

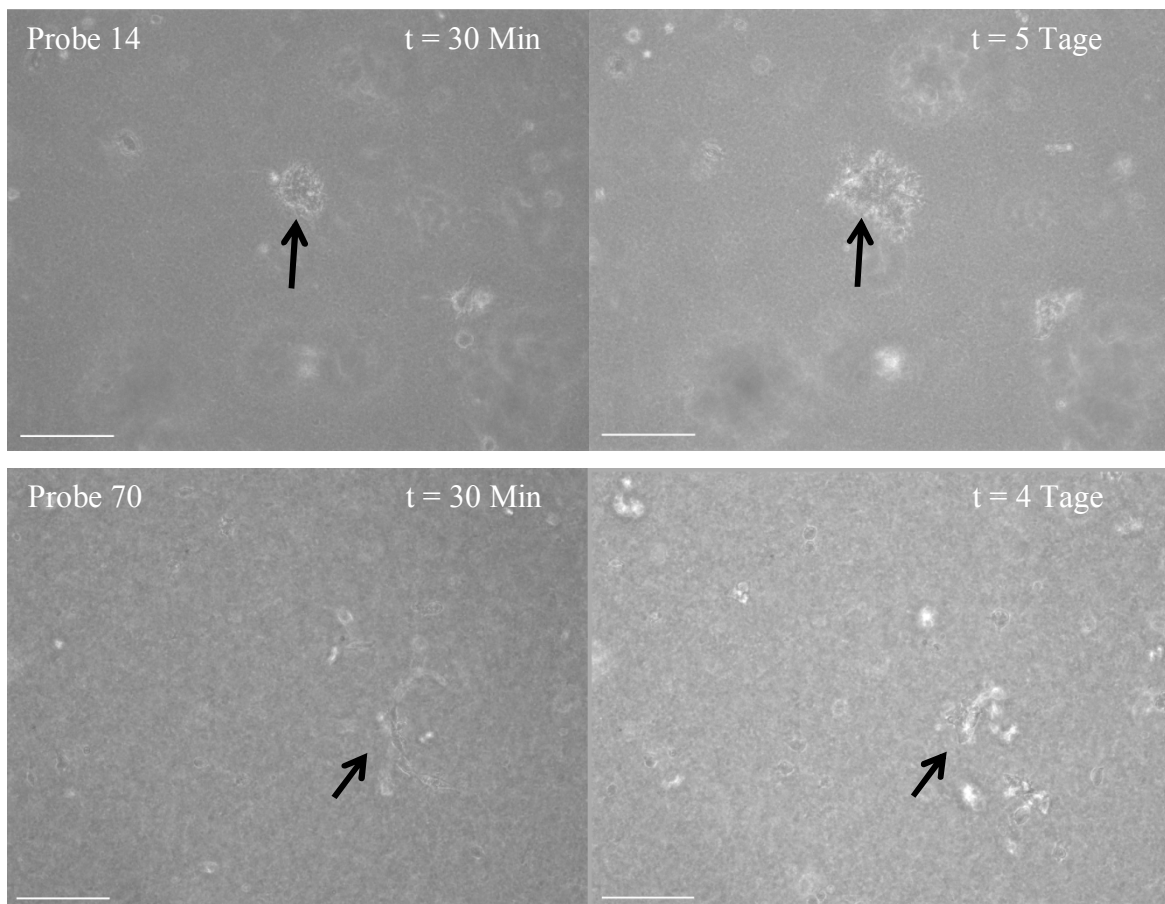


Abbildung 21: Zeitraffer-Aufnahmen von PSCs in Seidengelen. Die Zellen wurden in den Gelen 14 und 70 verkapselt (Tabelle 19). In Gel 14 sind die Aufnahmen nach 30 Minuten bzw. 5 Tagen und in Gel 70 nach 30 Minuten bzw. vier Tagen in Kultur zu sehen. Die Aufnahmen der Zellen wurden nach einem Tag auf den Gelen begonnen. Maßstab = 200 μm .

Aus Abbildung 21 wurde ersichtlich, dass sich die Zellen an Tag fünf (14) bzw. vier (70) vermehrt hatten (schwarze Pfeile), aber wesentlich schlechter als in der 2D-Kultur. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen sich in dem Gel bewegen konnten, außerdem wurden Mitosen beobachtet.

Abschließend wurde eine Genomanalyse von Zellen durchgeführt, welche auf Seidenbeschichteten Oberflächen kultiviert wurden. Um die Zellen mit dem Standard (Frahm, 2015) vergleichen zu können, wurden Pankreaszellen aus der Maus verwendet.

Ergebnisse

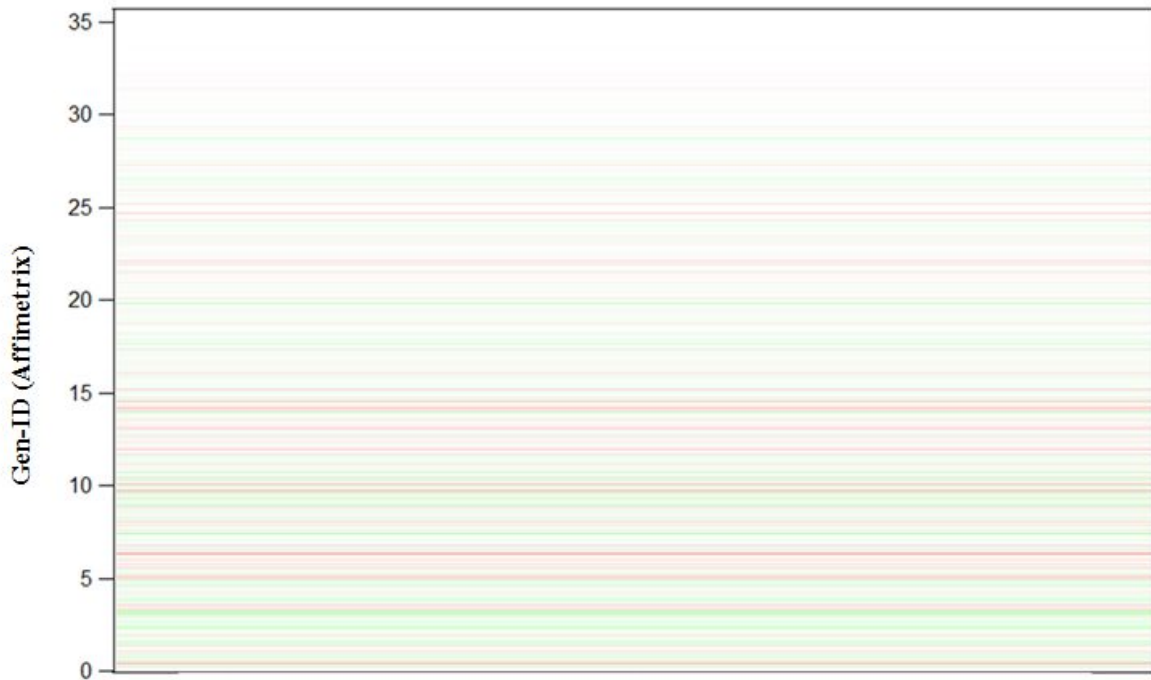


Abbildung 22: Veränderte Genexpression von Zellen, die auf Seiden-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden. Abgebildet ist die Differenz im Vergleich zu Zellen, die auf herkömmlicher Zellkulturoberfläche kultiviert wurden. Hochregulierte Gene sind in rot, runterregulierte Gene sind in grün und unveränderte Gene sind in weiß dargestellt.

Die Änderung der Genexpression von Zellen, die auf Seiden-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden, war im Vergleich zu den Zellen, die auf herkömmlichen Oberflächen kultiviert wurden eher gering: Von den 30000 untersuchten Genen waren 50 signifikant ($p \leq 0,05$; $0,5 \geq Fc \geq 2$) hoch- und 29 signifikant runterreguliert. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Kultivierung von Zellen auf Seiden-beschichteten Oberflächen nur zu einer unwesentlich veränderten Genexpression der Zellen führte, was darauf schließen ließ, dass die Oberfläche ähnlich bio-inert wie die Kontrolle zu sein schien.

5.1.2.2. *Antheraea pernyi*

Die zweite untersuchte Seide, *Antheraea pernyi*, verfügt im Gegensatz zu der Seide von *Bombyx mori* über integrierte RGD-Peptide (J. Qu, L. Xin, X. Xu, F. Zhang, B. Zuo, 2010). Um in die Seidengele Haftfasern und zusätzlich die integrierten RGD-Peptide einbringen zu können, wurden außerdem Seidenvliese verwendet (Abbildung 23).

Ergebnisse

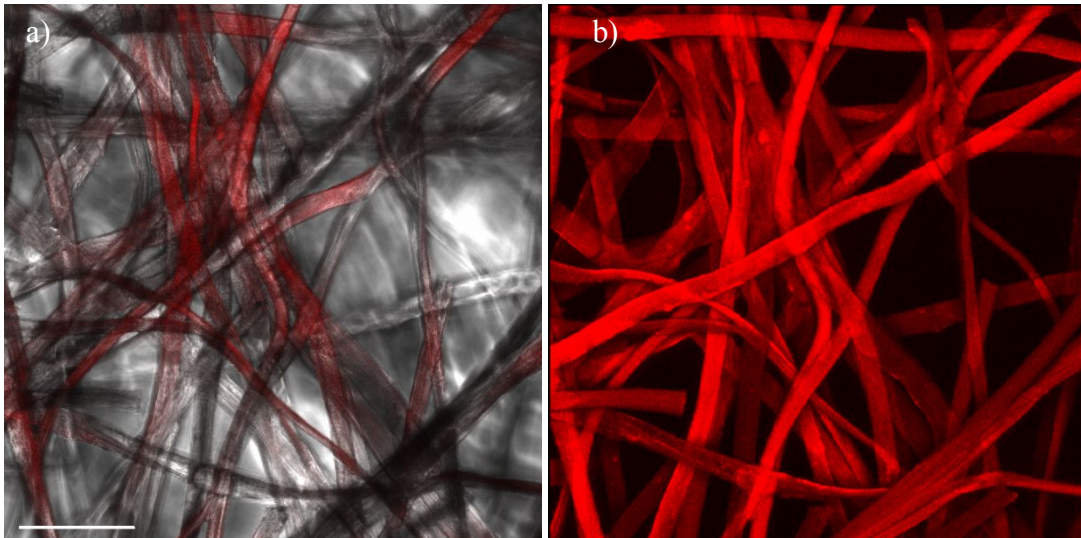
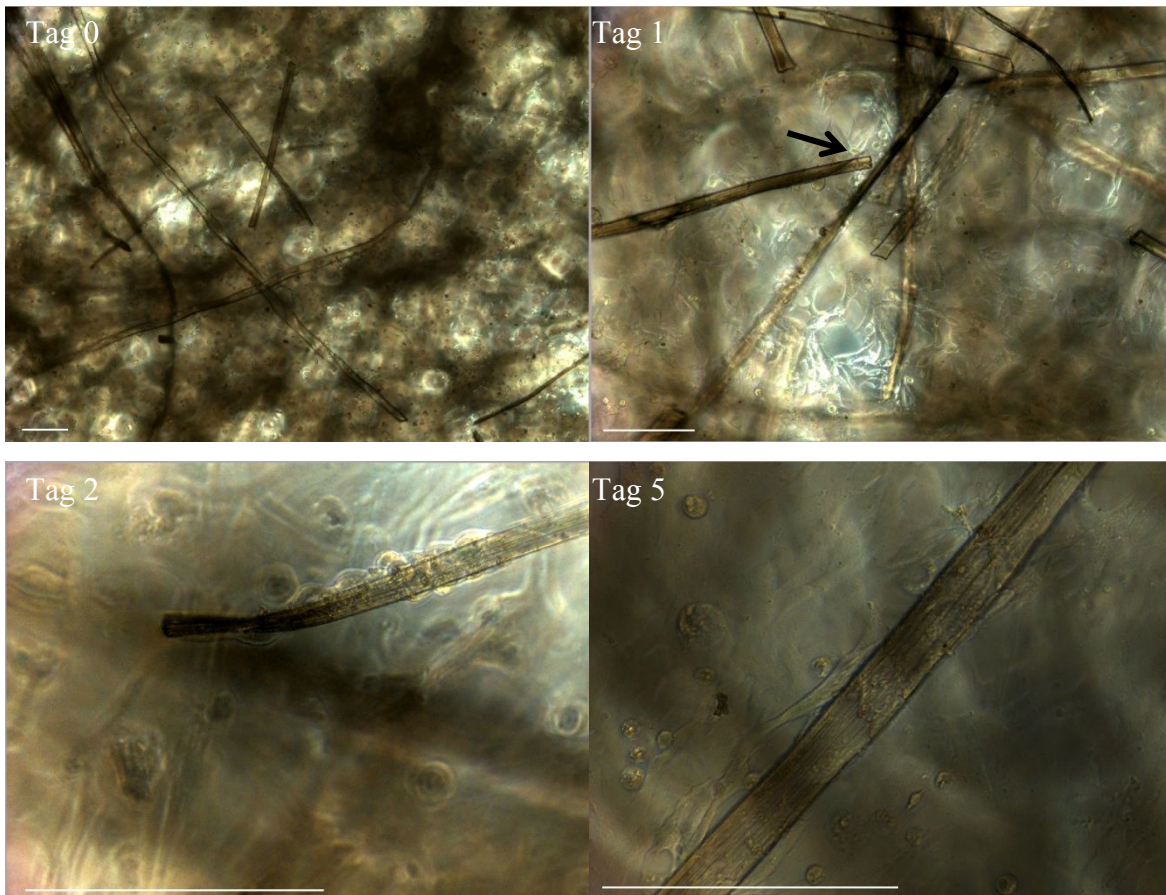


Abbildung 23: Far Red-gefärbte Seidenvliese. Mit der Färbung wurden die Faserstrukturen des Vlieses sichtbar. In a) sind die gefärbten Fasern mit Durchlicht und in b) ohne Durchlicht dargestellt. Maßstab = 200 µm.

Die Zellinokulation erfolgte zunächst durch Pipettieren der Zellen auf die Vliese. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.



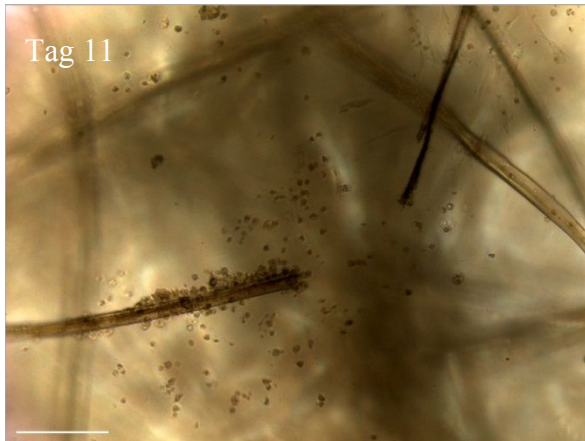


Abbildung 24: Kultivierung von PSCs auf Seidenvliesen (*A. pernyi*). Die Zellen wurden durch Pipettieren auf die Gele gegeben und null bis elf Tage kultiviert. Maßstab = 200 μm .

Die Zellen auf den Seidenvliesen konnten zunächst auf den Fasern adhäreren (Abbildung 24, Tag 1-5), allerdings war mit zunehmender Kultivierungsdauer ein Ablösen der Zellen zu verzeichnen (Abbildung 24, Tag 11). Um sicherzustellen, dass die Zellen auf den Vliesen blieben und nicht durch die Fasern auf den jeweiligen Wellboden adhärerten, wurden die Zellen auf den Vliesen zusätzlich in einem Hydrogel aus *B. mori* verkapselt (Abbildung 25).

Ergebnisse

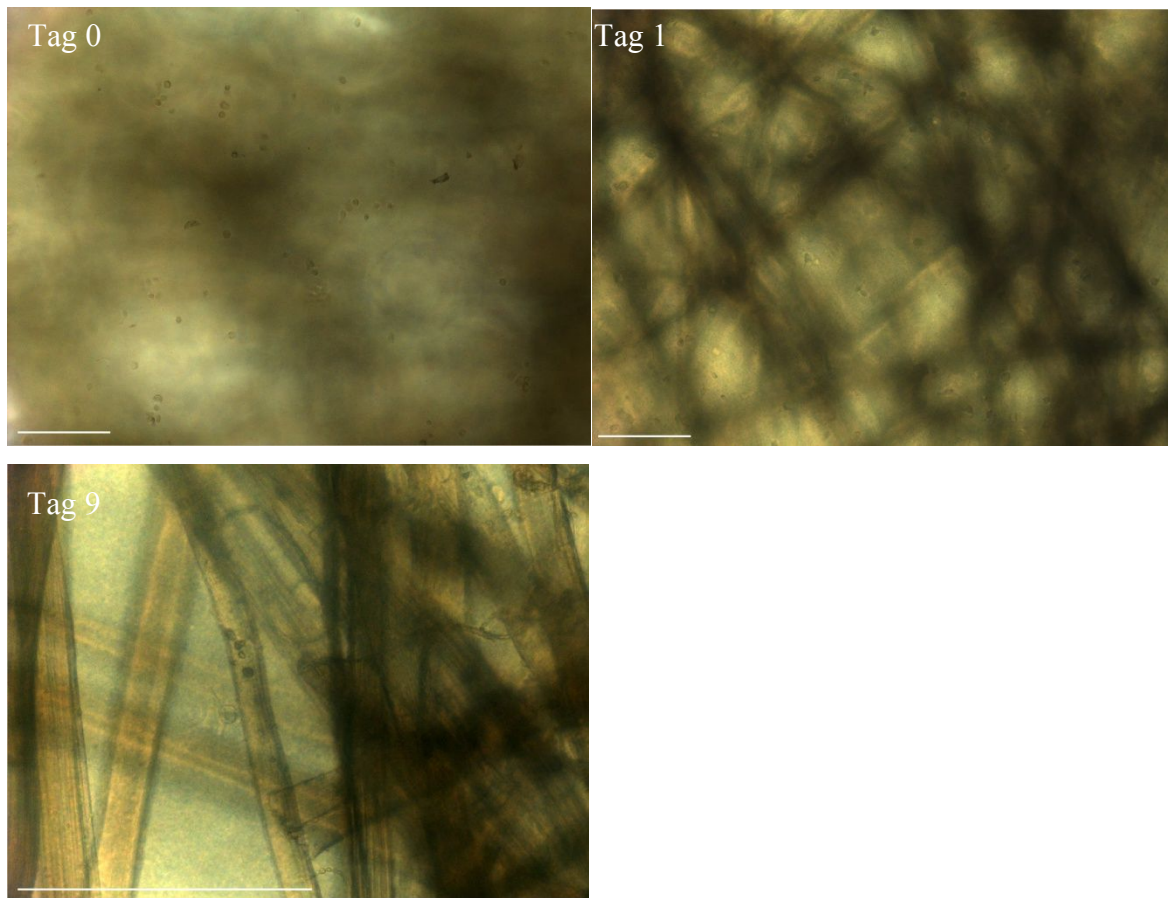


Abbildung 25: Kultivierung von PSCs auf Seidenvliesen (*A. pernyi*) in einem Hydrogel (*B. mori*). Die Zellen wurden in einem Hydrogel aus *B. mori* verkapselt und auf Seidenvliesen aus *A. pernyi* kultiviert. Maßstab = 200 μm .

In Abbildung 25 waren die Zellen durch das zusätzliche Hydrogel nur sehr schwer zu erkennen, allerdings wurde deutlich, dass die Zellen von Tag null bis Tag neun abgelöst vorlagen und nicht adhären konnten. Aus diesem Grund wurden Gazefilter als alternative Besiedlungshilfe verwendet (Abbildung 26).

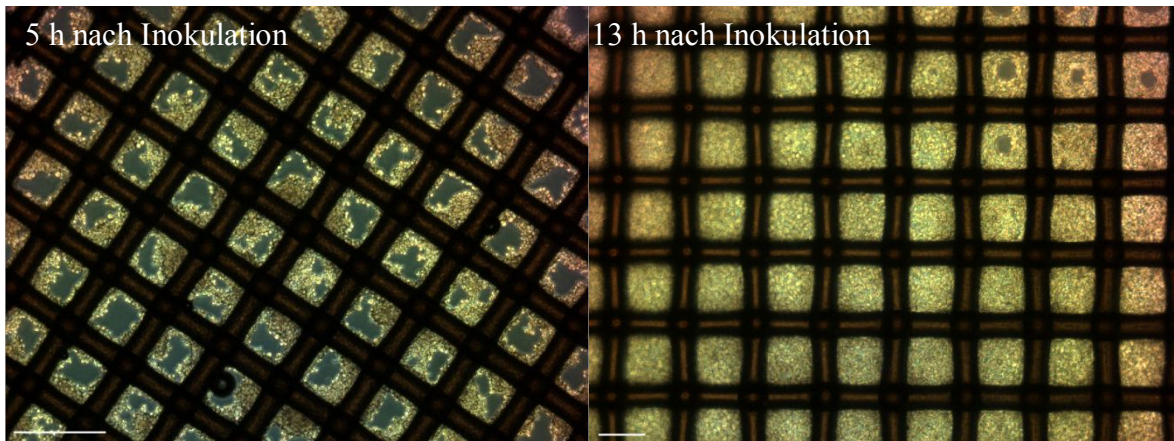


Abbildung 26: Gazefilter als Inokulationshilfe. Für die Besiedlung der Seidenvliese wurden Gazefilter verwendet, auf denen die Zellen vorkultiviert wurden. Maßstab = 200 μm .

Die Zellen wurden zunächst auf den Gazefiltern vorkultiviert (Abbildung 26). 5 h nach der Zellinokulation waren die Zellen in den Filtermaschen deutlich zu sehen. Nach 13 h auf dem Gazefilter waren die Maschen durch den Zellrasen fast komplett bedeckt. Die besiedelten Gazefilter wurden anschließend als Besiedlungshilfe in einer *Sandwich*-Anordnung (Abbildung 27) für die Seidenvliese verwendet und 24 h nach dem Transfer hinsichtlich der Zellzahl untersucht (Abbildung 27).

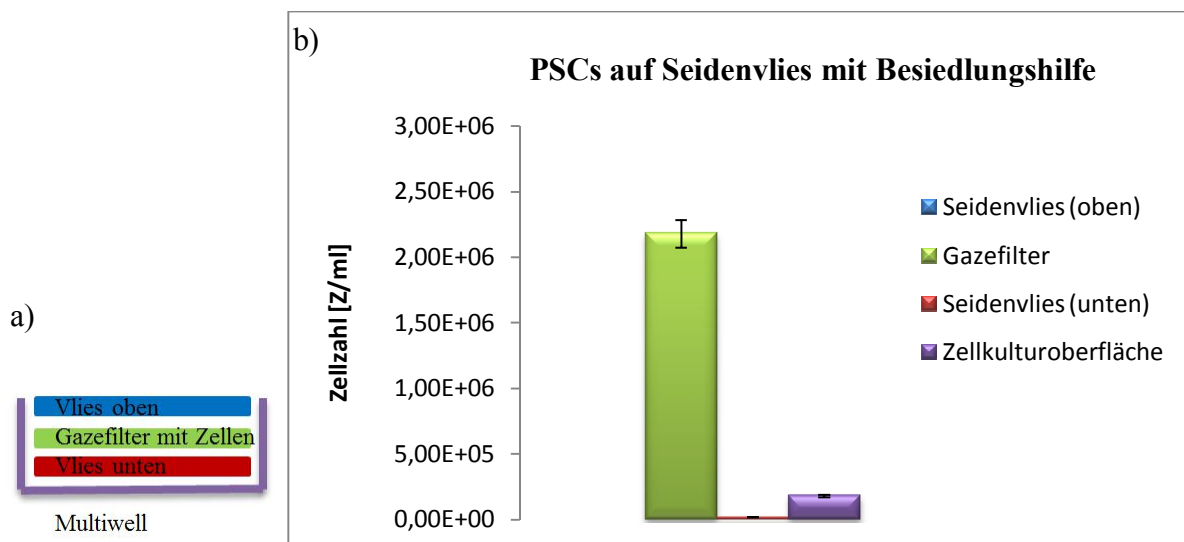


Abbildung 27: a) Schematische Darstellung der Besiedlung der Seidenvliese mit PSCs. b) Zellzahlentwicklung 24 h nach der Besiedlung mit Hilfe der Gazefilter. a) Die Besiedlung der Vliese erfolgte indirekt unter Zuhilfenahme von Gazefiltern. b) Die Zellzahlentwicklung der Seidenvliese (blau, rot) wurde im Vergleich zur Zellzahl auf dem Gazefilter (grün) und der Zellkulturoberfläche (lila) dargestellt (n = 2, SEM).

Ergebnisse

Aus Abbildung 27 wird deutlich, dass die Besiedlung mit Gazefiltern zu einer ungenügenden Besiedlung der Seidenvliese führte. Die Zellen wanderten nicht nach oben auf das Vlies (blau) und nur zu sehr geringem Anteil auf das sich unter der Gaze befindene Vlies (rot). Die Zellen migrierten vielmehr auf die Zellkulturoberfläche (lila).

Zusätzlich wurde die Oberflächenstruktur einer mit Seidenlösung beschichteten Oberfläche elektronenmikroskopisch untersucht (Abbildung 28).

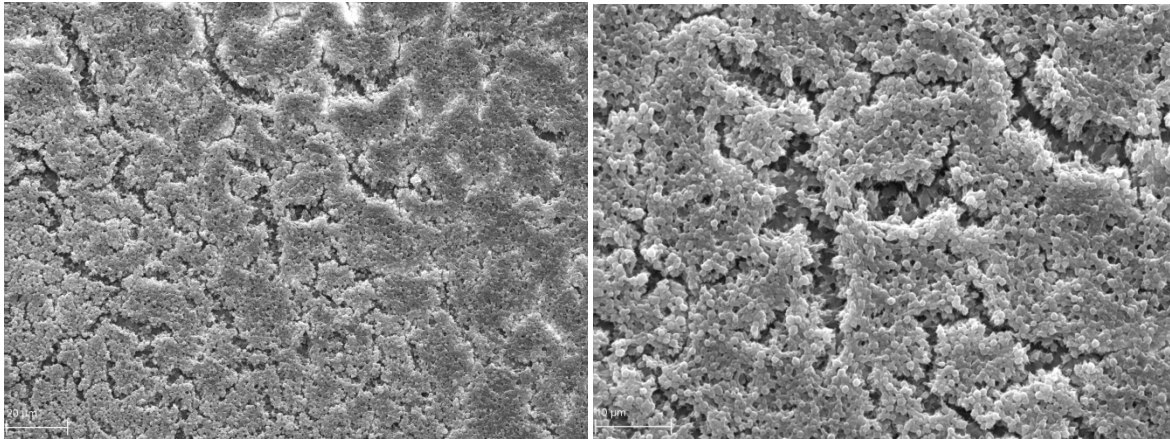


Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Seiden-beschichteten Oberflächen (A. pernyi). Die Glasoberflächen wurden mittels *Dip-coating* mit 1,4 % (w/v) beschichtet. Maßstab = 20 bzw. 10 μm .

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Besiedlung der Vliese ein großes Problem darstellte und die Seidenvliese somit nicht als Kultivierungsmatrix in Frage kamen.

5.1.3. Alginat

Die Gelbildung von Alginaten kann durch die Zugabe von z. B. Calciumionen initiiert werden. Die zu verkapselnden Zellen wurden hierbei in z. B. Alginat suspendiert und mit einer Calciumlösung versetzt. Die Kapseln mussten anschließend in Medium mit zusätzlichem Calcium kultiviert werden, damit sich die Kapseln nicht mit zunehmender Kultivierungsdauer auflösten. Um einen negativen Einfluss der Calciumzugabe auf die Zellvitalität auszuschließen, wurden PSCs zunächst in dem calciumhaltigen Medium kultiviert und hinsichtlich ihrer Vitalität untersucht (Abbildung 29).

Ergebnisse

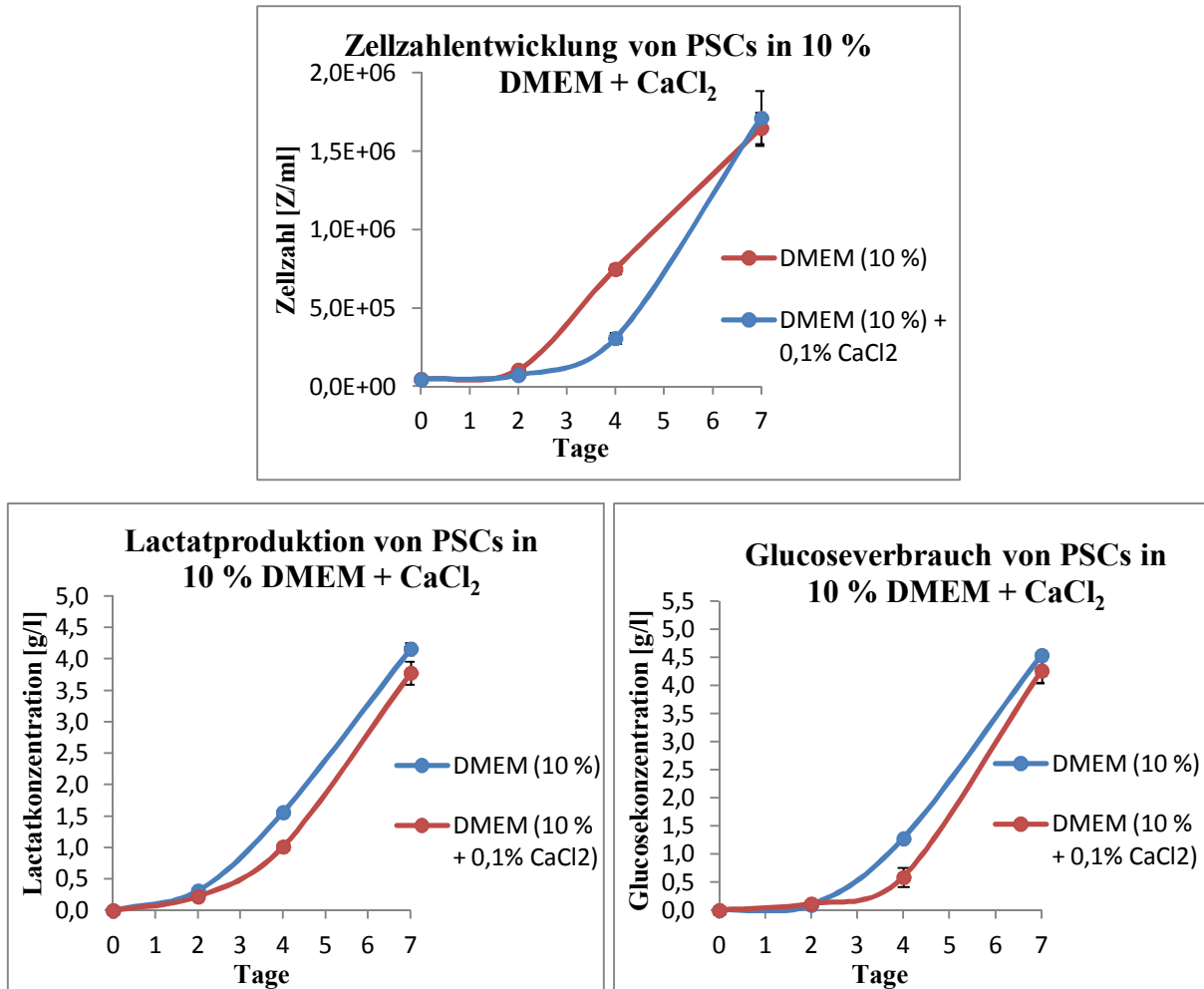
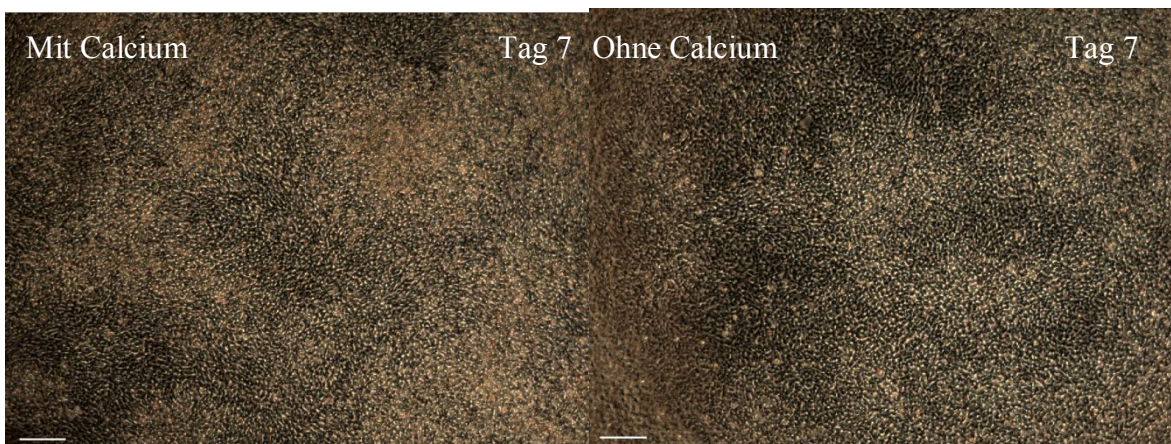
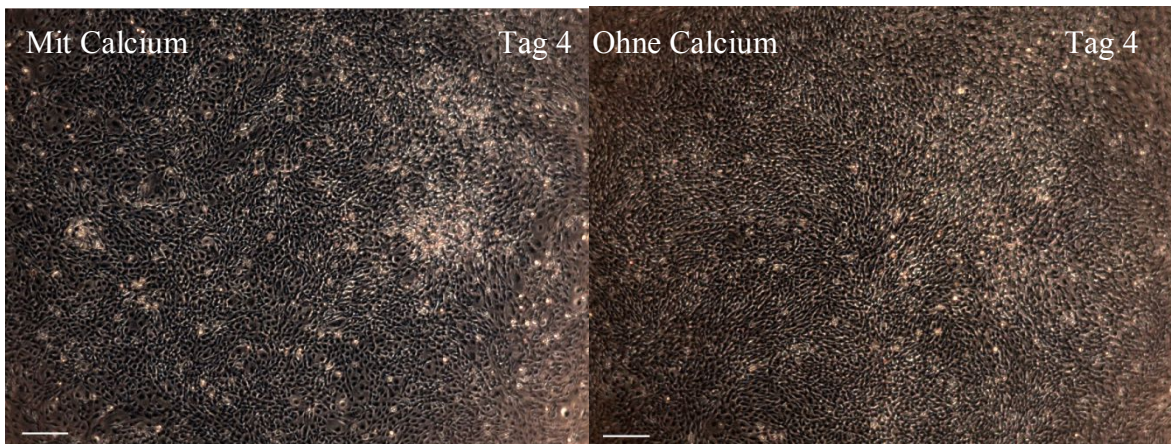
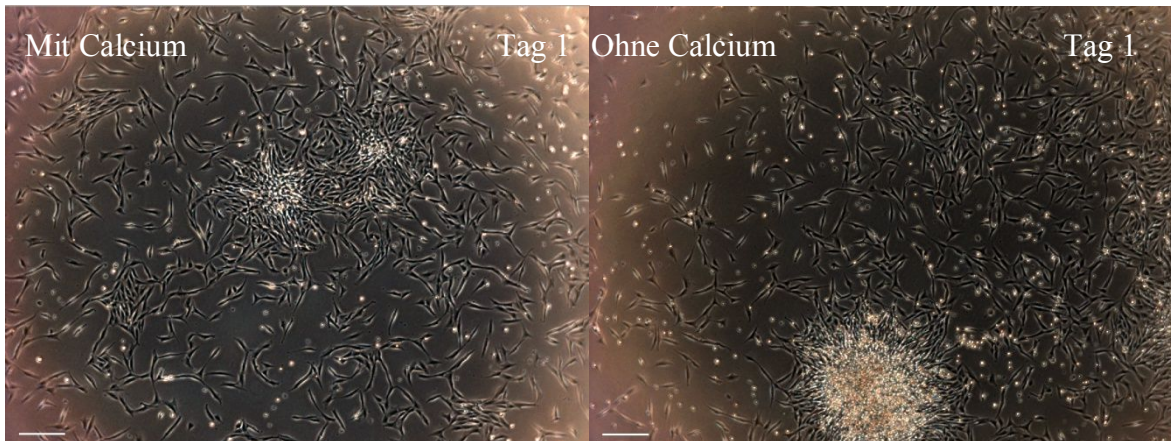
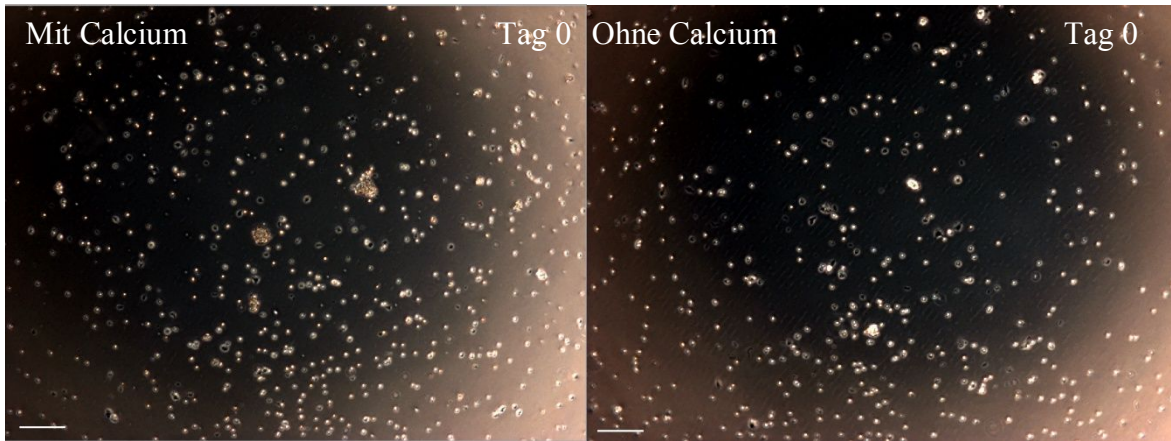


Abbildung 29: Vitalitätsuntersuchung von PSCs, die in 10 % DMEM mit und ohne Calcium kultiviert wurden. Es wurden einerseits die Zellzahlentwicklung und andererseits die Lactatproduktion, sowie der Glucoseverbrauch der Zellen über sieben Tage untersucht (n = 3, SEM).

Nach einem anfänglich verzögerten Anstieg der Zellzahl der PSCs im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 29, Zellzahl, rot), war die Anzahl der Zellen, die in Medium mit Calcium (Abbildung 29, Zellzahl, blau) kultiviert wurden an Tag sieben mit der Kontrolle vergleichbar. Die Lactatproduktion und der Glucoseverbrauch bestätigten diese Ergebnisse (Abbildung 29). Auch die optische Auswertung (Abbildung 30) stimmte mit der Aussage aus Abbildung 29 überein: Die Zellen, die mit Medium mit Calcium-Zugabe kultiviert wurden, zeigten keine Abnahme in ihrer Vitalität im Vergleich zu Zellen, die ohne Calcium kultiviert wurden.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 30: Kultivierung der PSCs in Medium mit und ohne Calcium-Zugabe. Die Zellen wurden an den Tagen null, vier und sieben untersucht. Maßstab = 200 μm .

Um die Tauglichkeit des Alginats als Kultivierungssystem für die adhären wachsenden Zellen auszutesten, wurden diese zunächst auf 2D-Gelschichten ausgesät (Abbildung 31).

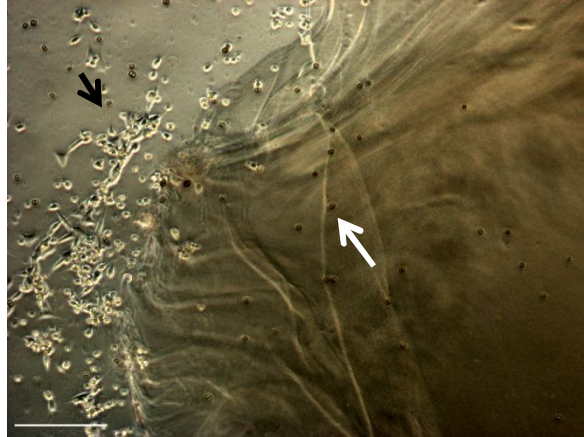


Abbildung 31: PSCs auf 2D-Gelschichten aus Alginat. Die Zellen auf der Alginatoberfläche konnten nicht adhären (weißer Pfeil), die Zellen die sich außerhalb des Gels auf der Zellkulturoberfläche befanden, konnten adhären (schwarzer Pfeil). Maßstab = 200 μm .

