

Screening neuer Gerüstmaterialien
und ihrer Modifikationen für den Einsatz im
Tissue Engineering peripherer Nerven

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Pharm. Stephanie Bruns
geboren am 16.09.1980 in Hannover

2007

Referent: Prof. Dr. T. Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 21.11.2007

Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie die ggf. zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im November 2007

In der ganzen Natur ist kein Lehrplatz, lauter Meisterstücke.

Johann Peter Hebel (1760 – 1826), dt. Schriftsteller

Meinem Vater
in liebevoller und dankbarer Erinnerung

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper für die Bereitstellung des interessanten Themas und die außerordentlich menschliche Art, mit der er seinen Arbeitskreis leitet. Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Weiterhin geht mein Dank an die Deutsche Forschungsgemeinschaft, die die durchgeführten wissenschaftlichen Arbeiten im Rahmen der Forschungsgruppe „Polysialinsäure – Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifizierlicher Gewebe“ finanziell unterstützt hat. Ausdrücklich möchte ich mich in diesem Zuge auch bei der Forschungsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Rita Gerardy-Schahn (Zelluläre Chemie, Medizinischen Hochschule Hannover) für diese schöne Chance bedanken, erste wissenschaftliche Schritte und Erfahrungen in einem interdisziplinären Umfeld machen zu können. Frau Prof. Dr. Grothe (Neuroanatomie, Medizinischen Hochschule Hannover) sowie allen Doktoranden der Partnerinstitute in diesem Projekt danke ich für den regen fachlichen Austausch und den Einblick in fremde Wissens- und Forschungsbereiche.

Bei der Firma Suwelack Skin & Health Care AG möchte ich mich für die Bereitstellung der Kollagenmatrizes und die sehr gute Zusammenarbeit, die keine (Material-)Wünsche offen lies, bedanken. Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Vogt von der Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover für die großzügige Bereitstellung der Spinnenseide und des Kryotoms. Herrn Dr. Shlieout der Solvay Pharmaceuticals GmbH in Hannover danke ich für die Möglichkeit, die mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide bestimmen zu können. Für die Zugmessungen an den Kollagenmatrizes danke ich Prof. Dr. Martijn van Griensven vom Institut für experimentelle und klinische Traumatologie des Ludwig Boltzmann Instituts in Wien. Dr. Armin Feldhoff vom Institut für physikalische Chemie der Leibniz Universität Hannover danke ich für die Bereitstellung des Rasterelektronenmikroskops. Für die Zusammenarbeit im Zuge der mikroskopischen Aufnahme von besiedelter Spinnenseide danke ich Dr. Kurt Dittmar und Dr. Manfred Rohde vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig.

Ein besonders großes und herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Arbeitskreises Scheper für das hervorragende Arbeitsklima:

Besonders danke ich Frau PD Dr. Cornelia Kasper und Dr. Frank Stahl für die Betreuung während der Doktorarbeit und das Korrekturlesen.

Allen Mitarbeitern der Feinmechanik-Werkstatt des TCI danke ich für die ausgezeichnete Umsetzung fixer Ideen in Rekordzeit. Martin Pähler danke ich für die unerschütterliche Hilfe im RNA- und Chip-Labor. Cornelia Repenning danke ich für die sekundäre Datenanalyse der Microarrays und ihre Ausdauer und Geduld, uns alle Daten so mundgerecht wie möglich zu präsentieren. Herzlich bedanke ich mich bei meiner Diplomandin Stefanie Röker und meiner Masterandin Dana Marten für die motivierende Zusammenarbeit. Meinen Kolleginnen aus dem Hühnerstall danke ich für die ausgezeichnete kulinarische und menschliche Rund-um-Versorgung – ich habe mich immer sehr wohl bei Euch gefühlt.

Mein besonderer Dank aber geht an meine liebe und unermüdliche Kollegin Yvonne Stark. Alles, was ich in den drei Jahren gelernt habe, habe ich von oder mit ihr gelernt. Sie hat mich motiviert und unterstützt. Wir waren ein super Team, Danke!

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Familie: Meinem lieben Bruder, der als Leidensgenosse und zuverlässiger IT-Spezialist per Standleitung mit Rat, Tat und seelischem Support zur Verfügung stand und mit seiner Formatvorlage einige Formatierungsarbeiten abkürzen konnte. Meiner Schwester, die immer ein Ohr und ein paar wohltuende Worte (oder ein vernünftiges Abendessen) für mich über hatte und mir viel Rückhalt gegeben hat, sowie meinem Schwager, der mir wie immer zuverlässig mit gutem Rat zur Seite gestanden hat. Meinem Freund Bernd danke ich für seine liebevolle und verständnisvolle Unterstützung über die gesamte Zeit, in der er mich auch an Tiefpunkten immer wieder ermutigt (und ertragen) hat. Der größte Dank gilt meinen Eltern, die ihre Kinder stets liebevoll unterstützt und gefördert und mir diese Ausbildung möglich gemacht haben.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract.....	2
1. Einleitung.....	3
2. Aufgabenstellung.....	5
3. Theoretische Grundlagen	7
3.1 Das periphere Nervensystem (PNS).....	7
3.2 Das Nervengewebe des peripheren Nervensystems	8
3.3 Periphere Nervenregeneration	9
3.4 Künstliche Nervenkonstrukte	11
3.4.1 Nerve guidance channels	12
3.4.2 Synthetische Materialien.....	14
3.4.3 Natürliche Materialien	15
3.5 Kollagen	17
3.6 Spinnenseide.....	18
3.7 Bioreaktoren im <i>Tissue Engineering</i>	20
3.7.1 Spinnerflaschen.....	22
3.7.2 Perfusionssysteme	24
4. Experimenteller Teil	25
4.1 Entwicklung eines Screening Systems für die iterative Testung von Biomaterialien... 25	
4.1.1 Modellzelllinien	26
4.1.2 Referenzmaterialien	27
4.1.3 Aufbau und Optimierung des Screening Systems.....	28
4.1.4 Optimierung eines humanen Albumin-ELISA	29
4.1.5 Kultivierung auf Referenzmaterialien zur Ermittlung der Auswahlkriterien	33
4.1.6 Fazit der Entwicklung eines Screening Systems für Biomaterialien im <i>Tissue Engineering</i> peripherer Nerven	44
4.2 Kollagenmatrix-Derivate im Screening System.....	45
4.2.1 Kollagenmatrix-Derivate	45
4.2.2 Kultivierung auf den Derivaten der Kollagenmatrix	48
4.2.3 Zellviabilität/-proliferation auf den Derivaten der Kollagenmatrix.....	48
4.2.4 Zelladhäsion auf den Derivaten der Kollagenmatrix	55
4.2.5 Untersuchung der Proliferation mittels BrdU-Assay	60
4.2.6 Immunhistochemischer Nachweis der Thyrosinhydroxylase	62
4.2.7 Quantifizierung des sezernierten Albumins	63
4.2.8 RT-PCR von Markergenen	64
4.2.9 Genexpressionsanalyse mittels eines murinen ZNS-Chips.....	67
4.2.10 Rasterelektronenmikroskopie.....	70
4.2.11 Histologische Analyse.....	74
4.2.12 Fazit der Untersuchung von Kollagenmatrix-Derivaten im Screening System..	76

4.3 Screening von Seide zum Einsatz in der peripheren Nervenregeneration	78
4.3.1 Mechanische Eigenschaften	78
4.3.2 Kultivierung auf nativer Spinnenseide	82
4.3.3 Zelladhäsion auf nativer Spinnenseide	84
4.3.4 Time-lap Aufnahmen mittels Phasenkontrastmikroskop	85
4.3.5 Rasterelektronenmikroskopie der Besiedlung von Spinnenseide	87
4.3.6 Fazit des Screenings von Seide zum Einsatz in der peripheren Nervenregeneration	88
4.4 Dynamische Kultivierung	90
4.4.1 Entwicklung einer modifizierten Spinnerflasche	90
4.4.2 Entwicklung eines Perfusionsreaktors	93
4.4.3 Vergleich der statischen und dynamischen Kultivierung anhand der Referenzmatrix Matristypt®	95
4.4.4 Fazit der dynamischen Kultivierung anhand der Referenzmatrix Matristypt® ..	100
4.4.5 Anwendung der dynamischen Kultivierung im Perfusionsreaktor an einer Kollagen-CA Matrix	101
5. Zusammenfassung und Ausblick	105
6. Anhang	109
6.1 Statistik	109
6.2 Medien und Puffer	109
6.3 Säugerzelllinien	110
6.4 Methoden	111
6.4.1 Zellkultur	111
6.4.2 MTT-Test	112
6.4.3 Fixierung von Zellen	113
6.4.4 DAPI-Färbung	113
6.4.5 Adhäsionsassay	113
6.4.6 BrdU-Assay	114
6.4.7 TH-ELISA	115
6.4.8 Glukose/Laktat-Bestimmung	115
6.4.9 Albumin-ELISA	116
6.4.10 RNA-Isolierung	118
6.4.11 Qualitätskontrolle der RNA	118
6.4.12 RT-PCR	119
6.4.13 DNA-Chip Technologie	122
6.4.14 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften	126
6.4.15 Rasterelektronenmikroskopie (REM)	127
6.4.16 Hämalaun-Eosin-Färbung histologischer Schnitte	127
6.5 Geräte und Reagenzien	129
6.6 Abkürzungsverzeichnis	136
7. Literaturverzeichnis	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Nervensystem der Wirbeltiere; topologische Einteilung von zentralen und peripheren Anteilen. (nach Lodish et al. 2000)	7
Abbildung 2:	Schematische Darstellung eines Neurons.	8
Abbildung 3:	Myelinisierung der Axone. (Thews et al. 1999).....	9
Abbildung 4:	Periphere Nervenregeneration. (Schmidt and Leach 2003)	10
Abbildung 5:	Eigenschaften des idealen nerve guidance channel. (Hudson et al. 1999).....	13
Abbildung 6:	Spinnerflasche zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Martin et al. 2004).....	23
Abbildung 7a:	<i>Wavy-walled Bioreaktor</i> zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Bilgen et al. 2006).....	23
Abbildung 7b:	<i>Rotating wall vessel Bioreaktor</i> zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Martin et al. 2004)	23
Abbildung 8:	Perfusionssystem zu Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Martin et al. 2004).....	24
Abbildung 9:	Fließschema des iterativen Screening Systems für die Testung von Biomaterialien auf ihre Eignung in der peripheren Nervenregeneration.	28
Abbildung 10:	Schematisch Darstellung des Ablaufs eines nicht-kompetitiven, direkten ELISA zur Quantifizierung eines Antigens. (Röker 2006)	30
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des Ablaufs eines Sandwich-ELISA. (Röker 2006).....	30
Abbildung 12:	Schachbretttitration zur Optimierung von Antigen- und Antikörperkonzentration für eine optimale Auswertung der Farbreaktion. (Röker 2006).....	32
Abbildung 13:	Standardreihen des optimierten Sandwich–ELISA: Humanes Serum Albumin (HSA) in DMEM + 10 % FKS, 1:100 mit <i>coating buffer</i> verdünnt (hell); HSA in <i>coating buffer</i> (dunkel). (Röker 2006)	33
Abbildung 14:	MTT-Test für Hep-G2 Zellen. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen auf verschiedenen Referenzmatrizes.	34
Abbildung 15:	Adhäsions-Assay für Hep-G2 Zellen auf den verschiedenen Referenzmatrizes.....	36
Abbildung 16:	DAPI-Färbung von Hep-G2 Zellen auf den Referenzmatrizes.....	37