Abbildung 31 zeigt, dass die Zellen nicht auf der Geloberfläche adhären und proliferieren konnten. Die Zellen, die auf die Zellkulturoberfläche migriert waren, konnten im Gegensatz dazu adhären. Somit hat das Alginat als Kultivierungssystem keine negativen (z. B. toxische) Einflüsse auf die Vitalität der Zellen. Es verfügt allerdings nicht über geeignete Haftungsstellen für die Zellen. Um Haftungsstellen neu in das Material einzufügen, wurde anstatt des relativ teuren RGD-Peptids nach einer günstigeren Alternative gesucht. Da Gelatine eine hohe Verfügbarkeit hat und auch RGD-Sequenzen enthält (Huang, Onyeri, Siewe, Moshfeghian, & Madihally, 2005) wurde mit unterschiedlichen Gelatinearten und zwei Gelatine-Hydrolysaten (Solugel) gearbeitet. Solugel 5000 und Solugel P/400 (PB Gelatins) haben Molekulargewichte von 3000 bzw. 4500 g/mol und werden durch enzymatische Hydrolyse hergestellt.

Zunächst wurde die Biokompatibilität der Gelatineproben und Hydrolysate untersucht, indem diese in das Nährmedium der Zellen gegeben wurden bzw. durch Beschichtung von Zellkulturoberflächen und anschließender Kultur von Zellen auf diesen Oberflächen. In Abbildung 32 sind exemplarisch die Ergebnisse der mit Hydrolysat-Zugabe/-Beschichtung

Ergebnisse

kultivierten Zellen zu sehen. Die Ergebnisse der restlichen Gelatineproben befinden sich im Anhang (Abbildung 79-82).

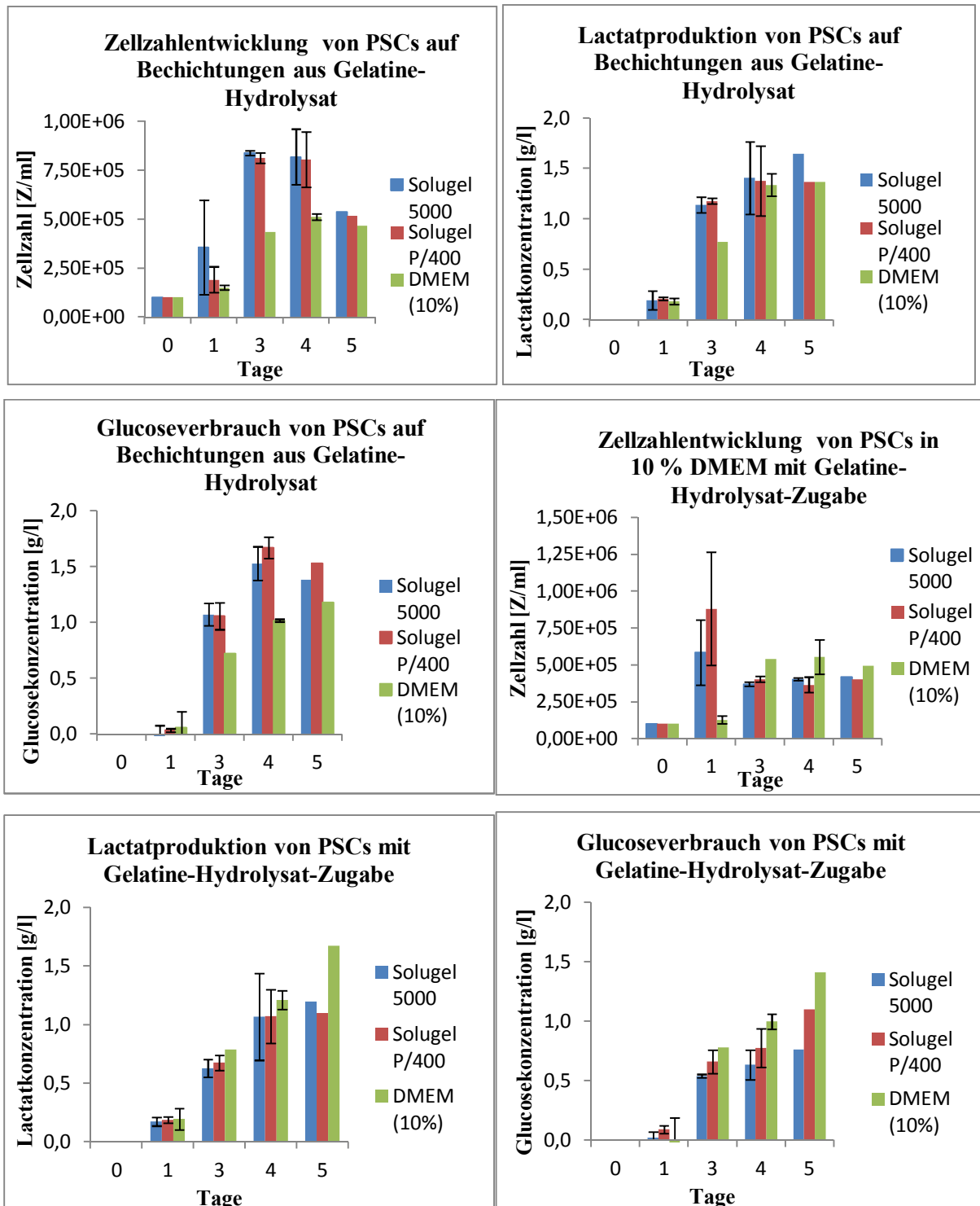


Abbildung 32: Vitalitätsuntersuchungen von PSCs auf Gelatine-Hydrolysat-Beschichtungen bzw. mit Gelatine-Hydrolysat-Zugabe. Exemplarisch wurde die Vitalitätsuntersuchung mit den Hydrolysaten (blau, rot) dargestellt. Es wurden die Zellzahlentwicklung, die Lactatproduktion und der Glucoseverbrauch von Zellen

Ergebnisse

auf Beschichtungen aus Gelatine, sowie von Zellen, die mit Nährmedium und Gelatine-Zugabe kultiviert wurden untersucht (n = 3, SEM).

Die ersten drei Diagramme aus Abbildung 32 zeigen die Ergebnisse von Zellen, die auf Gelatine-Beschichtungen kultiviert wurden. Im Gegensatz zur Kontrolle (ohne Beschichtung, Abbildung 32, grün) zeigten die Zellen auf den beschichteten Oberflächen (Abbildung 32, blau, rot) ähnliches Zellwachstum, Lactatproduktion, sowie Glucoseverbrauch. Die letzten drei Diagramme aus Abbildung 32 zeigen die Ergebnisse von Zellen, welche in Medium mit Gelatine-Zugabe kultiviert wurden. Im Vergleich zur Kontrolle ließ sich bei diesen Diagrammen eine vergleichbare Zellzahlentwicklung, Lactatproduktion und Glucoseverbrauch der Zellen verzeichnen.

Der nächste Schritt war die Verkapselung der Zellen in Mischgelen aus Alginate und Gelatine. Damit die Gelatine möglichst in den Gelen verblieb, wurden Hohl- und Vollkapseln aus Alginate mit Gelatine hergestellt. In Abbildung 33 sind die Hohlkapseln dargestellt.

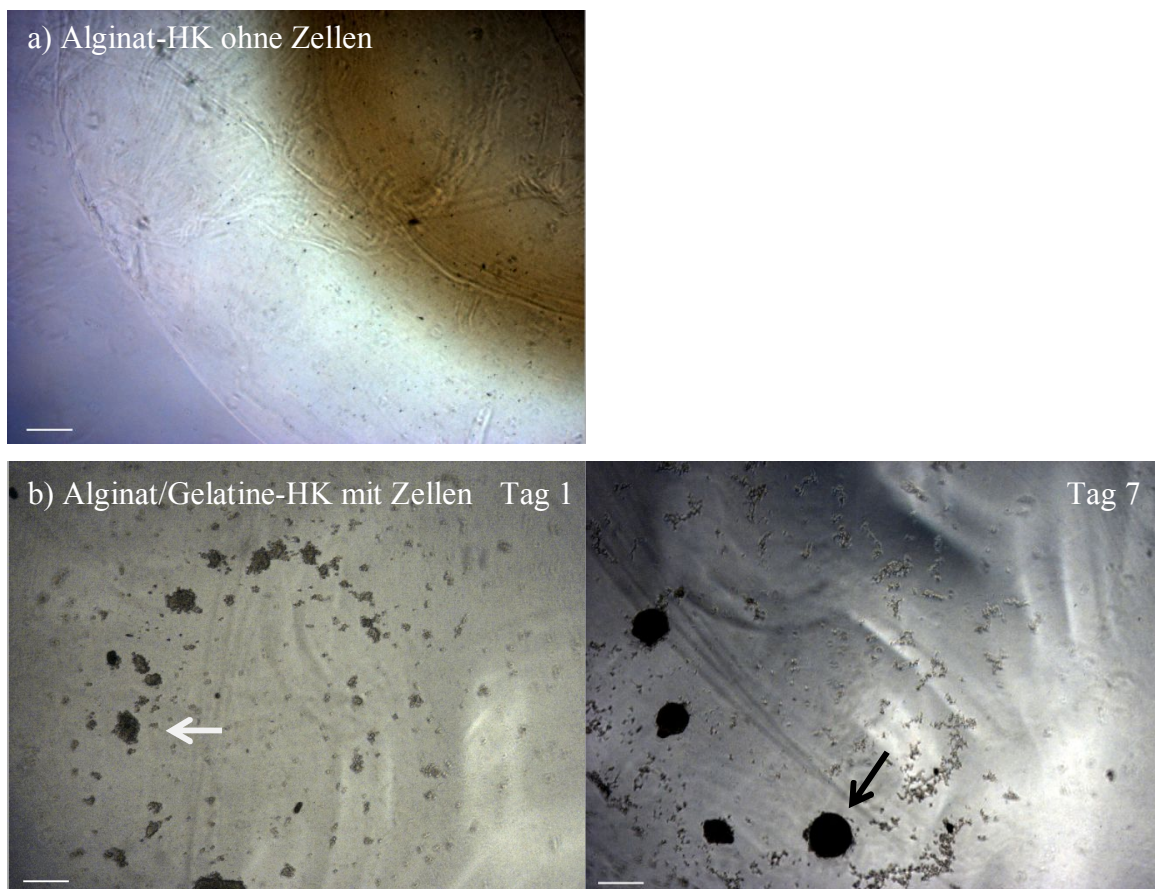


Abbildung 33: a) Alginat-Hohlkapseln ohne und b) Alginat/Gelatine-Hohlkapseln mit PSCs. Als Vergleich diente eine Alginat-Hohlkapsel ohne Zellen (a)). In den Alginat/Gelatine-Hohlkapseln mit Zellen (b)) waren an Tag eins Aggregate zu sehen (weißer Pfeil), ebenso an Tag sieben (schwarzer Pfeil). Für die Kapseln

Ergebnisse

wurde Alginat (High MW) und Gelatine-Hydrolysat (F) (siehe Tabelle 6) verwendet und die Zellen mit 10 % DMEM+Ca²⁺ (0,1 % (w/v)) kultiviert. Maßstab = 200 µm.

Die Zellen in den Holkapseln konnten nicht adhären, sondern lagen ab Tag eins in Form von Aggregaten vor (Abbildung 33b), weißer Pfeil), welche sich zusehends verstärkten (Abbildung 33b), schwarzer Pfeil). In Abbildung 34 sind die Zellen in den Alginat-Vollkapseln zu sehen.

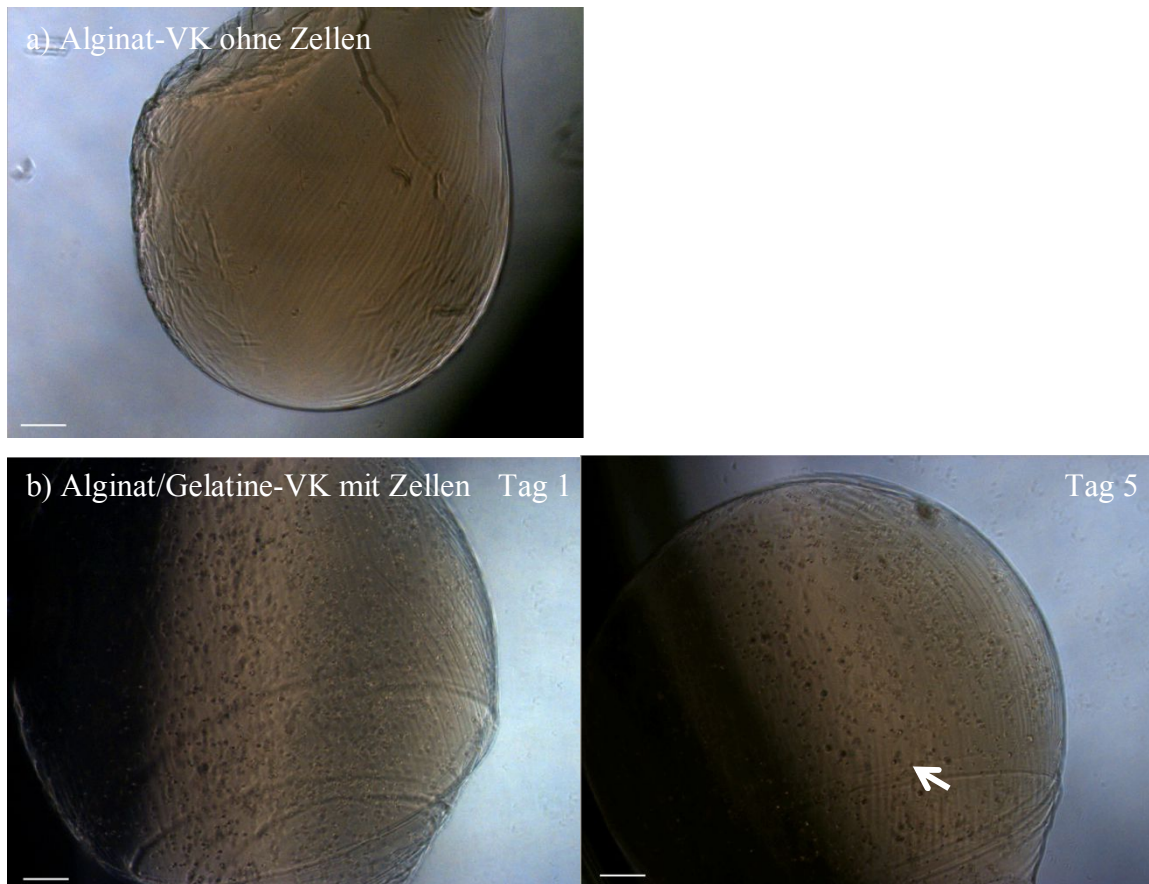


Abbildung 34: a) Alginat-Vollkapsel ohne und b) Alginat/Gelatine-Vollkapseln mit PSCs. Als Vergleich diente eine Alginat-Vollkapsel ohne Zellen (a). In den Alginat/Gelatine-Vollkapseln mit Zellen (b)) wurden die Zellen auch an Tag fünf nicht adhären (weißer Pfeil). Für die Kapseln wurde Alginat (Low MW) und Gelatine (A) (siehe Tabelle 6) verwendet und die Zellen mit 10 %DMEM+Ca²⁺ (0,5 % (w/v)) kultiviert. Maßstab = 200 µm.

Die Zellen in den Alginat/Gelatine-VK konnten auch nach fünf Tagen nicht adhären. Es bildeten sich keine Aggregate (vgl. Abbildung 33), da die Zellen wahrscheinlich nicht beweglich waren, sondern in der durchpolymerisierten Kapsel an einem Punkt fixiert waren. Die Untersuchung der Vitalität (Abbildung 35) zeigte zwar nur einen geringen Anstieg bzw.

Ergebnisse

stagnierende Werte des Glucoseverbrauchs und der Lactatproduktion, was aber wahrscheinlich auch dem Umstand geschuldet war, dass die Stoffwechselprodukte in den Vollkapseln verblieben und im Medium eine geringere Konzentration dieser Produkte vorhanden war.

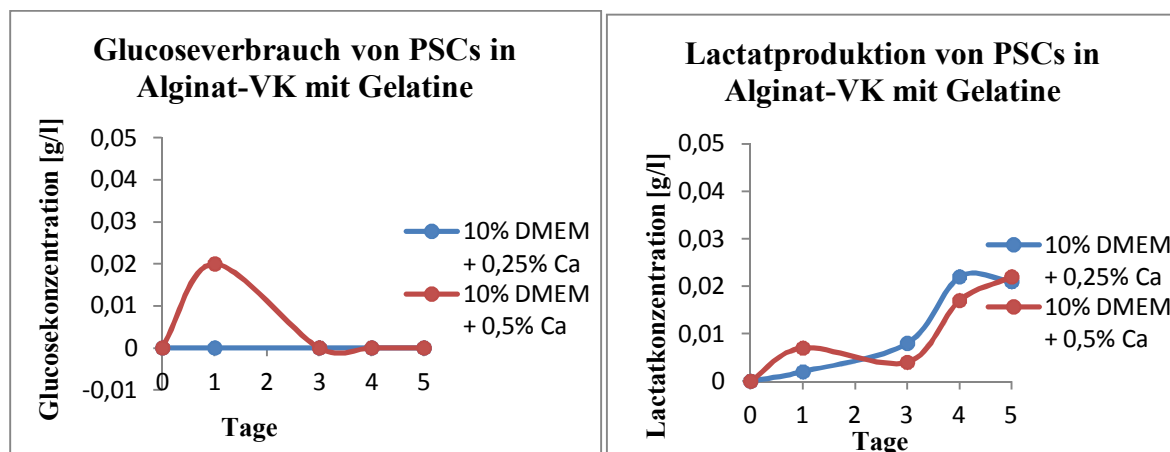


Abbildung 35: Stoffwechselaktivität von PSCs in Alginat/Gelatine-VK. Die Analyse der Stoffwechselaktivität erfolgte über fünf Tage. Die Alginatkapseln wurden mit 1 % (v/v) Gelatine (A) (siehe Tabelle 8) hergestellt. Die Kultivierung erfolgte in 10 % DMEM mit 0,25 % (w/v) Calciumzugabe (blau) bzw. mit 0,5 % (w/v) Calciumzugabe (rot) (n = 1).

Um die Vitalität der Zellen in den Kapseln zu untersuchen, wurde eine Lebend (FDA, grün)/Tot (PI, rot)-Färbung der Zellen nach vier Tagen Kultur durchgeführt (Abbildung 36).

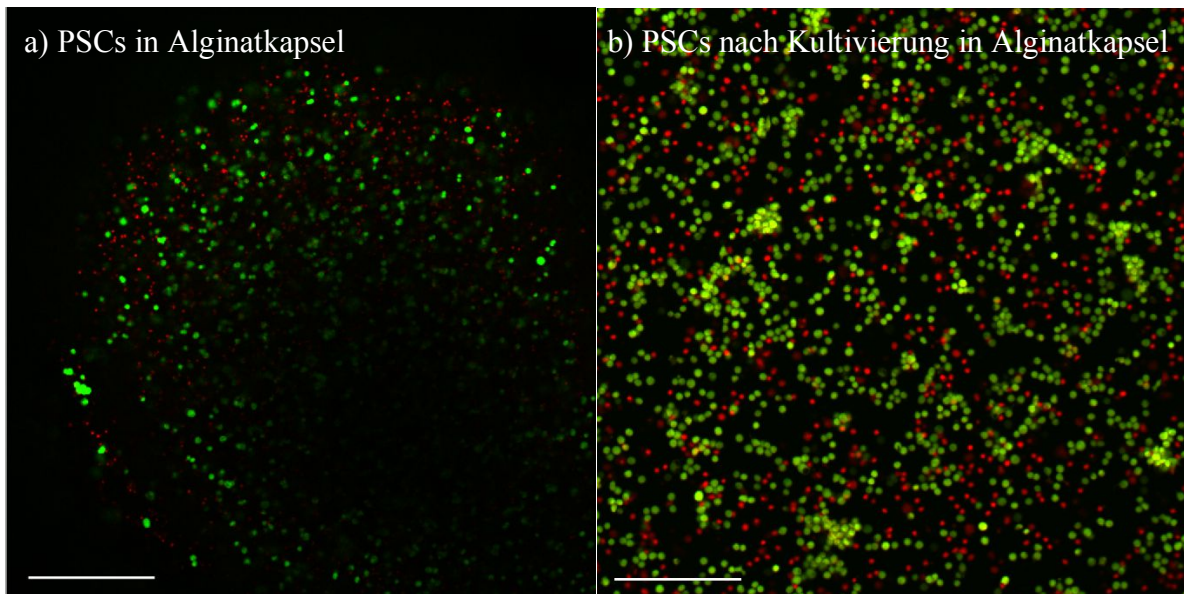


Abbildung 36: FDA/PI-Färbung von PSCs in Alginat-VK-Kultur. a) Es wurden Zellen nach vier Tagen in der Alginatkapsel gefärbt, anschließend wurde eine Kapsel degradiert und die frei gewordenen Zellen gefärbt (b).

Die FDA/PI-gefärbten Zellen in der Alginatkapsel (Abbildung 36, a)) sind überwiegend vital (= grüne Zellen). Es zeigte sich, dass die Zellen eine rundliche Morphologie aufwiesen: Das bedeutet, dass die Zellen nicht adhären und proliferieren konnten.

Um die Gesamtheit der Zellen darzustellen wurde eine zweite Kapsel mit 0,25 % (v/v) Citrat aufgeschlossen und die Zellen anschließend mit FDA/PI-gefärbt. In Abbildung 36 b) ist das Ergebnis dargestellt. Die Zellen waren nach vier Tagen in Kapsel-Kultur noch mehrheitlich vital (grün), ein kleiner Teil war aber bereits abgestorben (rot).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Gelatine, die dem Alginat beigemischt wurde, nicht in der Kapsel verblieb, sondern vielmehr in das umgebende Medium diffundierte. Aus diesem Grund wurde im Folgenden versucht, die Gelatine kovalent an das Alginat zu koppeln. Die angewandte chemische Reaktion fand unter Verwendung von Carbodiimid statt (Pu et al., 2009; Jon A Rowley & Mooney, 2002)

Exemplarisch sind einige der Ergebnisse nachfolgend dargestellt. In den Tabellen 13 und 14 sind die Zusammensetzungen der Versuchsbedingungen, die eingesetzten Reagenzien und das Verhältnis der Edukte und Kupplungsreagenzien dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 13: Exemplarische Auswahl der Versuchsansätze 1-11 und deren Zusammensetzungen.

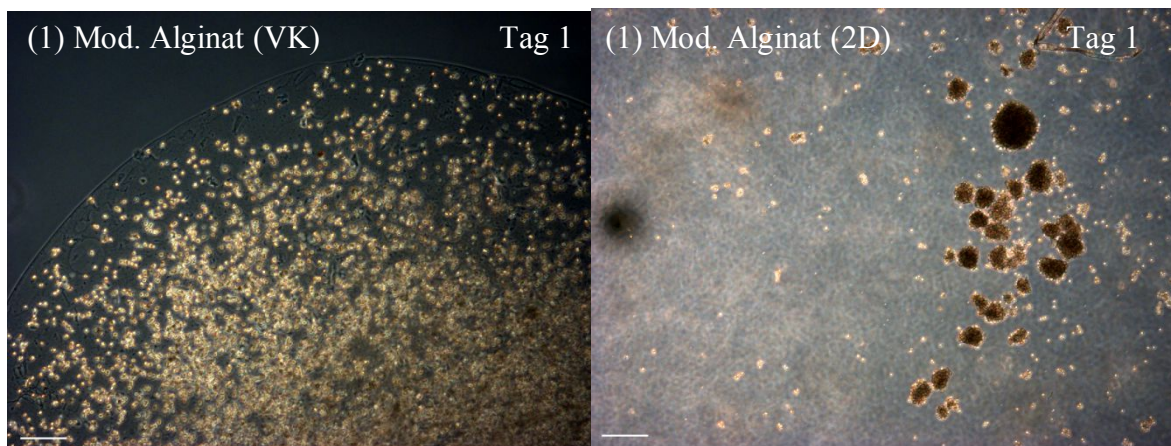
	Alginat	Gelatine	Kupplungsreagenz	Co-Kupplungsreagenz	Puffer	Sonstiges					
1	Low MW	Schweinehaut Typ A, 90-110 Bloom	EDC	Sulfo-NHS	MES	T: 25 °C pH: neutral MWCO: 3500					
2		Gelatine- Hydrolysat Solugel 5000									
3		Gelatine- Hydrolysat Solugel P/400									
4		Gelatine- Hydrolysat Solugel 5000									
5											
6		Gelatine- Hydrolysat Solugel 5000 + FKS				HOBt	A. dest.	pH: basisch MWCO: 50000			
7						Sulfo-NHS					
8						HOBt					
9		High MW				FKS			EDC·HCl		T: <0°C °C pH: basisch MWCO: 50000
10		High/Low MW									
11	High/Low MW	Gelatine- Hydrolysat Solugel 5000									

Ergebnisse

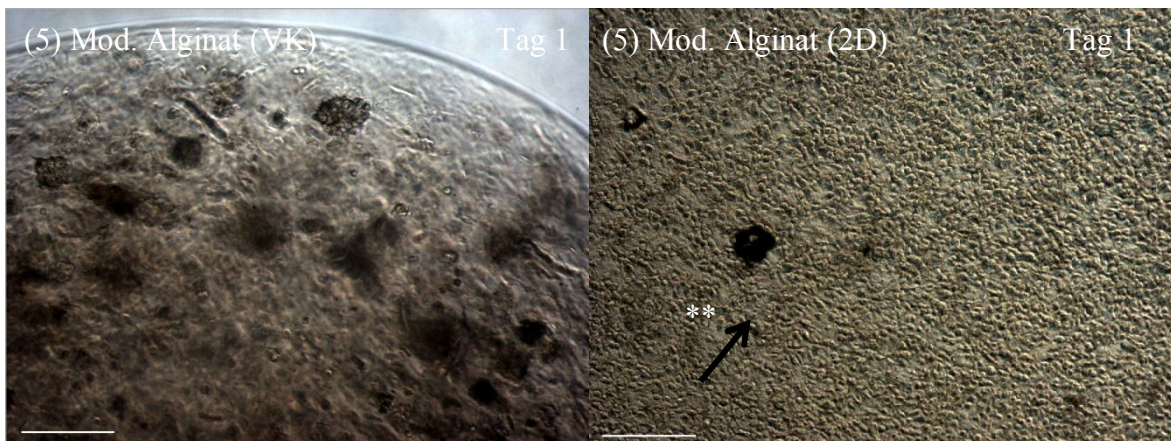
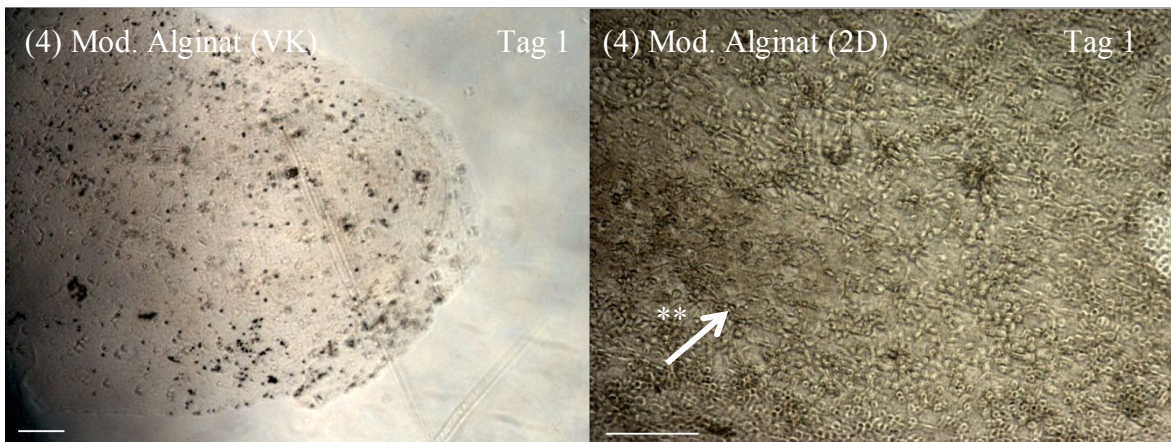
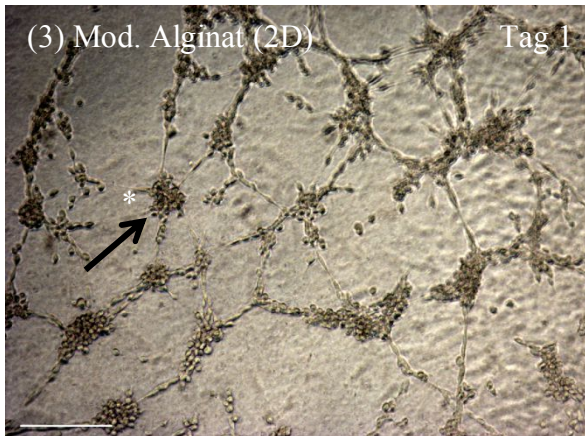
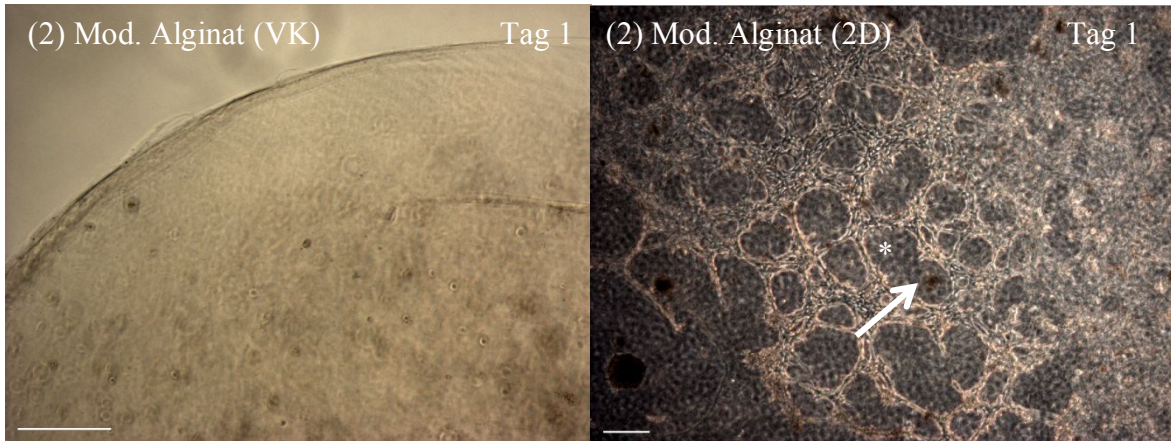
Tabelle 14: Verhältnisse der eingesetzten Edukte und Kupplungsreagenzien der Versuchsansätze 1-11.

	Alginat:Gelatine Gewichts%	Alginat:EDC* Mol%	EDC:Co-Kuppler Mol%
1	1:8	5:1	2:1
2	1:8	5:1	2:1
3	1:30	5:1	2:1
4	1:30	5:1	2:1
5	1:30	5:1	2:1
6	1:30	5:1	1:2
7	1:30	5:1	2:1
8	1:30	5:1	1:2,5
9	1:30	5:1	1:2,5
10	1:30	5:1	1:2,5
11	1:30	10:1	1:1

Die modifizierten Alginate wurden nach der Herstellung lyophilisiert und danach mit der gewünschten Massenkonzentration in Lösung gebracht. Die Zellen wurden anschließend entweder auf 2D-Gelschichten aufgebracht, oder in 3D-VK verkapselt (Abbildung 37).



Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 37: PSCs in 3D-VK und auf 2D-Gelschichten aus modifiziertem Alginat (vgl. Tabelle 14, 15 (1)-(5)). Die Änderungen der Versuchsbedingungen, Edukt- und Kupplungsreagenzien führte zu zunehmenden Verbesserungen der Geleigenschaften als Zellkultivierungsmatrix (Pfeile). Maßstab = 200 µm.

Die Zellen auf und in Probe (1) (Abbildung 37) konnten nicht adhären und bildeten auf den Gelen Aggregate. Die Verwendung von Gelatine-Hydrolysat führte bei den Proben (2) und (3), im Gegensatz zu Probe (1), zu einer Zellschicht, die zunehmend adhären konnte (Abbildung 37, weißer *Pfeil, schwarzer *Pfeil). Das Absenken der Versuchstemperatur während der Kupplungsreaktion führte bei Ansatz (5) zu einer Verbesserung der Adhärenz der Zellen (Abbildung 37, **weißer Pfeil). Die Verwendung des Co-Kupplungsreagenz (vgl. Abbildung 8, 9) HOBt statt sulfo-NHS, führte zu einer weiteren Verbesserung der Geleigenschaften: Die Zellen konnten auf den Gelen noch besser adhären (Abbildung 37, **schwarzer Pfeil).

Der direkte Vergleich der beiden verwendeten Co-Kupplungsreagenzien unter den gleichen Versuchsbedingungen bestätigte, dass die Verwendung von HOBt die bessere Alternative für die chemische Reaktion war (Abbildung 38).

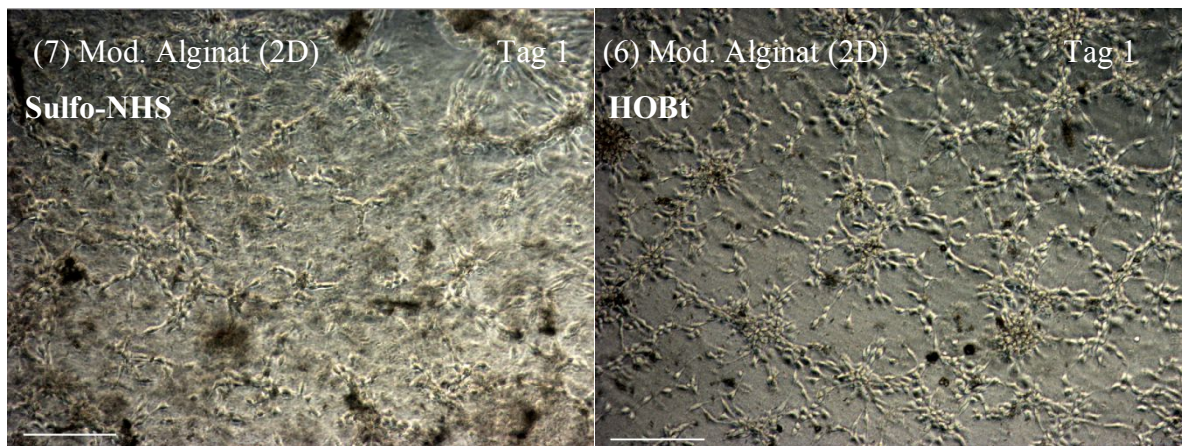


Abbildung 38: Vergleich der Geleigenschaften modifizierter Alginate unter Verwendung von sulfo-NHS oder HOBt. Dargestellt sind PSCs nach einem Tag auf den modifizierten Gelschichten. Maßstab = 200 µm.

Außerdem wurde die Methode der Reinigung angepasst und optimiert. Zunächst wurde die Dialysedauer untersucht. Dazu wurde modifiziertes Alginat null, einen, zwei und fünf Tage dialysiert, getrocknet und nach Einstellen der gewünschten Konzentration mit Zellen besiedelt und deren Zellzahlentwicklung untersucht (Abbildung 39).

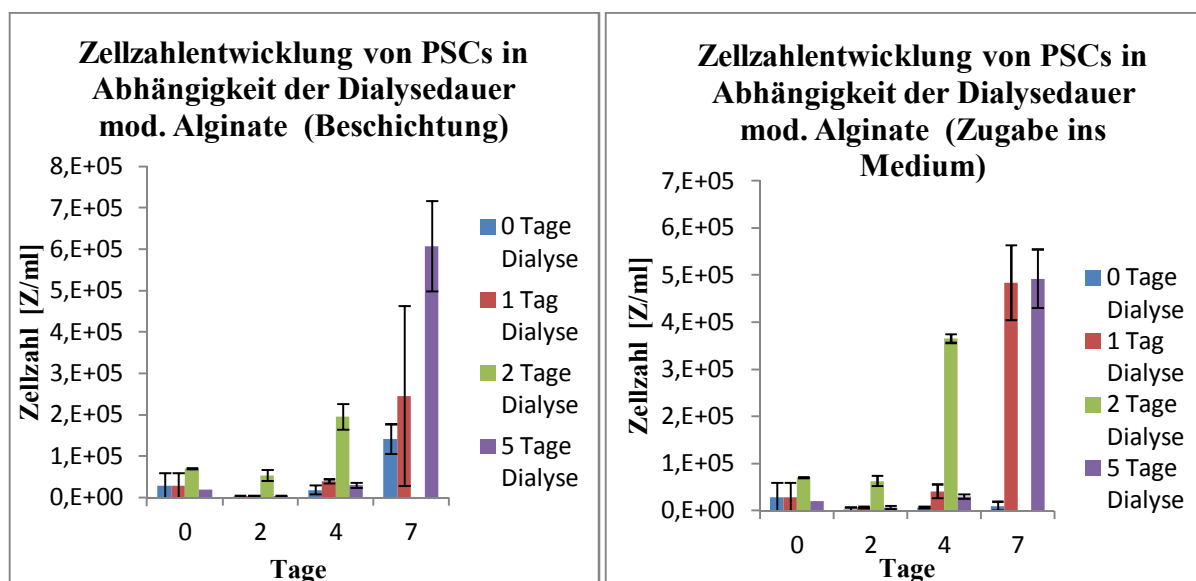


Abbildung 39: Zellzahlentwicklung von PSCs, die mit modifizierten Alginat kultiviert wurden. Die modifizierten Alginat wurden null (blau), einen (rot), zwei (grün) oder fünf (lila) Tage dialysiert und getrocknet. Die Zellen wurden entweder auf 2D-Gelschichten aus dem modifizierten Alginat, oder mit Alginat-Zugabe im Medium kultiviert und hinsichtlich ihrer Zellzahlentwicklung untersucht (n = 3, SEM).

Die Zellen, die mit null und einen Tag (Abbildung 39, blau, rot) dialysiertem Alginat kultiviert wurden, zeigten eine geringe Zellzahl, im Vergleich zu zwei und fünf Tage (Abbildung 39, grün, lila) dialysiertem Alginat. Der fehlende Wert des zwei Tage dialysierten Alginats an Tag sieben, kam durch ein vorzeitiges Absterben der Zellen zustande.

Es wurden außerdem zwei verschiedene Dialyseschläuche mit unterschiedlichen Porengrößen (*Cut-off*: = 3,5 bzw. 50 kDa) verwendet. Das Ergebnis ist in Abbildung 40 zu sehen.

Ergebnisse

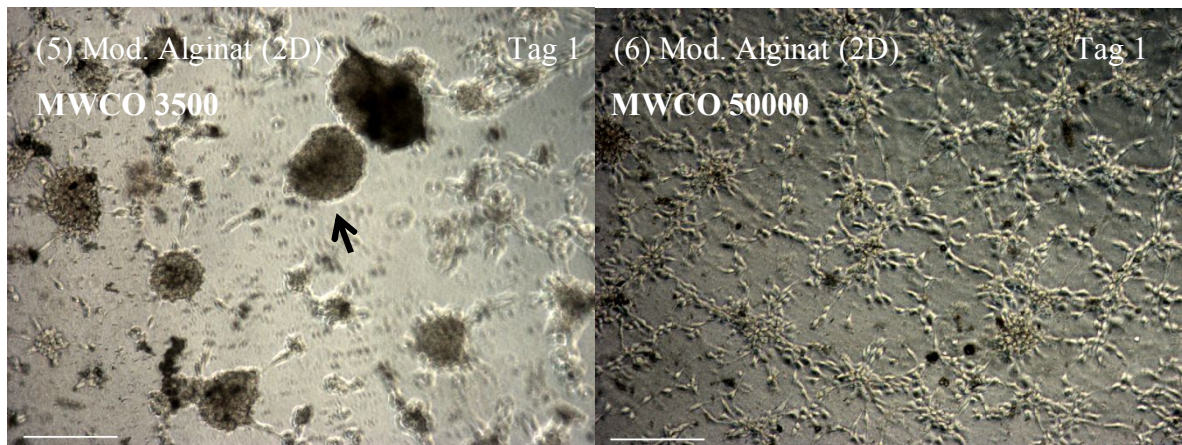


Abbildung 40: PSCs auf 2D-Gelschichten aus modifiziertem Alginat, welches mit unterschiedlichen Dialysemembranen gereinigt wurde. Die Reinigung der Alginate erfolgte mit Dialysemembranen, die einen *Cut-off* von 3,5 bzw. 50 kDa hatten. Die Zellen wurden nach einem Tag auf dem Gel untersucht. Maßstab = 200 µm.

Die Porengröße der Dialysemembranen hat einen deutlichen Einfluss auf die Gelverträglichkeit der Zellen (Abbildung 40). In dem Alginat, das mit der geringeren Porengröße gereinigt wurde, neigten die darauf kultivierten Zellen zu einer höheren Anzahl an Aggregat-Bildung (Abbildung 40, schwarzer Pfeil). Auf dem Alginat, welches dahingegen mit dem Dialyseschlauch mit der größeren Porengröße dialysiert wurde, zeigten die Zellen ein deutlich besseres Wachstumsverhalten.

Es wurden außerdem zwei Alginate mit verschiedenen Molekulargewichten (Low/High MW) getestet (Abbildung 41).

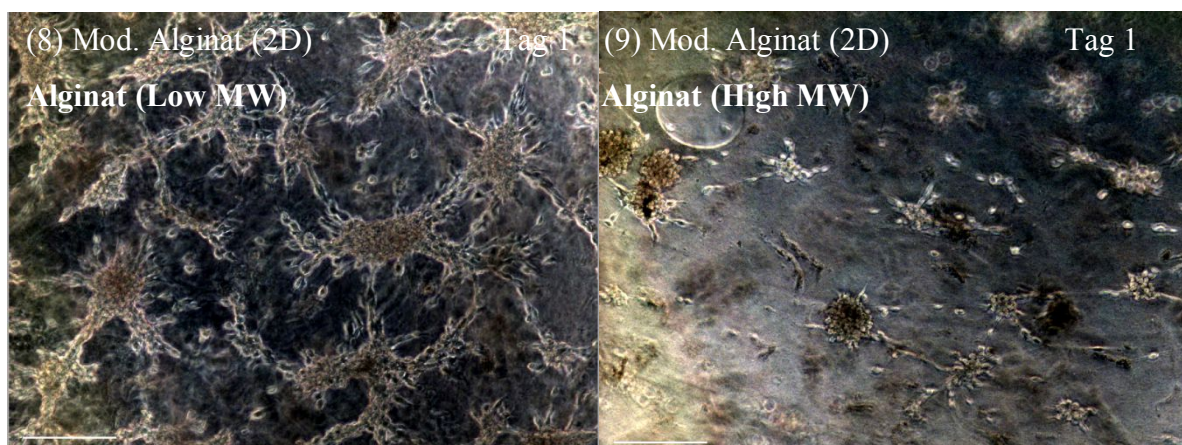


Abbildung 41: PSCs auf 2D-Gelen aus modifiziertem Alginat. Es wurde das Adhärenzverhalten von PSCs auf 2D-Gelen untersucht, welche entweder aus Alginat (Low MW) oder Alginat (High MW) bestanden. Maßstab = 200 µm.

Ergebnisse

Die Verwendung von Alginaten mit verschiedenen Molekulargrößen zeigen einen geringen Unterschied in der Adhärenz der Zellen (Abbildung 41). An Tag eins war zu sehen, dass die Zellen auf dem Alginat mit dem geringeren Molekulargewicht besser adhäreren konnten, als auf dem anderen. Allerdings waren die Geleigenschaften des Alginats mit dem höheren Molekulargewicht deutlich besser: Es bildeten sich stabilere Gele.

Da FKS bekanntermaßen einen positiven Einfluss auf die Adhäsion und Proliferation von Zellen hat, wurde außerdem versucht, Alginat mit Bestandteilen des FKS anstelle von Gelatine kovalent zu modifizieren (Schmitz, 2007) (Abbildung 42).

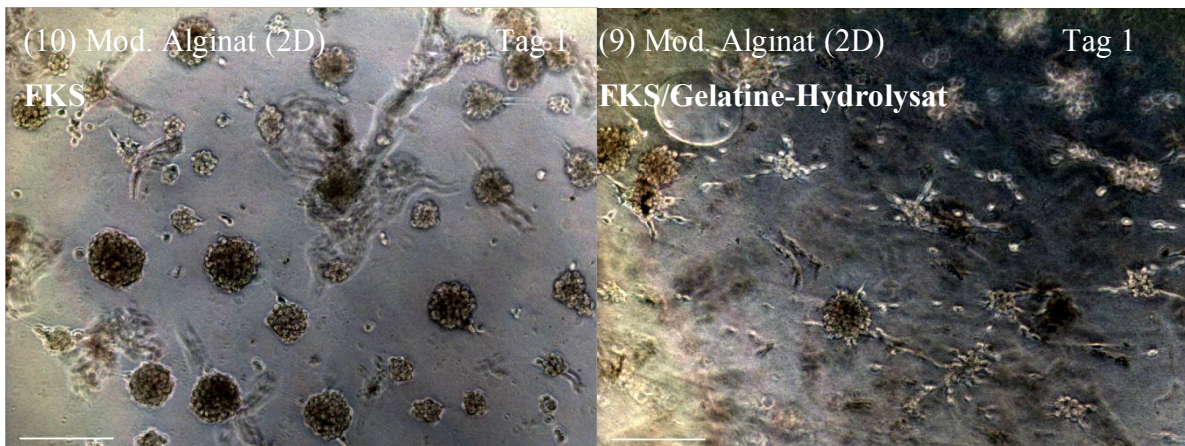


Abbildung 42: PSCs auf 2D-Alginatgelen, die mit FKS bzw. FKS und Gelatine modifiziert wurden. Als Anheftungsstellen für die Zellen sollte entweder FKS oder eine Mischung aus FKS und Gelatine-Hydrolysat dienen. Maßstab = 200 µm.

In Abbildung 42 sind die Ergebnisse von Zellen dargestellt, die auf modifizierten Alginaten kultiviert wurden. Die Modifizierung erfolgte in Form von FKS bzw. FKS und Gelatine-Hydrolysat. Es wurde deutlich, dass eine Modifizierung mit FKS nicht zu adhären Zellen führte. Auf der Kontrolle, die sowohl mit FKS, als auch mit Gelatine modifiziert wurde, waren dahingegen adhärent wachsende Zellen zu sehen.

Die Versuchsbedingungen wurden variiert, bis die optimalen Voraussetzungen für die Gelherstellung geschaffen waren. In Tabelle 14 sind die Reaktionsbedingungen dargestellt (Ansatz 11). Die verwendeten Edukte waren Alginat (High/Low MW) und Gelatine-Hydrolysat Solugel 5000. Als Kupplungsreagenz wurde EDC·HCl und als Co-Kupplungsreagenz wurde HOBt verwendet. Die Gelatine wurde im 30fachen Überschuss

Ergebnisse

(bezogen auf die Masse des Alginat) eingesetzt und das Kupplungsreagenz wurde so verwendet, dass jedes zehnte Alginatmonomer modifiziert werden konnte. Das Verhältnis zwischen den Kupplungsreagenzien selbst betrug 1:1 (Tabelle 15). Diese Versuchsbedingungen wurden für alle weiteren Versuche angewendet.

Zunächst wurden die Zellen auf diesen modifizierten Gelen kultiviert und mit einer Vitalfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 43).

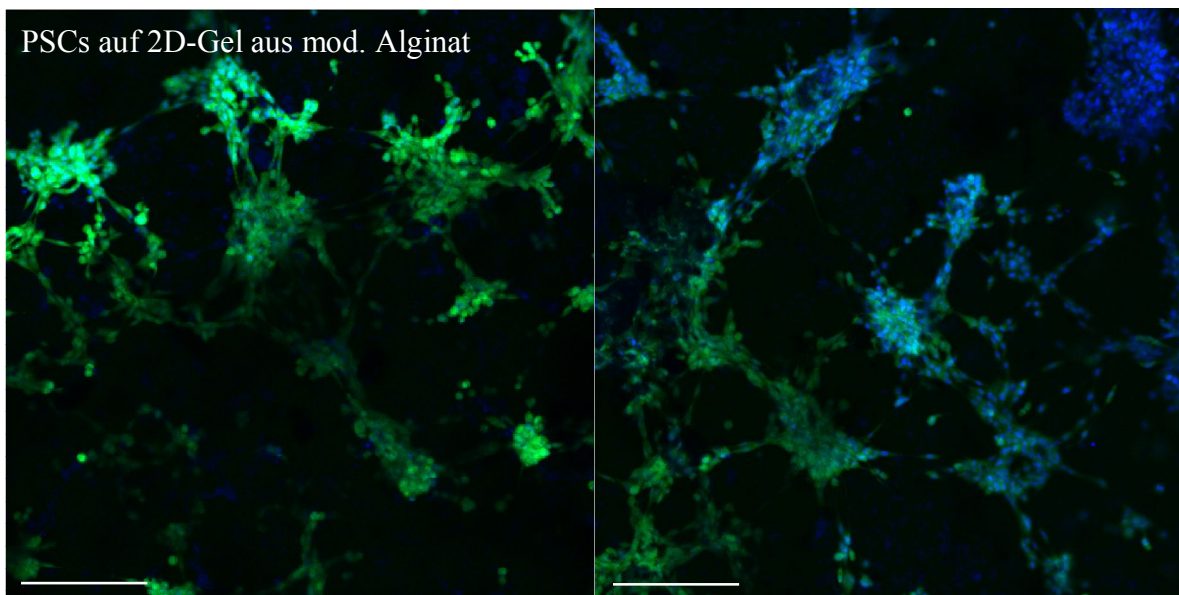


Abbildung 43: FDA/HOECHST-Färbung der PSCs auf modifizierten 2D-Gelen. Nachdem die Zellen einen Tag auf den Gelen kultiviert wurden, wurden diese mit FDA (grün, vitale Zellen) und HOECHST (blau, vitale Zellen, Zellkern) gefärbt. Maßstab = 200 µm.

Die Aufnahmen wurden mit dem LSM gemacht, so dass verschiedene Gelschichten aufgenommen werden konnten. Deutlich zu sehen sind die blau (HOECHST) angefärbten Zellkerne und die grün (FDA) angefärbten vitalen Zellen (Abbildung 43). Es konnte somit sowohl die Vitalität, als auch die Morphologie der adhären wachsenden Zellen dargestellt werden. Der nächste Schritt war die Verkapselung der Zellen in den gleichen Gelen. Um die Morphologie der Zellen einerseits zu überprüfen und andererseits, die Vitalität der Zellen nach längerer Zeit in der Kapselkultur, wurden diese mit FDA/PI gefärbt (Abbildung 44).

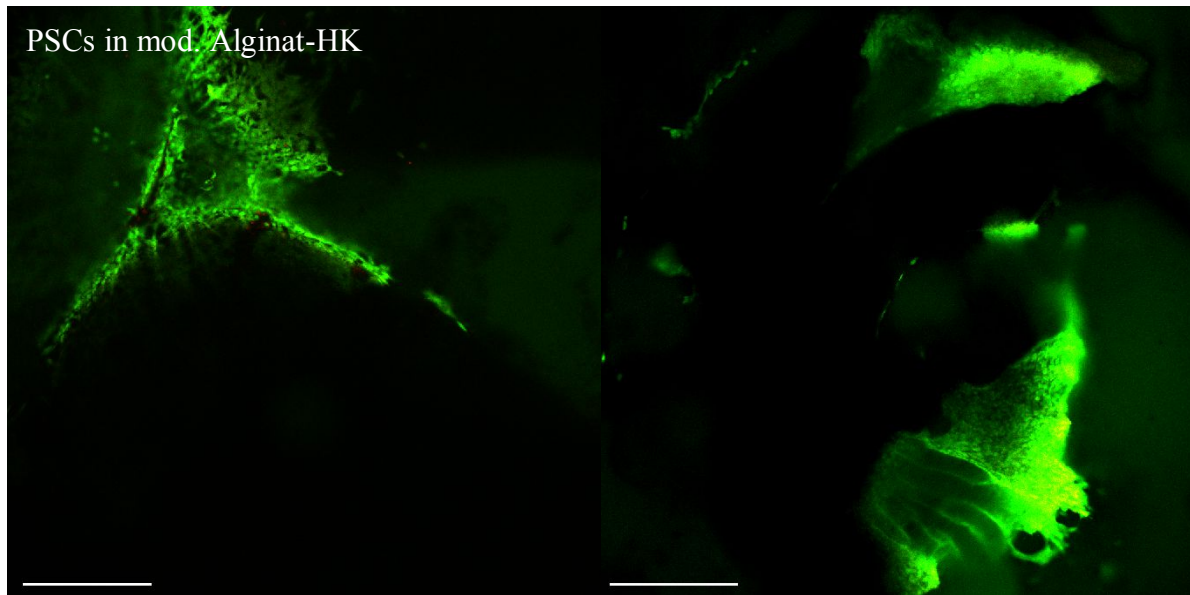


Abbildung 44: FDA/PI-Färbung der PSCs in modifizierten Alginathohlkapseln. Die Zellen wurden nach 30 Tagen in der Kapselkultur mit FDA (grün, vitale Zellen) und PI (rot, tote Zellen) gefärbt. Maßstab = 200 μm .

Die Zellen in den Gelen wurden mit einem *z-stack* (nicht dargestellt) in den verschiedenen Gelebenen sichtbar gemacht. Die Zellen, vornehmlich vital, waren durch die Aufnahmen in den verschiedenen Ebenen in den einzelnen Poren und Gelschichten zu sehen.

Auch die Kultivierung von Zellen auf Beschichtungen aus modifiziertem Alginat bestätigte die Vitalität der Zellen (Abbildung 45).

Ergebnisse

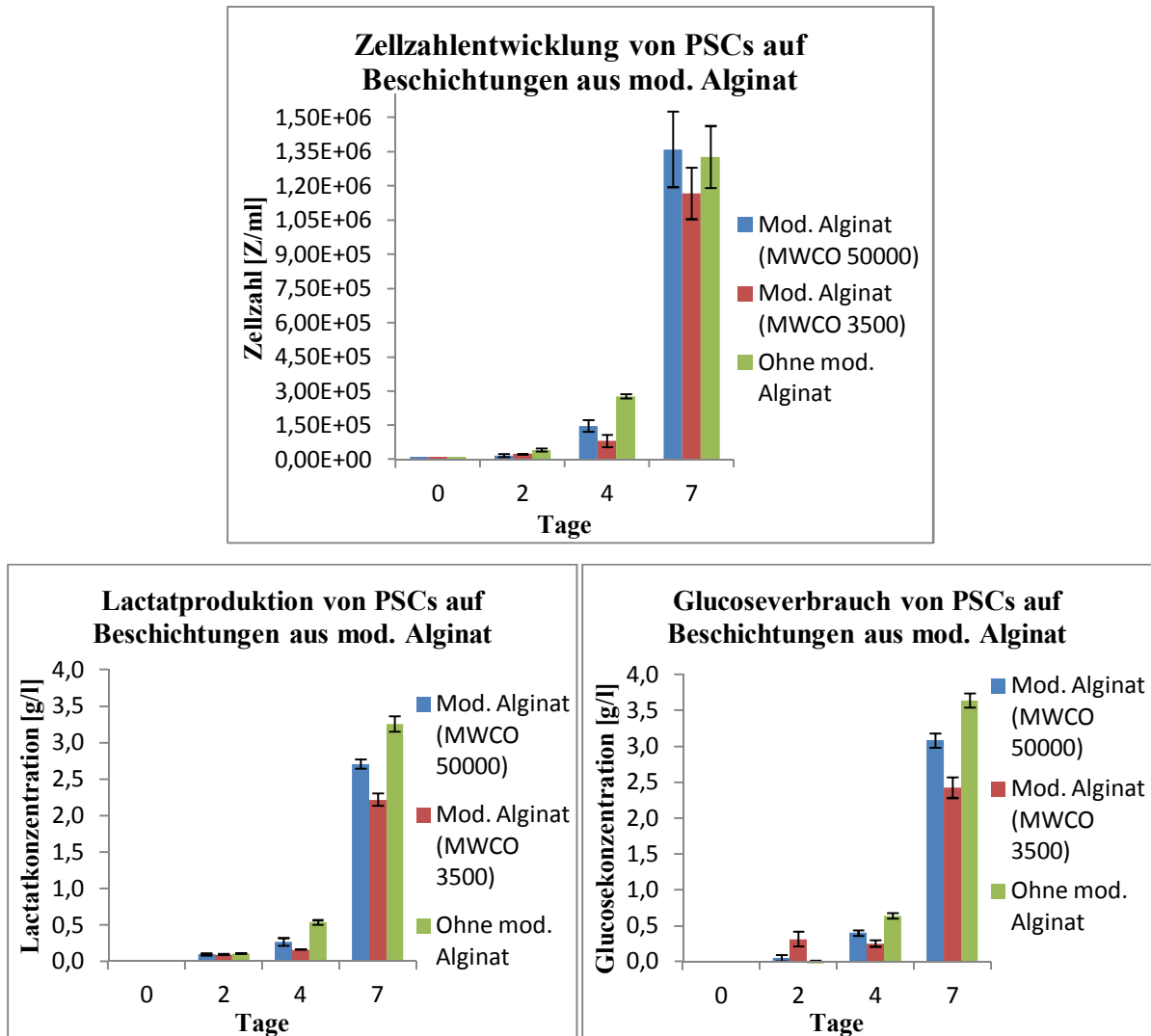


Abbildung 45: Zellzahlentwicklung und Stoffwechselaktivität von PSCs, die auf Beschichtungen aus modifiziertem Alginat kultiviert wurden. Die Zellen wurden auf modifiziertem Alginat kultiviert, welches mit einem Dialyseschlauch mit einem *cut-off* von 50000 (blau) bzw. 3500 (rot) gereinigt wurden. Die Kontrolle (grün) wurde auf einer herkömmlichen Zellkulturoberfläche kultiviert (SEM, n = 3).

Die Zellen, die auf den Beschichtungen aus modifiziertem Alginat kultiviert wurden, welches während der Reinigung mit einer Membran mit einer Porengröße von 50 kDa (Abbildung 45, blau) dialysiert wurde, zeigten in Zellzahlentwicklung und Stoffwechselaktivität ein besseres Ergebnis als das Alginat, welches mit der geringeren Porengröße (Abbildung 45, rot) dialysiert wurde.

Die Modifizierung des Alginates führt somit zu einem Gelsystem, mit dem die Zellen zufriedenstellend kultiviert werden konnten. Allerdings werden die Geleigenschaften durch

die Modifizierung hinsichtlich ihrer Stabilität deutlich beeinflusst. Nach der Modifizierung waren die hergestellten Kapseln auch nach Verdopplung der Endkonzentration des modifizierten Alginats sichtbar labiler, als die unmodifizierten Alginat.

5.1.3.1. Charakterisierung der Kupplungsprodukte

Im Folgendem wurden die Alginat-Gelatine-Systeme charakterisiert, um den Erfolg der Modifizierung der Alginat zu überprüfen. Es wurden zunächst NMR-Spektren der Edukte und Produkte aufgenommen (Abbildung 46)

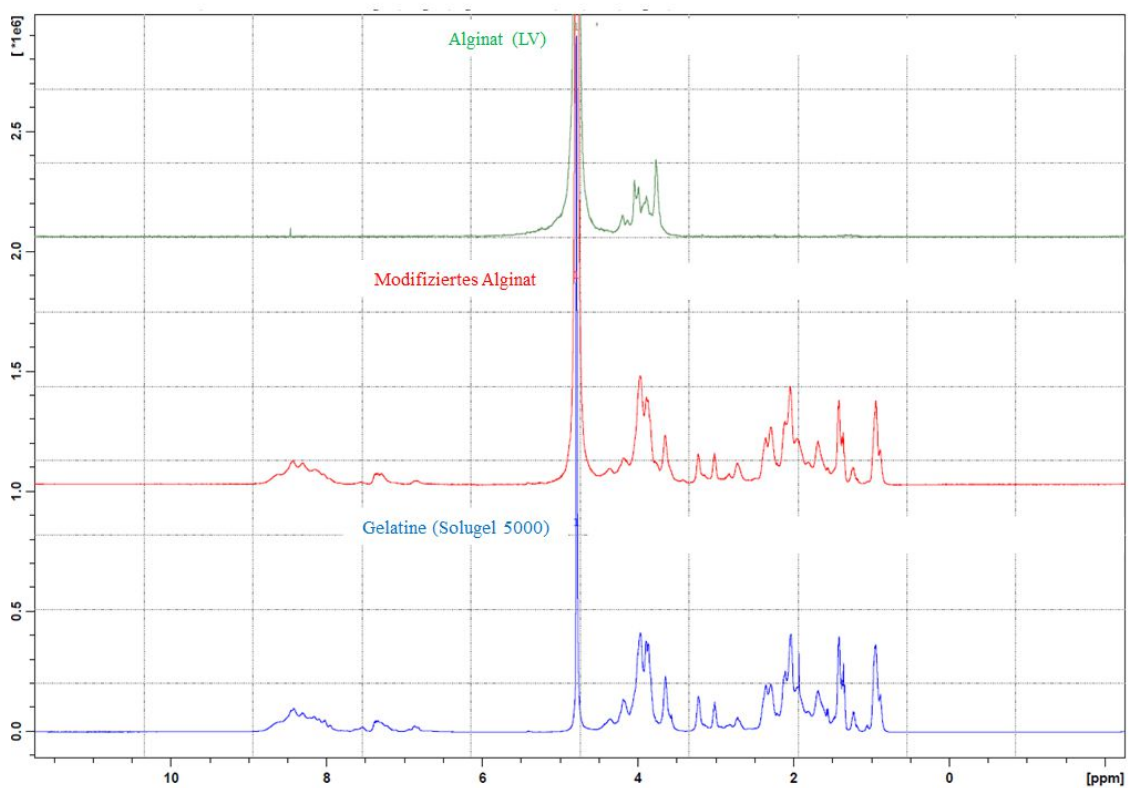


Abbildung 46: NMR-Spektren von Alginat (grün), modifiziertem Alginat (rot) und Gelatine (blau).

Aus Abbildung 46 wird ersichtlich, dass das modifizierte Alginat (rot) sehr viel Nebenprodukt (= Gelatine) enthielt, da es mit einem deutlichen Überschuss eingesetzt wurde. Außerdem erfolgte die Dialyse mit einem *Cut-off* von 3,5 kDa. Aus diesem Grund wurde eine weitere Reinigung mittels Dialyse mit einem *Cut-off* von 50 kDa durchgeführt. Die so gereinigten Produkte wurden mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie analysiert (Abbildung 47 und 48).

Ergebnisse

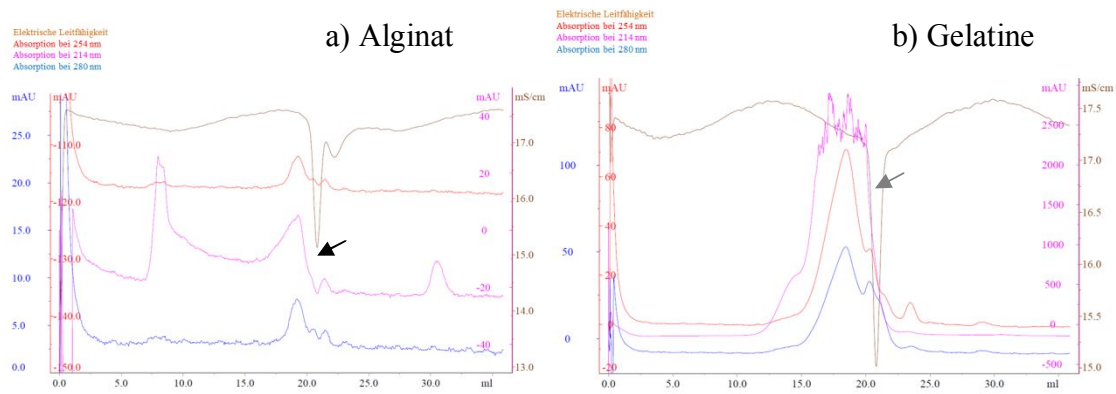


Abbildung 47: Chromatogramme der SEC-Messung der Edukte a) Alginat (low MW) und b) Gelatine-Hydrolysat (Solugel 5000). Neben der Absorption bei 214 nm (pink), sind die Absorption bei 254 nm (rot) und 280 nm, sowie die elektrische Leitfähigkeit (braun) dargestellt.

Abbildung 47 und 48 zeigen, dass nach einer weiteren Dialyse mit einem MWCO von 50 kDa nur das modifizierte Alginate vorlag (Abbildung 47 a), Absorption bei 214 nm (pink), Abbildung 48 (blau)) (vgl schwarzer Pfeil Abbildung 47a und Abbildung 48). Im Gegensatz dazu zeigte das modifizierte Alginate, welches mit einem MWCO von 3,5 kDa dialysiert wurde, ein Chromatogramm auf, welches dem der Gelatine ähnelte, da es wahrscheinlich die Gelatine als Nebenprodukt enthält, die im Alginate nicht sein sollte (Abbildung 47 b), Absorption bei 214 nm (pink), Abbildung 47 (rot)) (vgl grauer Pfeil Abbildung 47b und Abbildung 48).

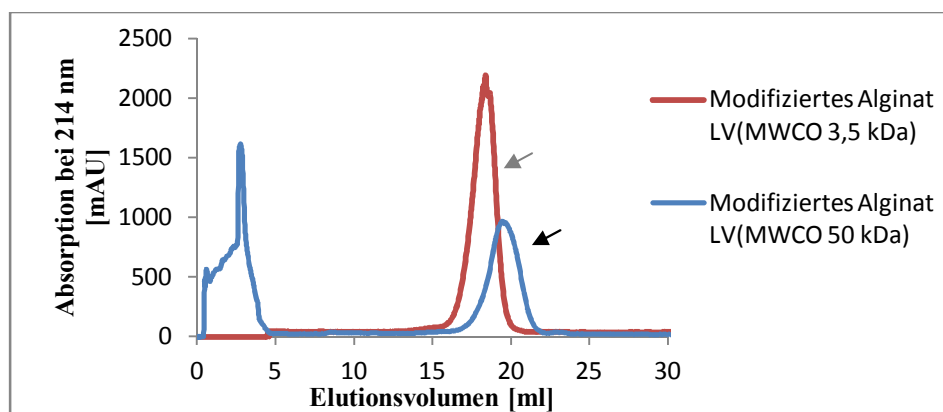


Abbildung 48: Chromatogramm der modifizierten Alginat bei 214 nm. Dargestellt sind die Ergebnisse nach einer Dialyse mit einem MWCO von 3,5 kDa (rot) und 50 kDa (blau).

Um nun endgültig nachzuweisen, dass die Kupplung erfolgreich war, wurde der TNBS-Assay durchgeführt. TNBS ist in der Lage mit primären Aminen zu reagieren und orangefarbene Produkte zu bilden. Primäre Amine sind im unmodifizierten Alginate nicht vorhanden und

Ergebnisse

sollten somit nur in den Proben vorhanden sein, die Gelatine enthalten. Es wurden vier verschiedene Konzentrationen von Alginat, Gelatine und modifiziertem Alginat untersucht (Tabelle 15, Abbildung 49).

Tabelle 15: Konzentrationen und Absorption der Proben des TNBS-Assays.

Gelatine	Absorption	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Mod. Alginat	Absorption	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]	Alginat	Absorption	Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
1	0,46	444		0,09	221		0,03	332,5
2	0,51	333		0,08	165,75		0,02	249,4
3	0,39	222		0,08	110,5		0,02	166,3
4	0,27	111		0,05	55,25		0,01	83,1

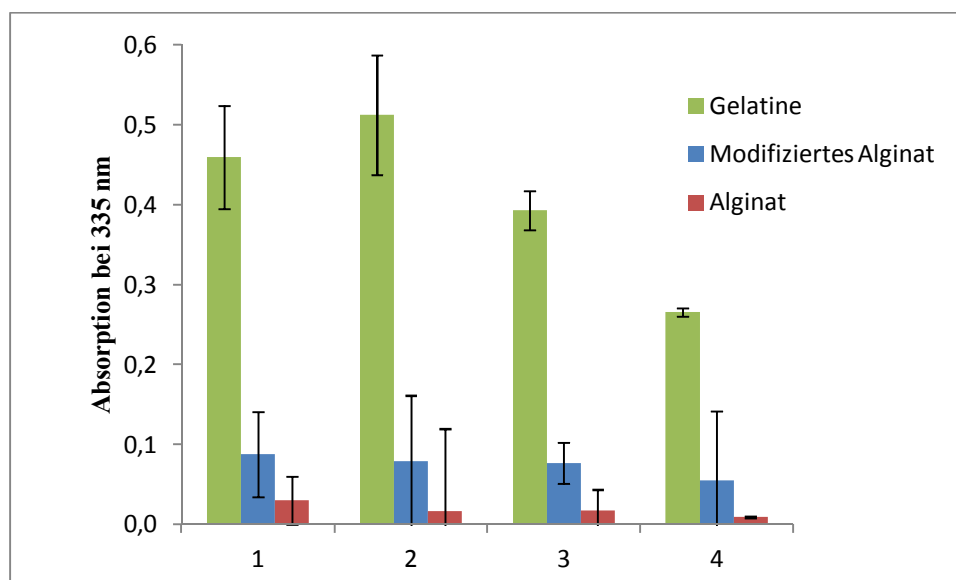


Abbildung 49: Ergebnis des TNBS-Assays zur Überprüfung der Kupplungsreaktion. Dargestellt ist die Absorption bei 335 nm von Gelatine Solugel 5000 (grün), dem modifizierten Alginat (blau) und Alginat low MW (rot) (SEM, n = 3).

Es ist deutlich zu sehen, dass die Proben Gelatine und das modifizierte Alginat nach Zugabe von TNBS eine gelbliche Färbung aufwiesen (Daten nicht dargestellt) und somit über primäre Amine verfügen (Abbildung 49). Im Gegensatz dazu zeigt das unmodifizierte Alginat keine Färbung.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Kupplung von Alginat und Gelatine vermutlich erfolgreich war, da sowohl das Alginat (Größenausschlusschromatographie,

Ergebnisse

Abbildungen 47, 48)), als auch die Gelatine (TNBS-Assay, Abbildung 49)) in den Proben nachgewiesen werden konnten.

5.1.3.2. Alginat und weitere Zusätze

Zu den bisher beschriebenen Versuchen wurde Alginat zusätzlich mit anderen gelbildenden Materialien zusammengegeben, um die Eigenschaften des Alginats hinsichtlich der Zellkompatibilität zu verbessern.

Den Alginatgelen wurden außerdem Polyamid-Beads (PA) zugeführt, um somit innere Oberfläche in den Gelen zu erzeugen, damit die Zellen an diese adhäreren und somit proliferieren können. Das PA hatte eine Korngröße von 40-60 μm . Das verwendete PA 2200 ist ein Polyamid 12, bzw. ein Laurinlactam. Als erstes wurden Zellen mit und ohne PA2200 kultiviert (Abbildung 50) und deren Stoffwechselaktivität untersucht (Abbildung 51).

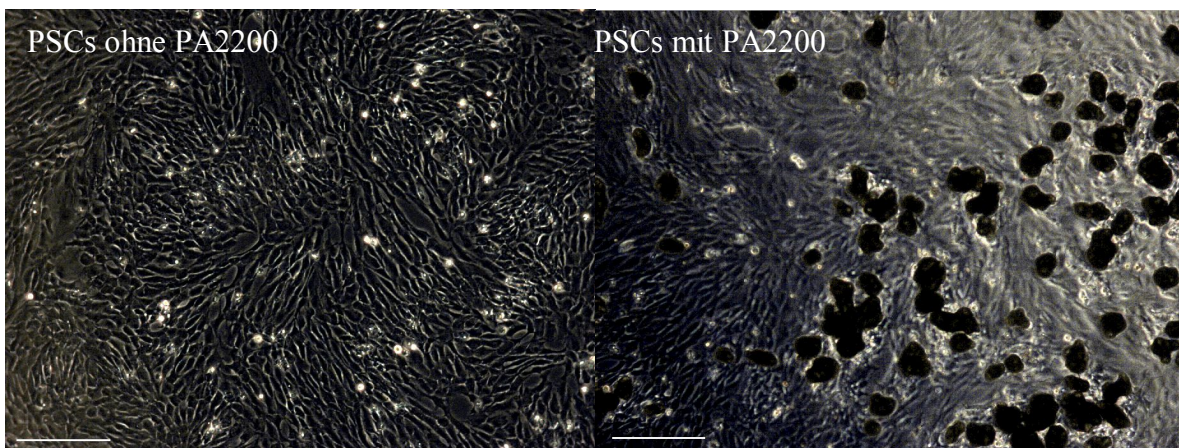


Abbildung 50: Zellen, die mit oder ohne Polyamid-Zugabe kultiviert wurden an Tag vier. Das PA wurde in Form von Pulver dem Nährmedium zugegeben. Maßstab = 200 μm .

Ergebnisse

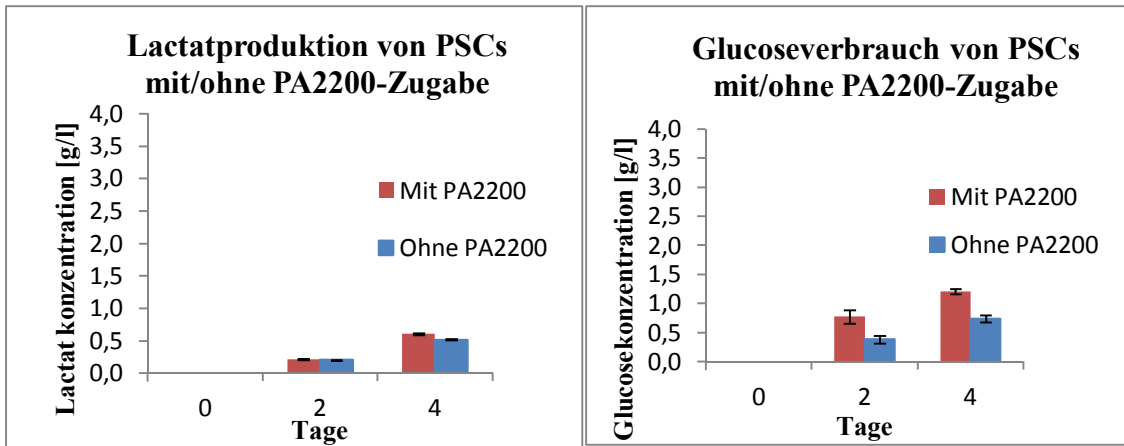
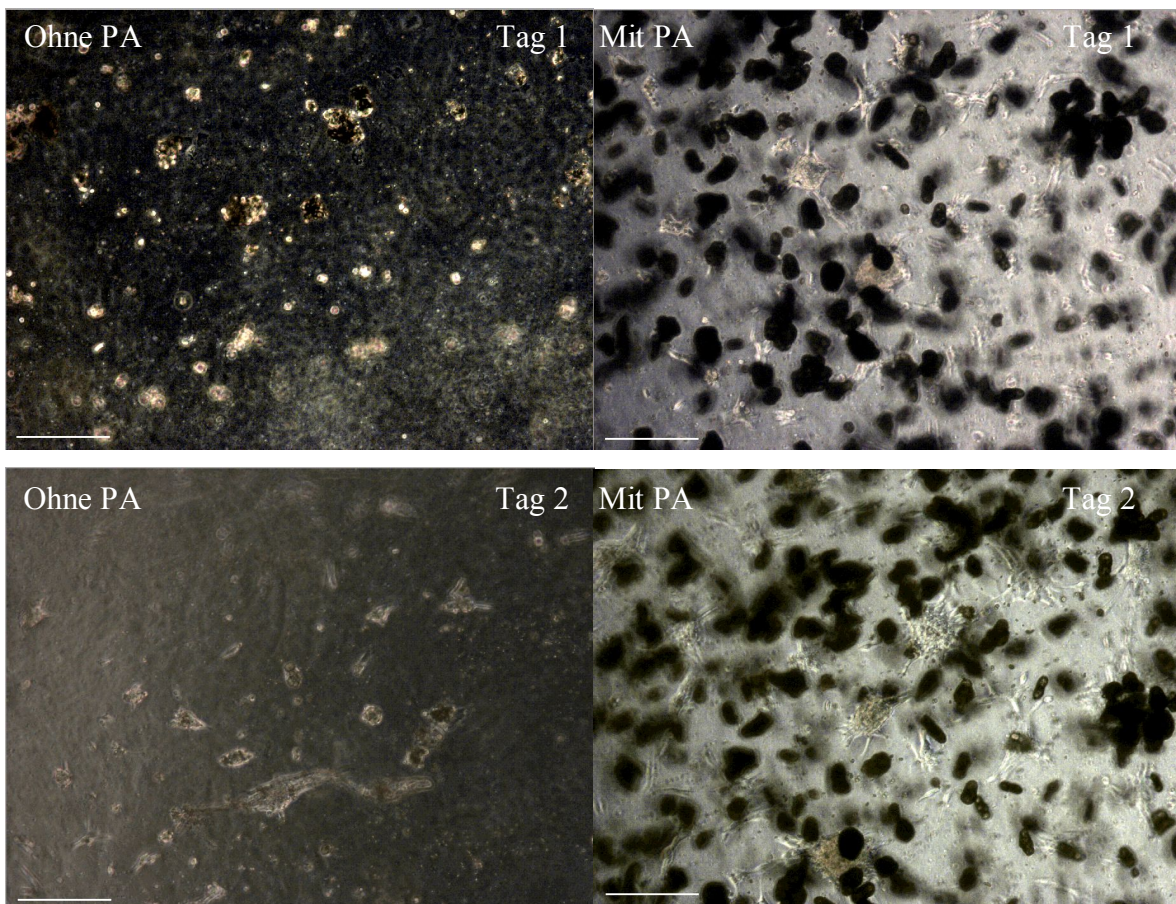


Abbildung 51: Stoffwechselaktivität von PSCs, die mit (rot) und ohne (blau) PA2200-Zugabe kultiviert wurden. (SEM, n = 3).

Die Zellen, die mit PA-Zugabe kultiviert wurden, zeigten ein ähnliches Stoffwechselverhalten, wie die Zellen, die in dem herkömmlichen Medium kultiviert wurden (Abbildung 51). Im nächsten Schritt wurde dem Alginate das Pulver zugegeben und die Zellen auf 2D-Schichten aus diesem Alginate aufgebracht (Abbildung 52).



Ergebnisse

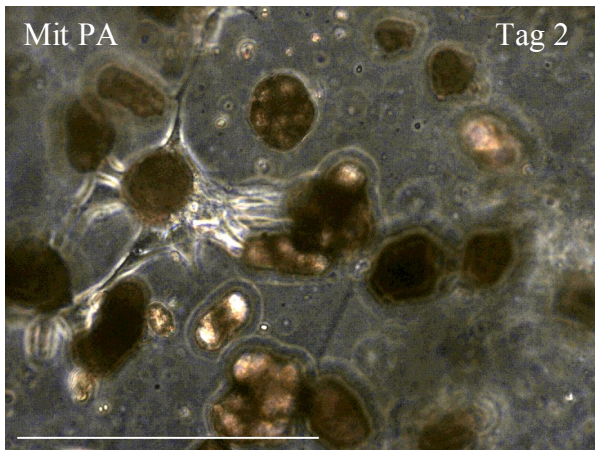
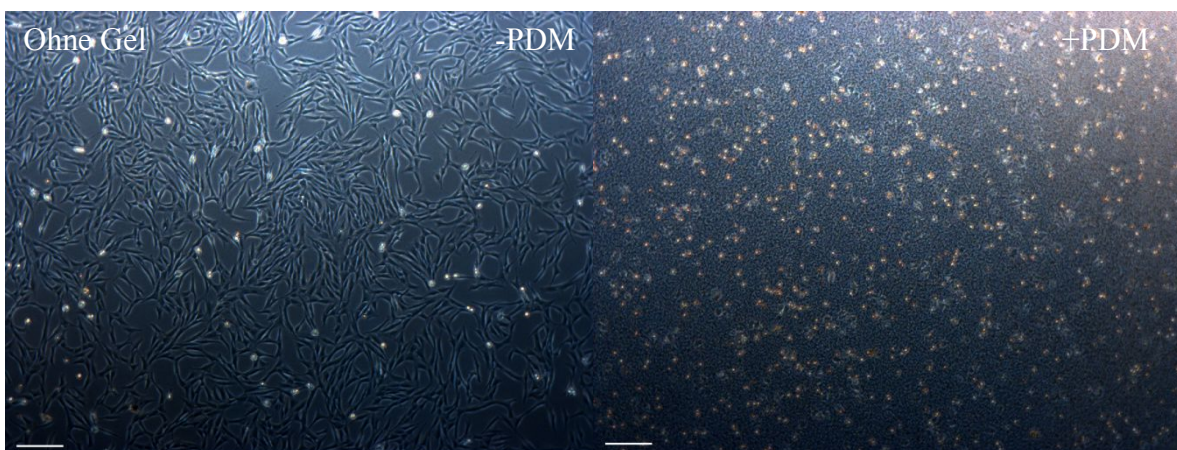


Abbildung 52: PSCs auf modifiziertem Alginat mit/ohne PA-Zugabe. Das PA wurde dem Alginat beigemischt, anschließend wurden daraus 2D-Schichten hergestellt und die Zellen auf diesen kultiviert. Maßstab = 200 μm .