Abbildung 17: MTT-Test mit undifferenzierten (A) und ab Tag 4 mit NGF neuronal differenzierten (B) PC-12 Zellen. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen auf verschiedenen Referenzmatrizes.	40
Abbildung 18: Adhäsions-Assay für PC-12 Zellen auf den verschiedenen Referenzmatrizes.	41
Abbildung 19: DAPI-Färbung von PC12 Zellen auf den Referenzmatrizes.	42
Abbildung 20: MTT-Test für Hep-G2 (A) und ISC (B) auf Spalt gegen ihre Referenz.	49
Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nativem, bovinem Spalt (A), das als Rohstoff zur Herstellung der porösen Kollagenmatrix Matristypt [®] (B) verwendet wird.	50
Abbildung 22: MTT-Test für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf C-CA Matrizes gegen ihre Referenz.	51
Abbildung 23: MTT-Test für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf C-HA Matrizes gegen ihre Referenz.	53
Abbildung 24: MTT-Test für Hep-G2 (A), PC-12 (B) (Marten 2006) und ISC (C) (Marten 2006) auf C-Seide gegen ihre Referenz.	54
Abbildung 25: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf den C-CA Matrizes gegen ihre Referenz.	56
Abbildung 26: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf den C-HA Matrizes gegen ihre Referenz.	58
Abbildung 27: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf C-Seide gegen ihre Referenz.	59
Abbildung 28: BrdU-Assay für Hep-G2 (A) und ISC (B) auf C-CA Matrizes und C-HA 10 % gegen ihre Referenz.	61
Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von PC-12 Zellen auf MS (A) und C-CA 5% (B).	62
Abbildung 30: Ergebnisse des Albumin-ELISA für Hep-G2 Zellen auf der Referenzmatrix C-Alg sowie auf C-CA 5% und C-HA 10 %. (Röker 2006).	64
Abbildung 31: RT-PCR von Markergenen der verschiedenen Modellzellen.	65
Abbildung 32: Konventionelle REM-Aufnahmen von MS (A), C-CA 5% (B) und C-HA 5% (C).	70
Abbildung 33: QuantomiX Kapsel QX-302 für REM-Aufnahmen feuchter Zell- und Gewebe-Proben. (Quelle: User Manual für QuantomiX QX-302 Capsule) ..	71
Abbildung 34: Kalibrierung mit Hilfe der QuantomiX Kalibrations-Kapsel. (Manfred Rohe, HZI, Braunschweig).	72

Abbildung 35: <i>Wet SEM</i> Aufnahmen mit QuantomiX QX-302 Kapseln von ISC auf C-CA 10 %.....	73
Abbildung 36: Konventionelle REM-Aufnahmen von ISC kultiviert auf C-CA 10 % nach Paraformaldehyd-Fixierung und Trocknung über eine aufsteigenden Acetonreihe.	74
Abbildung 37: Übersichtsfärbung mit Hämalaun & Eosin von gefrorenen, histologischen Querschnitten. A: ISC auf Matristypt [®] (200x), B: ISC auf C-CA 10 % (200x), C: Hep-G2 Zellen auf C-Alg (100x), D: Hep-G2 Zellen auf C-CA 10 % (100x).	75
Abbildung 38: Maschine zur mechanischen Gewinnung von Spinnenseide.	79
Abbildung 39: Bestimmung der mechanischen Eigenschaften (F_{\max} und maximale Dehnung in Prozent der Ausgangslänge) eines Spinnenseiden-Fadens in Abhängigkeit der Anzahl an Einzelfäden (50 Verdrillungen). (Marten 2006).....	80
Abbildung 40: Bestimmung der mechanischen Eigenschaften (F_{\max} und Dehnung bei F_{\max}) der C-Seide Matrix im Vergleich zum Basismaterial MS und den Referenzen MS und C-Alg. (Prof. Dr. Marijn van Griensven, Experimentelle und klinische Traumatologie, Ludwig Boltzmann Institut, Wien).....	81
Abbildung 41: MTT-Test für PC-12 (A) und ISC (B) auf Spinnenseide gegen ihre Referenzen und C-Seide im Vergleich. (Marten 2006).....	82
Abbildung 42: MTT-Test (Viabilität) und BrdU-Assay (Proliferation) für ISC auf Spinnenseide-Fasern (20 Einzelfäden, 70 Verdrillungen). (Marten 2006)	83
Abbildung 43: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A) und ISC (B) auf Spinnenseide gegen ihre Referenzen.	84
Abbildung 44: DAPI-Färbung von Hep-G2 Zellen (A) und ISC (B). Die Fluoreszenz-Bilder (x400) zeigen die Ergebnisse der DAPI-Färbung der Zellkerne nach Adhäsion von 24 Stunden auf der Spinnenseide.	85
Abbildung 45: ISC auf einem Spinnenseide-Faden (blau: Zellkern; rot: Zytosol). (Kurt Dittmar, HZI, Braunschweig).....	86
Abbildung 46: Aufnahmen von der Besiedlung eines Spinnenfadens mit ISC im Phasenkontrastmikroskop (Vergrößerung: x400). (Kurt Dittmar, HZI, Braunschweig) (Marten 2006).....	86
Abbildung 47: REM-Aufnahmen der Anheftung von ISC auf einem Spinnenseiden-Faden. (Manfred Rohde, HZI, Braunschweig).....	87
Abbildung 48: REM-Aufnahmen von ISC auf einem Spinnenseiden-Faden. (Manfred Rohde, HZI, Braunschweig) (Marten 2006)	88

Abbildung 49: Erster Prototyp der entwickelten Spinnerflasche zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes.....	91
Abbildung 50: Zweiter Prototyp der entwickelten Spinnerflasche zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. A: schematische Darstellung; B: technische Zeichnung.....	92
Abbildung 51: Zweiter Prototyp der entwickelten Spinnerflasche zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes (Fotografien).....	93
Abbildung 52: Entwickelter Perfusionsreaktor zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. A: schematische Darstellung; B: technische Zeichnung.....	94
Abbildung 53: Entwickelter Perfusionsreaktor zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes (Fotografien).....	94
Abbildung 54: Kalibration der peristaltischen Pumpe im geschlossenen System des Perfusionsreaktors.	95
Abbildung 55: MTT-Test für ISC auf der Referenzmatrix MS im Vergleich von statischer und dynamischer Kultivierung in der modifizierten Spinnerflasche und im Perfusionsreaktor.....	97
Abbildung 56: Kumulativer Glukoseverbrauch (A) und Laktatproduktion (B) von dynamisch kultivierten ISC auf MS gegenüber einer statischen Kultivierung über einen Zeitraum von vier Wochen.....	98
Abbildung 57: REM-Aufnahmen von einer Matrix-Aufsicht (oben) und Übersichtsfärbung mit Hämalaun & Eosin von gefrorenen, histologischen Querschnitten (unten). A: ISC auf Matristypt [®] nach statischer Kultivierung (4 Wochen), B: ISC auf Matristypt [®] nach dynamischer Kultivierung in der Spinnerflasche (4 Wochen), C: ISC auf Matristypt [®] nach dynamischer Kultivierung im Perfusionsreaktor (REM: 3 Wochen, Histo: 4 Wochen).....	99
Abbildung 58: MTT-Test für ISC auf C-CA 10 % im Vergleich von statischer und dynamischer Kultivierung im Perfusionsreaktor.	102
Abbildung 59: Kumulativer Glukoseverbrauch (A) und Laktatproduktion (B) von im Perfusionsreaktor dynamisch kultivierten ISC auf C-CA 10 % gegenüber einer statischen Kultivierung über einen Zeitraum von vier Wochen.....	103
Abbildung 60: REM-Aufnahmen von einer Matrix-Aufsicht (oben) und Übersichtsfärbung mit Hämalaun & Eosin von gefrorenen, histologischen Querschnitten (unten). A: ISC auf C-CA 10 % nach statischer Kultivierung (4 Wochen), B: ISC auf C-CA 10% nach dynamischer Kultivierung im Perfusionsreaktor (4 Wochen).....	104
Abbildung 61: Reduktion von MTT zu Formazan.	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Referenzmatrizes für das Screening System von Biomaterialien in der peripheren Nervenregeneration.	27
Tabelle 2:	Bewertungskriterien für zu testende Biomaterialien im Screening System bei Kultivierung mit Hep-G2 Zellen.	39
Tabelle 3:	Bewertungskriterien für zu testende Biomaterialien im Screening System bei Kultivierung mit PC-12 Zellen.	43
Tabelle 4:	Übersicht über die im Screening System untersuchten Kollagenmatrizes und die Komponenten, die zur Optimierung der Materialeigenschaften für das <i>Tissue Engineering</i> beigemischt wurden.	46
Tabelle 5:	Regulierte Gene durch Zusatz von CA zur Kollagenmatrix. Es wurde die Genexpression der ISC nach Kultivierung auf C-CA 10 % gegenüber MS verglichen.	68

Zusammenfassung

Die heutige Standardtherapie schwerwiegender peripherer Nervenläsionen stellt die Transplantation autologer Nerven dar. Eine Alternative zur Verwendung autologer Nerven kann das *Tissue Engineering* bieten, indem Schwann Zellen *in vitro* auf formgebenden, biokompatiblen Leitschienen kultiviert und anschließend zur Unterstützung der gerichteten peripheren Nervenregeneration implantiert werden. Für diesen Zweck wurden bereits vielfältige Biomaterialien und Konstrukte getestet; ein optimales Konstrukt als wirkliche Alternative zu autologen Nerven konnte jedoch noch nicht entwickelt werden.

In dieser Arbeit wurde ein Screening System entwickelt, das eine reproduzierbare und schnelle Testung von Biomaterialien und ihren Modifikationen *in vitro* ermöglicht. Die getesteten Materialien sollten für die periphere Nervenregeneration eingesetzt werden. Für eine reproduzierbare Beurteilung konnten erfolgreich Assays, Referenzmaterialien sowie Bewertungskriterien definiert werden.

Exemplarisch wurden hier auf Grundlage einer Kollagenmatrix (Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck), die bisher in der Kosmetik und Wundheilung eingesetzt wird, drei verschiedene Modifikationen durch Einarbeitung natürlicher Polymere innerhalb des entwickelten Screening Systems getestet und beurteilt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Einarbeitung von Hyaluronsäure keinen negativen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hatte, diese jedoch auch nicht begünstigte. Dagegen führte die Dotierung der Kollagenmatrix mit Colominsäure zu einer Verbesserung des Zellwachstums und einer verstärkten dreidimensionalen Gewebekonstruktion. Auf molekulargenetischer Ebene konnten neuroprotektive und regenerationsfördernde Effekte beobachtet werden.

Die Modifikation der Kollagenmatrix mit Seiden-Fibroin lieferte im Hinblick auf die neuronalen Zellmodelle eine Optimierung der Viabilität und Zelladhäsion. Die vergleichende Untersuchung nativer Spinnenseide zeigte neben herausragender mechanischer Eigenschaften die Eignung von Seide, zur Förderung einer gerichteten Nervenregeneration eingesetzt zu werden.

Weiterhin wurden eine modifizierte Spinnerflasche und ein Perfusionsreaktor für die dynamische Kultivierung von Materialien, die im Screening System als vielversprechend ermittelt wurden, entwickelt. Erste Ansätze zur optimalen Kultivierung wurden erarbeitet.

Schlagnworte: periphere Nervenregeneration, *Tissue Engineering*, Biomaterialien

Abstract

For severe peripheral nerve injury, treatment typically consists of autologous nerve transplantation. An alternative treatment may be provided by *Tissue Engineering* using biocompatible nerve guidance channels seeded with Schwann cells that are integrated into the defect of the patient for enhanced and guided peripheral nerve regeneration. In this regard, numerous materials have been tested and used until today, but the ideal construct as capable alternative to the autologous nerve grafts is not available yet.

In this study, a screening system was developed in order to provide a reproducible and efficient *in vitro* testing of biomaterials and their modifications with regard to peripheral nerve regeneration. Appropriate assays, reference matrices and assessment criteria could successfully be defined guaranteeing a reproducible evaluation.

On the basis of a collagen matrix (Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck, Germany) currently used for cosmetics and wound healing purposes, three different modifications by adding natural polymers were investigated and evaluated within the developed Screening System. The results indicated that the incorporation of hyaluronic acid had indeed no inhibitory effect on the proliferation of the cells but did not promote proliferation of the cells on the matrix either. In contrast, the incorporation of chondroitin led to an amelioration of cell growth and an enhanced three dimensional tissue formation. On the molecular genetic level, neuroprotective and regeneration promoting effects could be observed.

The modification of the collagen matrix with silk fibroin could enhance viability and cell adhesion of neuronal cell systems. Moreover, the investigation of native spider silk revealed excellent mechanical properties and the suitability of silk to enhance guided nerve regeneration.

For the dynamic cultivation of materials which showed promise in the screening system a modified spinner flask and a perfusion reactor were developed. First approaches towards the optimized cultivation conditions could be acquired.

Keywords: peripheral nerve regeneration, *Tissue Engineering*, biomaterials

1. Einleitung

Periphere Nerven besitzen ein physiologisches Regenerationspotential nach Verletzung oder Durchtrennung von Nervenfasern (Fawcett and Keynes 1990). Die so genannte *Waltersche Degeneration* ermöglicht es Axonen, in Richtung des distalen Endes zu verheilen und damit im besten Fall ohne Funktionsverlust zu regenerieren (Sanghvi et al. 2004). Der Heilungserfolg ist jedoch stark abhängig von der Art der Läsion und der Größe des Substanzverlusts (Suematsu 1989). Bei großen Nervenverletzungen sind die lange Dauer der Axonregeneration, das ungerichtete Wachstum der regenerierenden Axone sowie die Bildung von Narbengewebe problematisch für die eigenständige funktionelle Regeneration (Sanghvi et al. 2004; Schmidt and Leach 2003).