Aus Abbildung 52 wurde ersichtlich, dass die Zellen sich an den PA-Partikeln besser anheften und proliferieren konnten, im Gegensatz zu Alginatgelen ohne PA-Zugabe.

Als letzter Schritt wurde ein Gelsystem aus Alginat mit PolyDADMAC hergestellt, um zusätzlich positive Ladungen in das Gelsystem einbringen zu können. Hierzu wurde das PolyDADMAC mit Calcium vermischt und nach Zusammengabe mit Alginat führte dies zur Ausbildung von Gelen (Abbildung 53).



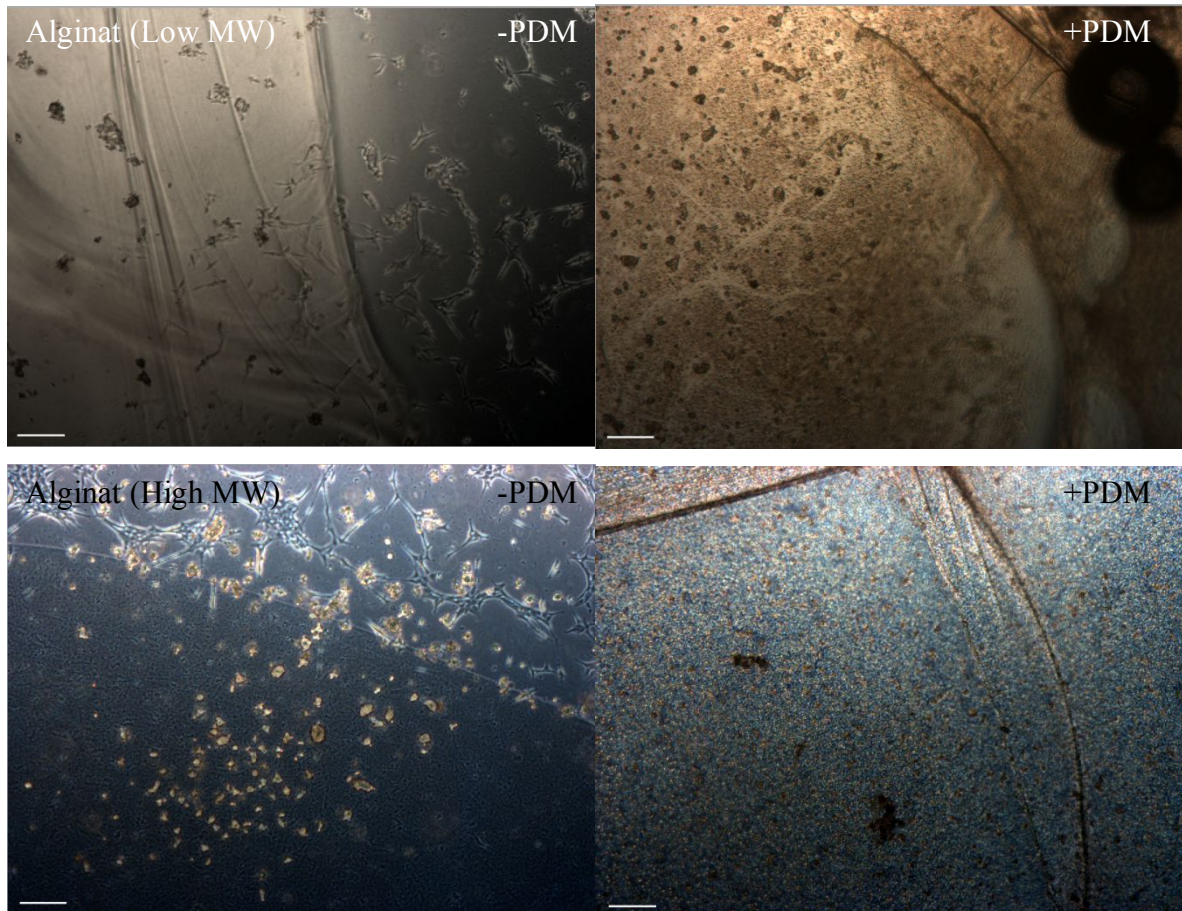


Abbildung 53: Kultivierung von PSCs auf 2D-Schichten aus Alginat/PolyDADMAC-Gelen an Tag eins. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Gel kultiviert. Für die Gele wurden die Alginate Low MW und High MW verwendet. Maßstab = 200 μm .

Aus der Kontrolle aus Abbildung 53 wird sichtbar, dass die Zugabe von PolyDADMAC einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hat. Auch die Bildung der Gele mit Alginat und PolyDADMAC führt zu nicht adhären Zellen, im Gegensatz zu Gelen aus Alginat. Somit wird deutlich, dass sich dieses Gelsystem in dieser Form nicht für die Kultivierung der Zellen eignet.

5.2. Synthetische Materialien

Vollsynthetische Materialien als Zellkultivierungsmatrix haben den Vorteil, keinen chargenabhängigen Schwankungen zu unterliegen. Allerdings liegen die Kosten für die meisten synthetischen Materialien, besonders bei biokompatiblen Modifizierungen, häufig deutlich über denen biologischer Materialien. Im Folgenden wurden vier voll-/teilsynthetische Materialien bezüglich der Tauglichkeit als Zellkultivierungssystem untersucht.

5.2.1. Novatach (Peptid-gekoppelte Alginat)

Zur Verkapselung der Zellen in den Gelen aus Novatach, wurde dem Gelbildner Calcium zugesetzt. So konnte das halbsynthetische Peptid-gekoppelte Material innerhalb weniger Minuten gelieren.

Die Zellen wurden zunächst auf 2D-Gelschichten aus Alginat ausgesät (siehe Abbildung 54).

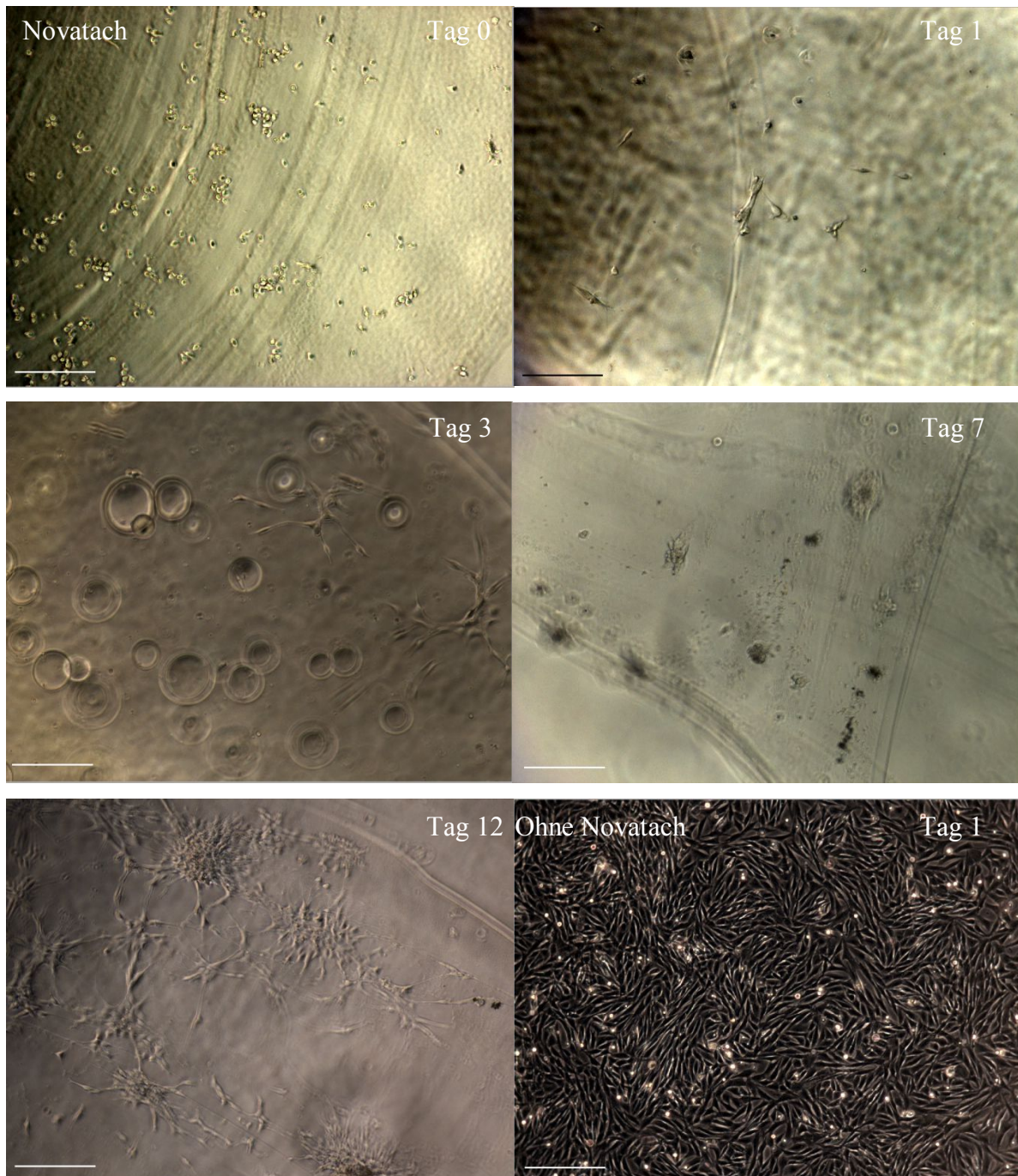


Abbildung 54: PSCs auf 2D-Novatach-Gelen. Die Zellen wurden null bis zwölf Tage auf den Gelen kultiviert. Als Kontrolle sind Zellen an Tag eins ohne Gel zu sehen. Maßstab = 200 μm .

Ergebnisse

In Abbildung 54 ist sichtbar, dass die Zellen über die Kultivierungsdauer von zwölf Tagen auf dem Gel adhären können und proliferieren. Dem Kultivierungsmedium wurde 0,1 % CaCl_2 zugesetzt. Der nächste Schritt war die Verkapselung der Zellen in Hohlkapseln aus dem Peptid-modifizierten Alginat (Abbildung 55).

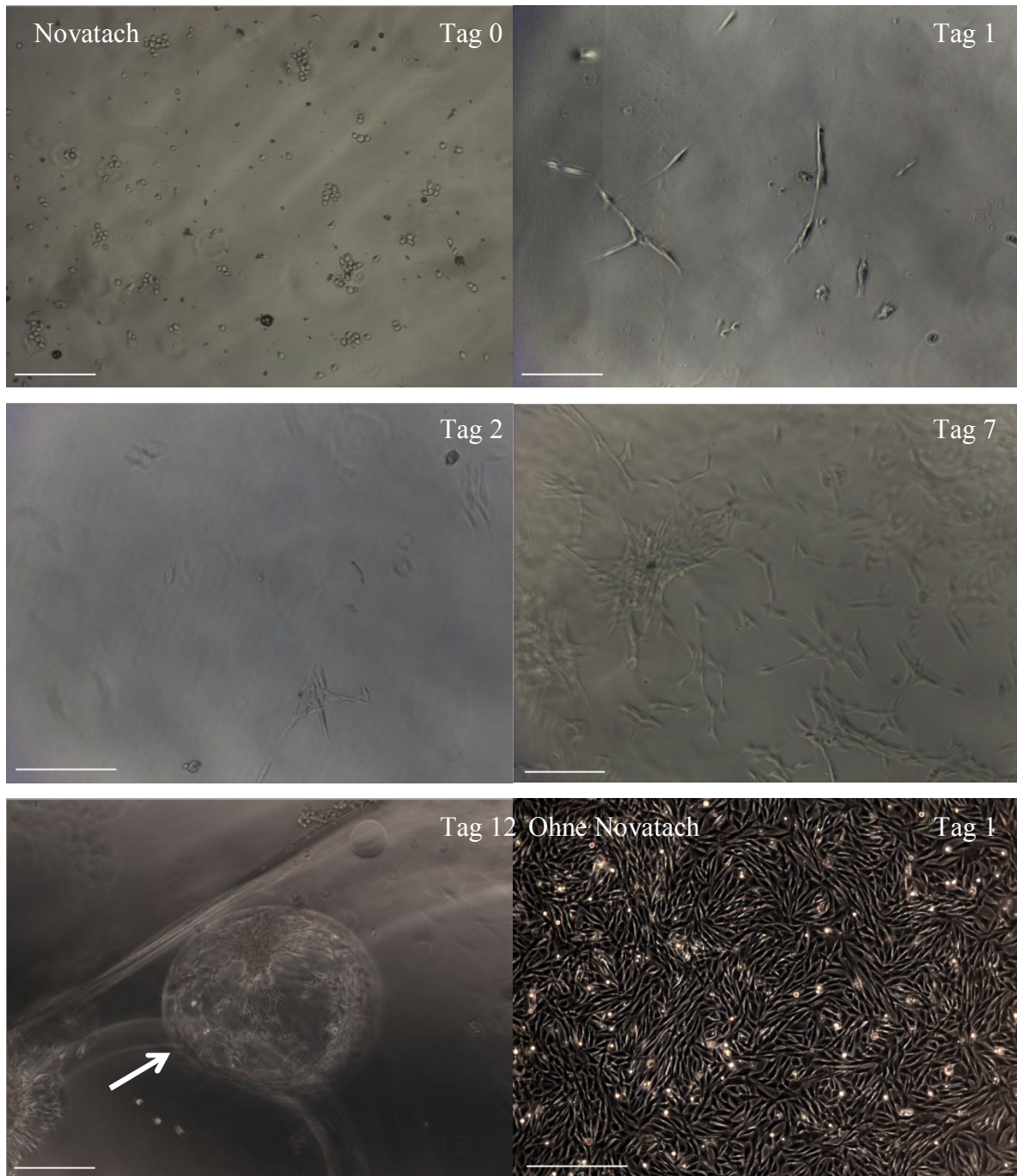


Abbildung 55: PSCs in Novatach-Hohlkapseln. Die Zellen wurden zwölf Tage in den Gelen kultiviert. Am Tag zwölf sind die Zellen in Poren innerhalb des Gels lokalisiert (weißer Pfeil). Als Kontrolle sind Zellen am Tag eins ohne Gel zu sehen. Maßstab = 200 μm .

Ergebnisse

An Tag null (Abbildung 55) sind die Zellen noch kugelförmig, beginnen aber ab Tag eins zu adhären und proliferieren. An Tag zwölf sind die Zellen vermehrt in Poren, die während der Gelbildung entstanden sind, innerhalb des Gels zu sehen (Abbildung 55, weißer Pfeil).

In Abbildung 56 ist einerseits die Entwicklung der Zellzahl und andererseits die Stoffwechselaktivität der Zellen in Novatach-Hohlkapseln abgebildet.

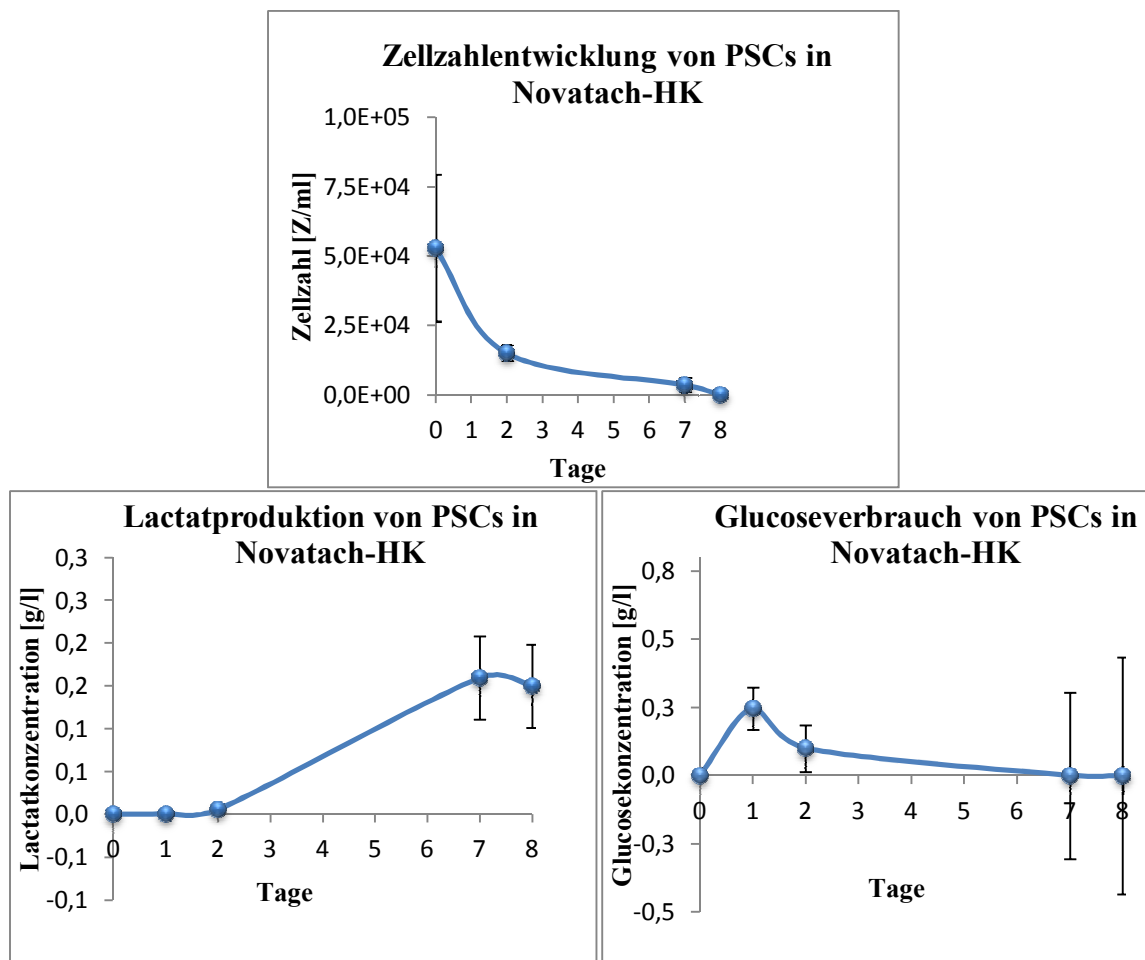


Abbildung 56: Zellzahlentwicklung und Stoffwechselaktivität von PSCs in Novatach-HK. Dargestellt sind die Zellzahl und Lactatproduktion, sowie der Glucoseverbrauch der Zellen in den Hydrogelen (n = 3, SEM).

Die Zahl der Zellen in den Novatach-Hohlkapseln wurde durch Degradierung der Gele mit Hilfe von 0,05 M Citratlösung (10 % DMEM) und anschließender Zählung bestimmt. Es wurde allerdings schon nach einem Tag Kultivierungsdauer deutlich, dass die Gele auch nach Erhöhung der Konzentration und Einwirkzeit der Citratlösung anfänglich ungenügend und nach mehreren Tagen in Kultur gar nicht mehr abgebaut werden konnten. Die Gele wurden zeitabhängig immer stabiler und somit konnte die Zellzahl nicht mehr zufriedenstellend

Ergebnisse

bestimmt werden. So lässt sich die Abnahme der Zellzahl aus Abbildung 56 erklären. Die optischen Ergebnisse aus Abbildung 55 werden durch die Stoffwechselaktivität aus Abbildung 56 bestätigt: Es ist ein deutlicher Anstieg der Lactatkonzentration zu sehen. Der Glucoseverbrauch stagniert, dies ist wahrscheinlich dem Umstand geschuldet, dass die sehr geringe Änderung der Glukosekonzentration nicht messbar war.

Um die Struktur der Gele zu untersuchen wurden Kryoschnitte der verkapselten Zellen angefertigt. Damit die farblosen Gele später von dem ebenfalls farblosen Tissue Tek unterschieden werden konnte, wurden die Gele vor dem Einbetten in Tissue Tek mit Alzianblau angefärbt. Die blaue Färbung ist in Abbildung 57 an den Gelrändern zu erkennen. Da die Degradierung mit zunehmender Kultivierungsdauer nicht mehr möglich war, wurden Gele ohne zusätzliche Calcium-Zugabe hergestellt, um so labilere Kapseln zu erhalten.

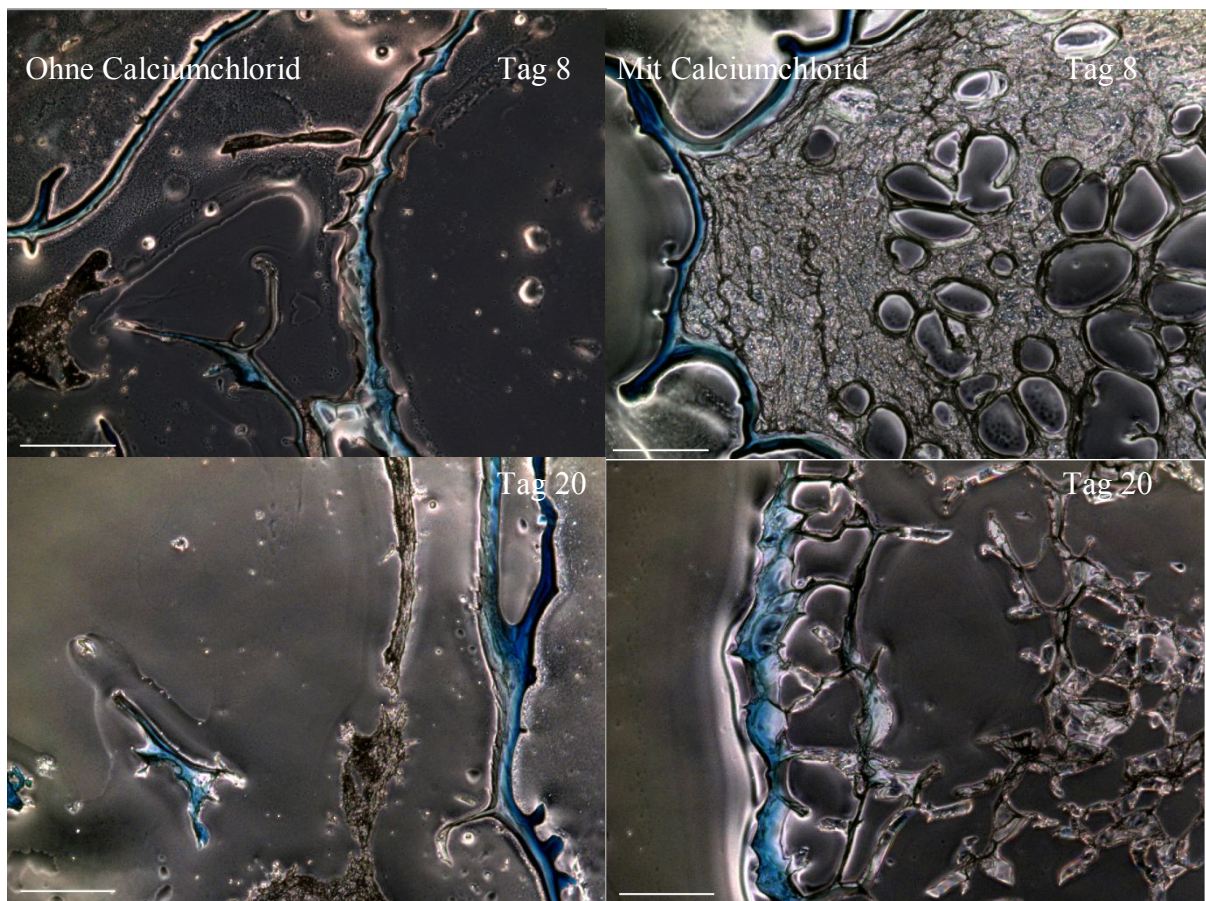
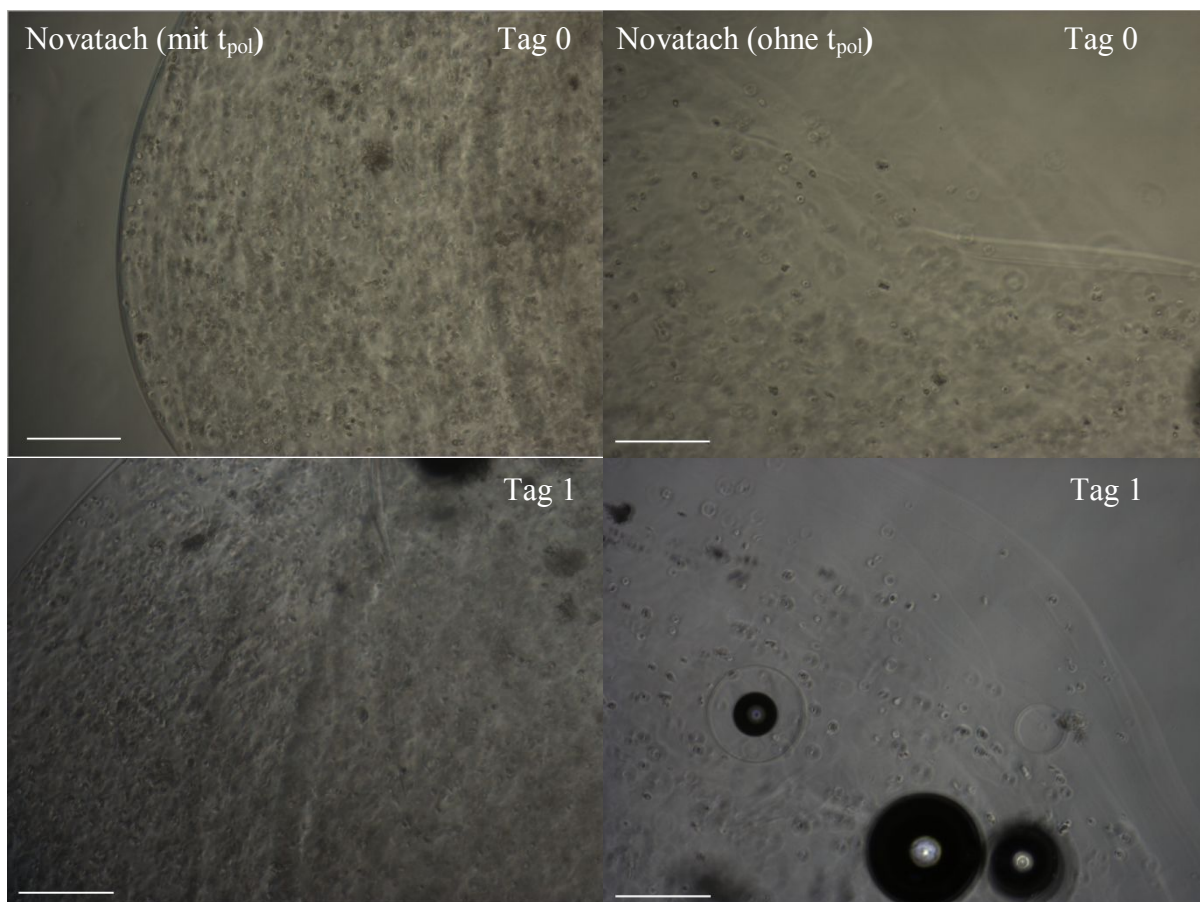


Abbildung 57: Kryoschnitte von PSCs in Novatach-Hohlkapseln mit bzw. ohne Calciumchlorid-Zugabe. Dargestellt sind alzianblaugefärbte Novatach-Gele mit Zellen, die in Medium mit/ohne Calcium kultiviert wurden an den Tagen 8 und 20. Maßstab = 20 μm .

Ergebnisse

In Abbildung 57 sind die in Novatach-Gelen verkapselten Zellen in Form von Kryoschnitten dargestellt. Die Gele, die ohne zusätzliches Calcium kultiviert wurden, zeigen eine deutlich offenere Struktur, als die Gele, die in DMEM mit 0,1 % Calcium kultiviert wurden. In der dichten Struktur der Gele mit Calcium-Zugabe, lassen sich die Zellen in den Gelen nicht mehr eindeutig ausmachen, es ist eine viel feinere Struktur zu erkennen.

Zusätzlich zu den Hohlkapseln wurden Vollkapseln hergestellt (Abbildung 58). Diese wurden nach der Herstellung für 10 Minuten bei 37 °C auspolymerisiert (Abbildung 58, mit Polymerisierungszeit (t_{pol})) oder sofort in Kultivierungsmedium überführt (Abbildung 58, ohne t_{pol}), um wiederum labilere und somit degradierbare Kapseln zu erhalten.



Ergebnisse

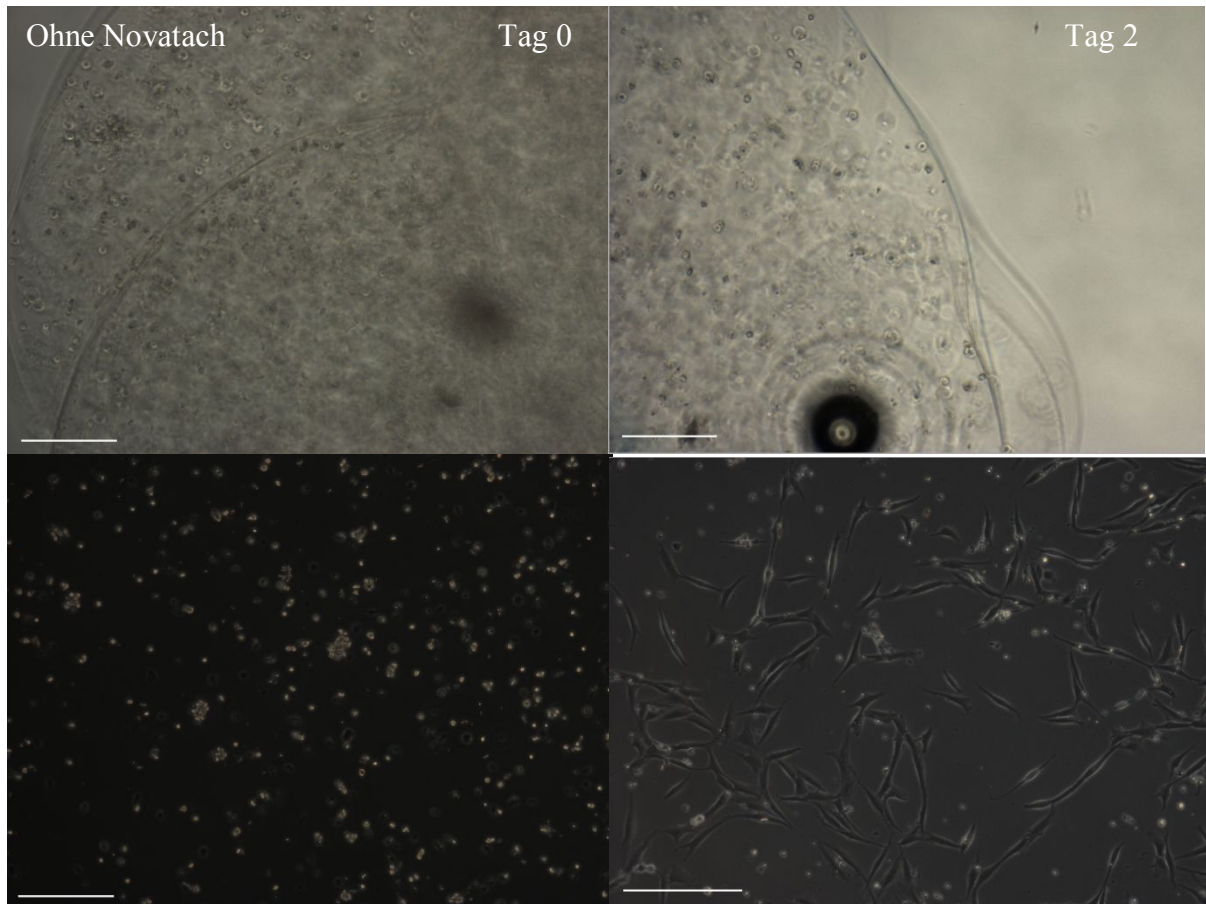


Abbildung 58: PSCs in Novatach-Vollkapseln. Dargestellt sind die Zellen an den Tagen null bis zwei. Als Kontrolle sind Zellen an Tag null und zwei ohne Gel zu sehen. Maßstab = 200 μm .

Die Gelstruktur der Vollkapseln ohne t_{pol} ist deutlich schwächer erkennbar, als bei den Gelen mit einer Polymerisierungszeit von 10 Minuten (Abbildung 58). Allen Gelen gemein ist die Tatsache, dass die Zellen in den Vollkapseln auch an Tag zwei nicht adhären wurden. Um die Vitalität der Zellen nach zwei Tagen in den Novatach-Gelen zu überprüfen, wurden diese zunächst mit Citrat degradiert (siehe Abbildung 59).

Ergebnisse

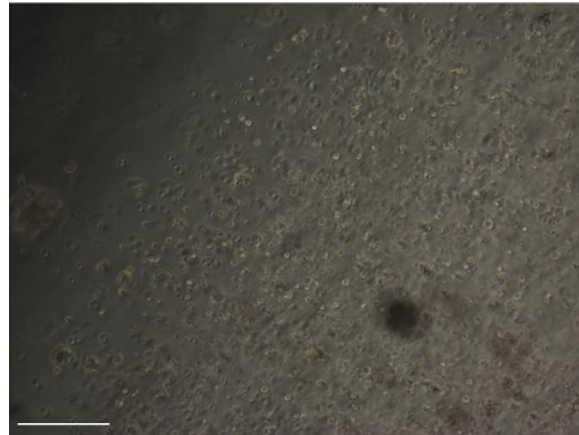
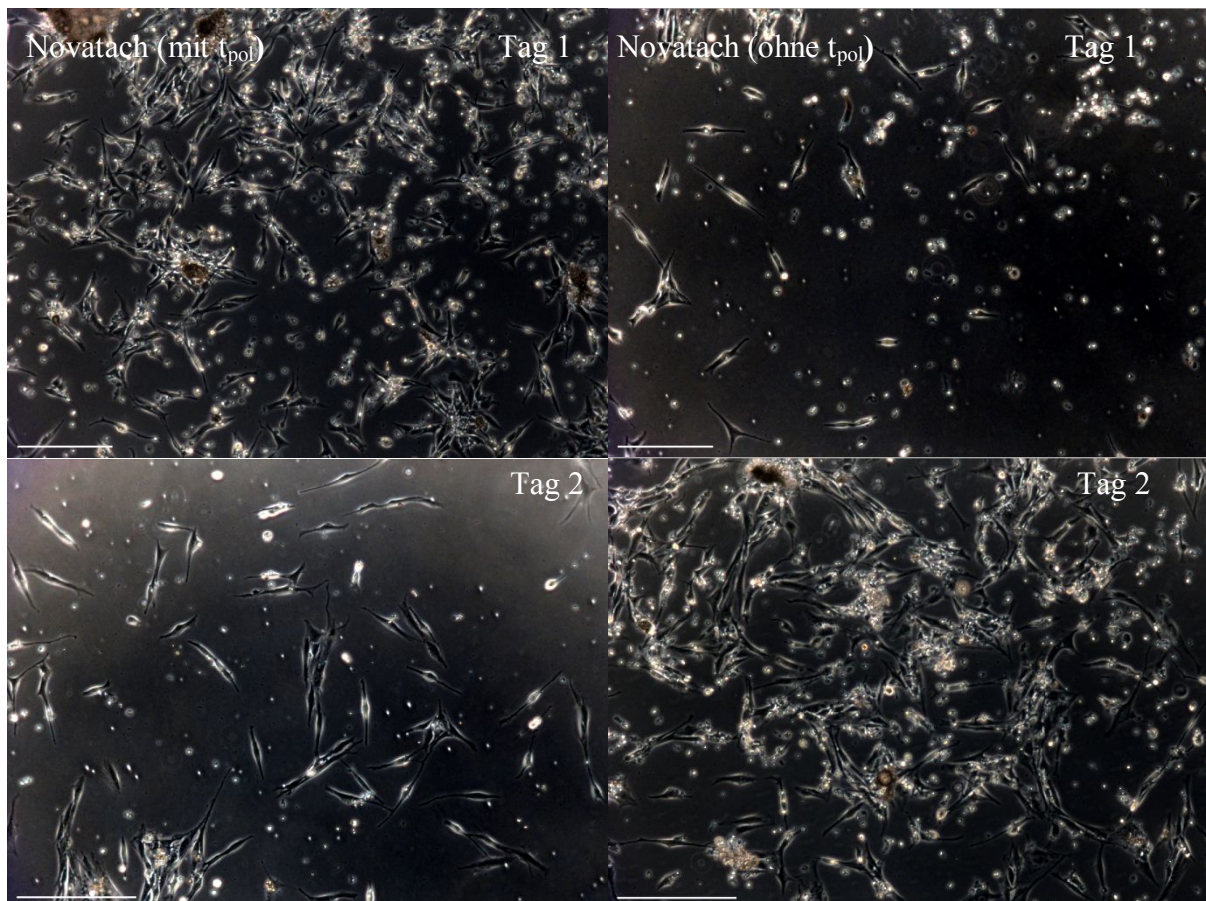


Abbildung 59: Degradierung einer Novatach-Vollkapsel mit PSCs nach zwei Tagen in Kultur. Zu sehen ist eine Vollkapsel 10 Minuten nach Zugabe der Citratlösung (0,05 M). Maßstab = 200 μm .

Die Degradierung der Vollkapsel war an Tag zwei noch möglich (Abbildung 59). Die aufgeschlossenen Zellen konnten wieder in Medium aufgenommen und kultiviert werden (siehe Abbildung 60).



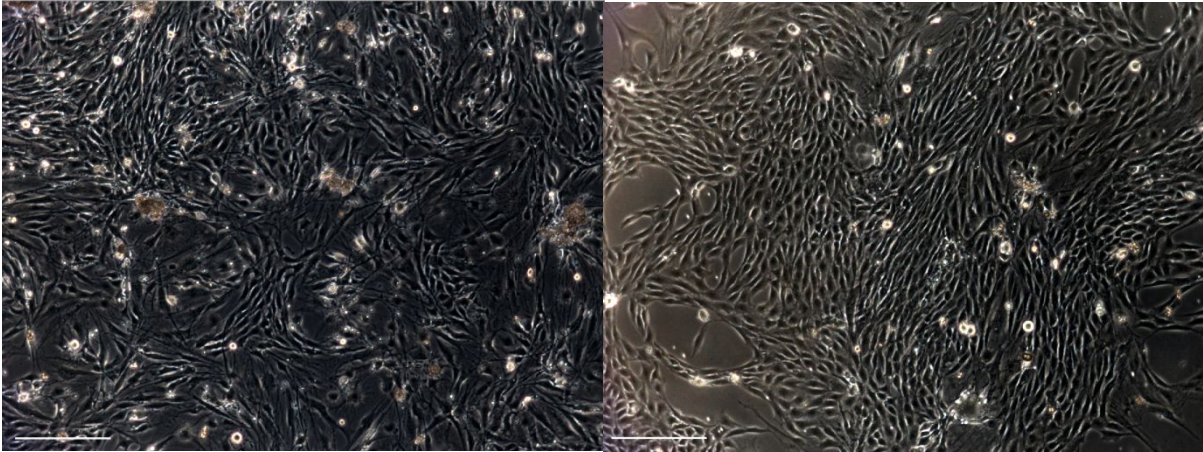


Abbildung 60: PSCs wieder ausgesät nach zwei Tagen in Novatach-Vollkapsel-Kultur. Dargestellt sind die Zellen, die nach zweitägiger Kultur wieder ausgesät und über fünf Tage kultiviert wurden. Maßstab = 200 μm .

Aus Abbildung 60 wird ersichtlich, dass die Zellen nach zwei Tagen in Novatach-Vollkapsel-Kultur vital sind, adhären und proliferieren können. Am Tag zwei ist ein Unterschied zwischen den Zellen, die in Kapseln mit bzw. ohne t_{pol} hergestellt, kultiviert wurden zu sehen. Nach fünf Tagen ist dieser Unterschied verschwunden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Peptid-modifizierten Gele als Kultivierungssystem für die adhären wachsenden Zellen in Frage kommen, sie aber noch deutliche Mankos hinsichtlich Degradierbarkeit und *Handling* aufweisen.

5.2.2. Puramatrix

Die Gelbildung des vollsynthetischen PM-Hydrogels erfolgte unter physiologischen Bedingungen durch die Anwesenheit von einwertigen Kationen im Zellkulturmedium. Zunächst wurden Gele aus Puramatrix in verschiedenen Konzentrationen untersucht. In Abbildung 61 sind die PSCs in PM-Gelen gezeigt. Deutlich zu sehen ist, dass die Zellen in den Gelen adhären und proliferieren können. Am Tag drei (Abbildung 61a) und b)) sind adhären wachsende Zellen sowohl in den Gelen mit 2,5 mg/ml Gelbildner, als auch in den Gelen mit 5 mg/ml Gelbildner zu sehen. Die Zunahmen der adhären Zellen sind ebenfalls bei beiden Konzentrationen sichtbar. Als Kontrolle (Abbildung 61c) diente eine herkömmliche Polystyroloberfläche (Zellkulturoberfläche). Es zeigte sich, dass die Zellen in PM-Gelen mit einer Konzentration von 5 mg/ml besser proliferieren.

Ergebnisse

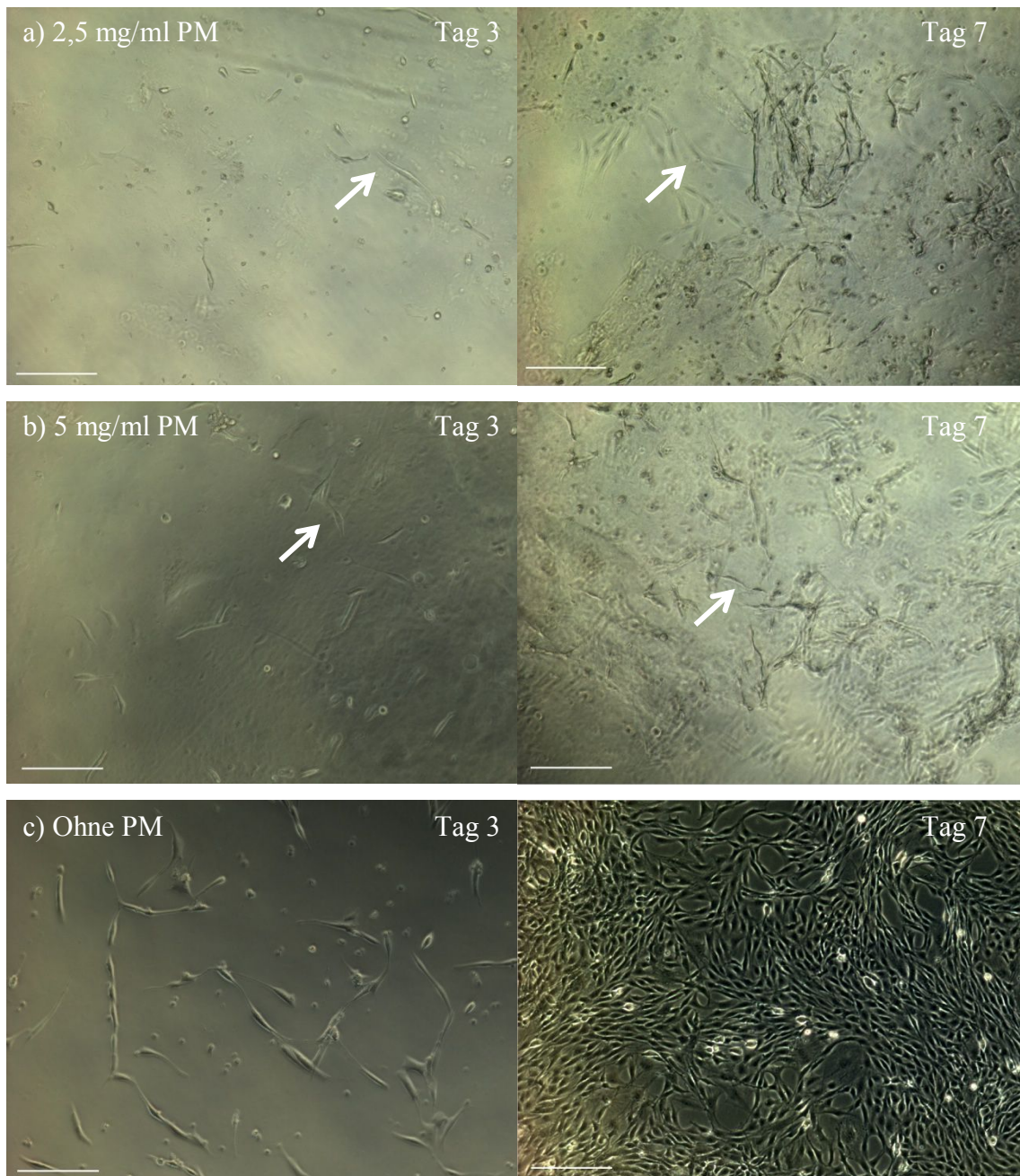


Abbildung 61: PSCs in PM-Hydrogelen an den Tagen 3 und 7. In Abbildung 61a) und b) sind PM-Gele mit verkapselten PSCs an den Tagen 3 und 7 gezeigt. Deutlich zu sehen (weiße Pfeile) sind adhärenz wachsende Zellen. Als Kontrolle diente eine herkömmliche Zelloberfläche (Polystyrol). Maßstab = 200 µm.

Im Folgenden wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen in den PM-Gelen (5 mg/ml) untersucht. Hierzu wurden die Zellen vier Tage kultiviert und mit der Stoffwechselaktivität herkömmlich kultivierter Zellen verglichen (siehe Abbildung 62).

Ergebnisse

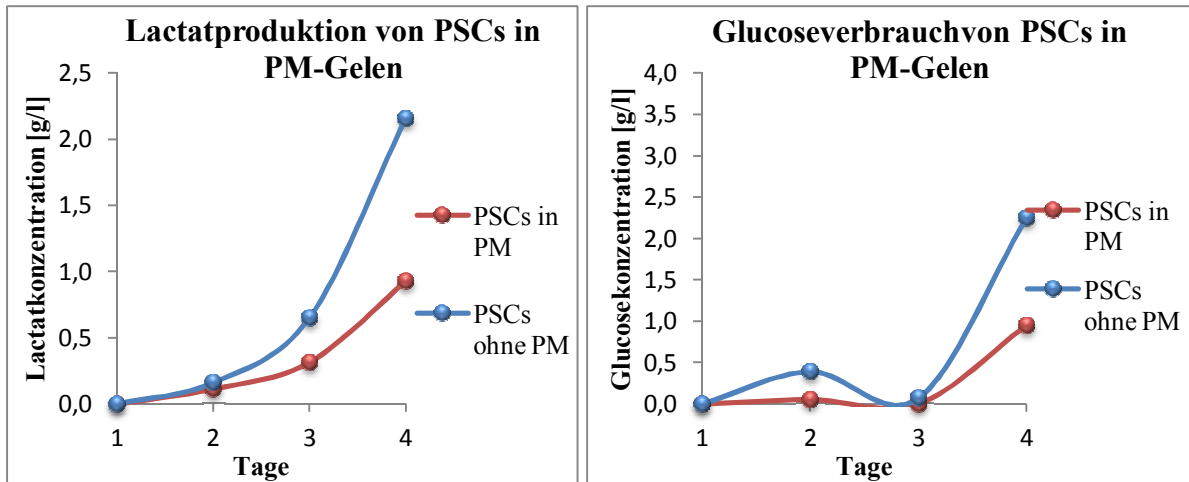


Abbildung 62: Stoffwechselaktivität von PSCs in PM-Hydrogelen. Dargestellt sind die Lactatproduktion und der Glucoseverbrauch von PSCs in PM-Gelen bzw. in herkömmlicher 2D-Kultur über vier Tage (n = 1).

Aus Abbildung 62 ist ersichtlich, dass die Zellen in den PM-Gelen zwar eine reduzierte Stoffwechselaktivität im Vergleich zur herkömmlichen 2D-Kultur aufweisen, allerdings sind die Zellen in den Gelen deutlich stoffwechselaktiv und vital. Dieses Ergebnis deckt sich mit der optischen Auswertung aus Abbildung 13 und zeigt, dass die PM-Gele eine gute Kultivierungsmatrix darstellen.

Um die Gelstrukturen darstellen zu können, wurden Kryoschnitte der verkapselten Zellen in den PM-Gelen mit einem PM-Gehalt von 5 mg/ml angefertigt (Abbildung 63).

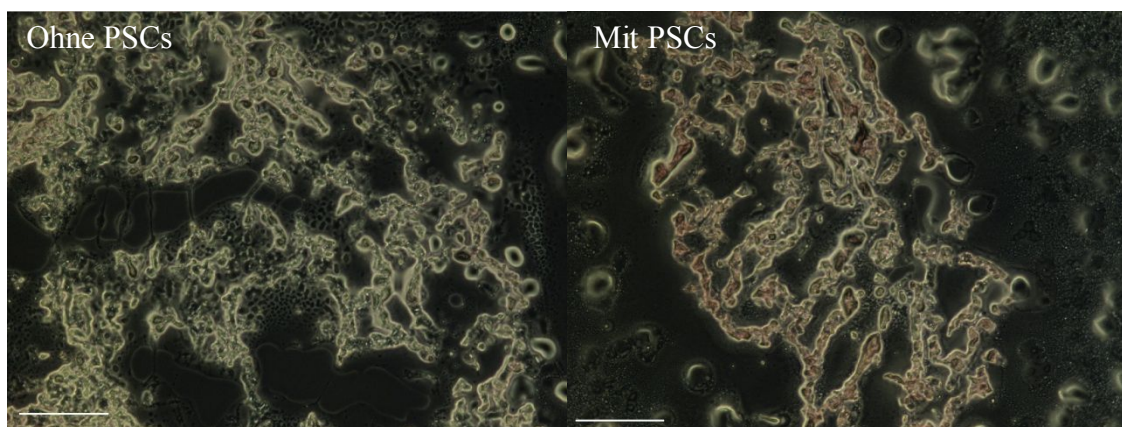


Abbildung 63: Kryoschnitte von PM-Gelen mit und ohne Zellen. Abgebildet sind PM-Gele nach fünf Kultivierungstagen mit und ohne Zellen. Maßstab = 200 µm.

Die Strukturen des Matrixmaterials in Abbildung 63 lassen Hohlräume von ca. 100-500 µm erkennen, an deren innerer Oberfläche die Zellen adhären können.

5.2.2.1. Puramatrix mit Alginat

Um das zellkompatible Gelmaterial PM besser degradierbar und hinsichtlich der Kosten noch attraktiver und anwendungsangepasster zu gestalten, wurden die PM-Gele zusätzlich mit Alginat versetzt. In Abbildung 64 sind die Zellen in den Gelen an Tag eins zu sehen.

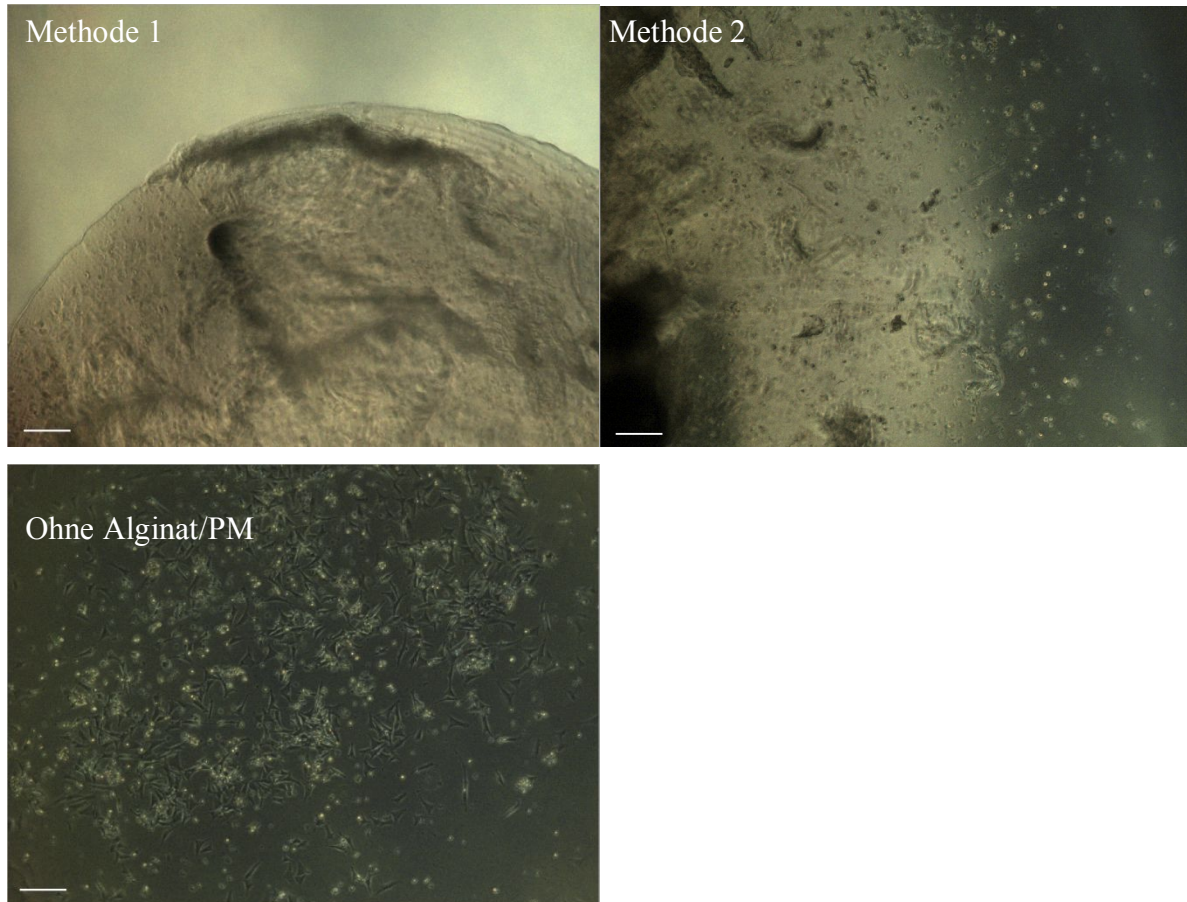


Abbildung 64: PSCs in PM/Alginat-Gelen nach zwei verschiedenen Methoden an Tag eins. Nach Methode 1 (Eintropfen) und Methode 2 (Überschichten) wurden Zellen in PM/Alginat-Gelen hergestellt. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Gel kultiviert. Maßstab = 200 μm .

Die Zellen wurden in Gelen aus 5 mg/ml PM und 2 % Alginat verkapselt und in Medium mit 0,05 % CaCl_2 kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen in den Gelen nicht adhäreren können und somit auch nicht proliferieren. Um den Zellen mehr „Raum“ für ihr Wachstum bzw. innere Kapseloberfläche bereitzustellen, wurden außerdem Hohlkapseln aus Alginat und PM hergestellt (siehe Abbildung 65).

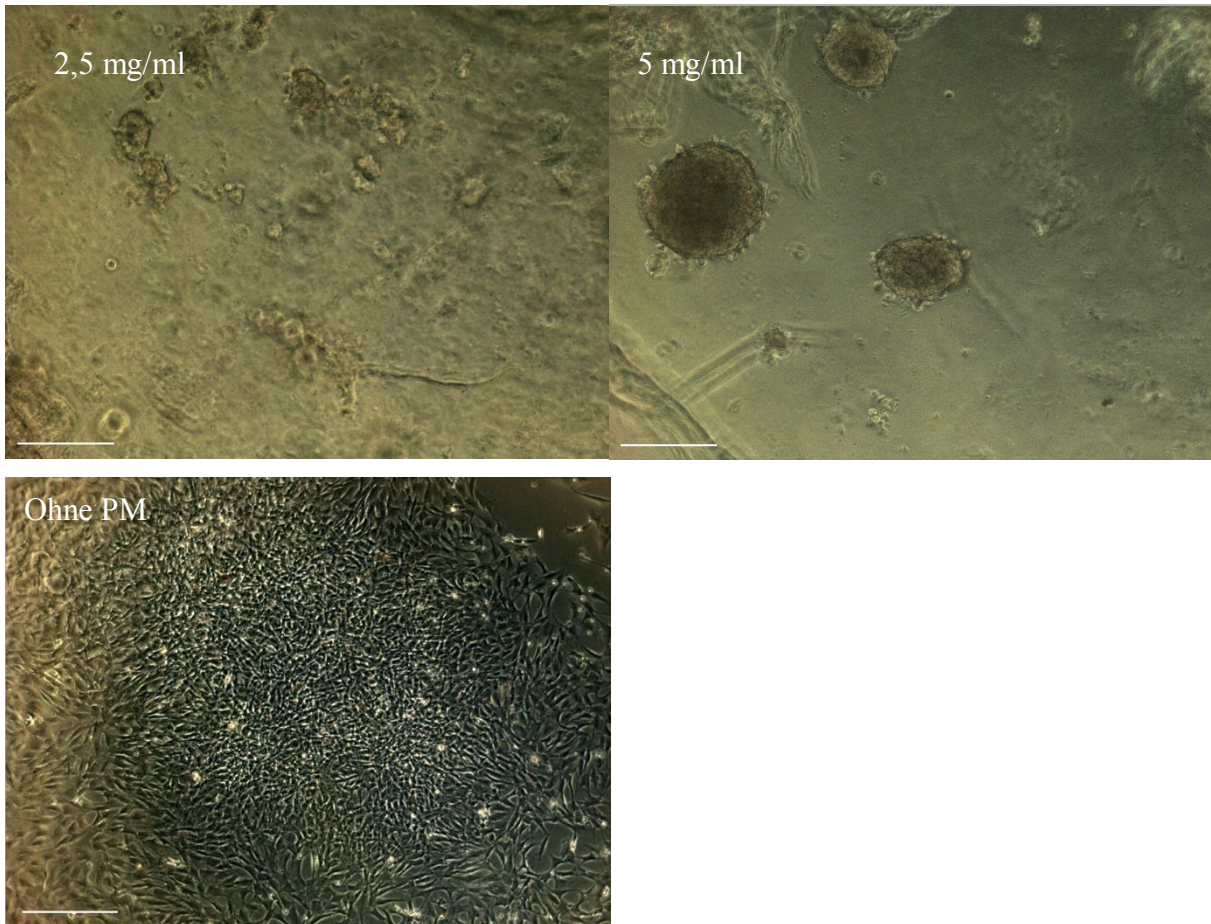


Abbildung 65: PSCs in PM/Alginate-Hohlkapseln an Tag eins. Die Zellen wurden in PM-Alginat-Gelen mit einer PM-Konzentration von 2,5 bzw. 5 mg/ml kultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Gel kultiviert. Maßstab = 200 μ m.

Die Zellen wurden in Hohlkapseln aus PM (2,5 bzw. 5 mg/ml) und Alginate (2 %) kultiviert. Aus Abbildung 65 wird deutlich, dass die Zellen bereits an Tag eins anfangen Aggregate zu bilden, dies spricht dafür, dass die Zellen nicht adhären können, sondern sich vielmehr kohäsiv zusammenlagern.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Zellen in den PM-Gelen adhären und proliferieren können, in Mischgelen aus Alginate und PM hingegen nicht.

5.2.3. Dextran-CD-Hydrogel

Um aus dem Dextran-basierten Polymer Gele herstellen zu können, wurde der Polyethylenglycol-Crosslinker (PEG-CL) zu dem System gegeben. Die chemische Vernetzungsreaktion findet unter physiologischen Bedingungen statt. Zusätzlich konnte das *Backbone* mit RGD-Peptiden modifiziert werden, um so Haftungsstellen für die Zellen

Ergebnisse

bereitstellen zu können. Um die Notwendigkeit der Adhäsionspeptide auszutesten, wurden zunächst Gele mit und ohne RGD-Peptiden hergestellt. In Abbildung 66 sind in Dextran-Gelen kultivierte Zellen an den Tagen null, eins und zwei dargestellt.

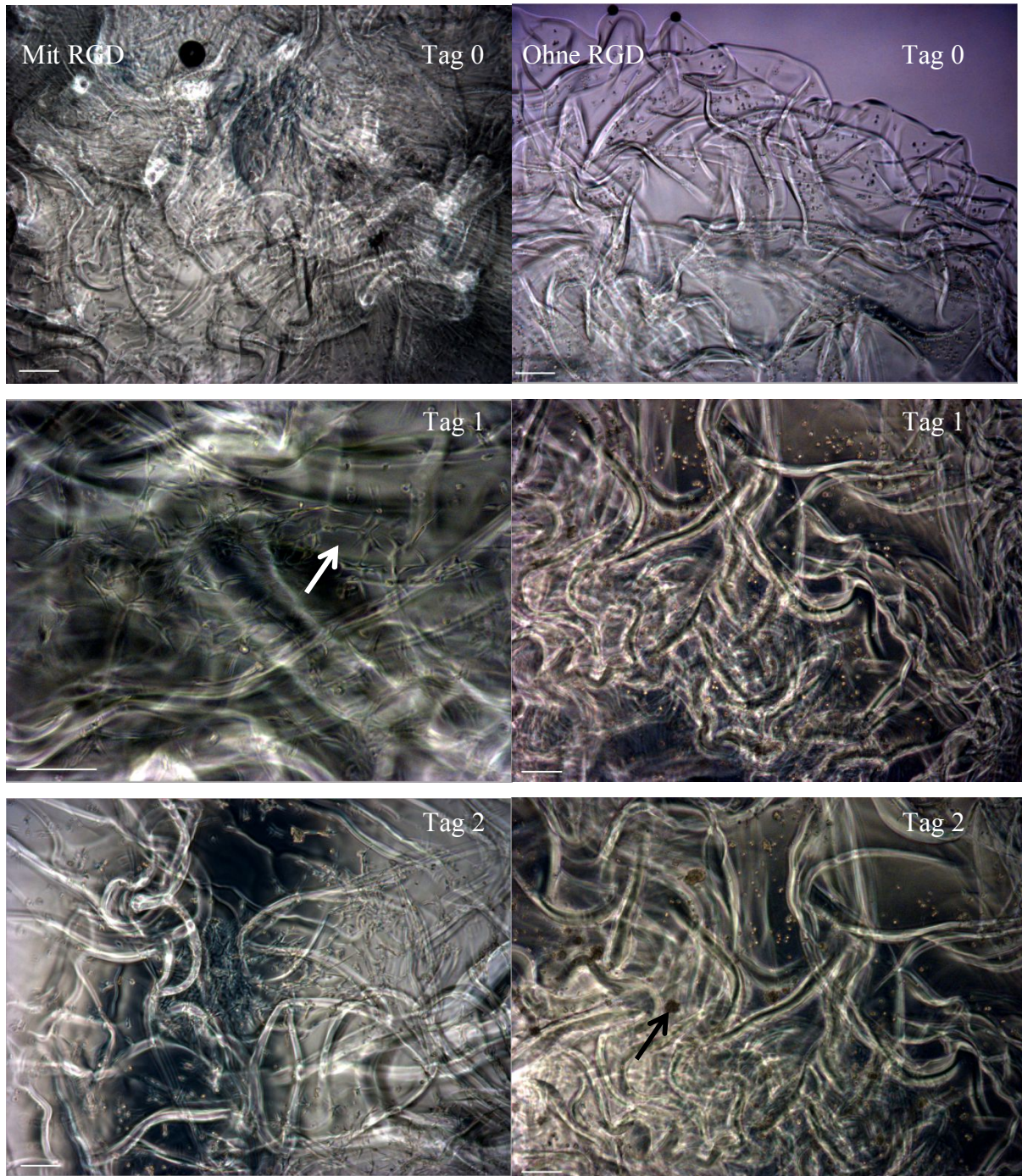


Abbildung 66: PSCs in Dextran-CD-Gelen mit und ohne RGD-Peptid modifiziert. Dargestellt sind Zellen in Dextran-CD-Gelen an den Tagen null, eins und zwei, welche teilweise mit RGD-Peptiden modifiziert wurden. Maßstab = 200 μm .

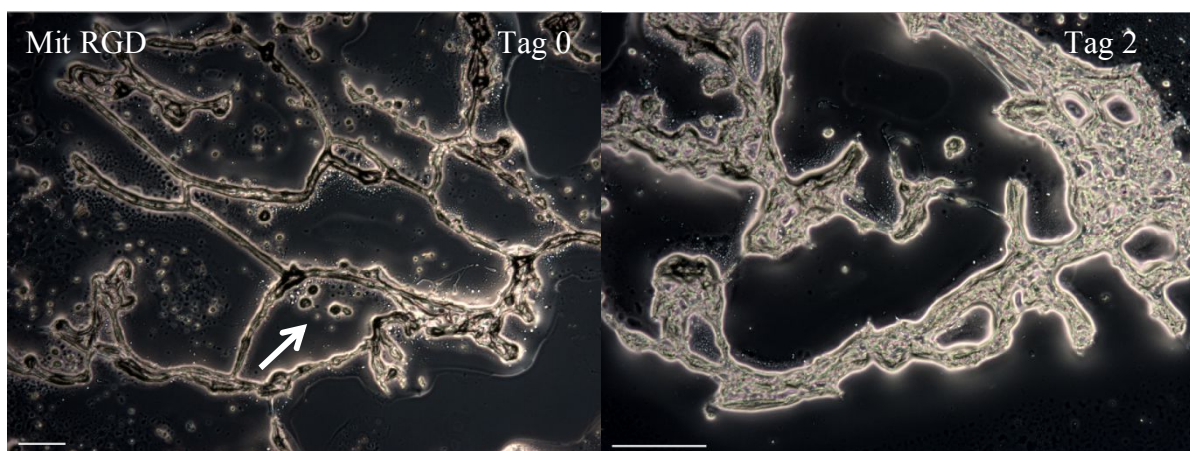
Ergebnisse

Deutlich zu sehen ist, dass die Zellen in den Gelen ohne RGD-Peptide nicht adhären können und abgekugelt bleiben und sich ab Tag zwei Aggregate bilden (Abbildung 66, schwarzer Pfeil). In den Gelen hingegen, die vor der Herstellung mit den Adhäsionsmolekülen modifiziert wurden, sind die Zellen ab Tag eins adhären (Abbildung 66, weißer Pfeil). Die Auflösung der Gele mit Hilfe des Enzyms Dextranase führt sowohl bei Gelen mit, als auch bei Gelen ohne RGD-Peptiden zu problemlosen Degradieren der Matrix und zu einer Einzelzellsuspension (siehe Abbildung 67).



Abbildung 67: Auflösung einer Dextran-CD-Kapsel mit Hilfe des Enzyms Dextranase. Nachdem die Zellen drei Tage in Dextran-Gelen inkl. RGD-Peptid kultiviert wurden, wurden nach der Degradation mit Dextranase wieder Einzelzellen (schwarzer Pfeil) erhalten. Maßstab = 200 μm .

Die Untersuchung der Gelstruktur innerhalb der Kapseln wurde mit Hilfe von ungefärbten Kryoschnitten durchgeführt. In Abbildung 68 sind die Ergebnisse dargestellt.



Ergebnisse

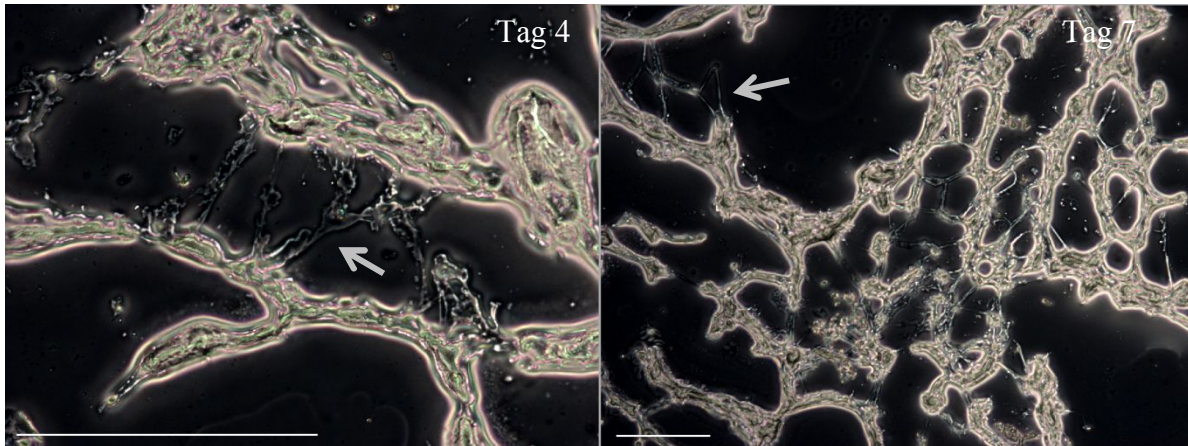
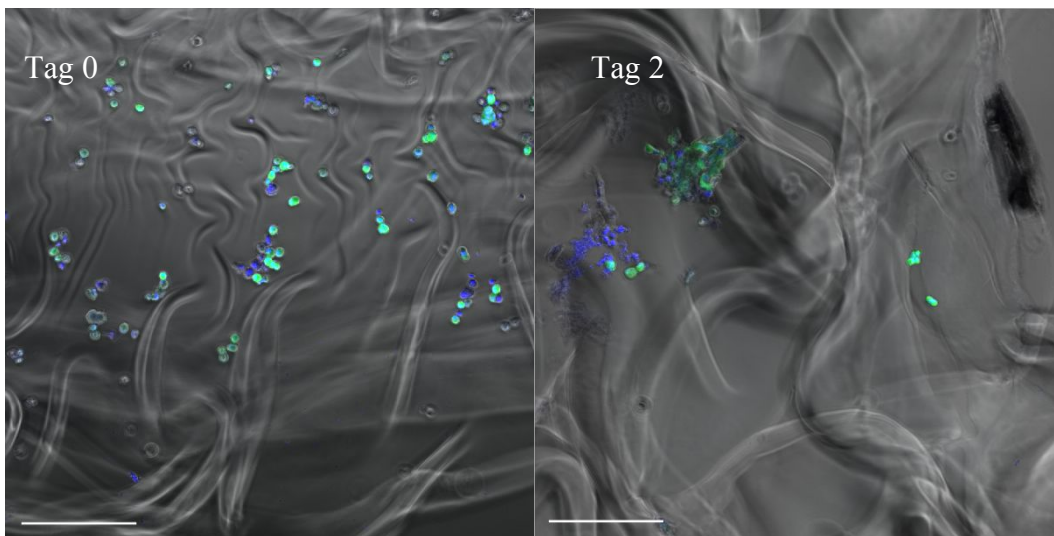


Abbildung 68: Kryoschnitte von PSCs in Dextran-CD-Gelen inkl. RGD-Peptiden. Die Kryoschnitte der verkapselten Zellen wurden an den Tagen null, zwei, vier und sieben angefertigt. Die Zellen sind an Tag null noch kugelförmig, mit zunehmender Kultivierungsdauer sind die „aufgespannten“ Zellen zwischen den Gelfasern sichtbar (graue Pfeile). Maßstab = 200 μm .

Anhand der Kryoschnitte aus Abbildung 68 wird deutlich, dass die Zellen an Tag null zunächst abgekugelt vorliegen (weißer Pfeil). Ab Tag zwei, besonders an Tag vier und sieben, sind die adhären Zellen zu sehen, die in den inneren Oberflächen der Poren des Gels anheften und proliferieren. Zur besseren Übersicht der Zelllokalisierung, –morphologie und um einen Aufschluss über die Vitalität der Zellen zu erhalten, wurde außerdem eine FDA/HOECHST-Färbung der Zellen in den Gelen durchgeführt (Abbildung 69).



Ergebnisse

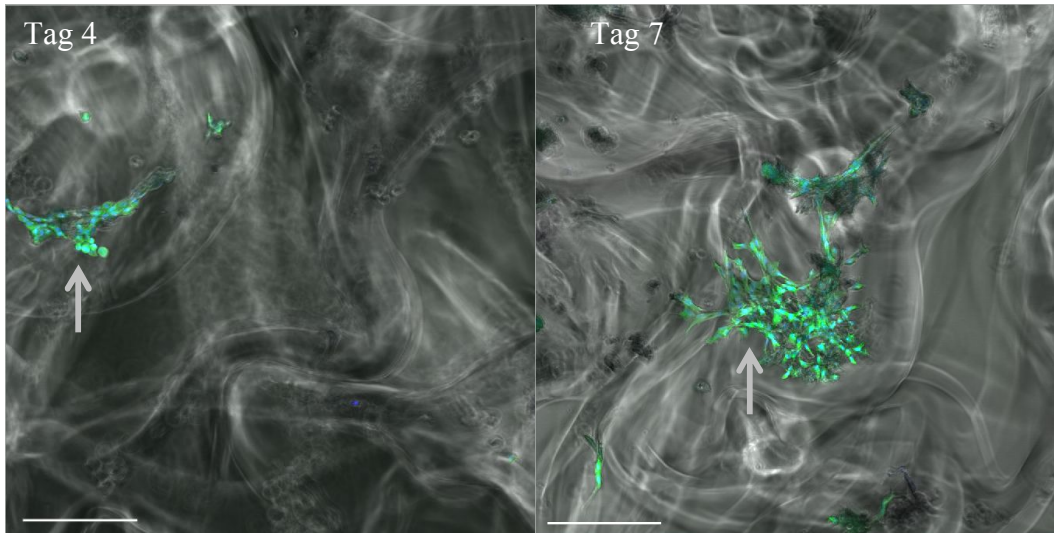
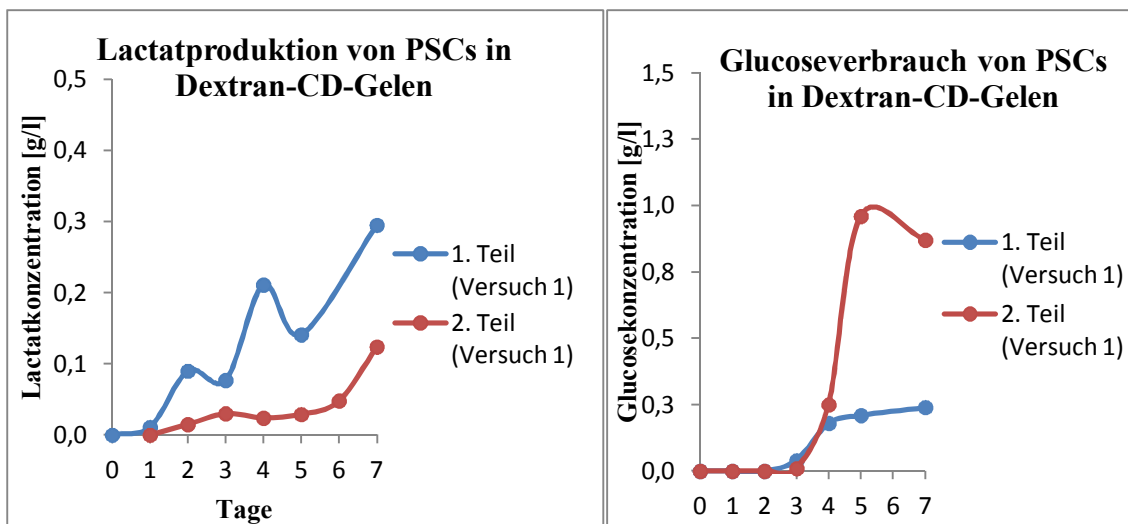


Abbildung 69: FDA/HOECHST-gefärbte PSCs in Dextran-CD-Gelen. Die gefärbten Zellen wurden sieben Tage kultiviert. HOECHST (blau) färbt Zellkerne und FDA (grün) färbt das Zytoplasma der Zellen an. Die Gele wurden mit RGD-Peptiden modifiziert. Maßstab = 200 μm .

Die morphologischen Ergebnisse aus Abbildung 69 decken sich mit denen aus Abbildung 70. An Tag null liegen die Zellen abgekugelt vor, ab Tag zwei sind adhärenente und proliferierende Zellen zu sehen (weißer Pfeil). Außerdem wurden die Stoffwechselaktivität und die Zellzahlentwicklung der Zellen in den Gelen untersucht (Abbildung 70).



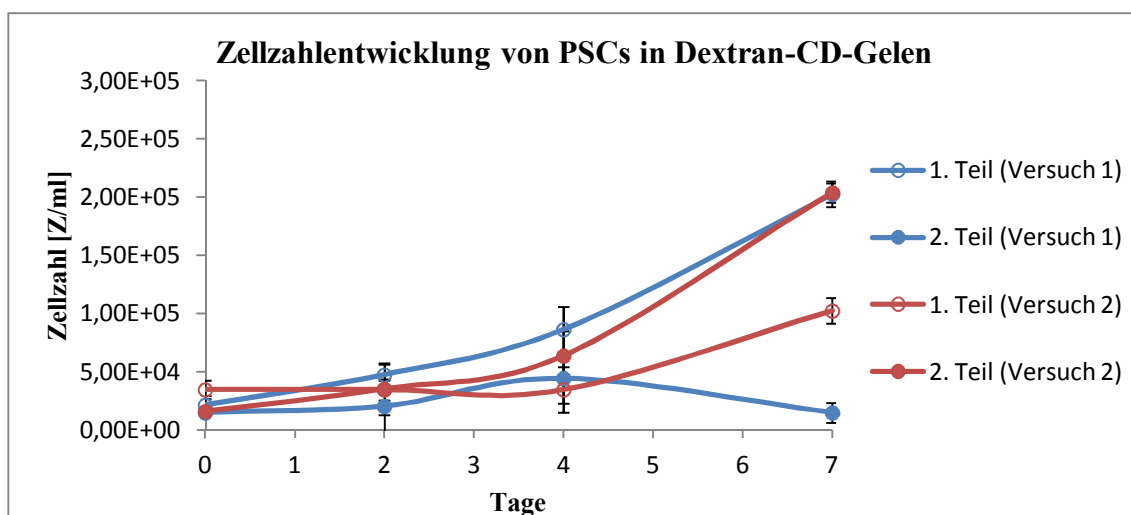
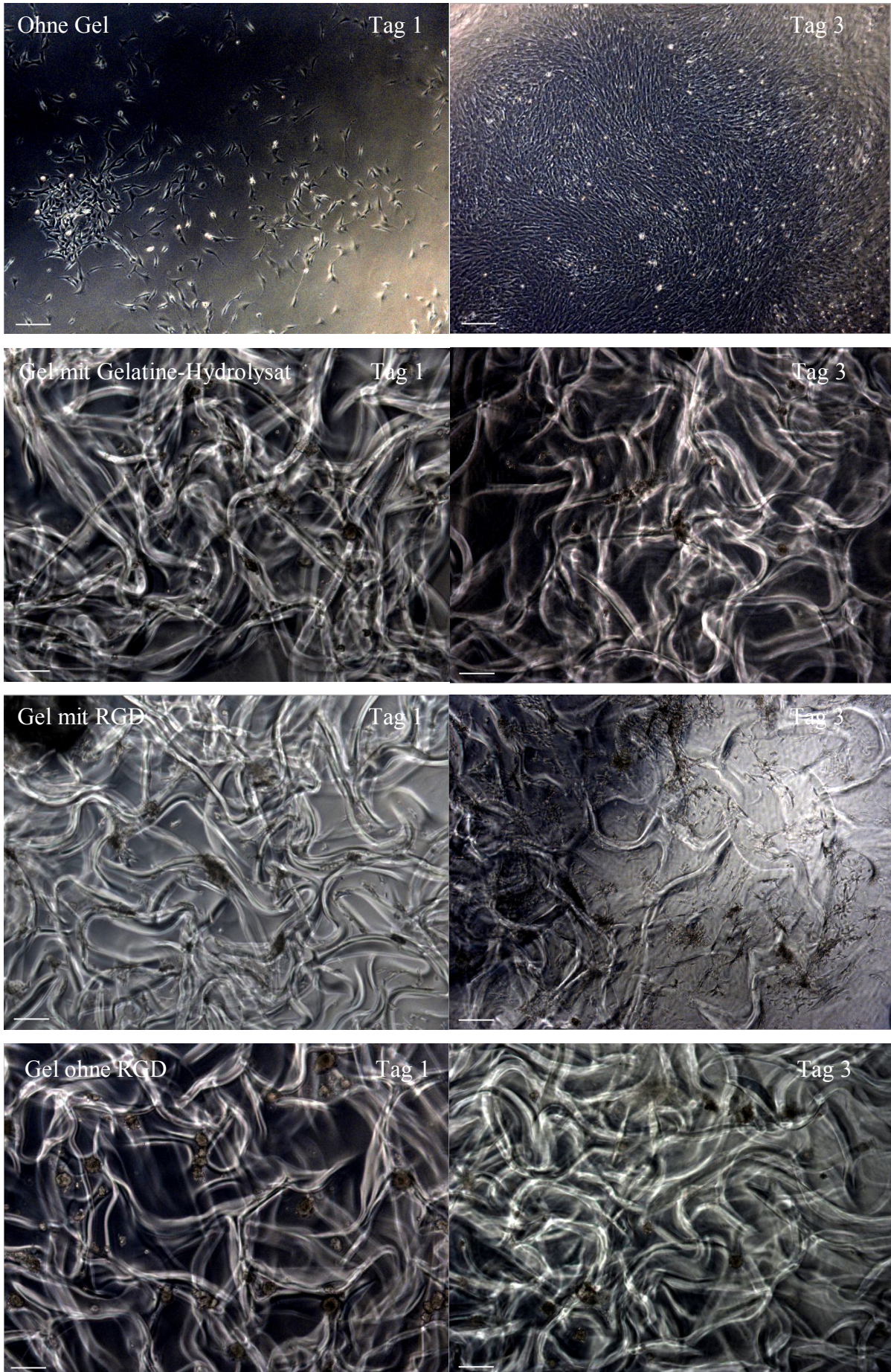


Abbildung 70: Zellzahlentwicklung und Stoffwechselaktivität von PSCs in Dextran-CD-Gelen. Dargestellt sind die Stoffwechselaktivität ($n = 1$) in einem Durchlauf und die Zellzahlentwicklung ($n = 3$, SEM) nach zwei Zellverkapselungsdurchläufen.