In Europa allein treten im Jahr 300 000 Fälle von so starken peripheren Nervenverletzungen auf, dass eine eigenständige Regeneration nicht zu einer funktionellen Reinnervation der betroffenen Nerven führt. Die schlimmste Form der peripheren Nervenverletzung, die komplette Durchtrennung eines Nervs, hat eine hohe klinische Inzidenz und betrifft jährlich etwa 2,8 % der Trauma-Patienten, was in der Regel zu lebenslangen Einschränkungen und Behinderungen führt. Vor allem bei der häufig auftretenden Ruptur des *plexus brachialis* nach Motorradunfällen aber auch im Verlauf von Geburten reicht das intrinsische Regenerationspotential der betroffenen peripheren Nerven nicht aus, um zu einer vollständigen, funktionellen Innervation zu führen (Belkas et al. 2004; Ciardelli and Chiono 2006).

Typischerweise behandelt man solch große Nervenläsionen entweder durch ein direktes Zusammennähen der geschädigten Nervenenden oder durch den Einsatz von autologen Transplantaten. Das Verbinden der geschädigten Enden beinhaltet jedoch häufig das Einbringen sehr großer schmerzhafter Spannungen und ist bei großen Substanzverlusten gar nicht möglich. Die Transplantation autologer Nerven bietet in diesen Fällen eine Alternative, zeigt aber im Hinblick auf den Verlust von Nervensubstanz im Spendergewebe, den hohen operativen Aufwand und die schlechte morphologische Übertragbarkeit von Nervenfasern in andere Gewebe Schwächen (Schmidt and Leach 2003).

Ein viel versprechender Ansatz zur Therapie von großen Nervendefekten ist das *Tissue Engineering*, bei dem künstliches Gewebe *in vitro* gezüchtet wird. Dazu werden Zellen auf eine formgebende Matrix kultiviert, so dass in Kultur eine dreidimensionale Gewebestruktur entsteht. Abschließend erfolgt die Integration des Implantats in den Gewebedefekt. In diesem Zuge arbeitet man seit den 80er Jahren daran, biosynthetische Leitschienen zu entwickeln, um

die gerichtete periphere Nervenregeneration ähnlich wie ein autologes Konstrukt zu verbessern (Bellamkonda and Aebischer 1994). Dabei wurden diverse synthetische und natürliche, bioabbaubare und nicht-bioabbaubare Polymere getestet. Wie auf anderen Gebieten des *Tissue Engineerings* setzt man heute vor allem Hoffnung in natürliche Polymere und Komponenten der physiologischen extrazellulären Matrix (Ciardelli and Chiono 2006). Ein optimales Konstrukt konnte jedoch noch nicht gefunden werden, denn die Anforderungen an eine Matrix sind vielfältig (Hudson et al. 1999): Sie muss biokompatibel, einfach zu besiedeln sowie im Hinblick auf das Zielgewebe formgeben sein und die Eigenschaften des Zielgewebes begünstigen. Das Konstrukt muss mechanisch stabil sein und sollte eine ausreichende Porosität zur Nährstoffversorgung im gesamten Konstrukt zur Verfügung stellen. Über die statische Kultivierung hinaus kann die Nährstoffversorgung zusätzlich durch eine dynamische Kultivierung verbessert werden, mit der man die *in vivo* Bedingungen nachempfindet und gleichzeitig ein geeignetes Testsystem besitzt.

2. Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der DFG Forschergruppe 548 „Polysialinsäure – Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifizierlicher Gewebe“ in enger Zusammenarbeit mit Frau Yvonne Stark vom Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover erstellt. Yvonne Stark untersuchte den Einfluss von Biopolymeren auf Modelzelllinien. Dazu wurden zunächst die Biopolymere in zweidimensionaler Form als Oberflächenbeschichtungen und Beschichtungen von dreidimensionalen Konstrukten getestet. Darüber hinaus wurde eine Annäherung an dreidimensionale Konstrukte in Form von Hydrogelen durchgeführt. Besonderer Schwerpunkt war die Testung des physiologischen Polysaccharids Polysialinsäure, das Potenzial für die periphere Nervenregeneration besitzt.

Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit ist der Aufbau eines geeigneten Screening Systems für dreidimensionale Konstrukte aus Biomaterialien zur Regeneration peripherer Nerven. Das Screening System soll für eine Vielfalt von harten oder weichen, synthetischen oder natürlichen, elastischen oder unelastischen Konstrukten verwendbar sein. Ziel ist eine reproduzierbare und schnelle Testung von Materialien durch geeignete *in vitro* Tests. So sollen auch Modifikationen und optimierte Materialien schnell und unter einheitlichen Bedingungen auf ihre Eignung zur Kultivierung von Nervenzellen beurteilt werden können. Dabei sollen einfache analytisch erfassbare Größen wie Wachstum, Proliferation, Adhäsion, Zellphysiologie und Distribution der Zellen im Konstrukt untersucht werden, um die Eignung der Materialien beurteilen zu können. Ausgewählte Materialien werden dann einer dynamischen Kultivierung unterzogen, um so den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen. Ziel des Screening Systems ist damit, die Eignung von Biomaterialien in einem geeigneten Zeit- und Finanzrahmen zu bestimmen, eine schnelle Optimierung von Biomaterialien zu ermöglichen sowie die kostenintensiven *in vivo* Tests mit unzureichend getesteten Materialien zu vermeiden.

Im Rahmen des DFG-Forschungsprojekts bereitgestellte und diverse andere Materialien werden im Screening System getestet. Beispielsweise werden Kollagenmatrizes verschiedene Substanzen beigefügt, die die Nervenregeneration besonders fördern sollen. Die so modifizierten Materialien durchlaufen das Screening System und werden auf ihre Eignung als Biomaterialien für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven getestet. Dabei werden die Kollagen Materialien mit natürlichen Gerüstbildnern (Hyaluronsäure, Fibroin) und, in Kooperation mit Frau Stark, mit Colominsäure angereichert und der Einfluss der Modifikation herausgearbeitet.

Darüber hinaus wird auch der natürliche Seidenfaden von Spinnen der Gattung *Nephila* innerhalb des Screening Systems getestet. Dazu sollen zunächst grundlegend die herausragenden mechanischen Eigenschaften untersucht werden, um die Fäden anschließend entsprechend des Screening Systems in der Zellkultur zu testen. Ein Fokus wird hier auf die Adhäsion und die vorrangige Besiedlung von Nervenzellen auf dem Spinnenseidenfaden gelegt.

Für die abschließende Beurteilung von ausgewählten Materialien im Rahmen des Screening Systems soll in Zusammenarbeit mit Frau Stark eine modifizierte Spinnerflasche sowie ein Perfusionsreaktor zur dynamischen Kultivierung der besiedelten Biomaterialien entwickelt werden. Ziel ist eine Verbesserung der Nährstoffversorgung der Zellen im Konstrukt und eine Steigerung der Proliferation durch geeignete Scherbeanspruchung in Anlehnung an die Bedingungen *in vivo*.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Das periphere Nervensystem (PNS)

Das periphere Nervensystem (PNS) grenzt sich bei Wirbeltieren anatomisch und funktionell vom zentralen Nervensystem (ZNS) ab (Thews et al. 1999). Während zum ZNS das Gehirn und Rückenmark gezählt werden, umfasst das PNS alle außerhalb des ZNS gelegenen neuronalen Bestandteile. Dazu gehören neben den paarigen Hirn- und Spinalnerven, die dem Gehirn bzw. Rückenmark unmittelbar entspringen, auch alle sensorischen (afferent; von den Sensoren zum ZNS) und motorischen (efferent; vom ZNS zu den Effektoren wie Muskeln und innere Organe) Nervenzellen (siehe Abbildung 1) (Huang and Huang 2006; Lodish et al. 2000; Schmidt and Leach 2003).

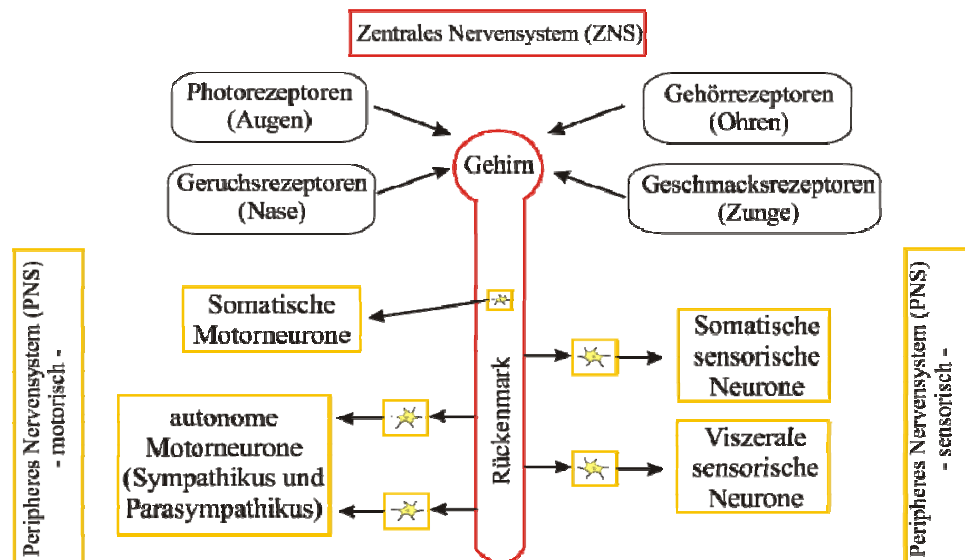


Abbildung 1: Nervensystem der Wirbeltiere; topologische Einteilung von zentralen und peripheren Anteilen (nach Lodish et al. 2000).

Somit innervieren periphere Nervenfasern alle Gewebe eines Organismus, indem sie exzitatorische und inhibitorische Reize zum und vom Rückenmark übermitteln. Die Abgrenzung des peripheren vom zentralen Nervensystem ist dabei rein topologisch, da die Zellkörper (Soma) aller somatischen Motoneurone im ZNS lokalisiert sind. Die Soma der sensorischen Neurone liegen zwar in Nervenknotten (Ganglien) im PNS selbst, doch ihre Fortsätze enden im ZNS, wo die Integration der Wahrnehmung und Empfindungen stattfindet und Reaktionen generiert werden. Das PNS ist demnach nur als räumlich und nur bedingt funktionell abgrenzbares System zu betrachten, das nicht autonom existieren kann (Campbell and Reece 2003).

3.2 Das Nervengewebe des peripheren Nervensystems

Das Nervengewebe besteht sowohl im PNS als auch im ZNS hauptsächlich aus zwei verschiedenen Zelltypen: den Neuronen und den Gliazellen als ektodermales Stützgewebe (Thews et al. 1999). Die Neurone stellen die funktionelle Einheit des Nervensystems dar. Sie bestehen aus einem Zellkörper (Soma) und ihren Zellfortsätzen. Der Fortsatz, mit dem die Nervenzelle Erregungen an andere Zellen weiterleitet (efferente Faser), wird als Axon bezeichnet. Alle übrigen Zellfortsätze, an denen viele Nervenfasern anderer Neurone enden und die damit Signale aufnehmen (afferente Fasern), werden Dendriten genannt (siehe Abbildung 2) (Alberts et al. 2002; Siegal et al. 1999).

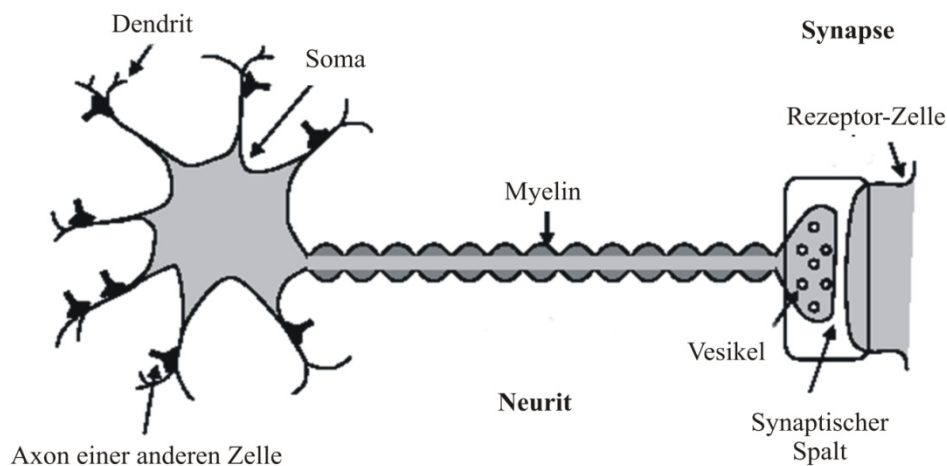


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Neurons. Dendriten empfangen Signale und leiten sie über das Axon und terminale Axonendigung an andere Neurone oder Effektoren (Muskeln, Drüsen, Haut etc.) weiter.