Die Zellzahl der PSCs wurde an den Tagen null, zwei, vier und sieben in den Dextran-CD-Gelen untersucht (Abbildung 70). Die Zellen wurden hierfür aus den Gelen mittels Dextranase gelöst und gezählt (1. Teil). Die aufgeschlossenen Zellen wurden abermals verkapselt, kultiviert und ausgezählt (2. Teil), um zu untersuchen, ob auch ein Kreisprozess bzw. eine mehrmalige Verkapselung/Degradierung der Gele zu einer Erhöhung der Zellzahl führt und eine Bioreaktorprozessführung somit prinzipiell möglich ist (siehe auch 5.3). Der Versuch wurde wiederholt (rot), da der letzte Wert des ersten Versuches (blau) durch eine unzureichende Degradierung des Gels verfälscht war. Außerdem wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen in den Gelen untersucht (Abbildung 70). Deutlich zu sehen ist, dass es sowohl zu einer erhöhten Lactatproduktion, als auch zu einem gesteigerten Glucoseverbrauch der Zellen kam, was die Zellzahlentwicklung widerspiegelt.

Um ein Ersatz- und somit kostengünstigeres Material für die Adhäsionspeptide (RGD) zu finden, sollte das Dextran-CD-Gel mit Gelatine-Hydrolysat gemischt werden. Die Gelherstellung und Zellverkapselung verlief ansonsten analog zu den bisherigen Versuchen. In Abbildung 71 und 73 sind die Zellen auf 2D-Gelen bzw. verkapselt in den Gelen dargestellt.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 71: PSCs in Dextran-CD-Gelen mit unterschiedlichen Adhäsionsmotiven. Die Gele wurden vor der Zellverkapselung entweder mit RGD-Peptiden oder Gelatine-Hydrolysaten modifiziert und die Zellen in diesen an den Tagen eins und drei untersucht. Maßstab = 200 μm .

Aus Abbildung 71 wird deutlich, dass die Zellen nur in den RGD-modifizierten Dextranen adhären und proliferieren können. Allerdings sind die Zellen auch in den Gelen ohne RGD-Peptid weitgehend vital und stoffwechselaktiv, wie aus Abbildung 72 deutlich wird.

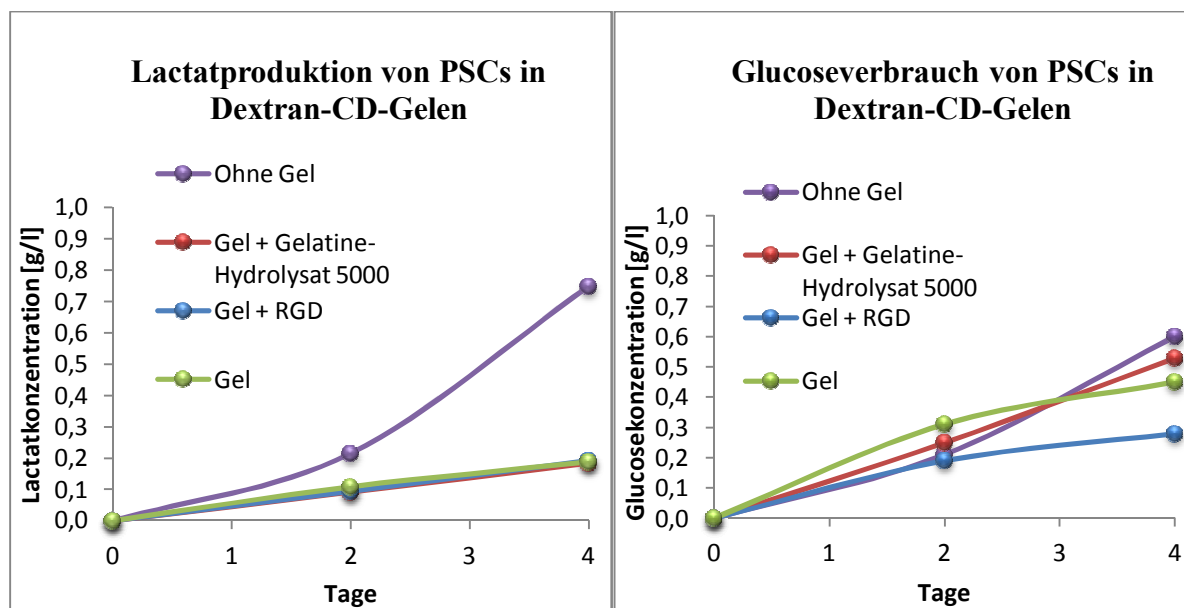


Abbildung 72: Stoffwechselaktivität von PSCs in Dextran-CD-Gelen mit unterschiedlichen Adhäsionspeptiden. Die Zellen wurden vier Tage in Gelatine-Hydrolysat-modifizierten (rot), RGD-modifizierten (blau) und unmodifizierten (grün) Gelen kultiviert. Zusätzlich wurde die Stoffwechselaktivität der Zellen in 2D-Kultur ohne Gel ausgewertet (n = 1).

Die Lactatproduktion der Zellen in den modifizierten Gelen ist bei allen Proben weitgehend identisch (Abbildung 72). Die Zellen in der 2D-Kontrolle zeigen im Vergleich eine erhöhte Lactatproduktion. Der Glucoseverbrauch verhält sich analog (Abbildung 72), wohingegen in diesem Fall alle Ergebnisse der verschiedenen Proben ähnliche Ergebnisse erbrachten. Ein Grund dafür wird die geringe Änderung des Glukosewertes, im Vergleich zum Anfangswert, und somit geringe Empfindlichkeit der Messung sein.

Zusätzlich zu den Zellverkapselungsexperimenten in den Hydrolysat-modifizierten Gelen, wurden die Zellen auf 2D-Gelen aus denselben Materialien ausgesät (Abbildung 73), um den Einfluss auszuschließen, den die 3D-Umgebung zusätzlich auf das Zellwachstum hatte.

Ergebnisse

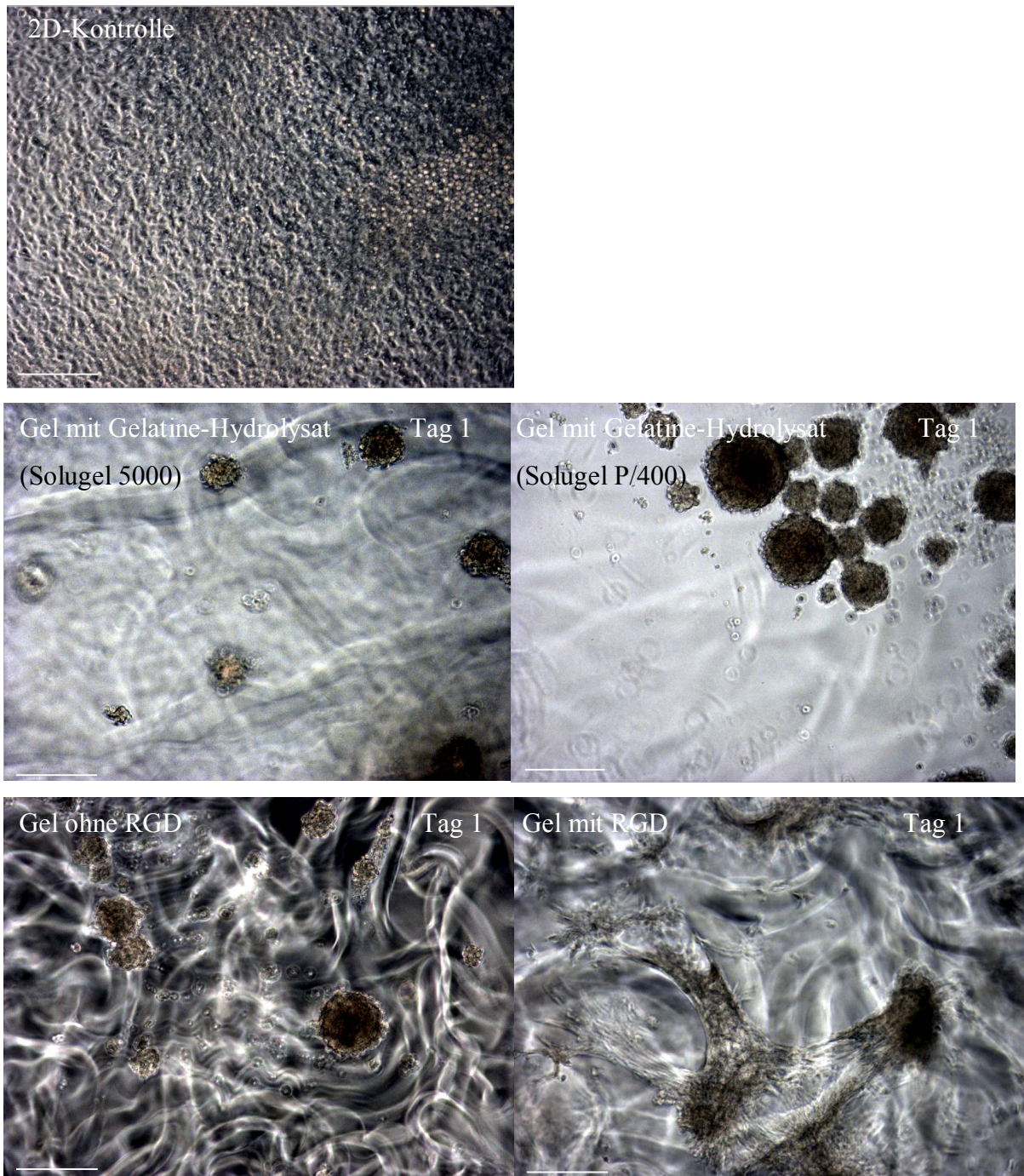


Abbildung 73: PSCs auf 2D- Dextran-CD-Gelen mit unterschiedlichen Adhäsionsmotiven. Bevor die Zellen auf die Gele aufgebracht wurden, wurden diese mit unterschiedlichen Haftmotiven modifiziert. Als Negativkontrolle wurden Gele ohne Haftmotiv mit Zellen besiedelt. Maßstab = 200 µm.

Die Gele wurden vor der Zellbesiedlung mit verschiedenen Haftmotiven modifiziert (Abbildung 73). Die 2D-Kontrolle (ohne Gel) zeigt einen konfluenten Zellrasen. Die Modifizierung der Gele mit den Gelatine-Hydrolysat führte an Tag eins zu Zellen, die in Aggregaten vorlagen, was für eine niedrige Zelladhäsion sprach. Ähnlich sieht das Ergebnis

ohne Haftmotiv aus (Gel ohne RGD). In dem Gel, welches mit dem RGD-Peptid modifiziert wurde, sind adhärente Zellen und einzelne langgestreckte Zellen zu erkennen.

Um die Lokalisation der Zellen in den Gelen und die geeignete Struktur der Kapsel darzustellen, wurden die Gele, wie in 4.4.4.4 beschrieben, fixiert, gefärbt und am Röntgenmikroskop vermessen (Abbildung 74).

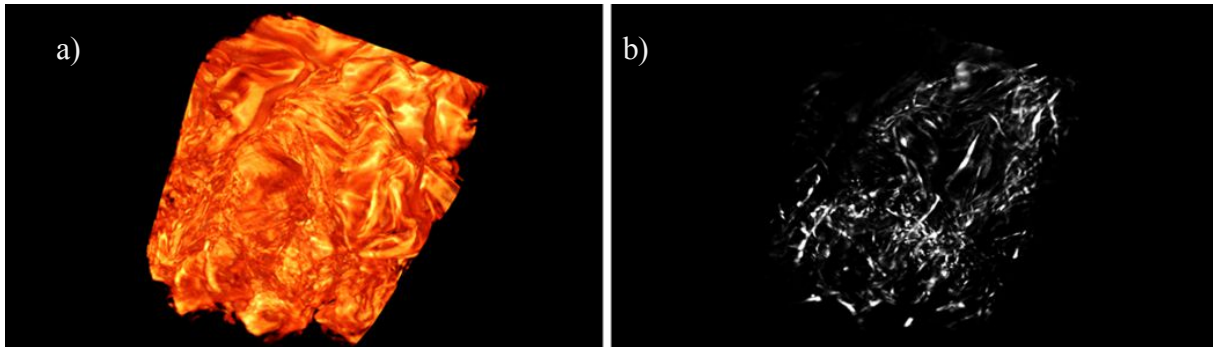


Abbildung 74: Röntgenmikroskopische Darstellung von Zellen in einem Dextran-Hydrogel. Das rekonstruierte Bild wurde digital angefärbt (a)), um die Gelstruktur sichtbar zu machen. Bei erhöhter Transparenz (b)) wurden zellähnliche Strukturen sichtbar (Rapoport, Voigt, & Walter, 2015).

Die Röntgenaufnahme der Dextran-Gele lässt die faserige Struktur der Gele deutlich werden (Abbildung 74 a)). Auch die Lokalisation der Zellen entlang dieser Faserstrukturen sind in Abbildung 74 b) zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Dextran-basierte und RGD-modifizierte Gele ein geeignetes Kultivierungssystem zu sein scheinen, eine Mischung mit Ersatz-Motiven (Gelatine-Hydrolysate) allerdings nicht zu adhären Zellen führt.

5.3. Bioreaktor

Um eine Machbarkeitsstudie für das Reaktorprinzip (Abbildung 10) durchführen zu können, wurde mit dem Gelsystem Dextran-CD der Firma Cellendes gearbeitet, da es viele Vorteile aufweist (Tabelle 1). Hierzu wurden Zellen in den Gelen verkapselt, sieben Tage im Reaktor kultiviert und analysiert. Die Gele wurden in 0,3 ml-Reaktionsgefäße überführt, welche mit Löchern versehen Medium-durchlässig waren. Die Reaktionsgefäße wurden an einer Schnur mit zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäßen (Schwimmkörper) befestigt und in den Reaktor überführt (Abbildung 75, 76).

Ergebnisse

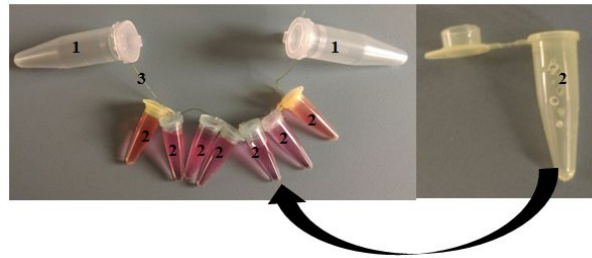


Abbildung 75: Reaktionsgefäße (2) und Schwimmkörper (1) für die Dextran-CD-Gele im Reaktor. Es wurde je ein Gel pro Reaktionsgefäß (2) kultiviert.

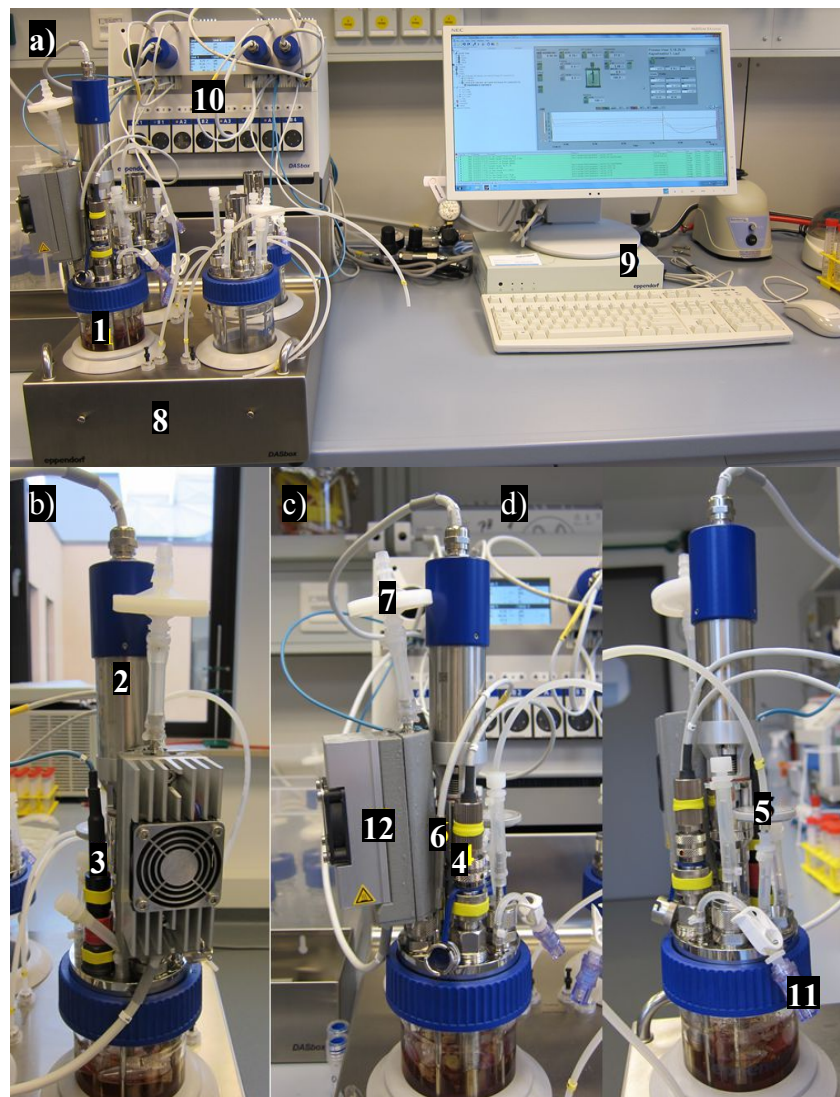


Abbildung 76: Übersichtansicht (a) und Seitenansichten des vollautomatisierten Reaktors (b), c), d))
Der vollautomatisierte Reaktor verfügte über folgende Einheiten: 1: Reaktorvessel, 2: Antrieb, 3: pH-Sonde, 4: O₂-Sonde, 5: Begasung, 6: Temperaturfühler, 7: Überdruckfilter, 8: Temperaturstation, 9: Computer (Steuereinheit), 10: Kontrolleinheit (Mischung der Gase, Pumpen des Mediums, pH/O₂/T-Kontrolle), 11: Probenahme, 12: Rückflusskühler.

Ergebnisse

Die Analyse der verkapselten Zellen ergab folgende Ergebnisse (Abbildung 77, 78):

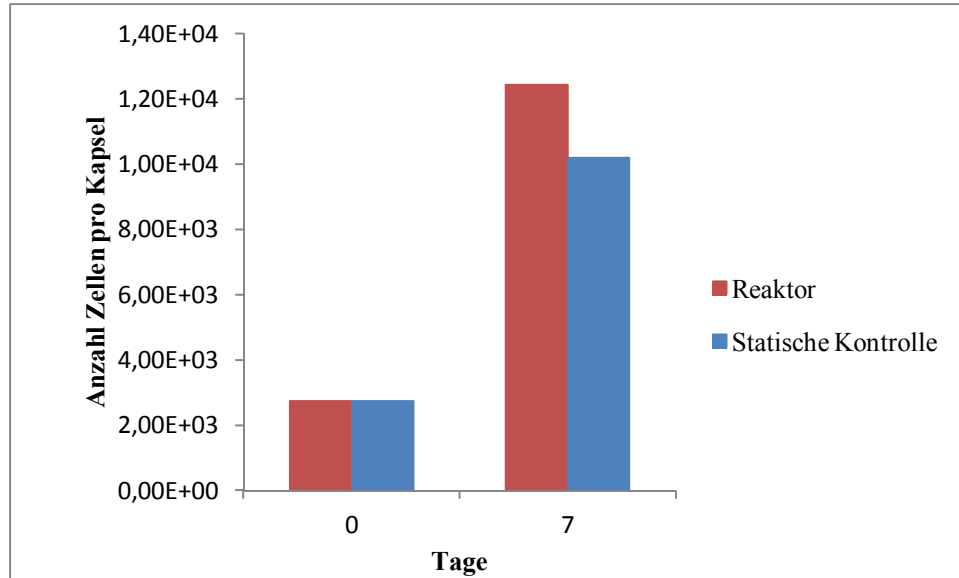


Abbildung 77: Zellzahlentwicklung der Zellen in den Dextran-CD-Kapseln im Reaktor. Dargestellt sind zwei Durchläufe im Reaktor (rot) und in der statischen Kontrolle (blau).

Aus Abbildung 77 wird deutlich, dass die Zellen nach sieben Tagen in Reaktorkultur eine vergleichbare Vitalität zu der statischen Kontrolle aufweisen. Die entsprechende Vitalitätsfärbung ist in Abbildung 78 zu sehen.

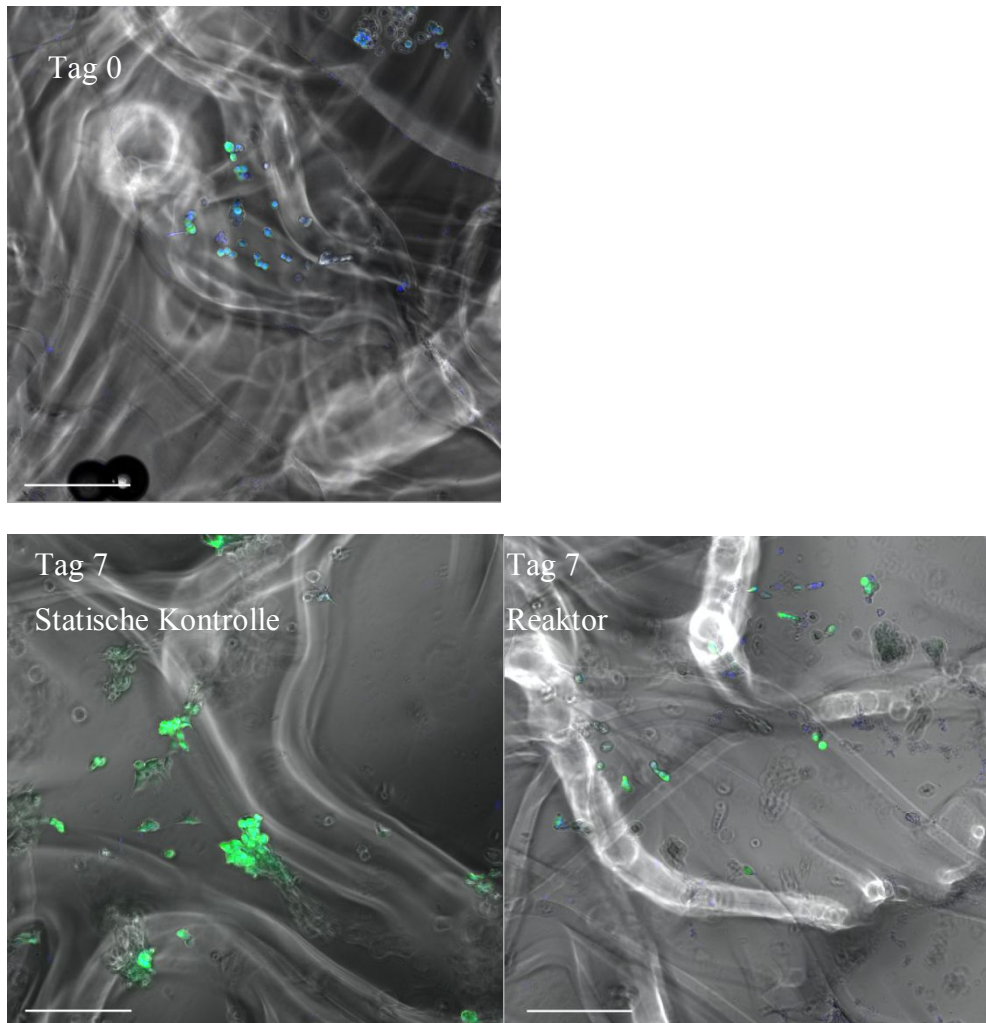


Abbildung 78: FDA/HOECHST-Färbung der Zellen in den Dextran-CD-Kapseln im Reaktor. Dargestellt sind die Zellen an Tag null und sieben in der statischen Kontrolle und im Reaktor. Maßstab = 200 μm .

Die FDA/HOECHST-Färbung der Zellen (Abbildung 78) zeigt, dass die Zellen in den Gelen an Tag null abgekugelt vorliegen und vital sind (FDA-Färbung). Nach sieben Tagen in Kultur weisen die Zellen eine deutlich veränderte Morphologie auf und sind ebenfalls vital. Die Ergebnisse der Färbung decken sich mit denen aus Abbildung 77.

6. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach einer Möglichkeit zur effizienten Vermehrung adhärent wachsender Zellen gesucht. Es wurden verschiedene Hydrogele hinsichtlich ihrer Eignung als Kultivierungssystem für die Zellen untersucht, anschließend erfolgte die Überführung des geeigneten Kapselmaterials in den entsprechenden Bioreaktor um einen zyklischen Prozess zu etablieren.

Während der Austestung der Gelmaterialien als Kultivierungssystem für adhärent wachsende Zellen, wurden verschiedene Eigenschaften und Charakteristika des Kapselmaterials identifiziert, die für eine zyklische Prozessführung notwendig sind (siehe Tabelle 1). Zhang et al. definierten einige Punkte, die ein ideales synthetisches Material mitbringen soll (Shuguang Zhang, Rutledge Ellis-Behnke, Xiaojun Zhao, 2005):

- Chemisch-definiert, synthetisch herstellbar (evtl. Vorkommen in nativem Gewebe)
- Modifizierungen möglich
- Zelladhäsion, -migration, Zell-Zell- und Zell-Substrat-Interaktion, Rückgewinnung der Zellen vom Substrat
- Keine Zytotoxizität, chemisch kompatibel in wässrigen Lösungen/ Zellkultur/ physiologische Bedingungen
- Kompatibel mit Mikroskopie und weiterer Analyse
- Steril und stabil für u.a. Zellkultivierungsexperimente
- Ökonomisch (Verfügbarkeit, skalierbar)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Charakteristika identifiziert, die das Kapselmaterial für die Vermehrung adhärent wachsender Zellen mitbringen muss. Dazu gehören (vgl. Tabelle 1):

- Biokompatibilität
- Haftungsstellen
- Degradierbarkeit

Außerdem sollte das Material einfach in der Handhabung sein, eine gute Verfügbarkeit aufweisen und kostengünstig zu erwerben sein.

Einen Überblick der positiven und negativen Eigenschaften aller untersuchten Gelmaterialien gibt zusammenfassend Tabelle 1.

6.1. Biomaterialien

6.1.1. Fibrin

Fibrin, ein Biopolymer, welches eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung spielt, bringt auch viele positive Eigenschaften zur Verwendung als Kultivierungssystem für adhärent wachsende Zellen mit sich (Shaikh et al., 2008). Die Herstellung des Hydrogels erfolgt durch das Zusammenfügen von Thrombin und Fibrinogen (Park & Lakes, 2007) (Abbildung 13). Die Zellen konnten in den Gelen adhären und proliferieren, was an der Biokompatibilität und den Oberflächeneigenschaften des Fibrins liegen wird, die die Zelladhäsion nachweislich unterstützen (Shaikh et al., 2008). Außerdem konnten die Zellen das Gel degradieren (Abbildung 13): Fibrin wird auch in der Literatur als nicht-toxisch und bioresorbierbar beschrieben (Demol, Eyckmans, Roberts, Luyten, & Van Oosterwyck, 2011), eine weitere wichtige Eigenschaft für das Hydrogel als Kultivierungssystem für die adhärent wachsenden Zellen.

Um die Gele zu charakterisieren und zu untersuchen, wie die innere Gelstruktur aufgebaut ist und wo sich die Zellen innerhalb des Gels befinden, wurden Kryoschnitte von den Gelen angefertigt und entsprechend gefärbt (Abbildung 14). Ebenfalls in dieser Versuchsreihe wurde deutlich, dass die Zellen die Matrix zeitabhängig degradierten. Die Zellen befanden sich in porenartigen Strukturen, von 50-500 μm . Shapiro et al. haben bei der Untersuchung von Alginat-Schwämmen herausgefunden, dass Porengrößen von 70-300 μm ideal sind, um Zellen darin zu kultivieren (Shapiro & Cohen, 1997).

Ein Nachteil von Fibrin ist dessen geringe Verfügbarkeit und somit der hohe Preis. Um den Einsatz von Fibrin möglichst gering zu halten, wurden Mischgele aus Seide und Fibrin hergestellt (Abbildung 15). Allerdings zeigte sich, dass nur sehr inhomogene Gele hergestellt werden konnten und die Zellen nur direkt an Fibrin adhären konnten. In den Seiden-Bereichen bildeten die Zellen Aggregate. Die Mischung der Gele führte somit weder zu einem erhöhten Zellwachstum, noch zu einer Verbesserung der Geleigenschaften.

Abschließend wurde, wie auch bei der Seide eine globale Genexpressionsanalyse durchgeführt um zu überprüfen, ob sich die Genexpression der Zellen nach der Kultur auf Fibrin-beschichteten Oberflächen änderte. Hierzu wurden die normalisierten Daten hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz mittels T-Test untersucht. Auch in diesem Fall zeigte sich, dass die Kultivierung der Zellen auf den Fibrin-beschichteten Oberflächen, einen geringen Einfluss auf die Genexpression der Zellen hatte: 34 Gene waren hoch- ($p \leq 0,05$, $F_c \geq 2$) und 36 Gene waren runterreguliert ($p \leq 0,05$, $F_c \geq 0,5$). Somit scheinen die untersuchten Oberflächen ähnlich unphysiologisch wie das ansonsten verwendete Polystyrol als Kultivierungsoberfläche zu sein.

6.1.2. Seide

6.1.2.1. *Bombyx mori*

Das Fibroin, ein Hauptbestandteil der Seide, bildet selbst-organisierend und zeit-abhängig durch Zusammenlagerung von β -Faltblatt-Strukturen ein wasserunlösliches Hydrogel (Altman et al., 2003). Da die natürliche Gelbildung aber sehr lange dauern würde, kann dieser Effekt zusätzlich durch den Eintrag von Energie (Ultraschall) beschleunigt werden (Wang et al., 2008).

Zunächst wurde allerdings die Zellverträglichkeit der Seide untersucht, indem diese dem Nährmedium zugesetzt wurde (Abbildung 17). Die Ergebnisse zeigen, dass der Zusatz von Seide einen negativen Einfluss auf die Zellvitalität hat, was an der unzureichenden Reinheit der Seide und somit dem Vorhandensein von zelltoxischem Sericin liegen könnte. Die Verwendung von unbehandelter Seide löst bekanntermaßen *in vivo* und *in vitro* eine inflammatorische Reaktion aus (Panilaitis et al., 2003; Salthouse, 1980; Santin, Motta, Freddi, & Cannas, 1999).

Durch ihre vielen positiven Eigenschaften (Altman et al., 2003; Cao & Wang, 2009) wurde die Seide vielfach in unterschiedlichster Form, zum Beispiel als poröses *Scaffold*, verwendet (Nazarov, Jin, & Kaplan, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Seide in Form von ultraschall-induzierten Hydrogelen angewandt (Wang et al., 2008). Zur Optimierung der Geleigenschaften, wurde den Gelen Glycerin und Gelatine zugesetzt (Abbildung 18, Tabelle 19). Die Stabilität der Gele, sowie die Gelierungszeit nahmen mit abnehmender Seidenkonzentration ab. Es wurde beobachtet, dass die Zellen an der Stabilitätsgrenze der Gele anfangen zu adhären und zu proliferieren (Abbildung 19). Dies lässt sich dadurch

erklären, dass die Gele bei höheren Seidenkonzentrationen wahrscheinlich zu dicht waren und die Zellen nicht genügend Raum zum Ausweiten hatten. Es fehlte wahrscheinlich an innerer Oberfläche, was die Ergebnisse der Fibrin-Untersuchungen nochmals bestätigt. Darüber hinaus ist das Seidengel inert gegen zelleigene Proteasen, da die β -Faltblatt-Struktur der Seide stabile kristalline Bereiche ausbilden und somit zu stabil sind. Somit können die Zellen keinen Raum und somit innere Oberfläche schaffen.

Ein Gelsystem, das dieses Problem umgeht, ist das Dextran-CD-Gel, in welches Schnittstellen für die zelleigenen MMPs eingebaut wurden (Cellendes, 2012). So können sich die Zellen je nach Bedarf durch Synthese der MMPs mehr Raum zum Adhären, Proliferieren und Migrieren verschaffen.

Um auszuschließen, dass die gestörte Zellkommunikation der Einzelzellen in den Gelen für eine ungenügende Proliferation sorgte, wurden die Zellen in Form von Aggregate in die Gele eingebracht (Abbildung 20). Allerdings zeigte sich auch hier kein anderes Ergebnis, als bei der Einbringung von Einzelzellen, was dafür spricht, dass eine gestörte Zellkommunikation nicht der Grund für die ungenügende Zellproliferation ist, sondern vielmehr die nicht vorhandene Oberfläche innerhalb der Gele. Die Zeitraffer-Aufnahmen (Abbildung 21) bestätigten diese Ergebnisse und zeigten, dass die Zellen in den Gelen grundsätzlich mobil waren.

Die globale Genexpressionsanalyse wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Genexpression der Zellen nach der Inkulturnahme nach fünf Passagen und Kultivierung auf verschiedenen Oberflächen änderte. Hierzu wurden die normalisierten Daten hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz mittels T-Test untersucht. Die murinen Pankreaszellen wurden auf herkömmlichen Zellkulturoberflächen bzw. auf Seiden- oder Fibrin-beschichteten Oberflächen (siehe Abschnitt Fibrin) kultiviert. Frau Dr. Frahm (Fraunhofer EMB) hat untersucht, wie sich die Genexpression von murinen Pankreaszellen ändert, nachdem diese aus dem Gewebe entnommen und unter 2D-Bedingungen kultiviert wurden, um der Frage nachzugehen, ob der Verlust der Gewebsintegrität und die *in vitro*-Kulturbedingungen Einfluss auf die Expression der Zellen hat (Frahm, 2015). Es zeigte sich, dass die Inkulturnahme der Zellen eine drastische Änderung der Genexpression zur Folge hatte: 879 Gene wurden hoch- ($p \leq 0,05$, $F_c \geq 2$) und 594 wurden runterreguliert ($p \leq 0,05$, $F_c \geq 0,5$), im weiteren Verlauf der Kultivierung änderte sich dahingegen relativ wenig (Frahm, 2015). Die Kultivierung der Zellen auf den Seiden-beschichteten Oberflächen zeigte, dass 50 Gene hoch-

($p \leq 0,05$, $F_c \geq 2$) und 29 runterreguliert ($p \leq 0,05$, $F_c \geq 0,5$) wurden. Demnach scheint der Verlust der Nische und somit die Inkulturnahme der Zellen zu einer starken Expressionsänderung zu führen. Die Änderung der Oberfläche von Plastik zu Seide führte hingegen zu einer vergleichsweise geringen Änderung der Genexpression.

6.1.2.2. *Antheraea pernyi*

Antheraea pernyi, verfügt im Gegensatz zu der Seide von *Bombyx mori* über integrierte RGD-Peptide (J. Qu, L. Xin, X. Xu, F. Zhang, B. Zuo, 2010). Sie wurde verwendet, um in die Seidengele Haftfasern und zusätzlich die integrierten RGD-Peptide einbringen zu können.

Hierbei stellte es sich allerdings als schwierig heraus, die Vliese mit den Zellen zu inokulieren (Abbildung 24). Es wurden zum einen Gazefilter als Besiedlungshilfe verwendet (Abbildung 26), zum anderen Hydrogele aus *Bombyx mori* hergestellt und auf die Seidenvliese gegeben (Abbildung 25). Beide Methoden erwiesen sich als weitgehend ungeeignet. Die Zellen in den Seiden-Hydrogelen konnten nicht adhären und proliferieren (siehe Abschnitt 6.1.2.1). Auch die Gazefilter führten nicht zu einer Besiedlung der Seidenvliese (Abbildung 26). Da diese Seidenart noch nicht hinreichend untersucht wurde (Yan et al., 2010), zeigen sich auch bezüglich der Handhabbarkeit und Erfahrungen mit der Zellkultur große Defizite; oftmals werden Mischungen mit anderen Materialien hergestellt (He, 2, & Wang, 2010; Kweon et al., 2001; Zhang, Zuo, Zhang, & Bai, 2009).

Die Untersuchung der Oberflächenstruktur (Abbildung 28) zeigte, dass eine geringe 3D-Struktur zu detektieren war.

Die Verwendung von Vliesen in einem automatisierten Reaktorprozess ist darüber hinaus ungeeignet, da die Zellinokulation und –ernte schwer zu automatisieren ist.

6.1.3. Alginat

Alginat sind natürlich vorkommende Polysaccharide und bestehen aus zwei verschiedenen Monomer-Arten, die sich durch Zugabe von zweiwertigen Ionen gelieren lassen (Rees & Welsh, 1977). Auch wegen ihrer einzigartigen Gelierungseigenschaften wurden Alginatgele schon vielfach als Zellkultivierungssysteme eingesetzt (Smidsrod & Skjak-Braek, 1990).

Die Gelbildung der Alginat erfolgte im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit Calcium-Ionen, die von den Guluronsäuren komplexiert werden. Die hergestellten Kapseln wurden in Nährmedium mit zusätzlichem Calcium kultiviert, da die Gele zeitabhängig durch eine

Diffusion der Ionen aus den Gelen in das umgebene Medium destabilisiert wurden (Shoichet, Li, White, & Winn, 1996). Die hierbei eingestellte Calcium-Konzentration wurde so gewählt, dass sie die Zellvitalität nicht beeinträchtigte (Abbildung 29, 30) (Gebauer, 2013).

Die Zellen wurden zunächst auf 2D-Schichten aus Alginat ausgesät und kultiviert (Abbildung 31). Es zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur (J A Rowley et al., 1999), dass die Zellen auf den Alginatgelen nicht adhären konnten. Auf vielen hydrophoben Oberflächen von Polymeren kommt es durch eine physikalische Adsorption von Adhäsionsmolekülen aus dem umgebenden Medium (Chinn, 1991), die von den Transmembran-Rezeptoren der Zellen erkannt werden, zu einer Interaktion zwischen Zellen und dem Biomaterial (Hynes, 1992). Alginat wirkt dieser Adsorption allerdings auf Grund seiner hydrophilen Eigenschaften entgegen (Smetana, 1993), dies erklärt auch die Ergebnisse aus Abbildung 31.

Um den Zellen die Haftungsstellen innerhalb des Alginatgels zur Verfügung stellen zu können, musste dieses entsprechend modifiziert werden. Rowley et al. zeigten, dass die Modifizierung von Alginatgelen mit RGD-Peptiden, einem Haftungsmotiv für adhären wachsende Zellen, zu einem Gel führte, auf dem die Zellen adhären und proliferieren konnten (J A Rowley et al., 1999). Allerdings sollte mit einem kostengünstigeren Ersatz gearbeitet werden. Hierzu wurden verschiedene Gelatine und Gelatine-Hydrolysate ausgewählt (Tabelle 6), da Kollagen bzw. Gelatine neben seiner mechanischen Stabilität auch Peptide enthält, die unter anderem die Zelladhäsion unterstützen (Fu et al., 2013; Plant, Bhadriraju, Spurlin, & Elliott, 2009). Die Förderung der Zelladhäsion durch Gelatine wurde durch die Kultivierung von Zellen auf Gelatine-beschichteten Oberflächen untersucht und bestätigt (Abbildung 32). Zunächst wurden Mischgele aus Alginat und Gelatine hergestellt, um zu untersuchen, ob diese zu adhären und proliferierenden Zellen führen (Abbildung 33, 34). Es zeigte sich, dass die Zellen zwar vital waren (Abbildung 35, 36), aber nicht adhären konnten. Vermutlich war die Gelatine aus den Gelen heraus diffundiert, so dass lokal keine Haftungsstellen für die Zellen bereitgestellt werden konnten. Aus diesem Grund musste eine kovalente Verknüpfung zwischen Alginat und Gelatine durchgeführt werden.

Als *Crosslinker* werden häufig Glutaraldehyd (Collins & Birkinshaw, 2008), Epoxy-Verbindungen (Tomihata, 1997) oder Carbodiimide (Collins & Birkinshaw, 2011; Lai et al., 2010) verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das wasserlösliche EDC genutzt, welches den Vorteil hat, dass es zu einem nicht toxischen Harnstoff-Derivat weiterreagiert (Lai & Li, 2010). Die Versuchsbedingungen wurden vielfach variiert (Tabelle 7, 8) und folgende optimale Bedingungen für den Versuch herausgefunden (Abbildung 43-45):

Tabelle 16: Optimale Versuchsbedingungen für die chemische Kupplung von Alginat mit Gelatine.

Alginat	Gelatine	Kupplungsreagenz	Co- Kupplungsreagenz	Puffer	Sonstiges
High/Low MW	Gelatine- Hydrolysat Solugel 5000	EDC·HCl	HOBt	A. dest.	T:<0°C pH: basisch MWCO 50000

Tabelle 17: Optimale Verhältnisse der Edukte für die chemische Kupplung von Alginat mit Gelatine.

Alginat:Gelatine Gewichts%	Alginat:EDC* Mol%	EDC:Co-Kuppler Mol%
1:30	10:1	1:1

Als Alginat konnten beide untersuchten Arten verwendet werden. Es bildeten sich stabilere Gele, wenn das Alginat mit dem höheren Molekulargewicht verwendet wurde. Der Einsatz von Gelatine-Hydrolysat erwies sich als geeigneter, als die Verwendung von Gelatine (Abbildung 37 (1), (2)). Die Hydrolysate wurden durch enzymatische Hydrolyse gewonnen und enthalten deutlich kleinere Moleküle (3-5 kDa) im Gegensatz zu der Gelatine. Möglicherweise war dies der Grund für die bessere Eignung der Hydrolysate. Es konnten kleinere Moleküle an das Alginat gekoppelt werden und die Haftungsmotive standen so den Zellen lokal zur Verfügung. Die Verwendung von FKS anstelle von Gelatine-Hydrolysat als Kupplungspartner konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden (Abbildung 42). Möglicherweise waren nicht ausreichend viele Haftungsmotive vorhanden.

Es wurde herausgefunden, dass als Kupplungsreagenz sowohl EDC, als auch das entsprechende Hydrochlorid verwendet werden konnte. Auf Grund der besseren Handhabung wurde aber das EDC·HCl angewandt. Als Co-Kupplungsreagenz wurde das HOBt verwendet (Abbildung 38), damit die Nebenreaktion zu dem unreaktiven N-Acylharnstoff möglichst umgangen wird (Abbildung 9). Die Versuchsbedingungen (Temperatur, Puffer) wurden ebenfalls optimiert. Die Wahl der Dialysemembran und der Länge der Dialyse erwies sich ebenfalls als optimierbar (Abbildung 39, 40). Ab einer Länge von zwei Tagen Dialysedauer waren die Zellen deutlich vitaler, als nach einem Tag Dialysedauer, da wahrscheinlich alle negativ auswirkenden Nebenprodukte aus dem Produkt entfernt wurden (Abbildung 39).

Diskussion

Vergleichbares ließ sich bei der Porengröße beobachten: Bei einem MWCO von 50 kDa konnten die Zellen adhären und proliferieren (Abbildung 40). Bei einem MWCO von 3,5 kDa bildeten die Zellen Aggregate, da wahrscheinlich ebenfalls negativ wirkenden Nebenprodukte im Produkt enthalten waren.

Die Verhältnisse der Edukte wurden so ausgewählt, dass die Gelatine im deutlichen Überschuss eingesetzt wurde und ca. jedes zehnte Alginat-Monomer für eine Kupplung zur Verfügung stand.

Nach der Einhaltung der Versuchsbedingungen (Tabelle 16) und der Optimierung der Eduktverhältnisse (Tabelle 17) konnten die Zellen sowohl auf 2D-Gelen, als auch in 3D-Kapseln erfolgreich kultiviert werden (Abbildung 43, 44). Auch die Vitalität der Zellen war vergleichbar zur herkömmlichen 2D-Kultur (Abbildung 45).

Ein Nachteil der modifizierten Alginate war die Instabilität der entstandenen Gele. Der Grund war wahrscheinlich, dass die Monomere, die vorher für die Chelatisierung der Calcium-Ionen verwendet wurden, durch die Kupplung nicht mehr für die Komplexierung bereitstanden. Um stabilere Gele zu erhalten, könnte in weiteren Versuchen mit einem Bariumsalz gearbeitet werden, da Barium im Vergleich zu Calciumionen eine höhere Bindungsaffinität zu den Alginatmonomeren hat (Smidsrød, 1974).

Die Überprüfung der Kupplungsreaktion erfolgte zunächst mittels NMR-Spektroskopie. Es zeigte sich, dass das Produkt dem Spektrum der Gelatine sehr ähnlich war (Abbildung 46). Die Dialyse erfolgte mit einer Membran mit einem MWCO von 3,5 kDa. Wahrscheinlich war noch sehr viel Gelatine in der Probe enthalten, sodass das Spektrum überlagert wurde. Die Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie zeigten die gleichen Ergebnisse (Abbildung 47). Das Produkt wurde daraufhin ein zweites Mal mittels Dialyse gereinigt mit einem MWCO von 50 kDa und mit der Größenausschlusschromatographie untersucht (Abbildung 48). Es zeigte sich nun deutlich, dass das Produkt ein ähnliches Chromatogramm wie das des Alginat aufwies. Erwartungsgemäß hätten die Peaks der Alginatspektren bei >50 kDa liegen müssen. Verglichen mit entsprechenden Kalibrierdaten lagen die Peaks allerdings bei ca. 18 ml, was einer Molekülgröße von ca. 12 kDa entspricht. Diese Diskrepanz kam wahrscheinlich durch eine Interaktion zwischen Alginat und Säulenmaterial zustande. Es

ist auch möglich, dass die Alginatproben in unterschiedlich gefalteter Form vorlagen und es deswegen zu verfälschten Größenangaben kam.

Schlussendlich wurde der TNBS-Assay durchgeführt, welcher ein Nachweisreagenz für Aminogruppen ist und bei positivem Ergebnis zu einer gelben Färbung führt (Abbildung 12) (Bubnis & Ofner, 1992). Die gelbe Färbung war in der Positiv-Kontrolle und bei dem modifizierten Alginat zu sehen und stellt sicher, dass Aminogruppen (= Gelatine) in dem Produkt enthalten waren, die Kupplung hatte somit erfolgreich stattgefunden (Abbildung 49, Tabelle 15).

Neben der Modifizierung wurden außerdem Mischgele aus Alginat, Polyamid und PolyDADMAC hergestellt.

Die Verwendung von PA-Pulver innerhalb der Gele führte dazu, dass die Zellen an den Pulver-Partikeln adhären konnten (Abbildung 50, 51, 52), allerdings ist diese Art von Mischgelen in einem Reaktorprozess nur schwer integrierbar, da pulverförmige Substanzen in einem automatisierten Reaktor schnell zu Problemen (z.B.: Handhabung) führen würden.

Auch führte der Einsatz von PolyDADMAC nicht zu einer Verbesserung der Alginatgele. Bereits die Aussaat der Zellen auf den 2D-Beschichtungen zeigte, dass dieses Material die Zelladhäsion nicht unterstützte (Abbildung 53).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Modifizierung der Alginatgele mit Gelatine-Hydrolysaten zu zufriedenstellenden Ergebnissen bezüglich Zellkultivierung und –vitalität führten, die Geleigenschaften (Stabilität) waren allerdings noch optimierungsbedürftig.

6.2. Synthetische Materialien

6.2.1. Novatach (Peptid-gekoppelte Alginat)

Das halbsynthetische Material der Firma Novamatrix besteht aus Alginat, welches mit RGD-Peptiden modifiziert wurde. Die Eigenschaften und Charakteristika von Alginat werden unter 6.1.3 diskutiert. Da die Alginatmoleküle von sich aus keine Adhäsionsmotive für die Zellen mitbringen, ist es notwendig diese synthetisch einzubringen. Rowley et al. modifizierten Alginatgele mit RGD-Peptiden, um diese als Ersatz für die Extrazelluläre Matrix der Zellen zu verwenden (Jon A Rowley & Mooney, 2002). Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen sowohl auf 2D-Gelschichten aus modifizierten Alginatgelen, als auch in Alginat-Hohlkapseln

adhärieren und proliferieren konnten (Abbildung 54, 55). Auch die Untersuchung der Stoffwechselaktivität bestätigte dieses Ergebnis. Die Zellzahl konnte mit zunehmender Kultivierungsdauer nicht mehr bestimmt werden, da die Alginatkapseln so stabil wurden, dass diese nicht mehr mit Citrat degradiert werden konnten (Abbildung 56). Das ionische *Crosslinking* der Gele geht über Calciumionen vonstatten, welche allerdings zeitabhängig aus den Gelen in das umgebende Medium diffundieren (Shoichet et al., 1996). Um dieses Phänomen zu unterbinden, wurde dem Kultivierungsmedium zusätzlich Calcium zugesetzt, das vermutlich mit zunehmender Kultivierungsdauer zu einer Erhöhung der Gelstabilität führte, so dass die Gele nicht mehr degradiert werden konnten. Die einzustellende Calciumkonzentration im Nährmedium wurde hinsichtlich der Zellverträglichkeit eingestellt und überprüft (Gebauer, 2013). Dieses Ergebnis wurde durch die Untersuchung der Gelstruktur mit Hilfe von Kryoschnitten bestätigt (Abbildung 57): Die Gele, welche mit zusätzlichem Calcium im Nährmedium kultiviert wurden, zeigten eine deutlich dichtere Struktur im Gegensatz zu den Gelen, die ohne zusätzliche Calciumzugabe kultiviert wurden. Die Zellen konnten in Alginatvollkapseln nicht adhärieren (Abbildung 58). Hierbei scheint ebenfalls die dichtgepackte Struktur der Gele das Problem zu sein. Trotzdem waren die Zellen vital (Abbildung 60).

6.2.2. Puramatrix

Die Gelbildung der PM-Kapseln erfolgte unter physiologischen Bedingungen durch Zugabe von Nährmedium, welches die notwendigen monovalenten Ionen enthält. Durch seinen amphiphilen Charakter bilden sich aus den wasserlöslichen β -Faltblättern die Gelstrukturen (Cormier, Lopez-Majada, Alamo, & Paravastu, 2013).

Die Verkapselung der Zellen in den PM-Gelen, führte zu vitalen Zellen, die auch in der Lage waren in dem Gel zu adhärieren (Abbildung 61).

Selbst-organisierende Peptid-Gele wurden hinsichtlich ihrer Eignung als Zellkultivierungssysteme für verschiedene Zelltypen, beispielweise für Endothelzellen, untersucht (Jung et al., 2009; Narmoneva et al., 2005; Sieminski, Semino, Gong, & Kamm, 2008). PM-Gele unterstützen nachweislich die Zelladhäsion, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen (Ortinou et al., 2010; Thonhoff, Lou, Jordan, Zhao, & Wu, 2008). Auch die Stoffwechselaktivität der in den PM-Gelen kultivierten Zellen, wies auf vitale Zellen nach vier Tagen in Gel-Kultur hin. PM-Gele verstärken nicht nur die Überlebensrate

der Zellen, sondern erlauben auch eine Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff durch die Gelmembran (Moradi et al., 2012; Ortinau et al., 2010).

Die Untersuchung der inneren Gelstruktur mit Hilfe von Kryoschnitten, zeigte die Porengrößen der Hohlräume in den Gelen an und die lokale Zellumgebung. Die wichtige 3D-Umgebung der Zellen in den PM-Gelen analysierten auch Moradi et al. mittels Elektronenmikroskopie und stellten ein Netzwerk dar.

Die Herstellung von Mischgelen aus Alginat und Puramatrix führte nicht zu einer Verbesserung der Geleigenschaften (Abbildung 64, 65).

6.2.3. Dextran-CD-Hydrogel

Das synthetische Polymer der Firma Cellendes enthält das Maleimid-funktionalisierte Dextran, welches pH-abhängig mit einem SH-haltigem *Crosslinker* ein stabiles Hydrogel bildet (Abbildung 10). Die Gelbildung erfolgt unter physiologischen Bedingungen, sodass Zellen in den Gelen verkapselt werden konnten (Abbildung 66). Die Zellen konnten allerdings nur in Gelen adhären, welche mit RGD-Peptiden modifiziert wurden. Diese Peptide sorgen durch die Interaktion der zelleigenen Integrine mit den RGD-Einheiten (Pierschbacher & Ruoslahti, 1984; Ruoslahti, 1996) für die Adhäsion der Zellen (Hersel et al., 2003; Hubbell, 1995). Dies wird ebenso durch die Ergebnisse der Dünnschnitte aus Abbildung 68 und der Vitalitätsfärbung aus Abbildung 69, sowie der Vitalitätsuntersuchung aus Abbildung 70 gestützt, in welcher die adhären Zellen in den Gelen sichtbar wurden. Die Gele konnten anschließend mit Hilfe des Enzyms Dextranase wieder abgebaut werden, so dass wieder Einzelzellen vorlagen (Abbildung 67). Einen automatisierten Prozess unter Verwendung dieser Dextran-Gele verwendeten Rimann et al. zur Verbesserung der Arzneimittelentwicklung im Hochdurchsatz-Screening. Hierbei wurden die Zellen in den Gelen und als Kontrolle in herkömmlicher 2D-Kultur kultiviert. Nach abgeschlossener Kultivierungsdauer konnten die Zellen zellverträglich aus dem Gel herausgelöst und für weitere Untersuchungen verwendet werden. Die Behandlung der 2- und 3D-kultivierten Zellen mit Arzneistoffen führte zu gleichen Ergebnissen und zeigte somit das Potential eines 3D-Systems für die Arzneistoffentwicklung und -testung (Rimann et al., 2014).

Da im Rahmen dieser Arbeit ein Material gesucht wurde, welches auch im großen Maßstab ökonomisch verwendet werden kann, wurde versucht das RGD-Peptid zu ersetzen. Hierfür sollte Gelatine-Hydrolysat verwendet werden, da Gelatine nachweislich RGD-Sequenzen enthält (Huang et al., 2005). Die Gelbildung sollte über die Thiolgruppe der Cysteine des

Diskussion

Hydrolysats mit dem Maleimid-funktionalisierten Dextran erfolgen. Die Ergebnisse aus Abbildung 73 zeigten, dass die Gelatine-modifizierten Gele nicht zu adhären Zellen führten. Ein Grund hierfür könnte sein, dass Cysteine einen sehr geringen (< 0,1 %) Anteil in Gelatine ausmachen (Gelatin Manufacturers, 2012) und es somit nicht genügend Haftungsmotive innerhalb der Gele gab. Die ungebundenen Gelatinemoleküle lagen somit wahrscheinlich nicht lokal im Gel vor, sondern diffundierten vielmehr ins Medium. Die Strukturaufklärung des vernetzen Dextran mit Hilfe des Röntgenmikroskops zeigte die faserartige Struktur der Gele und nach Erhöhung der Transparenz zell-ähnliche Strukturen entlang der Fasern (Abbildung 74). Faserartige Strukturen scheinen für die Adhäsion von Zellen von Vorteil zu sein, was die Verwendung von Vliesen in der Zellkultur bestätigt. Beispielsweise wird bei dem Fibrastage™ ein Einwegsystem aus Zellkulturflaschen mit Fibracell^R-Disks verwendet, welche aus Polyesterfasern und Polypropylen bestehen, die die Zelladhäsion begünstigen.

Zusammengefasst sind im Folgenden noch einmal die positiven und negativen Eigenschaften aller untersuchten Gelmaterialien dargestellt (Tabelle 1 bzw. 18).

Tabelle 18: Zusammenfassende Tabelle der positiven (✓) und negativen (✗) Eigenschaften der untersuchten Gelmaterialien.

Hydrogel	Biokompatibel	Haftungsstellen	Handhabung	Verfügbarkeit	Degradierbarkeit	Preis	Zusatz
Fibrin	✓	✓	✓	✗	✓	✗	
Seide (<i>Bombyx mori</i>)	✓	✗	✓	✓	✗	✓	Gelatine Glycerin Fibrin
Seide (<i>Antheraea pernyi</i>)	✓	(✓)	✗	✓	✗	✓	<i>Bombyx mori</i> Gazefilter
Alginat	✓	✓	(✓)	✓	✓	✓	PA PolyDADMAC
Novamatrix	✓	✓	✓	✓	(✓)	✗	-
Puramatrix	✓	✓	✓	✓	✗	✗	Alginat
Dextran- CD	✓	✓	✓	✓	✓	✗	-

6.3. Bioreaktor

Nach dem Auffinden eines geeigneten Gelmaterials zur Kultivierung der adhären wachsenden Zellen, sollten die Zellen in einem Bioreaktorsystem kultiviert werden, um so eine effiziente Vermehrung der Zellen sicherzustellen, da diese technische Fragestellung noch immer offen ist. Eine Lösung dieses Problems könnte in zahlreichen Bereichen, wie der Medizin, Zellbanken, in der Ernährungsindustrie oder Landwirtschaft hilfreich sein. Die herkömmliche Kultivierung adhären wachsender Zellen erfolgt in Form von *Microcarrier*n (Rowley J, Abraham E, Campbell A, Brandwein H, 2012; Want et al., 2012) oder Hohlfaser-Systemen (Sardonini & Wu, n.d.; Zeilinger et al., 2011). Allerdings sind die genannten Methoden durch ihre Wachstumsoberfläche beschränkt, da Zellen nur in bestimmten Dichtebereichen wachsen können (Schmitz, 2007).

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Prozess ist in Abbildung 2 dargestellt. Es handelt sich hierbei um einen zyklischen Reaktorprozess, der fünf Phasen durchläuft:

- Vorlegen der Zellen in dem Gelbildner mit Adhäsionsstellen
- Eintropfen der Zellsuspension und Entstehung der Gelkapseln
- Expansion der Zellen in den Kapseln
- Auflösen der Kapseln und Freisetzen der Zellen
- Resuspendieren der Zellen in dem Gelbildner und Wiederherstellung der ersten Phase

Dieser Prozess beinhaltet folgende Vorteile:

- Inokulation und Ernte der Zellen durch Verkapseln und Auflösen der Kapseln vielfach vereinfacht und wenig/keine Zwischenschritte
- Die Zellen befinden sich in lokaler Mikroumgebung, dadurch kann der Reaktor mit kleinen Start-Zellzahlen betrieben werden
- Mechanischer Schutz der Zellen durch die Kapseln, dadurch erhöhen sich die Überlebensraten
- Das Zellwachstum in dreidimensionaler Umgebung, dadurch Erhalt der biologischen Funktion und Identität, sowie effiziente Ausnutzung des Reaktorvolumens

Diskussion

Auf Grund der vielen Vorteile des Dextran-CD-Hydrogels wurde eine Machbarkeitsstudie mit diesem Material durchgeführt (Tabelle 1). Als Reaktorsystem wurde ein vollautomatischer Rührkesselreaktor der Firma Dasgip verwendet (Abbildung 76). Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen in den Gelen im Reaktor vital waren und ein ähnliches Zellwachstum zur statischen Kontrolle aufwiesen (Abbildung 77, 78). Da der zyklische Ablauf dieses Prozesses ein wichtiges Kriterium ist, sollten die Zellen erneut verkapselt und kultiviert werden. Allerdings waren die hergestellten Kapseln nicht stabil. Die Kapseln können durch Zugabe des Enzyms Dextranase aufgelöst werden (Cellendes, 2012). Bevor die Zellen erneut verkapselt wurden, wurden diese einem mehrmaligen Waschschrift unterzogen. Das Enzym wurde somit nicht inaktiviert, sondern ausgewaschen. Somit könnten Reste des Enzyms in der Zellsuspension für das abermalige Auflösen der Kapseln gesorgt haben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Dextran-CD-Hydrogel ein geeignetes Gelsystem zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen in einem Bioreaktor-Prozess darstellt.

7. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Hydrogele hinsichtlich ihrer Eignung für die Vermehrung von adhärent wachsenden Zellen, wie z. B. Stammzellen untersucht. Es wurden sechs Materialien ausgetestet und charakterisiert und verschiedene Bewertungscharakteristika (siehe Tabelle 1) festgelegt.

Die Zellen wurden, je nach Material, in dem Gel verkapselt, kultiviert und anschließend wieder aufgeschlossen. Das Dextran-CD-Hydrogel erwies sich hierbei als optimales Kultivierungssystem für eine Machbarkeitsstudie in einem Rührkesselreaktor. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen innerhalb der Dextran-Gele proliferierten und die Gele nach erfolgreicher Kultivierung wieder aufgeschlossen und die Zellen erhalten werden konnten. Die Zellen blieben vital, so dass ein Reaktorprozess generiert wurde, in dem die Zellen erfolgreich vermehrt werden konnten.

Eine kostengünstigere Alternative wurde in einem Alginat-basierten System gefunden. Das Alginat musste vor der Gelherstellung allerdings noch mit essentiellen Haftungsstellen für die adhärent wachsenden Zellen versehen werden. Dies konnte erfolgreich mit der wässrigen Carbodiimid-Chemie durchgeführt werden, sodass Gelatine-modifizierte Alginat erhalten wurden, in denen die Zellen proliferieren konnten. Es stellte sich allerdings heraus, dass die Stabilität der hergestellten Gele, im Gegensatz zu den unmodifizierten Alginaten deutlich abnahm. Um dieses Problem zu umgehen, könnte in Zukunft ein Alginat mit einem höheren Anteil an GS-Monomeren verwendet werden, da dies zu einer höheren mechanischen Stabilität und größeren Porosität der Gele führt (Orive et al., 2006). Außerdem würde ein höheres Molekulargewicht und erhöhte Konzentrationen auch zu einer Verbesserung der Stabilität der Gele führen (Martinsen, Skjåk-Braek, & Smidsrød, 1989).

8. Literaturverzeichnis

- Abu-Yousif, A. O., Rizvi, I., Evans, C. L., Celli, J. P., & Hasan, T. (2009). PuraMatrix encapsulation of cancer cells. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (34). <http://doi.org/10.3791/1692>
- Acevedo, C. A., Weinstein-Opppenheimer, C., Brown, D. I., Huebner, H., Buchholz, R., & Young, M. E. (2009). A mathematical model for the design of fibrin microcapsules with skin cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32(3), 341–51. <http://doi.org/10.1007/s00449-008-0253-1>
- Altman, G. H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R. L., Chen, J., ... Kaplan, D. L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials*, 24(3), 401–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423595>
- Bubnis, W. A., & Ofner, C. M. (1992). The determination of epsilon-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry*, 207(1), 129–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1489085>
- Cao, Y., & Wang, B. (2009). Biodegradation of silk biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), 1514–24. <http://doi.org/10.3390/ijms10041514>
- Carrel, A., & Burrows, M. T. (1911). AN ADDITION TO THE TECHNIQUE OF THE CULTIVATION OF TISSUES IN VITRO. *The Journal of Experimental Medicine*, 14(3), 244–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2124775&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cavalcanti, B. N., Zeitlin, B. D., & Nör, J. E. (2013). A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 29(1), 97–102. <http://doi.org/10.1016/j.dental.2012.08.002>
- Cellendes. (2012). Cellendes Cell Environment Design, 3-D Life Hydrogels, User Guide.
- Chen, L., Xiao, Z., Meng, Y., Zhao, Y., Han, J., Su, G., ... Dai, J. (2012). The enhancement of cancer stem cell properties of MCF-7 cells in 3D collagen scaffolds for modeling of cancer and anti-cancer drugs. *Biomaterials*, 33(5), 1437–44. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.056>
- Cheng, Y.-H., Yang, S.-H., Su, W.-Y., Chen, Y.-C., Yang, K.-C., Cheng, W. T.-K., ... Lin, F.-H. (2010). Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: an in vitro study. *Tissue Engineering. Part A*, 16(2), 695–703. <http://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0229>
- Chinn, J. A. (1991). Biomaterials: protein-surface interactions. *The Biomedical Engineering handbook. Boca Raton, FL: CRC Press*, 1597–608.

- Chmiel, H. (2011). *Bioprozesstechnik*. (H. Chmiel, Ed.). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. <http://doi.org/10.1007/978-3-8274-2477-8>
- Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2008). Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 19(11), 3335–43. <http://doi.org/10.1007/s10856-008-3476-4>
- Collins, M. N., & Birkinshaw, C. (2011). Morphology of crosslinked hyaluronic acid porous hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 120(2), 1040–1049. <http://doi.org/10.1002/app.33241>
- Cormier, A. R., Lopez-Majada, J. M., Alamo, R. G., & Paravastu, A. K. (2013). Distinct solid and solution state self-assembly pathways of RADA16-I designer peptide. *Journal of Peptide Science : An Official Publication of the European Peptide Society*, 19(8), 477–84. <http://doi.org/10.1002/psc.2524>
- Dautzenberg H, Loth F, Wagenknecht W, P. B. (1985). Cellulose-Ausgangsmaterial für hochveredelte Produkte im biologisch-medizinischen Bereich. *Das Papier*, 12, 601–607.
- Demol, J., Eyckmans, J., Roberts, S. J., Luyten, F. P., & Van Oosterwyck, H. (2011). Does tranexamic acid stabilised fibrin support the osteogenic differentiation of human periosteum derived cells? *European Cells & Materials*, 21, 272–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21432782>
- Foty, R. (2011). A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (51). <http://doi.org/10.3791/2720>
- Frahm, S. (2015). *Systematische Untersuchung der Inkulturnahme adhärent wachsender Zellen*.
- Fu, H.-L., Valiathan, R. R., Arkwright, R., Sohail, A., Mihai, C., Kumarasiri, M., ... Fridman, R. (2013). Discoidin domain receptors: unique receptor tyrosine kinases in collagen-mediated signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7430–7. <http://doi.org/10.1074/jbc.R112.444158>
- Gebauer, N. (2013). *Immobilisierung adhärent wachsender Zellen in degradierbaren Alginhydrogelen*.
- Gelatin Manufacturers, I. of A. (2012). *Gelatin Handbook*.
- Gil, E. S., Spontak, R. J., & Hudson, S. M. (2005). Effect of beta-sheet crystals on the thermal and rheological behavior of protein-based hydrogels derived from gelatin and silk fibroin. *Macromolecular Bioscience*, 5(8), 702–9. <http://doi.org/10.1002/mabi.200500076>
- He, I.-X., 2, & Wang, and S.-Y. (2010). Structure and Miscibility of Tussah Silk Fibroin/Carboxymethyl Chitosan Blend Films. *Iranian Polymer Journal*, 19(8), 625–633.
- Henning, S. (2009). *Charakterisierung von Alginat-Kapseln mit ortsaufgelöster NMR*.

- Hersel, U., Dahmen, C., & Kessler, H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, *24*(24), 4385–415. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12922151>
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., & Madihally, S. V. (2005). In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, *26*(36), 7616–27. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.036>
- Hubbell, J. A. (1995). Biomaterials in tissue engineering. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*, *13*(6), 565–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9634795>
- Huglin, M. R. (1989). Hydrogels in medicine and pharmacy Edited by N. A. Peppas, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1986 (Vol. 1), 1987 (Vols 2 and 3). Vol. 1 Fundamentals, pp. vii + 180, £72.00, ISBN 0-8493-5546-X; Vol. 2 Polymers, pp. vii + 171, £72.00, ISBN 0-8493-5547-8; *British Polymer Journal*, *21*(2), 184–184. <http://doi.org/10.1002/pi.4980210223>
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, *69*(1), 11–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1555235>
- J. Qu, L. Xin, X. Xu, F. Zhang, B. Zuo, H. Z. (2010). Tussah Silk Fibroin Excels Silk Fibroin from the Domesticated Silkworm in Supporting the Development of Neurons. In *FMBE Proceedings* (pp. 1574–1577).
- Jeanes, A. I., Maya-Mendoza, A., & Streuli, C. H. (2011). Cellular microenvironment influences the ability of mammary epithelia to undergo cell cycle. *PloS One*, *6*(3), e18144. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018144>
- Jung, J. P., Nagaraj, A. K., Fox, E. K., Rudra, J. S., Devgun, J. M., & Collier, J. H. (2009). Co-assembling peptides as defined matrices for endothelial cells. *Biomaterials*, *30*(12), 2400–10. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.033>
- Kim, U.-J., Park, J., Li, C., Jin, H.-J., Valluzzi, R., & Kaplan, D. L. (2004). Structure and properties of silk hydrogels. *Biomacromolecules*, *5*(3), 786–92. <http://doi.org/10.1021/bm0345460>
- Kruse, C., Kajahn, J., Petschnik, A. E., Maass, A., Klink, E., Rapoport, D. H., & Wedel, T. (2006). Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures. *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger : Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, *188*(6), 503–17. <http://doi.org/10.1016/j.aanat.2006.07.012>
- Kweon, H., Um, I. C., & Park, Y. H. (2001). Structural and thermal characteristics of *Antheraea pernyi* silk fibroin/chitosan blend film. *Polymer*, *42*(15), 6651–6656. [http://doi.org/10.1016/S0032-3861\(01\)00104-5](http://doi.org/10.1016/S0032-3861(01)00104-5)
- Lai, J.-Y., & Li, Y.-T. (2010). Functional assessment of cross-linked porous gelatin hydrogels for bioengineered cell sheet carriers. *Biomacromolecules*, *11*(5), 1387–97. <http://doi.org/10.1021/bm100213f>

- Lai, J.-Y., Ma, D. H.-K., Cheng, H.-Y., Sun, C.-C., Huang, S.-J., Li, Y.-T., & Hsiue, G.-H. (2010). Ocular biocompatibility of carbodiimide cross-linked hyaluronic acid hydrogels for cell sheet delivery carriers. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 21(3), 359–76. <http://doi.org/10.1163/156856209X416980>
- Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W.-M., Lee, K.-D., Hsieh, S.-L., & Chen, T.-H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), 1669–75. <http://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1670>
- Lu, Y., Zhang, G., Shen, C., Uygun, K., Yarmush, M. L., & Meng, Q. (2012). A novel 3D liver organoid system for elucidation of hepatic glucose metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(2), 595–604. <http://doi.org/10.1002/bit.23349>
- Lukanoff B, D. H. (1994). Natriumcellulosesulfat als Komponente für die Erzeugung von Mikrokapseln durch Polyelektrolytkomplexbildung. *Das Papier*, 6, 287–298.
- Lutolf, M. P., Weber, F. E., Schmoekel, H. G., Schense, J. C., Kohler, T., Müller, R., & Hubbell, J. A. (2003). Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nature Biotechnology*, 21(5), 513–8. <http://doi.org/10.1038/nbt818>
- Marks, D. M. (2003). Equipment design considerations for large scale cell culture. *Cytotechnology*, 42(1), 21–33. <http://doi.org/10.1023/A:1026103405618>
- Martinsen, A., Skjåk-Braek, G., & Smidsrød, O. (1989). Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnology and Bioengineering*, 33(1), 79–89. <http://doi.org/10.1002/bit.260330111>
- Merten, O. W., Dautzenberg, H., & Palfi, G. E. (1991). A new method for the encapsulation of mammalian cells. *Cytotechnology*, 7(2), 121–30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1367907>
- Metscher, B. D. (2009). MicroCT for developmental biology: a versatile tool for high-contrast 3D imaging at histological resolutions. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 238(3), 632–40. <http://doi.org/10.1002/dvdy.21857>
- Moradi, F., Bahktiari, M., Joghataei, M. T., Nobakht, M., Soleimani, M., Hasanzadeh, G., ... Maleki, F. (2012). BD PuraMatrix peptide hydrogel as a culture system for human fetal Schwann cells in spinal cord regeneration. *Journal of Neuroscience Research*, 90(12), 2335–48. <http://doi.org/10.1002/jnr.23120>
- Mosesson, M. W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH*, 3(8), 1894–904. <http://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01365.x>
- Narmoneva, D. A., Oni, O., Sieminski, A. L., Zhang, S., Gertler, J. P., Kamm, R. D., & Lee, R. T. (2005). Self-assembling short oligopeptides and the promotion of angiogenesis. *Biomaterials*, 26(23), 4837–46. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.005>

- Nazarov, R., Jin, H.-J., & Kaplan, D. L. (2004). Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules*, 5(3), 718–26. <http://doi.org/10.1021/bm034327e>
- Nuttelman, C. R., Mortisen, D. J., Henry, S. M., & Anseth, K. S. (2001). Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 57(2), 217–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11484184>
- Orive, G., Hernández, R. M., Gascón, A. R., & Pedraz, J. L. (2006). Encapsulation of Cells in Alginate Gels. In *Immobilization of Enzymes and Cells Methods in Biotechnology* (pp. 345–355). http://doi.org/10.1007/978-1-59745-053-9_30
- Ortinau, S., Schmich, J., Block, S., Liedmann, A., Jonas, L., Weiss, D. G., ... Frech, M. J. (2010). Effect of 3D-scaffold formation on differentiation and survival in human neural progenitor cells. *Biomedical Engineering Online*, 9, 70. <http://doi.org/10.1186/1475-925X-9-70>
- Panilaitis, B., Altman, G. H., Chen, J., Jin, H. J., Karageorgiou, V., & Kaplan, D. L. (2003). Macrophage responses to silk. *Biomaterials*, 24(18), 3079–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12895580>
- Park, J., & Lakes, R. (2007). *Biomaterials*. New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-37880-0>
- Pasqui, D., De Cagna, M., & Barbucci, R. (2012). Polysaccharide-Based Hydrogels: The Key Role of Water in Affecting Mechanical Properties. *Polymers*, 4(4), 1517–1534. <http://doi.org/10.3390/polym4031517>
- Pescosolido, L., Schuurman, W., Malda, J., Matricardi, P., Alhaique, F., Coviello, T., ... Vermonden, T. (2011). Hyaluronic acid and dextran-based semi-IPN hydrogels as biomaterials for bioprinting. *Biomacromolecules*, 12(5), 1831–8. <http://doi.org/10.1021/bm200178w>
- Pierschbacher, M. D., & Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309(5963), 30–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6325925>
- Plant, A. L., Bhadriraju, K., Spurlin, T. A., & Elliott, J. T. (2009). Cell response to matrix mechanics: focus on collagen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(5), 893–902. <http://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.012>
- Pu, Y. J., Vaid, R. K., Boini, S. K., Towsley, R. W., Doecke, C. W., & Mitchell, D. (2009). A Practical Method for Functionalized Peptide or Amide Bond Formation in Aqueous–Ethanol Media with EDC as Activator †. *Organic Process Research & Development*, 13(2), 310–314. <http://doi.org/10.1021/op800240d>
- Purpura, K. A., Bratt-Leal, A. M., Hammersmith, K. A., McDevitt, T. C., & Zandstra, P. W. (2012). Systematic engineering of 3D pluripotent stem cell niches to guide blood development. *Biomaterials*, 33(5), 1271–80. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.051>

- Rafiq, Q. A., Brosnan, K. M., Coopman, K., Nienow, A. W., & Hewitt, C. J. (2013). Culture of human mesenchymal stem cells on microcarriers in a 5 l stirred-tank bioreactor. *Biotechnology Letters*, 35(8), 1233–45. <http://doi.org/10.1007/s10529-013-1211-9>
- Rapoport, D., Voigt, M., & Feldhoff, C. (2013). Verfahren zur Kultivierung von Zellen in Adhäsionskultur unter Verwendung eines Zellkultur-Trägers in Kapselform, sowie Zellkultur-Träger dafür.
- Rapoport, D., Voigt, M., & Walter, C. (2015). Röntgenmikroskopie zur Untersuchung von Zellkulturen, Organismen und Geweben. Retrieved September 4, 2015, from <http://www.laborundmore.com/news/218176/Roentgenmikroskopie-zur-Untersuchung-von-Zellkulturen,-Organismen-und-Geweben.html>
- Rees, D. A., & Welsh, E. J. (1977). Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 16(4), 214–224. <http://doi.org/10.1002/anie.197702141>
- Rimann, M., Angres, B., Patocchi-Tenzer, I., Braum, S., & Graf-Hausner, U. (2014). Automation of 3D cell culture using chemically defined hydrogels. *Journal of Laboratory Automation*, 19(2), 191–7. <http://doi.org/10.1177/2211068213508651>
- Rimann, M., & Graf-Hausner, U. (2012). Synthetic 3D multicellular systems for drug development. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(5), 803–9. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.01.011>
- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., & Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 87(1), 125–8. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.007>
- Rosas, M. N. C. (2011). *Polypeptide based carriers for adherently growing cells*.
- Rowley J, Abraham E, Campbell A, Brandwein H, O. S. (2012). Meeting lot-size challenges of manufacturing adherent cells for therapy. *BioProcess International*.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., & Mooney, D. J. (1999). Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20(1), 45–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916770>
- Rowley, J. A., & Mooney, D. J. (2002). Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(2), 217–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11857427>
- Runstadler, P. W., Tung, A. S., Hayman, E. G., Ray, N. G., Sample, J. G., & DeLucia, D. E. (1990). Continuous culture with macroporous matrix, fluidized bed systems. *Bioprocess Technology*, 10, 363–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1367065>
- Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 697–715. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>

- Sahni, A., & Francis, C. W. (2000). Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood*, *96*(12), 3772–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090059>
- Salthouse, T. N. (1980). Biologic response to sutures. *Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, *88*(6), 658–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7010269>
- Santin, M., Motta, A., Freddi, G., & Cannas, M. (1999). In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *Journal of Biomedical Materials Research*, *46*(3), 382–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10397996>
- Sardonini, C. A., & Wu, Y. J. (n.d.). Expansion and differentiation of human hematopoietic cells from static cultures through small-scale bioreactors. *Biotechnology Progress*, *9*(2), 131–7. <http://doi.org/10.1021/bp00020a600>
- Schmitz, S. (2007). *Der Experimentator Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Shaikh, F. M., Callanan, A., Kavanagh, E. G., Burke, P. E., Grace, P. A., & McGloughlin, T. M. (2008). Fibrin: a natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells, Tissues, Organs*, *188*(4), 333–46. <http://doi.org/10.1159/000139772>
- Shapiro, L., & Cohen, S. (1997). Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials*, *18*(8), 583–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134157>
- Shoichet, M. S., Li, R. H., White, M. L., & Winn, S. R. (1996). Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnology and Bioengineering*, *50*(4), 374–81. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960520\)50:4<374::AID-BIT4>3.0.CO;2-I](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960520)50:4<374::AID-BIT4>3.0.CO;2-I)
- Shuguang Zhang, Rutledge Ellis-Behnke, Xiaojun Zhao, L. S. (2005). PuraMatrix: Self-assembling Peptide Nanofiber Scaffolds. In *Scaffolding in Tissue Engineering*.
- Sieminski, A. L., Semino, C. E., Gong, H., & Kamm, R. D. (2008). Primary sequence of ionic self-assembling peptide gels affects endothelial cell adhesion and capillary morphogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *87*(2), 494–504. <http://doi.org/10.1002/jbm.a.31785>
- Sittinger, M., Lukanoff, B., Burmester, G. R., & Dautzenberg, H. (1996). Encapsulation of artificial tissues in polyelectrolyte complexes: preliminary studies. *Biomaterials*, *17*(10), 1049–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8736742>
- Smetana, K. (1993). Cell biology of hydrogels. *Biomaterials*, *14*(14), 1046–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8312457>
- Smidsrød, O. (1974). Molecular basis for some physical properties of alginates in the gel state. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, *57*, 263. <http://doi.org/10.1039/dc9745700263>