Die Neurone werden umgeben von ihrem Stützgewebe aus Gliazellen oder Neuroglia. Diese auch als „Nervenkitt“ bezeichneten Zellen erfüllen im Nervensystem eine Hüll- und Stützfunktion. Sie üben durch die Zellmembranen und produzierten Proteine eine Isolationsfunktion aus. Darüber hinaus kontrollieren sie den Extrazellularraum und sind am Stoffwechsel des Gewebes beteiligt. Die Glia des ZNS und PNS unterscheidet sich. Im peripheren Nervensystem ist sie hauptsächlich aus Schwann Zellen aufgebaut. Im Gegensatz zu den Neuronen behalten Schwann Zellen, wie alle Gliazellen, während des gesamten Lebens ihre Teilungsfähigkeit (Huang and Huang 2006; Thews et al. 1999).

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, sind die Soma der peripheren Neurone entweder direkt im ZNS oder in den dem Rückenmark nahen Ganglien lokalisiert. Somit besteht ein peripheres Neuron in der Regel aus seinem Zellkörper und einem bis zu einem Meter langen Axon, um

sein Target zu erreichen. Um eine adäquate Reizleitungsgeschwindigkeit gewährleisten zu können, ist ein solches Axon in der Peripherie abschnittsweise in eine isolierende Myelinscheide eingerollt, die von Schwann Zellen gebildet wird (siehe Abbildung 3) (Huang and Huang 2006). Dies ermöglicht eine schnelle sprunghafte (saltatorische) Reizweiterleitung entlang des Axons (Purves et al. 2001).

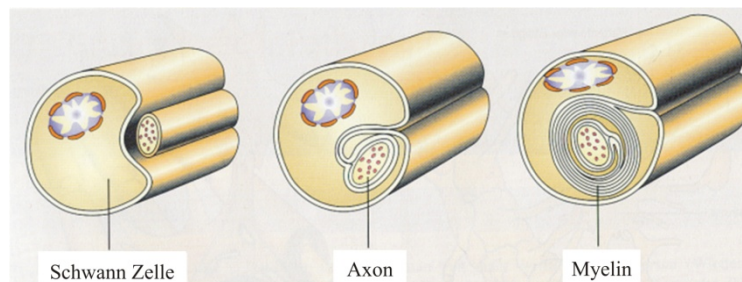


Abbildung 3: Myelinisierung der Axone: Peripherer Nervenzellen. Schwann Zellen „umwickeln“ die Axone in mehreren Schichten und bilden die Myelin- oder Markscheide aus (Thews et al. 1999).

3.3 Periphere Nervenregeneration

Periphere Nerven besitzen ein physiologisches Regenerationspotenzial nach Verletzungen oder Durchtrennung von Nervenfasern. Dieses intrinsische Potenzial resultiert aus einem gut bekannten, komplexen Prozess, der *Walterschen Degeneration* (siehe Abbildung 4) (Fawcett and Keynes 1990; Sanghvi et al. 2004; Schmidt and Leach 2003). In Folge einer peripheren Axotomie bricht das neuronale Zytoskelett am distalen Stumpf des durchtrennten peripheren Nervens zusammen (Sanghvi et al. 2004). Makrophagen kumulieren im defekten Areal und phagozytieren die Zell- und Myelin-Trümmer. Auch Schwann Zellen resorbieren anfallende Myelinreste (Ciardelli and Chiono 2006). Die Zell- und Myelintrümmer sowie mitogene Faktoren, die von den Makrophagen ausgeschüttet werden, stimulieren die Schwann Zellen, sich aus dem myelinisierenden Phänotyp zu dedifferenzieren und zu proliferieren (Fawcett and Keynes 1990). Diese dedifferenzierten und sich teilenden Schwann Zellen migrieren in den Zwischenraum der Läsion, wo sie eine Art Zellsäule ausbilden, die als *Büingner'sche Bänder* bezeichnet werden (Grothe and Nikkhah 2001). Sie fungieren im Verlauf der Regeneration als Leitschiene für die vom proximalen Ende aussprossenden Nervenfasern. Gleichzeitig schaffen die Schwann Zellen im distalen Stumpf ein Regeneration förderndes Milieu, indem sie vermehrt Wachstumsfaktoren, Zytokine und andere lösliche Faktoren produzieren (Schmidt and Leach 2003). Über kleinere Zwischenräume wird so ein gerichtetes Wachstum des regenerierenden Axons zum distalen Stumpf ermöglicht und der Nerv kann komplett funktionell wieder hergestellt werden. Der intrinsische Regenerationserfolg ist

jedoch abhängig von der Art der Verletzung (Quetschung, partielle oder komplette Durchtrennung) und kann durch Ausmaß und Lokalisation der Läsion eingeschränkt werden (Lundborg et al. 1982; Mackinnon and Dellon 1990; Sanghvi et al. 2004).

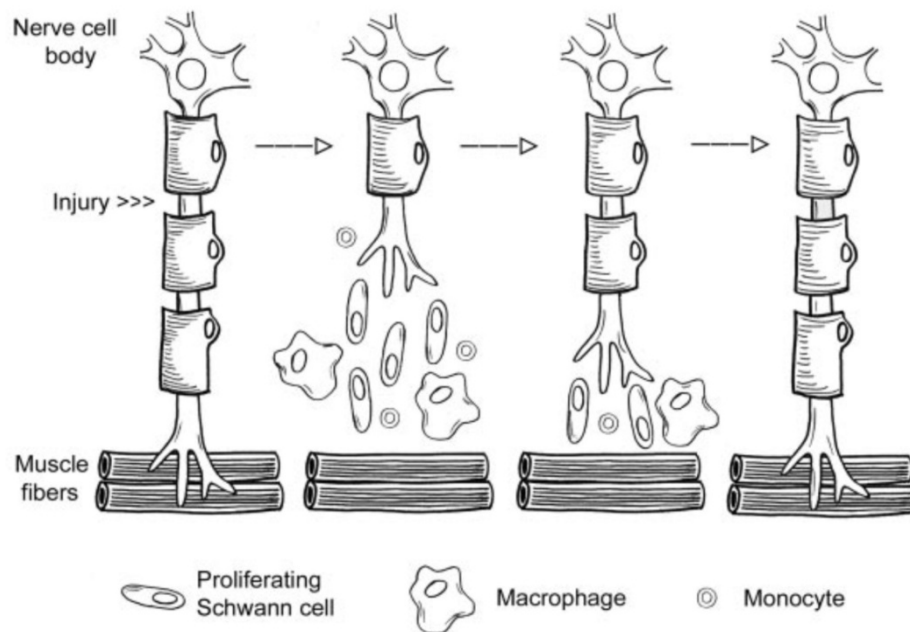


Abbildung 4: Periphere Nervenregeneration: Proliferierende Schwann Zellen, Makrophagen und Monozyten bauen gemeinsam die Trümmer der Myelinscheide ab, schütten Neurotrophine aus und ermöglichen ein gerichtetes Wachstum des regenerierenden Axons zum distalen Stumpf. So kann der Nerv komplett und funktionell wieder hergestellt werden. (Schmidt and Leach 2003)

Das größte Problem der physiologischen peripheren Nervenregeneration stellt dabei das ungerichtete Wachstum von Axonen in Folge großer Substanzverluste dar (Huang and Huang 2006). Bei großem Abstand des proximalen Stumpfs vom distalen Target kommt es häufig zu einer Desorganisation der sprossenden Axone (Sanghvi et al. 2004). Die resultierende Fehlausrichtung kann dazu führen, dass die regenerierenden Nervenfasern ihr Target verfehlen oder ein falsches Target innervieren (Fawcett and Keynes 1990). Nicht selten entstehen in diesen Fällen auch schmerzhafte Neurome, Nervenfaserknäule, wodurch eine Innervation des distalen Stumpfs komplett fehlschlägt (Sanghvi et al. 2004). Gleichzeitig konkurriert das regenerierende Nervengewebe mit der Bildung von Narbengewebe im defekten Bereich (Allmeling et al. 2006; Zhang et al. 2005). Aus all diesen Limitierungen in der intrinsischen peripheren Nervenregeneration resultieren Dysfunktionen durch eine fehlgeschlagene funktionelle Reinnervation des distalen Stumpfs (Fawcett and Keynes 1990). Darüber hinaus bedarf die Ausheilung von erheblichen Defekten bei einer Regenerationsgeschwindigkeit regenerierenden humanen Nervengewebes von 2-5 mm am

Tag häufig vieler Monate (Keilhoff et al. 2005; Sanghvi et al. 2004; Schmidt and Leach 2003).

Standard in der Behandlung solch schwerer peripherer Nervenverletzungen ist heute zum einen das direkte Zusammennähen der beiden Nervenenden (Anastomose). Problem hierbei ist jedoch die zum Teil große Spannung, die aufgebaut wird und die Nervenregeneration inhibieren kann (Fawcett and Keynes 1990). Diese Methode ist daher ausschließlich für die Wiederherstellung kleinerer Defekte geeignet (Schmidt and Leach 2003). Für größere Lücken zwischen den vorhandenen Stümpfen ist zum anderen der Einsatz von autologen Nerventransplantaten in Form von Venen oder peripheren Nerven zur Überbrückung des Defekts etabliert (Evans 2000). Vorteil von autologen Nerven, die an anderen Stellen, wie am Unterschenkel, entnommen werden, ist das physiologische Vorhandensein aller wichtiger Faktoren für eine erfolgreiche Nervenregeneration: Schwann Zellen und die röhrenartige Basallamina mit ihren neurotrophen Faktoren und Adhäsionsmolekülen (Ciardelli and Chiono 2006). Doch es resultieren entsprechend ein Substanz- und Funktionsverlust im Donorgewebe sowie eine hohe Morbidität an der Entnahmestelle (Narbenbildung, schmerzhaftes Neurom etc.) (Bini et al. 2005; Chalfoun et al. 2006). Darüber hinaus ist die Verfügbarkeit solch autologer Nervenlimitiert (Keilhoff et al. 2005), Gewebestruktur und -größe stimmen nicht immer ausreichend überein und es sind zwei chirurgische Eingriffe nötig (Ciardelli and Chiono 2006; Evans 2000). Daher gibt es viele Bemühungen, Alternativen zu autologen Nerventransplantaten für große Nervendefekte in Form von natürlichen und synthetischen Konstrukten zu entwickeln, um ein gerichtetes Axonwachstum zu ermöglichen.

3.4 Künstliche Nervenkonstrukte

Mit künstlichen Nervenkonstrukten möchte man den Problemen der heutigen Standardtherapien aus dem Wege gehen und gleichermaßen alle Erfordernisse für eine gerichtete axonale Proliferation erfüllen. Erforderlich sind hier zum einen ein strukturgebendes Gerüst sowie Stütz- und Trägerzellen. Hinzu kommen Induktions- oder Wachstumsfaktoren sowie Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM) (Chalfoun et al. 2006; Ciardelli and Chiono 2006). Die EZM ist Bestandteil jeden Gewebes, wird von den Zellen des Gewebes selbst produziert und sezerniert und bietet den Zellen ein optimales Gerüst aus strukturgebenden Proteinen, Kohlenhydraten und Signalmolekülen (Vlakh et al. 2005). Daneben müssen die künstlichen Nervenkonstrukte allen Anforderungen entsprechen, die an Matrizes im *Tissue Engineering* im Allgemeinen gestellt werden: Sie müssen biokompatibel sowie leicht sterilisierbar und implantierbar sein. Sie dürfen keine Immunreaktion auslösen und sollten den speziellen Ansprüchen des zu rekonstruierenden Gewebes genügen (Chalfoun

et al. 2006). Solch ein „smarteres“ Biomaterial für den Einsatz in der peripheren Nervenregeneration sollte also stabil und reißfest, gleichzeitig aber auch elastisch und flexibel sein (Hudson et al. 1999). Idealerweise sollte das Gerüstmaterial im Verlauf des Aufbaus der zelleigenen EZM bioabbaubar sein, so dass nach erfolgter Regeneration nur natürliches Gewebe zurück bleibt (Zhang et al. 2005). Die dabei freigesetzten Abbauprodukte dürfen nicht zytotoxisch sein. Durch die Steuerung von chemischen und physikalischen Eigenschaften können Gewebeform und -eigenschaften idealerweise imitiert und das Material kann in Bezug auf Zelladhäsion und -differenzierung attraktiv modifiziert werden (Stark et al. 2006).

Diverse Materialien wurden bereits für den Einsatz in der Nervenregeneration getestet (Bryan et al. 2004; Wen and Tresco 2005). Es zeigten sich vielversprechende Ansätze, wobei Optimierungsbedarf besteht und der heutige Stand der Technik nach wie vor die Transplantation autologer Nerven darstellt (Cai et al. 2005; Ciardelli and Chiono 2006; Schmidt and Leach 2003). Eine Übersicht über die verschiedenen getesteten Konstrukte und Materialien soll im Folgenden gegeben werden.

3.4.1 Nerve guidance channels

Unabhängig von dem verwendeten Biomaterial haben sich nerve guidance channels (NGC) in der Forschung etabliert und werden vielfach in der Literatur als mögliche, alternative Leitschienen für die Nervenregeneration beschrieben (Belkas et al. 2005; Dahlin and Lundborg 2001; Suematsu 1989). Das strukturgebende Gerüst liegt in diesem Fall röhrenförmig vor und ahmt idealerweise die Basallamina natürlicher Nervenfasern nach (Zhang et al. 2005). Die Konstruktion vereinfacht das mikrochirurgische Zusammennähen der beiden Nervenstümpfe erheblich und ermöglicht die Überbrückung größerer Defekte. Neben der Reduktion der Spannung an der Nahtlinie ermöglicht die tubuläre Form die Akkumulation der von den geschädigten Nervenenden sekretierten neurotrophen und neurotrophin Faktoren in ihrem Inneren (Bryan et al. 2004; Jansen et al. 2004) und isoliert den Prozess der Nervenregeneration vom Wundheilungsprozess außerhalb, insbesondere vom Einwachsen von Narben- und Bindegewebe (Bellamkonda and Aebischer 1994; Ciardelli and Chiono 2006; Hudson et al. 1999). Damit wird ein ungestörtes, gerichtetes Wachstum des sprossenden Axons gewährleistet und eine funktionelle Reinnervation gefördert (Dahlin and Lundborg 2001). Über die physikalischen Vorteile und die wichtigen Materialeigenschaften hinaus, spielen viele weitere Faktoren für einen optimalen NGC eine Rolle. So muss es das Ziel sein, Scaffolds zu entwickeln, die Bedingungen analog der in Abschnitt 3.3 beschriebenen intrinsischen peripheren Nervenregeneration kleinerer Defekte schaffen.

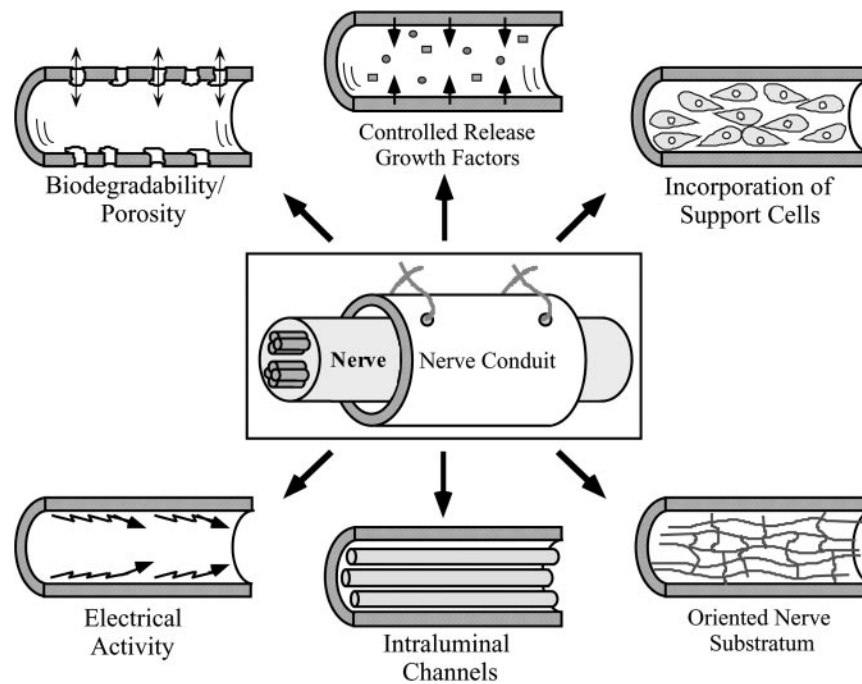


Abbildung 5: Eigenschaften des idealen nerve guidance channel. Folgende physikalische Eigenschaften einer Nervenleitschiene sind erwünscht (im Uhrzeigersinn): eine bioabbaubare und poröse Röhrenwand; die Fähigkeit, bioaktive Faktoren wie Wachstumsfaktoren freizusetzen; die Einarbeitung von Stützzellen wie Schwann Zellen; eine intraluminale orientierende Matrix zur Unterstützung der Zellmigration; intraluminale Röhren, um die Struktur der Nervenfasern zu imitieren; elektrische Aktivität. (Hudson et al. 1999)

Da die enorme Bedeutung von Schwann Zellen für eine erfolgreiche Unterstützung des Axonwachstums in Form der *Büngner'schen Bänder* bekannt ist, geht man davon aus, dass vor allem eine geeignete Matrix für die Besiedlung mit Schwann Zellen bereit gestellt werden muss, um die Nervenheilung zu verbessern (Guenard et al. 1992; Schmidt and Leach 2003). Schwann Zellen stellen dabei in jeglicher Hinsicht die zu bevorzugenden Stützzellen dar. Wesentliche Merkmale der Schwann Zellen sind, dass sie (Huang and Huang 2006):

- das intrinsische und optimale Substrat für eine Axonmigration bilden.
- bioaktive Faktoren freisetzen, die die Nervenmigration weiter unterstützen.
- strukturgebende und adhäsive EZM Moleküle wie Laminin und Kollagen produzieren und zahlreiche Zelladhäsionsmoleküle und -rezeptoren wie L1, N-cadherin, gamma 1 Integrine und das neurale Zelladhäsionsmolekül (NCAM) exprimieren.
- einen Cocktail aus neurotrophen Molekülen wie den nerve growth factor (NGF) oder den brain derived neurotrophic factor (BDNF) synthetisieren und sekretieren.
- eine endoneurale Scheide formen, die ein gerichtetes Axonwachstum unterstützt.
- Gewebetrümmer phagozytieren.
- das regenerierende Axon myelinisieren.

Außerdem werden diverse Wachstumsfaktoren, adhäsive Proteine und EZM Moleküle als unerlässliche oder unterstützende Bestandteile optimaler Scaffolds diskutiert (Barakat-Walter et al. 2007; Bellamkonda and Aebischer 1994; Chalfoun et al. 2006; Grothe and Nikkhah 2001; Lykissas et al. 2007; Sanghvi et al. 2004). Auch eine elektrische Stimulation des regenerierenden Nervens (English et al. 2007; Geremia et al. 2007), die Freisetzung anregender Hormone (Barakat-Walter et al. 2007) oder der Einsatz der Gentherapie (Haastert and Grothe 2007) mit modifizierten autologen Zellen wird vermehrt zur Förderung der Nervenregeneration beschrieben. Einen Überblick über die Eigenschaften eines idealen NGC gibt Abbildung 5 wieder. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit soll jedoch im speziellen die Optimierung der Scaffold-Materialien sein.

3.4.2 Synthetische Materialien

Eine Vielfalt von resorbierbaren synthetischen oder künstlichen Materialien wurde bereits als Transplantat in der peripheren Nervenregeneration getestet. Synthetische Materialien sind besonders attraktiv, weil sie häufig unkompliziert herstellbar sind. Vor allem aber können die chemischen, physikalischen und mechanischen Eigenschaften speziell für eine bestimmte Anwendung verändert, angepasst und optimiert werden (Schmidt and Leach 2003). Tatsächlich können die Eigenschaften (z.B. Biokompatibilität, Porosität, Degradation, mechanische Eigenschaften) der synthetischen Polymere häufig flexibel maßgeschneidert werden (Ciardelli and Chiono 2006). Darüber hinaus ist auch die Herstellung einer Vielfalt von makroskopischen Strukturen (z.B. Netze, Schwämme, Röhren) möglich, die eine Anpassung an die physiologischen Erfordernisse erleichtert (Sanghvi et al. 2004). Auch eine physikochemische Modifikation der Materialien mit bioaktiven Substanzen ist leichter durchführbar (Ciardelli and Chiono 2006). Einen Überblick über die diversen getesteten Materialien im *Tissue Engineering* peripherer Nerven, die Test-Organismen und den Heilungserfolg geben Huang und Huang (Huang and Huang 2006), Bellamkonda und Aebischer (Bellamkonda and Aebischer 1994), Belkas et al. (Belkas et al. 2004) sowie Bini et al. (Bini et al. 2005). Hier soll nur auf ausgewählte, häufig eingesetzte Materialien eingegangen werden.

Besonders Polyester wie Polymilchsäure (polylactic acid; PLA) und Polyglykolsäure (polyglycolic acid; PGA) sowie ihr Copolymer Polyglykol-Polymilchsäure (poly(lactic-co-glycolic acid); PLGA) wurden zahlreich, ausführlich und erfolgreich getestet (Bellamkonda and Aebischer 1994; Bini et al. 2005; Bryan et al. 2004; Cai et al. 2005; Chalfoun et al. 2006; Ciardelli and Chiono 2006; Huang and Huang 2006; Hudson et al. 1999; Sanghvi et al. 2004; Schmidt and Leach 2003). Ihre Vorteile bestehen in der problemlosen Verfügbarkeit sowie in

der leichten Herstellung und Verarbeitung. Vor allem aber sind sie bioabbaubar und durch die amerikanische Zulassungsbehörde für Arzneimittel und Medizinprodukte FDA (Food and Drug Administration) zugelassen. Gute klinische Testresultate wurden insbesondere mit PLGA erzielt (Chalfoun et al. 2006). PLGA besitzt zusätzliche attraktive Eigenschaften: Die Degradation ist durch die Variation des Molekulargewichts, das Copolymerverhältnis und die Kristallinität kontrollierbar. Außerdem kann das Polymer einfach zu vielfältigen makroskopischen Strukturen verarbeitet werden (Sanghvi et al. 2004).

Aber auch andere bioabbaubare Polyester wie Polycaprolactone (PCL) wurden bereits erfolgreich in Form von NGCs eingesetzt (Sanghvi et al. 2004; Schmidt and Leach 2003). Auch hier wird in der Regel das Copolymer mit Polymilchsäure (poly(lactide-caprolactone)) favorisiert (Jansen et al. 2004), weil aus dem Copolyester maßgeschneiderte Eigenschaften erhalten werden können (Ciardelli and Chiono 2006).

Neben diesen populären Polymeren zeigten in weiteren Studien auch Polyurethane (Soldani et al. 1998) und Eudragite[®] (Belkas et al. 2005) vielversprechende Kapazitäten für den Einsatz in der peripheren Nervenregeneration. Darüber hinaus wurden diverse Fabrikationstechniken mit etablierten Polymeren für die Herstellung der dreidimensionalen Röhren, Matten und Fasern entwickelt und getestet. Auch hiermit können neue, attraktive Materialeigenschaften generiert werden (Huang and Huang 2006). Ebenso gibt es vielfältige Ansätze, tubuläre Leitschienen mit intraluminaren Gerüstmatrizes zu verbinden (Bini et al. 2005; Cai et al. 2005; Huang and Huang 2006; Zhang et al. 2005), um ein gesteigertes gerichtetes Axonwachstum entlang des intraluminaren Gerüsts zu erzielen.

Trotz all der vielversprechenden Ergebnisse ist dieser biotechnologische Ansatz jedoch lange nicht optimiert (Wen and Tresco 2005) und es müssen verschiedene Lösungsansätze miteinander verbunden werden, um ein artifizielles Gewebe mit bioidentischen Eigenschaften zu generieren (Schmidt and Leach 2003).