- Smidsrod, O., & Skjak-Braek, G. (1990). Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71–78. [http://doi.org/10.1016/0167-7799\(90\)90139-O](http://doi.org/10.1016/0167-7799(90)90139-O)
- Thonhoff, J. R., Lou, D. I., Jordan, P. M., Zhao, X., & Wu, P. (2008). Compatibility of human fetal neural stem cells with hydrogel biomaterials in vitro. *Brain Research*, 1187, 42–51. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.046>
- Toma, J. G., McKenzie, I. A., Bagli, D., & Miller, F. D. (2005). Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(6), 727–37. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0134>
- Tomihata, K. (1997). Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. *Biomaterials*, 18(3), 189–195. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00116-0](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00116-0)
- Wang, X., Kluge, J. A., Leisk, G. G., & Kaplan, D. L. (2008). Sonication-induced gelation of silk fibroin for cell encapsulation. *Biomaterials*, 29(8), 1054–64. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.11.003>
- Want, A. J., Nienow, A. W., Hewitt, C. J., & Coopman, K. (2012). Large-scale expansion and exploitation of pluripotent stem cells for regenerative medicine purposes: beyond the T flask. *Regenerative Medicine*, 7(1), 71–84. <http://doi.org/10.2217/rme.11.101>
- Yan, S., Zhao, C., Wu, X., Zhang, Q., & Li, M. (2010). Gelation behavior of Antheraea pernyi silk fibroin. *Science China Chemistry*, 53(3), 535–541. <http://doi.org/10.1007/s11426-010-0093-0>
- Yang, H., & Jr., J. R. W. (1999). Calcium alginate. In *Cell Encapsulation Technology and Therapeutics* (pp. 79–89).
- Zeilinger, K., Schreiter, T., Darnell, M., Söderdahl, T., Lübberstedt, M., Dillner, B., ... Andersson, T. B. (2011). Scaling down of a clinical three-dimensional perfusion multicompartiment hollow fiber liver bioreactor developed for extracorporeal liver support to an analytical scale device useful for hepatic pharmacological in vitro studies. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 17(5), 549–56. <http://doi.org/10.1089/ten.TEC.2010.0580>
- Zhang, F., Zuo, B. Q., Zhang, H. X., & Bai, L. (2009). Studies of electrospun regenerated SF/TSF nanofibers. *Polymer*, 50(1), 279–285. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.10.053>
- Zorlutuna, P., Tezcaner, A., & Hasirci, V. (2008). A novel construct as a cell carrier for tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 19(3), 399–410. <http://doi.org/10.1163/156856208783720976>

9. Anhang

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung der Zelldichte adhärent wachsender Zellen.	3
Abbildung 2: Zyklischer kapsel-basierter Bioreaktor zur Kultivierung adhärent wachsender Zellen in Hydrogelen.	5
Abbildung 3: Erste Kultivierung von Zellen <i>in vitro</i>	7
Abbildung 4: Struktur eines Hydrogels.	10
Abbildung 5: Entwicklung eines Seiden-Hydrogels aus Fibroin-Molekülen.	12
Abbildung 6: Gelierung von Alginaten durch Einlagerung von zweiwertigen Kationen.	13
Abbildung 7: Herstellung von Hohl- und Vollkapseln aus Alginat und Calcium.	14
Abbildung 8: Kupplungsreaktion von Alginat und Gelatine mit Hilfe von Carbodiimid und sulfo-NHS.	15
Abbildung 9: Kupplungsreaktion von Alginat und Gelatine mit Hilfe von Carbodiimid und HOBt.	16
Abbildung 10: Dextranbasiertes Hydrogel der Firma Cellendes.	18
Abbildung 11: Umsetzung von Glucose und Lactat mittels Glucose- und Lactat-Oxidase.	32
Abbildung 12: TNBS-Assay zur Detektion primärer Amine.	52
Abbildung 13: Kultivierung von PSCs, die in Fibrinkapseln kultiviert wurden.	58
Abbildung 14: Dünnschnitte der Van Gieson-Färbung der Fibrinkapseln mit und ohne PSCs.	59
Abbildung 15: PSCs in Gelen aus Seide und Fibrin.	60
Abbildung 16: Veränderte Genexpression von Zellen, die auf Fibrin-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden.	61
Abbildung 17: Vitalitätsuntersuchung der in Medium mit Seiden-Zugabe kultivierten PSCs.	62
Abbildung 18: Zustandsdiagramm der Mischgele aus Seide und Glycerin bzw. Gelatine.	63
Abbildung 19: PSCs in ausgewählten Seidengelen an den Tagen null bzw. eins und drei.	65
Abbildung 20: PSCs als Aggregate im Seidengel Nr. 60.	66
Abbildung 21: Zeitraffer-Aufnahmen von PSCs in Seidengelen.	67
Abbildung 22: Veränderte Genexpression von Zellen, die auf Seiden-beschichteten Oberflächen kultiviert wurden.	68
Abbildung 23: Far Red-gefärbte Seidenvliese.	69

Anhang

Abbildung 24: Kultivierung von PSCs auf Seidenvliesen (<i>A. pernyi</i>).....	70
Abbildung 25: Kultivierung von PSCs auf Seidenvliesen (<i>A. pernyi</i>) in einem Hydrogel (<i>B. mori</i>).....	71
Abbildung 26: Gazefilter als Inokulationshilfe.....	72
Abbildung 27: a) Schematische Darstellung der Besiedlung der Seidenvliese mit PSCs. b) Zellzahlentwicklung 24 h nach der Besiedlung mit Hilfe der Gazefilter.....	72
Abbildung 28: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Seiden-beschichteten Oberflächen (<i>A. pernyi</i>).....	73
Abbildung 29: Vitalitätsuntersuchung von PSCs, die in 10 % DMEM mit und ohne Calcium kultiviert wurden.....	74
Abbildung 30: Kultivierung der PSCs in Medium mit und ohne Calcium-Zugabe.....	76
Abbildung 31: PSCs auf 2D-Gelschichten aus Alginat.....	76
Abbildung 32: Vitalitätsuntersuchungen von PSCs auf Gelatine-Hydrolysat-Beschichtungen bzw. mit Gelatine-Hydrolysat-Zugabe.....	77
Abbildung 33: a) Alginat-Hohlkapseln ohne und b) Alginat/Gelatine-Hohlkapseln mit PSCs.....	78
Abbildung 34: a) Alginat-Vollkapsel ohne und b) Alginat/Gelatine-Vollkapseln mit PSCs.....	79
Abbildung 35: Stoffwechselaktivität von PSCs in Alginat/Gelatine-VK.....	80
Abbildung 36: FDA/PI-Färbung von PSCs in Alginat-VK-Kultur.....	81
Abbildung 37: PSCs in 3D-VK und auf 2D-Gelschichten aus modifiziertem Alginat (vgl. Tabelle 14, 15 (1)-(5)).....	85
Abbildung 38: Vergleich der Geleigenschaften modifizierter Alginate unter Verwendung von sulfo-NHS oder HOBt.....	85
Abbildung 39: Zellzahlentwicklung von PSCs, die mit modifizierten Alginat kultiviert wurden.....	86
Abbildung 40: PSCs auf 2D-Gelschichten aus modifiziertem Alginat, welches mit unterschiedlichen Dialysemembranen gereinigt wurde.....	87
Abbildung 41: PSCs auf 2D-Gelen aus modifiziertem Alginat.....	87
Abbildung 42: PSCs auf 2D-Alginatgelen, die mit FKS bzw. FKS und Gelatine modifiziert wurden.....	88
Abbildung 43: FDA/HOECHST-Färbung der PSCs auf modifizierten 2D-Gelen.....	89
Abbildung 44: FDA/PI-Färbung der PSCs in modifizierten Alginathohlkapseln.....	90

Anhang

Abbildung 45: Zellzahlentwicklung und Stoffwechselaktivität von PSCs, die auf Beschichtungen aus modifiziertem Alginat kultiviert wurden.	91
Abbildung 46: NMR-Spektren von Alginat (grün), modifiziertem Alginat (rot) und Gelatine (blau).....	92
Abbildung 47: Chromatogramme der SEC-Messung der Edukte a) Alginat (low MW) und b) Gelatine-Hydrolysat (Solugel 5000).....	93
Abbildung 48: Chromatogramm der modifizierten Alginat bei 214 nm.	93
Abbildung 49: Ergebnis des TNBS-Assays zur Überprüfung der Kupplungsreaktion.	94
Abbildung 50: Zellen, die mit oder ohne Polyamid-Zugabe kultiviert wurden an Tag vier. ...	95
Abbildung 51: Stoffwechselaktivität von PSCs, die mit (rot) und ohne (blau) PA2200-Zugabe kultiviert wurden.	96
Abbildung 52: PSCs auf modifiziertem Alginat mit/ohne PA-Zugabe.....	97
Abbildung 53: Kultivierung von PSCs auf 2D-Schichten aus Alginat/PolyDADMAC-Gelen an Tag eins.	98
Abbildung 54: PSCs auf 2D-Novatach-Gelen.	99
Abbildung 55: PSCs in Novatach-Hohlkapseln.	100
Abbildung 56: Zellzahlentwicklung und Stoffwechselaktivität von PSCs in Novatach-HK.	101
Abbildung 57:Kryoschnitte von PSCs in Novatach-Hohlkapseln mit bzw. ohne Calciumchlorid-Zugabe.	102
Abbildung 58: PSCs in Novatach-Vollkapseln.	104
Abbildung 59: Degradierung einer Novatach-Vollkapsel mit PSCs nach zwei Tagen in Kultur.	105
Abbildung 60: PSCs wieder ausgesät nach zwei Tagen in Novatach-Vollkapsel-Kultur.	106
Abbildung 61: PSCs in PM-Hydrogelen an den Tagen 3 und 7.	107
Abbildung 62: Stoffwechselaktivität von PSCs in PM-Hydrogelen.	108
Abbildung 63: Kryoschnitte von PM-Gelen mit und ohne Zellen.	108
Abbildung 64: PSCs in PM/Alginat-Gelen nach zwei verschiedenen Methoden an Tag eins.	109
Abbildung 65: PSCs in PM/Alginat-Hohlkapseln an Tag eins.	110
Abbildung 66: PSCs in Dextran-CD-Gelen mit und ohne RGD-Peptid modifiziert.	111
Abbildung 67: Auflösung einer Dextran-CD-Kapsel mit Hilfe des Enzyms Dextranase.	112
Abbildung 68:Kryoschnitte von PSCs in Dextran-CD-Gelen inkl. RGD-Peptiden.....	113
Abbildung 69:FDA/HOECHST-gefärbte PSCs in Dextran-CD-Gelen.	114

Anhang

Abbildung 70: Zellzahlentwicklung und Stoffwechselaktivität von PSCs in Dextran-CD-Gelen.....	115
Abbildung 71: PSCs in Dextran-CD-Gelen mit unterschiedlichen Adhäsionsmotiven.	117
Abbildung 72: Stoffwechselaktivität von PSCs in Dextran-CD-Gelen mit unterschiedlichen Adhäsionspeptiden.	117
Abbildung 73: PSCs auf 2D- Dextran-CD-Gelen mit unterschiedlichen Adhäsionsmotiven.	118
Abbildung 74: Röntgenmikroskopische Darstellung von Zellen in einem Dextran-Hydrogel.	119
Abbildung 75: Reaktionsgefäße (2) und Schwimmkörper (1) für die Dextran-CD-Gele im Reaktor.....	120
Abbildung 76: Übersichtansicht (a)) und Seitenansichten des vollautomatisierten Reaktors (b), c), d))	120
Abbildung 77: Zellzahlentwicklung der Zellen in den Dextran-CD-Kapseln im Reaktor.	121
Abbildung 78: FDA/HOECHST-Färbung der Zellen in den Dextran-CD-Kapseln im Reaktor. Dargestellt sind die Zellen an Tag null und sieben in der statischen Kontrolle und im Reaktor. Maßstab = 200 µm.....	122
Abbildung 79: Zellzahlentwicklung von PSCs, welche auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen kultiviert wurden.....	XI
Abbildung 80: Laktatproduktion von PSCs, welche auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen kultiviert wurden.....	XII
Abbildung 81: Glukoseverbrauch von PSCs, welche auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen kultiviert wurden.....	XIII
Abbildung 82: PSCs auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen an Tag eins.....	XIV

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassende Tabelle der positiven (✓) und negativen (✗) Eigenschaften der untersuchten Gelmaterialien.	2
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien.	22
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmittel.	24
Tabelle 4: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 5: Verwendete Software.....	25
Tabelle 6: Verwendete Gelatine-Arten.....	36

Anhang

Tabelle 7: Verwendung verschiedener Edukte und Kupplungsreagenzien für die kovalente Verknüpfung von Alginat und Gelatine.	38
Tabelle 8: Eduktverhältnisse zur kovalenten Verknüpfung von Alginat und Gelatine.	38
Tabelle 9: Vorbereitung der einzelnen Komponenten zur Herstellung des dextranbasierten Hydrogelsystems.	45
Tabelle 10: Mastermix zur Herstellung eines dextran-basierten Hydrogels.	46
Tabelle 11: Van Gieson Färbeprotokoll.	48
Tabelle 12: Verwendete Proben für den TNBS-Assay.	52
Tabelle 13: Exemplarische Auswahl der Versuchsansätze 1-11 und deren Zusammensetzungen.	82
Tabelle 14: Verhältnisse der eingesetzten Edukte und Kupplungsreagenzien der Versuchsansätze 1-11.	83
Tabelle 15: Konzentrationen und Absorption der Proben des TNBS-Assays.	94
Tabelle 16: Optimale Versuchsbedingungen für die chemische Kupplung von Alginat mit Gelatine.	129
Tabelle 17: Optimale Verhältnisse der Edukte für die chemische Kupplung von Alginat mit Gelatine.	129
Tabelle 18: Zusammenfassende Tabelle der positiven (✓) und negativen (✗) Eigenschaften der untersuchten Gelmaterialien.	134
Tabelle 19: Abkürzungsverzeichnis.	V
Tabelle 20: Übersicht der verschiedenen Konzentrationen an Seide, Gelatine und Glycerin in den Seidengelen.	XV

9.3. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 19: Abkürzungsverzeichnis.

Abkürzung	
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
A. dest.	<i>Aqua destillata</i> (Destilliertes Wasser)
Ala (A)	Alanin
APE 1	Apurine/Apyrimidine Endonuclease 1
Arg (R)	Arginin
Asp (D)	Asparaginsäure
CD	<i>Cell degradable</i> (Zelldegradierbar)
CL	<i>Crosslinker</i> (Vernetzer)

Anhang

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDC·HCl	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESC	<i>Embryonic stem cell</i> (Embryonale Stammzelle)
Et al.	<i>Et altera</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Fluorescindiacetat
FKS	Fetales Kälberserum
GF	Glaskugelgefüllt
Gly (G)	Glycin
GS	Guluronsäure
HK	Hohlkapseln
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Lys (K)	Lysin
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MMP	Matrixmetalloprotease
MS	Mannuronsäure
MW	<i>Molecular weight</i> (Molekulargewicht)
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanzspektroskopie
OD	Optische Dichte
PA	Polyamid
PBS	Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PM	Puramatrix
PolyDADMAC	Polydiallyldimethylammoinchlorid
Pro (P)	Prolin
PSC	<i>Pancreatic stem cell</i> (Pankreas Stammzellen)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Gel-Permeations-Chromatographie)
Ser (S)	Serin
SR	Schlaufenreaktor
SSC	Skin-derived stem cell (Hautabgeleitete Stammzelle)
STR	<i>Stirred tank reactor</i> (Rührkesselreaktor)
Sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
TdT	Deoxyribonukleotidyltransferase
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
tpol	Polymerisierungszeit

Anhang

UDG	Uracil DNA Glykosilase
Val (V)	Valin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Endothelwachstumsfaktor)
VK	Vollkapseln
X-Ray-Mikroskopie	Röntgenmikroskopie

9.4. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 26.04.2016

9.5. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Poster

Feldhoff, S. C., Rapoport, D. H. (2013). Encapsulation of anchorage-dependent cells in degradable hydrogels. *World conference on regenerative medicine*. Leipzig.

Feldhoff, S. C., Voigt, M., Rapoport, D. H. (2014). Kapsel-basierte Bioreaktoren für die Vermehrung adhärent wachsender Zellen. *5. Kongress Industrielle Zelltechnik*. Lübeck.

Feldhoff, S. C., Voigt, M., Rapoport, D. H. (2015). Kapsel-basierte Bioreaktoren für die Vermehrung adhärent wachsender Zellen. *6th Annual Meeting Industrial Cell Technology*. Lübeck.

Patent

Rapoport, D. H., Voigt, M., Feldhoff, S. C., (2013). Verfahren zur Kultivierung von Zellen in Adhäsionskultur unter Verwendung eines Zellkultur-Trägers in Kapselform, sowie Zellkultur-Träger dafür. 10 2013 018 242.5.

Veröffentlichungen

Voigt, M., Walter, S. C., Rapoport, D. H., (2015). Röntgenmikroskopie zur Untersuchung von Zellkulturen, Organismen und Geweben. Die gläserne Zelle. *Labor und More*.

9.6. Masterurkunde



SANDRA CHARLOTTE FELDHOFF

MASTER OF SCIENCE (M.SC.)

CHEMIE

Die Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg verleiht

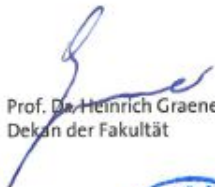
Frau Sandra Charlotte Feldhoff
geboren am 24.06.1986 in Bad Oldesloe

aufgrund der am 17.11.2011 bestandenen
wissenschaftlichen Gesamtprüfung,
die mit der Gesamtnote „gut“ bewertet
wird, den akademischen Grad

Master of Science

Zum Zeugnis dessen wird diese mit dem
Siegel der Universität versehen und von
dem Dekan der Fakultät unterzeichnete
Urkunde ausgestellt.

Hamburg, den 05.12.2011


Prof. Dr. Heinrich Graener
Dekan der Fakultät



9.7. Zusätzliche Abbildungen und Tabellen

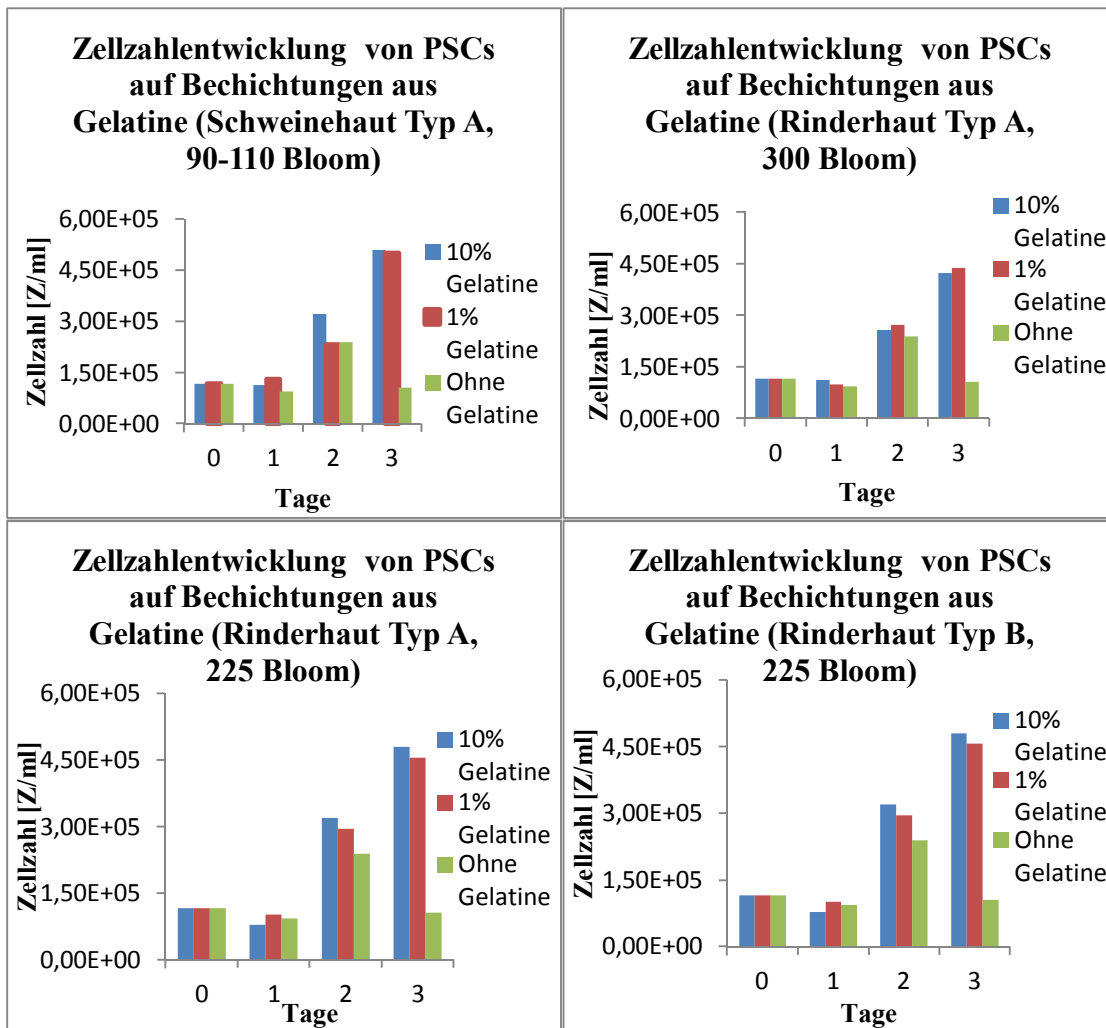


Abbildung 79: Zellzahlentwicklung von PSCs, welche auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen kultiviert wurden. Dargestellt ist die Zellzahlentwicklung von PSCs auf einer Beschichtung aus 10 % Gelatine (blau), 1 % Gelatine (rot) und der Kontrolle ohne Beschichtung (grün) (n = 1).

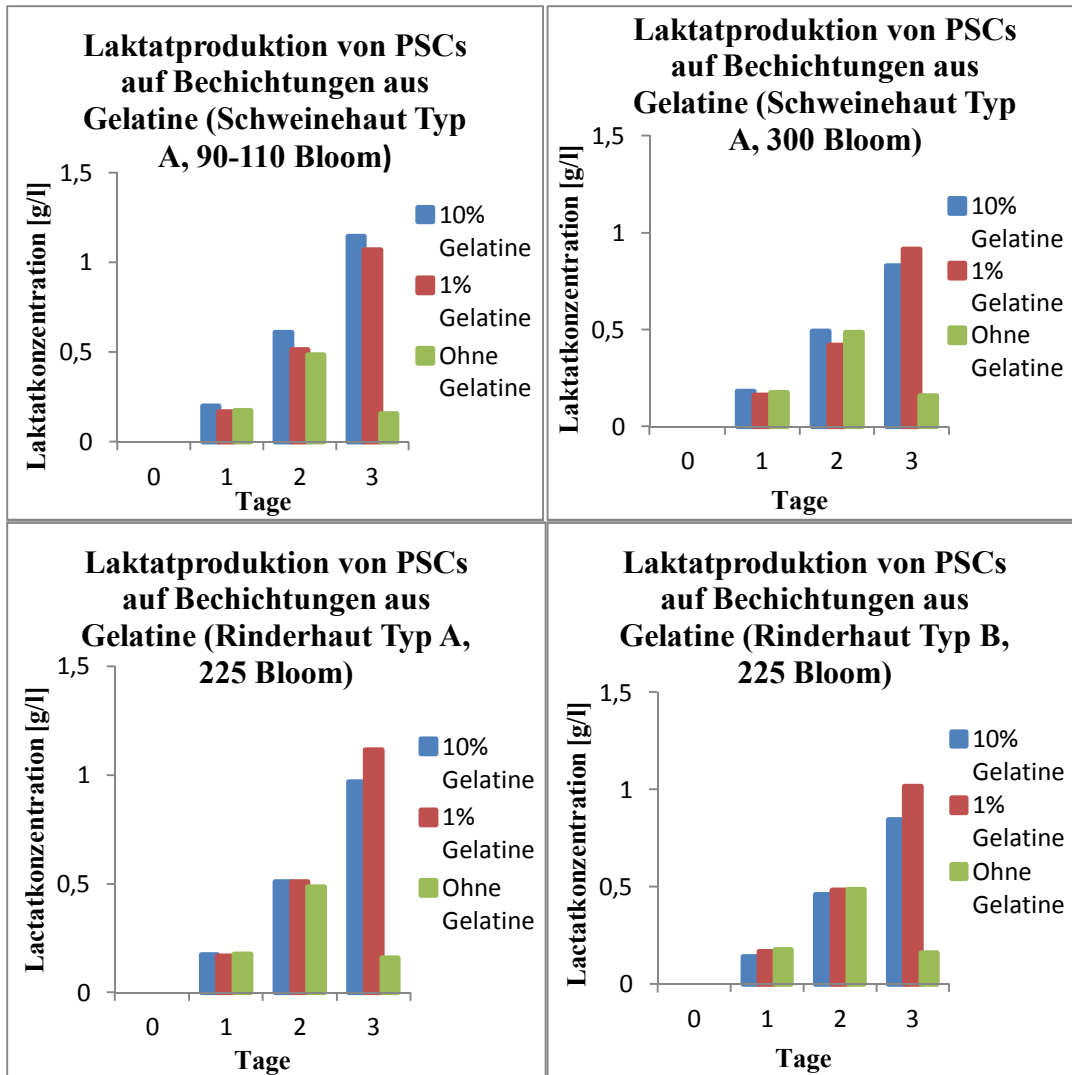


Abbildung 80: Laktatproduktion von PSCs, welche auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen kultiviert wurden. Dargestellt ist die Laktatproduktion von PSCs auf einer Beschichtung aus 10 % Gelatine (blau), 1 % Gelatine (rot) und der Kontrolle ohne Beschichtung (grün) (n = 1).

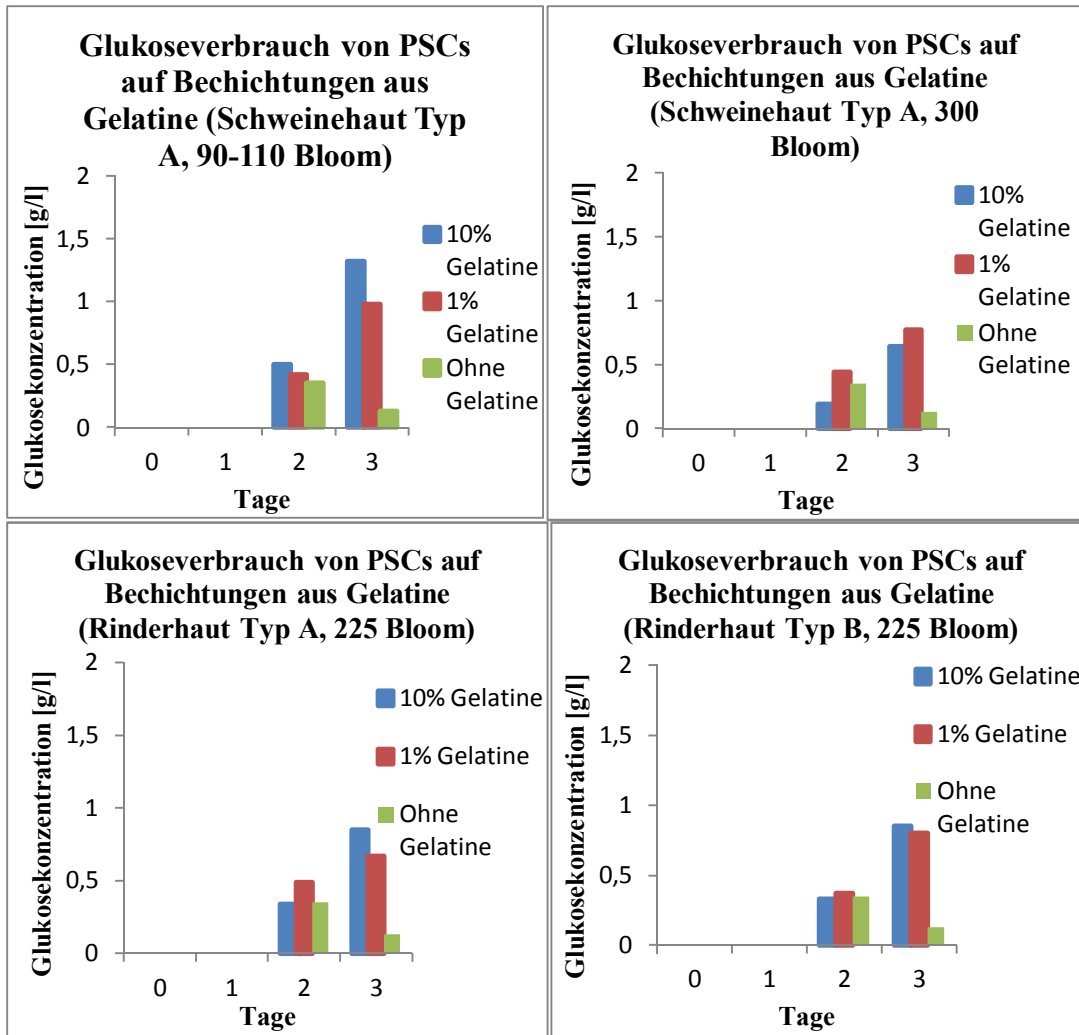


Abbildung 81: Glukoseverbrauch von PSCs, welche auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen kultiviert wurden. Dargestellt ist der Glukoseverbrauch von PSCs auf einer Beschichtung aus 10 % Gelatine (blau), 1 % Gelatine (rot) und der Kontrolle ohne Beschichtung (grün) (n = 1).

Anhang

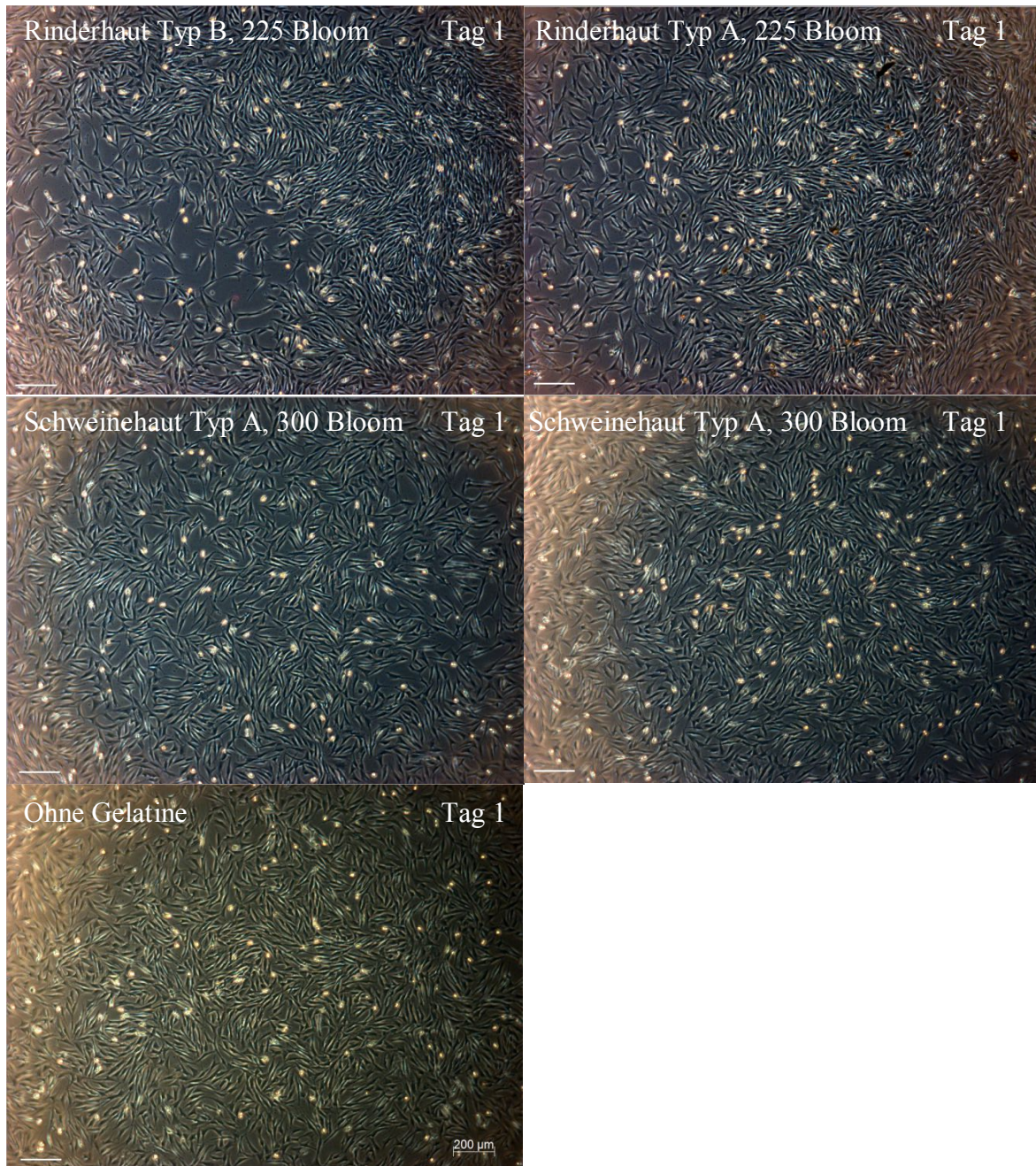


Abbildung 82: PSCs auf verschiedenen Gelatine-Beschichtungen an Tag eins. Dargestellt ist das Zellwachstum auf Beschichtungen aus 10 % Gelatine. Maßstab = 200 µm.

Anhang

Tabelle 20: Übersicht der verschiedenen Konzentrationen an Seide, Gelatine und Glycerin in den Seidengelen.

Versuchsnummer	Seide [%]	Gelatine [%]	Glycerin [%]	Gelierungszeit [h:min]	Stabilität in 10 % DMEM über min. 7 Tage
1	0,6	1	8	-	Nein
2	1	1	8	01:57	Nein
3	1,4	1	8	00:22	Ja
4	1,8	1	8	00:32	Ja
5	0,6	1	18	-	Nein
6	1	1	18	00:23	Ja
7	1,4	1	18	00:19	Ja
8	1,8	1	18	00:11	Ja
9	0,6	1	28	00:26	Nein
10	1	1	28	00:08	Nein
11	1,4	1	28	00:16	Ja
12	1,8	1	28	00:09	Ja
13	0,6	2	8	00:36	Nein
14	1	2	8	01:52	Ja
15	1,4	2	8	-	Ja
16	1,8	2	8	00:47	Nein
17	0,6	2	18	00:52	Nein
18	1	2	18	00:17	Ja
19	1,4	2	18	00:24	Ja
20	1,8	2	18	00:22	Ja
21	0,6	2	28	00:19	Ja
22	1	2	28	00:14	Ja
23	1,4	2	28	00:21	Ja
24	0,6	3	8	-	Nein
25	1	3	8	01:42	Nein
26	1,4	3	8	01:34	Ja
27	1,8	3	8	-	Nein
28	0,6	3	18	00:27	Ja
29	1	3	18	00:24	Ja
30	1,4	3	18	00:34	Ja
31	0,6	3	28	00:15	Nein
32	1	3	28	00:17	Ja
33	0,6	4	8	-	Nein
34	1	4	8	-	Nein
35	1,4	4	8	01:47	Ja
36	0	4	18	01:05	Nein
37	1	4	18	-	Nein
38	0,6	4	28	00:22	Nein

Anhang

39	0,6	1	13	-	Nein
40	1	1	13	-	Nein
41	1,4	1	13	-	Ja
42	1,8	1	13	00:43	Ja
43	0,6	1	23	-	Nein
44	1	1	23	00:42	Nein
45	1,4	1	23	00:26	Ja
46	1,8	1	23	00:26	Ja
47	0,6	4	13	00:44	Nein
48	1	4	13	00:44	Nein
49	1,4	4	13	01:26	Ja
50	0,6	2	13	-	Nein
51	1	2	13	00:44	Nein
52	1,4	2	13	01:13	Nein
53	1,8	2	13	00:39	Ja
54	0,6	2	23	-	Nein
55	1	2	23	00:20	Ja
56	1,4	2	23	00:36	Ja
57	0,6	4	23	00:32	Nein
58	1	4	23	00:39	Ja
59	0,6	3	13	00:48	Nein
60	1	3	13	00:37	Nein
61	1,4	3	13	00:55	Ja
62	0,6	3	23	00:32	Nein
63	1	3	23	-	Ja
64	1,4	3	23	00:16	Ja
65	0,8	2	8	n.b.	Nein
66	0,8	3	13	n.b.	Ja
67	0,9	1	8	n.b.	Ja
68	0,9	1	18	n.b.	Ja
69	1,9	1	28	n.b.	Nein
70	0,9	2	8	n.b.	Ja
71	0,9	2	18	n.b.	Nein
72	0,9	2	28	n.b.	Ja
73	0,9	3	8	n.b.	Ja
74	0,9	3	18	n.b.	Ja
75	0,9	3	28	n.b.	Nein
76	0,9	4	8	n.b.	Nein
77	0,9	4	18	n.b.	Nein
78	0,9	4	28	n.b.	Nein
79	0,94	3	28	00:09	Ja
80	0,94	4	8	00:39	Ja
81	0,94	4	18	00:09	Ja

Anhang

82	0,94	4	28	00:06	Ja
83	0,96	1	8	00:11	Nein
84	0,96	1	18	00:27	Ja
85	0,96	1	28	00:06	Ja
86	0,96	2	8	00:21	Ja
87	0,96	2	18	00:18	Ja
88	0,96	2	28	00:07	Ja
89	0,96	3	8	00:11	Ja
90	0,96	3	18	00:08	Ja
91	0,96	3	28	00:05	Ja
92	0,96	4	8	00:13	Ja
93	0,96	4	18	00:13	Ja
94	0,96	4	28	00:19	Nein
95	0,98	1	8	00:15	Ja
96	0,98	1	18	00:11	Ja
97	0,98	1	28	00:09	Nein
98	0,98	2	8	00:11	Ja
99	0,98	2	18	00:23	Nein
100	0,98	2	28	00:05	Ja
101	0,98	3	8	00:17	Ja
102	0,98	3	18	00:08	Ja
103	0,98	3	28	00:05	Ja
104	0,98	4	8	00:19	Ja
105	0,98	4	18	00:11	Ja
106	0,98	4	28	00:12	Ja

n.b.: nicht bestimmt; -: nicht fest geworden

9.8. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Charli Kruse dafür bedanken, dass ich in der Fraunhofer EMB meine Dissertation anfertigen durfte.

Prof. Jens Habermann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Prof. Jürgen Rohwedel danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Dr. Daniel Rapoport danke ich für die Betreuung, die anregenden Gespräche, die tolle Unterstützung und sein Verständnis.

Dr. Andrej-Nikolai Spiess (Abteilung für Andrologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) danke ich für die Normalisierung der Genomchip-Daten.

Dr. Karsten Seeger (Institut für Chemie, Universität Lübeck) danke ich für die Aufnahmen der NMR- und SEC-Daten.

Vielen Dank an Dr. Rudolf Hünert (Institut für Raster-Elektronenmikroskopie, Hamburg) für die Aufnahmen der REM-Aufnahmen.

Dem gesamten Team der Fraunhofer EMB, besonders den Techies und den Diffis, danke ich für das tolle Arbeitsklima, die zahlreichen Unterstützungen, die Hilfe von so vielen einzelnen und die schönen Pausen zwischen den Arbeitszeiten.

Ein besonderer Dank geht an Kerstin Wendt für die Unterstützung bei den Fibrin-Färbungen und an Carolin Wienke für die Hilfe bei den LSM-Aufnahmen, an Miriam Voigt für das Anlernen und die Unterstützung bei zahlreichen Versuchen, wie zum Beispiel im Bereich der Reaktorführung. Stephanie Frahm danke ich für die Vorbereitung der Genomchipdaten und Hilfe bei dessen Auswertung und das Korrekturlesen.

Anhang

Mein letzter und wichtigster Dank geht an meine wunderbare Familie und meine Freunde, allen voran Justus: Ich danke dir aus tiefstem Herzen, wie du in dieser besonderen und aufregenden Zeit für mich da warst und mich so oft wieder aufgebaut und ermutigst hast, wenn es mal wieder nicht so lief wie geplant. Du bist mein Fels.