3.4.3 Natürliche Materialien

Natürliche Polymere sind gegenüber den synthetischen Materialien vor allem auf Grund der hohen Biokompatibilität von Vorteil. Darüber hinaus fördern sie die Migration von Stützzellen und verhindern das Auftreten von toxischen Nebeneffekten und bauen sich in einer angemessenen Zeit ab (Ciardelli and Chiono 2006; Sanghvi et al. 2004). Aus den verschiedenen natürlichen Polymeren werden insbesondere Moleküle der EZM für die Nervenregeneration gewählt (Ciardelli and Chiono 2006; Schmidt and Leach 2003). Bestandteile der neuralen EZM sind z.B. Kollagen IV und Laminin, die von Schwann Zellen

produziert werden (Martini 1994; Rutka et al. 1988). Bei dem Einsatz von Konstrukten aus Kollagen, Fibronectin und Laminin konnten zahlreiche vielversprechende Resultate im *Tissue Engineering* peripherer Nerven erzielt werden (Bellamkonda and Aebischer 1994; Chalfoun et al. 2006; Huang and Huang 2006; Schmidt and Leach 2003), da sie auch physiologisch eine bedeutende Rolle in axonaler Entwicklung und Wiederherstellung spielen (Bunge et al. 1989; Grimpe and Silver 2002; Hirvonen et al. 1996; Rutishauser 1993; Tona et al. 1993). Charakteristisch für einige EZM Moleküle wie eben Kollagen, Fibronectin und Laminin ist, dass sie RGD-Sequenzen (L-Arginin, L-Glycin, L-Asparaginsäure, L-Sericin) beinhalten, die bei der Zelladhäsion eine Rolle spielen (Ciardelli and Chiono 2006).

Laminin ist das erste exprimierte EZM Protein während der Embryogenese und verfügt über verschiedene Bindungsdomänen für Zellen (Ciardelli and Chiono 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass Spuren von Laminin wachsende Neuriten lenken, während eine Schicht aus Laminin das Auswachsen von Neuriten fördert (Kato et al. 2002; Shin et al. 2003). Auch Fibronectin konnte eine Rolle bei der Förderung von axonalem Wachstum und Zellmigration zugeordnet werden (Zhang et al. 2003; Zhang et al. 2005). Kollagen zeigt im Allgemeinen eine sehr schwache antigene Aktivität und eine gute Haftfähigkeit für verschiedene Zelltypen. Letzteres fördert die lange Überlebensfähigkeit von Zellen und unterstützt Proliferation sowie Angiogenese (Chi et al. 1993).

Es gibt viele Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der EZM Moleküle Kollagen (Itoh et al. 2002; Phillips et al. 2005; Yoshii et al. 2001), Fibronectin (Ahmed and Brown 1999; Whitworth et al. 1995) und Laminin (Itoh et al. 2003; Kauppila et al. 1993; Yu and Bellamkonda 2003) in der peripheren Nervenregeneration (Chen et al. 2000; Tong et al. 1994). Dabei wurden verschiedenen Herstellungsmethoden, Formen und Modifikationen angewandt. So wurden beispielsweise Silikonröhren, die zu den nicht bioabbaubaren, synthetischen Materialien zählen, mit Laminin, Fibronectin und Kollagen gefüllt (Chen et al. 2000); Fibronectinmatten wurden zur Überbrückung von Nervendefekten eingesetzt (Whitworth et al. 1995); und Kollagenfäden zeigten einen Vorteil bei der Regeneration von peripheren Nerven in Ratten (Yoshii et al. 2002).

Auch bei den natürlichen Materialien zeigte sich, dass sowohl die Herstellungsmethode als auch die dreidimensionale Struktur den Regenerationserfolg beeinflussen können (Harley et al. 2006; Wen and Tresco 2005; Zhang et al. 2005). Darüber hinaus fokussieren sich einige Forscher auf etablierte Materialien, die sie chemisch, biochemisch oder zellulär mit Wachstumsfaktoren, aktiven Faktoren, Proteinen oder genetisch veränderten Zellen

modifizieren, um eine Verbesserung der Regeneration zu erhalten (Haastert et al. 2005; Saltzman and Olbricht 2002).

Neben diesen drei etablierten EZM Molekülen zum Einsatz in der peripheren Nervenregeneration wurden vereinzelt auch andere natürliche Polymere getestet. So untersuchten Seckel et al. den Einfluss von Hyaluronsäure auf die periphere Nervenregeneration (Seckel et al. 1995), Hashimoto et al. setzten Alginate ein und konnten ein beschleunigtes distales Axonwachstum nachweisen (Hashimoto et al. 2002) und Ahmed et al. zeigten, dass Fibrinogen die Zellmigration bei der Regeneration beschleunigt (Ahmed et al. 2000).

3.5 Kollagen

Wie bereits beschrieben, gehört Kollagen zu den Bestandteilen der EZM und wird von den Zellen des jeweiligen Binde- und Stützgewebes selbst produziert und sezerniert, um dem Gewebe ein dreidimensionales Gerüst für optimale Stabilität und Funktionalität zu verleihen (Vlakh et al. 2005). Im Gegensatz zur amorphen Grundsubstanz der EZM gehört Kollagen zu den geformten Extrazellulärsubstanzen bzw. Bindegewebsfasern. Die Kollagenfasern kommen nahezu überall im Körper vor (Thews et al. 1999). So kennt man sie vor allem als den organischen Anteil von Knochen und Knorpel sowie als Hauptbestandteil von Bändern, Sehnen und Haut (Gütt 2003). Aber auch die EZM von peripheren Nerven besteht zu einem guten Teil aus Kollagen, das von den die Axone umgebenden Schwann Zellen sezerniert wird (Huang and Huang 2006). Auf Grund der ungewöhnlichen Struktur sind Kollagenfasern ausgesprochen zugfest und nicht dehnbar (Thews et al. 1999). So tritt die Aminosäuresequenz Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (G-X-Y) besonders häufig auf und jede dritte Aminosäure ist stets das Glycin (Ricard-Blum and Ruggiero 2005). Die helikal aufgebauten Polypeptidketten des Kollagens bilden untypischerweise eine linksgängige Tripelhelix. Stabilität erhält die Helix durch Ausbildung von intramolekularen Wasserstoffbrücken zwischen Prolin- und Hydroxyprolinmolekülen. Drei dieser Helizes schlingen sich zudem umeinander und bilden eine rechtsgängige Superhelix (Groß 2001; Ottani et al. 2001). Diese dichte Wicklung ist ausschlaggebend für die hohe Zugfestigkeit von Kollagenfasern. Eine Vielzahl von Kollagen-Typen wird unterschieden, zurzeit sind 28 verschiedene Typen bekannt.

Wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben ist Kollagen eins der etabliertesten natürlichen Biomaterialien, die im *Tissue Engineering* und im Besonderen in der Regeneration peripherer Nerven verwendet werden (Schmidt and Leach 2003). In letzterem Fall sind besonders die mechanische Stabilität des Materials, die gute Zelladhäsion (Ahmed and Jayakumar 2005; Chi et al. 1993) und die strukturgebende Komponente (Meek et al. 2002; Phillips et al. 2005;

Yoshii et al. 2002) die entscheidenden Kriterien im Vergleich zu anderen natürlichen Biomaterialien. Aber auch bei der Verwendung von Kollagen zur Überbrückung von Nervendefekten muss trotz der guten Eignung und besten Biokompatibilität festgestellt werden, dass die Standardtherapie der Transplantation autologer Nerven weiterhin die Methode der Wahl darstellt. Nur eine Kombination vieler Eigenschaften (siehe Abbildung 5 Seite 13) kann zu einem idealen Nervenkonstrukt führen (Stang et al. 2005).

3.6 Spinnenseide

Intraluminare Röhren werden als ein Baustein eines idealen NGC beschrieben (siehe Abbildung 5) (Hudson et al. 1999) und haben sich auch in Form von PLA- oder Kollagenfasern bewährt (Yoshii et al. 2001). Damit bietet sich auch die Verwendung natürlicher Fasern, wie Spinnenseide, an. Sie vereint alle Anforderungen, die an Biomaterialien im *Tissue Engineering* gestellt werden (Altman et al. 2003): Spinnenseide ist biokompatibel und langsam (über ca. 1 Jahr) bioabbaubar (Horan et al. 2005), sie fördert die Zelladhäsion und -spreitung. Insbesondere passend für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven ist die hohe Stabilität bei gleichzeitiger Elastizität des Spinnenseidenfadens (Altman et al. 2003; Römer and Scheibel 2007).

Seiden werden generell als Proteinpolymere definiert, die von Spinnentieren (Arachnida), einigen Tausendfüßlern und Insekten, darunter der Schmetterling und bekannteste Seidenspinner *Bombyx mori*, produziert werden. Sie unterscheiden sich grundlegend in Zusammensetzung, Struktur und Eigenschaften entsprechend der speziellen Quelle (Altman et al. 2003), sind aber typischerweise faserförmige Biopolymerfilamente oder Fäden mit einem Durchmesser von einigen hundert Nanometern bis zu 50 μm (Vollrath 1999). Die Biosynthese der Seidenproteine erfolgt üblicherweise in den Epithelzellen spezialisierter Drüsen, die die Seidenproteine in das Lumen der Drüsen sekretieren. Dort werden die Proteine in flüssiger Form gespeichert, bevor sie bei der Sekretion aus den Drüsen zu Fasern gesponnen werden (Altman et al. 2003). Am besten charakterisiert sind die Seide vom Seidenwurm *Bombyx mori* und die Spinnenseide der großen Radnetzspinne (Gattung *Nephila*).

Charakteristisch für faserförmige Proteine wie Seide aber auch das in Abschnitt 3.5 beschriebene Kollagen ist die hochrepetitive Primärsequenz (Römer and Scheibel 2007), die zu einer signifikanten Homogenität in der Sekundärstruktur führt: Dies sind vor allem tripelhelikale Strukturen im Falle der Kollagene und β -Faltblätter im Falle der meisten Seiden (Altman et al. 2003; Craig 1997). Es resultieren außergewöhnliche mechanische Eigenschaften, die diese Familie der Strukturproteine als Biomaterialien für das *Tissue Engineering* prädestinieren. So vereinen Seiden eine außergewöhnliche Kombination aus

Festigkeit und Belastbarkeit. Darüber hinaus sind sie biokompatibel, leicht modifizierbar durch Funktionalisierung mit Wachstumsfaktoren und anderen aktive Molekülen und es besteht die Option, die Sequenz genetisch maßzuschneidern (Altman et al. 2003).

Die Seide des Seidenwurms *Bombyx mori* wurde bereits seit Jahrhunderten als Nahtmaterial genutzt. Da jedoch im Verlauf der vergangenen 20 Jahre immer wieder von Biokompatibilitätsproblemen berichtet wurde, ist die Nachfrage nach diesen Nahtmaterialien stark zurückgegangen (Altman et al. 2003). Die Seidenfäden des Seidenwurms bestehen aus zwei Proteinen: Zwei innere Fasern aus Fibroin umgeben von einem Mantel aus Sericin (leimartiges Protein). Fibroin ist das strukturgebende Protein und besteht aus einer leichten und eine schweren Aminosäurekette von 25 bzw. 325 kDa Molekulargewicht, die über eine Disulfidbrücke am C-Terminus beider Proteine verknüpft sind (Tanaka et al. 1999). Aus heutiger Sicht lassen sich die geschilderten Probleme der Biokompatibilität auf den Sericinanteil in den verwendeten Materialien zurückführen. In Publikationen mit definiert gereinigten Fäden ohne Sericin konnten keine Schwierigkeiten mit Bioinkompatibilität und Hypersensitivität gegenüber der eingesetzten Seide festgestellt werden (Kim et al. 2005).

Die Seidenfäden einer höher entwickelten Spinne unterscheiden sich entsprechend ihrer Funktion im Netz oder im täglichen Einsatz (Römer and Scheibel 2007). Bis zu sieben verschiedene Seidentypen können synthetisiert werden, wobei jeder Typ eine andere Aminosäuresequenz und -zusammensetzung hat und entsprechend unterschiedliche mechanische Eigenschaften aufweist (Altman et al. 2003; Hu et al. 2006).

Auch die Seide des Fallfadens von *Nephila* besteht in der Regel aus zwei Einzelfäden (Gosline et al. 1986). Das Molekulargewicht der Spinnenseidenproteine variiert stark zwischen 70 bis zu 700 kDa und ist nicht allein abhängig von der Spinnenart (Altman et al. 2003), sondern ebenso vom Tier, seinem Alter bzw. Entwicklungsstadium, seiner Ernährung und sogar von Umgebungsparametern wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit (Craig et al. 2000; Madsen et al. 1999; Zhou et al. 2000). Der Fallfaden von *Nephila clavipes* besteht charakteristischerweise aus Poly-L-Alanin Abschnitten und GGX-Regionen, wobei X in der Regel Tyrosin, Glutamin oder Leucin ist (Altman et al. 2003). Auch hier ist die Sekundärstruktur des β -Faltblatts maßgeblich für die enorme (Zug-)Festigkeit und Stabilität der Seide verantwortlich (Campbell and Reece 2003). In jedem Fall fehlt der Spinnenseide das leimartige Protein, was beim Seidenfaden der Seidenraupe zu Bioinkompatibilitäten führt und vor dem Einsatz in der Medizin aufwendig entfernt werden muss (Altman et al. 2003). Der Fallfaden von *Nephila clavipes* zeigte tatsächlich in der Zellkultur keinen allergischen Effekt (Allmeling et al. 2006). Darüber hinaus ist das Interesse an Spinnenseide in den letzten

Jahren vor allem wegen seiner sich von allen anderen Seiden unterscheidenden mechanischen Eigenschaften gewachsen (Meier 2001). Das herausragende Unterscheidungsmerkmal gegenüber Seide der Seidenraupe und allen anderen Biomaterialien ist die hohe Belastbarkeit und Zugfestigkeit in Kombination mit exzellenter Elastizität (Altman et al. 2003; Römer and Scheibel 2007). Bisher wird die Seide jedoch nicht kommerziell in der Biomedizin angewandt. Dies ist auf die geringen Produktionsmengen im Vergleich zum Kokon des Seidenspinners zurückzuführen (Allmeling et al. 2006). Mit Hilfe des genetischen Engineerings wird daher vermehrt versucht, diese limitierte Verfügbarkeit zu überwinden (Altman et al. 2003). So wurden Seidengene von Spinnen bereits in das Genom von *Escherichia coli* eingebracht (Arcidiacono et al. 1998). Die Proteine konnten jedoch nicht vollständig exprimiert werden. Auch Pflanzen wie z.B. Tabak und Kartoffeln (Hood and Jilka 1999; Scheller et al. 2001) und schließlich auch Säugertierzellen (Lazaris et al. 2002) wurden für die Produktion von Spinnenseide getestet. In den Pflanzen und Säugertierzellen werden die Proteine korrekt exprimiert und es gelang sogar, Fasern aus den löslichen Proteinen zu spinnen (Lazaris et al. 2002). Allerdings konnten die außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften der nativen Spinnenseidenfäden nicht erreicht werden.

Die Applikation von Spinnenseide im *Tissue Engineering* ist noch jung. Aufgrund der beschriebenen herausragenden Eigenschaften der Spinnenseide gewinnt sie jedoch immer mehr Bedeutung. Vor allem wenn mechanische Leistungs- und Widerstandsfähigkeit sowie ein langfristiger Abbau benötigt werden, bietet Spinnenseide eine große Vielseitigkeit für das Design von geeigneten Grundgerüsten auf verschiedensten Gebieten des *Tissue Engineerings*. Da sie zudem problemlos zu Filmen, Schäumen und Netzen hergestellt werden kann, stellt sie eine echte Alternative zu etablierten Biomaterialien dar (Altman et al. 2003; Wang et al. 2006). So konnten Spinnenseidenfäden bereits erfolgreich in der Zellkultur bei der Regeneration von Knochen eingesetzt werden (Sofia et al. 2001). Des Weiteren wurde Spinnenseide in Form von intraluminären Röhren in einen NGC eingefügt und in der Zellkultur getestet (Allmeling et al. 2006). Als Konduit wurden xenogene (Schwein), dezellularisierte Venen verwendet, die im Inneren von Seidenfäden durchzogen waren und zusätzlich mit einer Mischung aus Schwann Zellen und Matrigel[®] aufgefüllt wurden. Es bildeten sich *in vitro* Zellsäulen aus, die mit den *Büngner'schen Bändern* vergleichbar sind.

3.7 Bioreaktoren im *Tissue Engineering*

Typischerweise werden im *Tissue Engineering* geeignete Zellen in porösen, bioabbaubaren und biokompatiblen Matrices, die ein Gerüst für die Entwicklung des entsprechenden Gewebes bieten, immobilisiert und kultiviert. Dies wird in der Forschung in der Regel in

sterilen Einweg-Lochplatten oder Petrischalen durchgeführt (statische Kultivierung). Dieser Forschungsmaßstab muss jedoch zwangsläufig in einen Großmaßstab überführt werden, wenn es zu einer kommerziellen und medizinischen Anwendung gelangen soll. Ziel bei diesem Scale-up muss es sein, biologisch funktionelle Gewebe zu generieren, die reproduzierbar, sicher und ökonomisch konkurrenzfähig hergestellt werden (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005; Chen and Hu 2006; Martin et al. 2004; Portner et al. 2005). Dies kann nur mit der Kultivierung der besiedelten Matrices (Scaffolds) in einem geeigneten 3D-Bioreaktor, der dynamische Kultivierungsbedingungen für das Gewebewachstum gewährleistet, erreicht werden (Chen and Hu 2006). Dabei gibt es verschiedene Motivationen, einen Bioreaktor zur Züchtung von künstlichem Gewebe anzuwenden und zu entwerfen: Zunächst nutzt man sie, um dreidimensionale Gewebe wie Haut, Knorpel, Knochen u.a. im Vorfeld einer Transplantation in den Menschen zu züchten. Diese Funktion eines Bioreaktors soll auch hier im Vordergrund stehen. Bioreaktoren werden darüber hinaus jedoch für die Expansion von Zellen (z.B. hämatopoetische Zellen, Stammzellen) zur Transplantation benötigt. Außerdem können Bioreaktorsysteme zur Unterstützung von Organfunktionen z.B. in Form einer extrakorporalen Leber genutzt werden. Aber auch für diverse medizinische, biochemische und pathologische Fragestellungen wird der Bioreaktor als ein großes, realistischeres Testsystem genutzt. (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005; Portner et al. 2005)

Über den geringen Maßstab der statischen Kultivierung hinaus bestehen weitere Probleme, die durch eine dynamische Kultivierung im Bioreaktor gelöst werden sollen. Die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung durch reine Diffusion führt bei der statischen Kultivierung von Scaffolds für das *Tissue Engineering* häufig zu einer Grenzschichtbildung des nicht durchmischten Mediums. Dies resultiert in einer stagnierenden Zellschicht auf der Oberfläche der Matrix (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005; Chen and Hu 2006; Portner et al. 2005). Resultierend aus der Versorgungsproblematik im Inneren der Matrix findet nur eine mangelhafte Zellmigration hierhin statt (Ishaug et al. 1997; Martin et al. 1999), die einen Mantel aus Zellen um das Äußere der Matrix herum zur Folge hat. Es erfolgt also keine erwünschte und durch die Matrix vorgegebene, gleichförmige Gewebebildung durch eine dreidimensionale Zellbesiedlung der Matrix (Chen and Hu 2006).

Ein idealer Bioreaktor soll demnach eine *in vitro*-Umgebung bereitstellen, die die *in vivo*-Bedingungen imitiert (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005; Chen and Hu 2006). Vor allem eine ausreichende und effiziente Sauerstoff- und Nährstoffversorgung muss überall im Konstrukt gewährleistet sein (Bilgen et al. 2006; Chen and Hu 2006). Im Hinblick auf optimale Reproduzierbarkeit sollte der Bioreaktor eindeutig definierte Kultivierungsbedingungen bereit

stellen. Darüber hinaus besteht in der Forschung der Konsens, dass mechanische Belastung die Gewebeherstellung *in vitro* verbessert bzw. beschleunigt (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005; Chen and Hu 2006; Portner et al. 2005). So kann durch Anwendung von mechanischer Stimulation (z.B. mechanische Kompression, hydrodynamischer Druck, Flüssigkeitsstrom) die Aktivität, Differenzierung und Funktion der Zellen gelenkt werden (Chen and Hu 2006). Beispielsweise fördert Scherbeanspruchung erwiesenermaßen die Synthese von EZM (Bilgen et al. 2006). Scherbeanspruchung durch Flüssigkeitsfluss über die Oberfläche und in die Poren der Matrices wird dabei als der wichtigste mechanische Stimulus angesehen (Chen and Hu 2006) und daher auch am häufigsten eingesetzt (Vance et al. 2005).

Ein ideales Reaktor-Design ist abhängig vom zu kultivierenden Gewebe, das heißt es werden je nach Zielgewebe spezielle Anforderungen an den Bioreaktor gestellt (Chen and Hu 2006). Darüber hinaus ist die robuste Kontrolle kritischer Parameter unerlässlich in Bezug auf Kultivierungskontrolle und Reproduzierbarkeit. Als kritische Parameter sind vornehmlich der pH-Wert, die Temperatur sowie der Sauerstoff- und CO₂-Gehalt aber auch der Nährstofftransport, die Beseitigung toxischer Metabolite und die Kontinuität einer sinnvollen Scherbeanspruchung zu kontrollieren (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005; Portner et al. 2005). So wurde zum Beispiel nachgewiesen, dass der Sauerstoffgehalt einen Einfluss auf die Produktion der EZM und damit auf die Stabilität und Funktionalität des künstlichen Gewebes hat (Chen and Hu 2006). Idealerweise sind außerdem alle Arbeitsabläufe (Probenahme, Mediumwechsel etc.) ohne größeren Aufwand unter Beibehaltung der Sterilität möglich (Portner et al. 2005).

3.7.1 Spinnerflaschen

Der einfachste Bioreaktor zur dynamischen Kultivierung von artifiziellem Gewebe ist die Spinnerflasche. Dabei wird grundsätzlich das Medium mit einem Magnetrührkern kontinuierlich vermischt (Abbildung 6). Ein üblicher Ansatz ist es, die Scaffolds an Nadeln zu fixieren, die senkrecht in das Medium eintauchen (Freed and Vunjak-Novakovic 1997; Portner et al. 2005). Das genaue Flussfeld in einer solchen Konstruktion haben Sucosky u.a. (Sucosky et al. 2004) untersucht. Im Vergleich zur statischen Kultivierung erreicht man eine gut durchmischte Umgebung der Zellen, die in einer Minimierung der stagnierenden Zellschicht auf der Oberfläche der Matrix resultiert (Carrier et al. 1999; Freed and Vunjak-Novakovic 1997). Dies wurde bereits am Beispiel von Knorpelgewebe erfolgreich gezeigt (Gooch et al. 2001). Gleichzeitig bewirkt die Durchmischung des Mediums eine gezielte hydrodynamische Beeinflussung der Zellen. Diese mechanische Stimulation konnte die EZM-Abscheidung steigern und damit die Funktionalität des Implantats unterstützen (Bueno et al.

2005). Auch ein erhöhter Sauerstoffaustausch in den Scaffolds konnte erzielt werden (Kellner et al. 2002). Allerdings besteht bei den Spinnerflaschen die Gefahr, dass es zu turbulentem Mediumfluss kommt und dadurch die Scherbeanspruchung für die Zellen zu hoch wird (Bueno et al. 2005). Dieses sehr einfache Design ist jedoch trotzdem der statischen Kultivierung signifikant überlegen (Bueno et al. 2005; Chen and Hu 2006; Freed and Vunjak-Novakovic 1997).

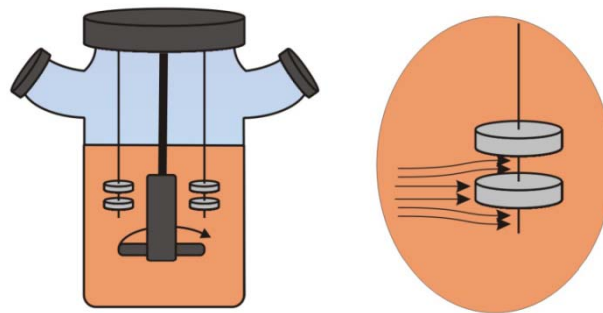


Abbildung 6: Spinnerflasche zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Martin et al. 2004)

Eine enge Weiterentwicklung der Spinnerflasche ist der *wavy-walled Bioreaktor* (Abbildung 7a). Durch seine gewellten Seitenwände wird eine Verbesserung der axialen Durchmischung bei geringerer Scherbeanspruchung erzielt (Bilgen et al. 2006; Bueno et al. 2005). Auch der *Rotating wall vessel Bioreaktor* (Abbildung 7b) erreicht diese Verbesserung. Als zusätzliche mechanische Stimulation fungiert hier außerdem die Zentrifugalkraft, die auf die Scaffolds im freien Fall wirkt. Die Regelung der Zentrifugalkraft kann durch die Einstellung der Rotationsgeschwindigkeit des Zylinders erfolgen (Freed and Vunjak-Novakovic 1995; Ratcliffe and Niklason 2002). Beide Systeme konnten bereits erfolgreich bei der Kultivierung von Knorpelgewebe eingesetzt werden (Bueno et al. 2005; Chen and Hu 2006).

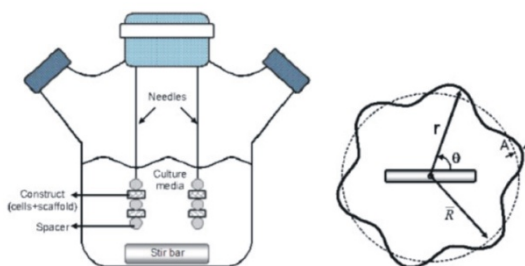


Abbildung 7a: *Wavy-walled Bioreaktor* zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Bilgen et al. 2006)

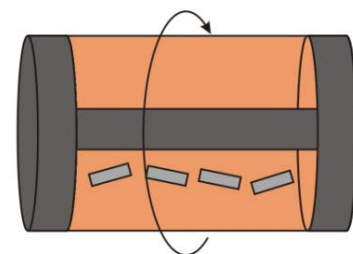


Abbildung 7b: *Rotating wall vessel Bioreaktor* zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Martin et al. 2004)

3.7.2 Perfusionssysteme

Ein weit verbreitetes Bioreaktor-Design für das *Tissue Engineering* ist das Perfusionssystem. Dabei werden die besiedelten Matrices in Kammern, Säulen oder Kartuschen überführt und fixiert. Durch eine peristaltische Pumpe wird das Medium gleichmäßig durch das Kulturgefäß und damit unausweichlich auch durch das Scaffold gepumpt (Abbildung 8).

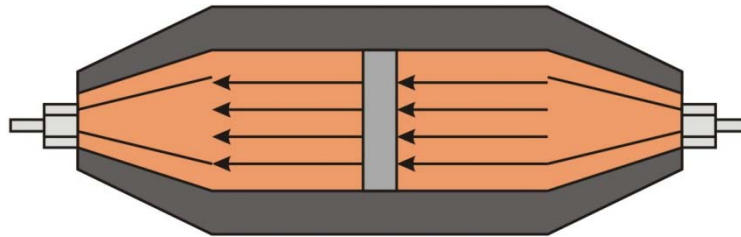


Abbildung 8: Perfusionssystem zu Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. (Martin et al. 2004).

Der Mediumfluss durch die Poren der Matrix begünstigt die Zelldifferenzierung durch den verbesserten Nährstoff- und Sauerstofftransport in das Innere der Matrix (Holtorf et al. 2005; Kim et al. 2000). Gleichzeitig sorgt er für eine mechanische Stimulation der Zellen (Bilgen et al. 2006; Holtorf et al. 2005). Durch die gleichbleibende Flussrichtung über den kompletten Kultivierungszeitraum erreicht man darüber hinaus eine Ausrichtung der Zellen (i.d.R. senkrecht zum Fluss) (Chen and Hu 2006). Diese Vorteile von Perfusionssystemen konnten bereits erfolgreich anhand der Kultivierung von Knorpel und Knochengewebe gezeigt werden (Chen and Hu 2006; Holtorf et al. 2005).

Trotz vielversprechender Ansätze ist der optimale Bioreaktor zum Einsatz im *Tissue Engineering* noch nicht entwickelt worden. Da viele komplexe Faktoren die Gewebebildung beeinflussen, ist auch das Bioreaktor-Design sehr anspruchsvoll. Zum Beispiel ist man sich zwar der Bedeutung von Scherbeanspruchung bewusst, eine optimale Belastung (Frequenz, Stärke etc.) konnte jedoch noch nicht gefunden werden (Martin et al. 2004). Die Entwicklung potenter 3D-Bioreaktoren befindet sich also noch am Anfang (Portner et al. 2005).

Die vorgestellten Reaktorsysteme wurden vor allem für die Regeneration von Knochen- und Knorpelkonstrukten entwickelt und auch mit diesen Systemen getestet (Chen and Hu 2006). Da ein Reaktor speziell auf sein Zielgewebe ausgelegt sein muss, sind die Ergebnisse nicht vollständig auf den Nerven übertragbar. Für die periphere Nervenregeneration selbst wurden noch keine Bioreaktoren oder Anwendungen in der Literatur beschrieben.

4. Experimenteller Teil

Zielsetzung

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau eines geeigneten Screening Systems für Konstrukte aus Biomaterialien zur Regeneration peripherer Nerven. Angesichts einer Vielzahl von in der Literatur getesteten Konstrukten war es das Ziel, eine reproduzierbare und schnelle Beurteilung von Materialien und ihren Modifikationen *in vitro* nach klar definierten Kriterien zu ermöglichen. Dazu wurden zunächst Referenzmaterialien und Assays für das mehrstufiges Testsystem definiert und etabliert, die Referenzmaterialien entsprechend kultiviert und getestet, um schließlich Entscheidungskriterien für Testmaterialien abgrenzen zu können. In das Screening System wurden auch verschiedene Modifikationen einer etablierten Kollagenmatrix eingespeist und auf ihre Eignung als Biomaterialien für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven getestet. Alternativ zu den Kollagenmatrizes wurden außerdem Fasern in Form von nativer Spinnenseide getestet. Als wichtiges Bewertungskriterium wurden hier zusätzlich die mechanischen Eigenschaften der verwendeten Seidenfäden untersucht. Einige der Arbeiten mit den Kollagenmatrizes und der Spinnenseide wurden zusammen mit einer Diplom- bzw. Masterarbeit durchgeführt. Für ausgewählte Materialien sieht das Screening System abschließend eine dynamische Kultivierung vor, um so den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen. Daher wurden eine modifizierte Spinnerflasche und ein Perfusionssystem entworfen und optimiert.

4.1 Entwicklung eines Screening Systems für die iterative Testung von Biomaterialien

Wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, wurden bereits diverse Materialien in der peripheren Nervenregeneration vornehmlich als NGC getestet (Bryan et al. 2004). Trotz vielversprechender Ansätze und einem offensichtlichen großen Potential, besteht weiterhin immenser Optimierungsbedarf (Wen and Tresco 2005). Die Methode der Wahl bleibt nach wie vor die Transplantation autologer Nerven (Cai et al. 2005; Ciardelli and Chiono 2006; Schmidt and Leach 2003), da bisher keine bioidentischen Gewebekonstrukte beschrieben werden konnten (Svensson et al. 2005). Tatsächlich ist man sich einig, dass nur die Kombination der verschiedenen erfolgversprechenden Lösungsansätze zu einem idealen Nervenkonstrukt, wie es Hudson et al. beschreiben, führen kann (Hudson et al. 1999; Stang et al. 2005).

So konzentrieren sich viele Forscher auf bereits etablierte und vielversprechende Materialien, die sie versuchen, durch chemische oder physikalische Modifikationen (z.B. Veränderung der

dreidimensionalen Struktur, Porosität, Oberflächenstruktur, Maße, Herstellungstechnik etc.) und Funktionalisierung mit bioaktiven Substanzen zu verbessern (Chalfoun et al. 2006). Während so einer Materialoptimierung entstehen zahlreiche Materialien, Zwischenprodukte und Modifikationen, die gegeneinander verglichen und in Bezug auf die Verbesserung gegenüber ihrem Ausgangsmaterial beurteilt werden müssen. Für einen derart hohen Materialdurchsatz wird daher ein effizientes Screening System benötigt, um möglichst viele Materialien parallel und unter gleichbleibenden Bedingungen testen zu können.

Im Folgenden wurde ein solches Screening System für Konstrukte aus Biomaterialien zur Regeneration peripherer Nerven entwickelt. Im Screening System sollten eine Vielfalt von harten oder weichen, synthetischen oder natürlichen, elastischen oder unelastischen Konstrukten getestet werden. Ziel war die reproduzierbare und schnelle Testung von Biomaterialien *in vitro*. Besonders Modifikationen und optimierte Materialien sollten schnell und unter einheitlichen Bedingungen iterativ auf ihre Eignung in der Zellkultur von Nervenzellen beurteilt werden können. Für ausgewählte Materialien sollte eine dynamische Kultivierung abschließend eine Annäherung an die *in vivo* Bedingungen ermöglichen und damit einen nahtlosen Übergang zu *in vivo* Tests sinnvoll machen. Ziel des Screening Systems war somit die Evaluation von Biomaterialien, ihre schnelle Optimierung und die Vermeidung kostenintensiver *in vivo* Tests mit unzureichend getesteten Materialien.

4.1.1 Modellzelllinien

Um eine schnelle, parallele Testung der Biomaterialien *in vitro* zu ermöglichen, wurden Modellzelllinien gewählt. Zelllinien erlauben gegenüber Primärzellen eine Kultivierung unter einheitlichen, standardisierten und kontrollierten Bedingungen. Darüber hinaus zeigen sie höhere, fast uneingeschränkte Proliferationsraten, was einen hohen Materialdurchsatz im Screening System erst möglich macht. Nur für ausgewählte Materialien ist eine erweiterte *in vitro* Testung mit Primärzellen zweckmäßig.

Für das Screening von Biomaterialien für den Einsatz in der peripheren Nervenregeneration wurden Hep-G2, PC-12 und immortalisierte Schwann Zellen (ISC) eingesetzt (Anhang 6.3). Dabei sollte mit Hilfe der Modell Leber Zelllinie Hep-G2 die Biokompatibilität der Materialien untersucht werden, da sie ein etabliertes System für Biokompatibilitätstestungen sind. Die PC-12 Zellen dagegen sind ein gebräuchliches Modell System für neurobiologische und neurochemische Studien (Greene and Tischler 1976; Oberdoerster et al. 1998) und in der Literatur ausführlich beschrieben (Aykin-Burns et al. 2005). Sie können durch Zusatz von NGF (nerve growth factor) neuronal differenziert werden. NGF bewirkt eine Veränderung in der Genexpression, die sich in der Morphologie der Zellen durch Ausbildung von Neuriten

zeigt. Als weiteres neuronales System mit bereits beschriebener immenser Bedeutung in der Funktionalität und Regeneration peripherer Nerven wurden Schwann Zellen eingesetzt, die zuvor immortalisiert wurden.

4.1.2 Referenzmaterialien

Um die diversen Materialien und ihre Modifikationen nach klar definierten Kriterien vergleichen zu können, wurden Referenzmaterialien ermittelt. Die Materialien sollten dann im Screening Systems zu einer einheitlichen Beurteilung der zu testenden Materialien dienen. Dazu wurde eine Vorauswahl an möglichen Referenzmaterialien getroffen und entsprechend des Screening Systems kultiviert und getestet. Damit im Screening System eine Vielfalt von harten oder weichen, synthetischen oder natürlichen, elastischen oder unelastischen Konstrukten getestet werden können, wurde diese Diversität auch bei der Auswahl der Referenzmaterialien berücksichtigt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Referenzmatrizes für das Screening System von Biomaterialien in der peripheren Nervenregeneration

Referenzmatrizes	Bestandteile	Quelle
Matristypt[®] (MS)	Kollagen I	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG
Matriderm[®] (MD)	Kollagen I + Elastin	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG
Kollagen-Alginat (C-Alg)	Kollagen I + Alginat (10%)	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG
med. Silikon	Harz + Vernetzer (9:1), bei RT vermischt und in eine strukturierte Form gegossen	Wacker Chemie AG
Sponceram[®]-HXA	Hydroxylapatit beschichtete Keramik (ZrO ₂), 600 µm Ø Porengröße	Zellwerk GmbH
Cellulosenitrat	Cellulosenitrat Membran, 0,45 µm Ø Porengröße	Sartorius AG

Wie bereits beschrieben, wurden EZM Moleküle wie Kollagen schon häufig für die periphere Nervenregeneration verwendet (Stang et al. 2005; Yoshii et al. 2001). Bisher werden die hier eingesetzten Kollagenmatrizes Matristypt[®] und Matriderm[®] in der Kosmetik und zur

Wundabdeckung von Brandverletzungen eingesetzt. Silikon-Röhren wurden bereits als NGC eingesetzt (Lundborg et al. 1982) und auch Hydroxylapatit, als körpereigene Substanz, wurde, neben seinem etablierten Haupteinsatz im *Tissue Engineering* von Knochen, auch schon in der Nervenregeneration getestet (Itoh et al. 2003).

4.1.3 Aufbau und Optimierung des Screening Systems

Das optimierte Screening System für Biomaterialien im *Tissue Engineering* peripherer Nerven ist in drei Teile gegliedert. Nach jedem Teilschritt erfolgt eine Beurteilung der zu testenden Materialien. Dies ermöglicht eine direkte Rückkopplung im Optimierungsprozess eines Konstrukts (Abbildung 9).

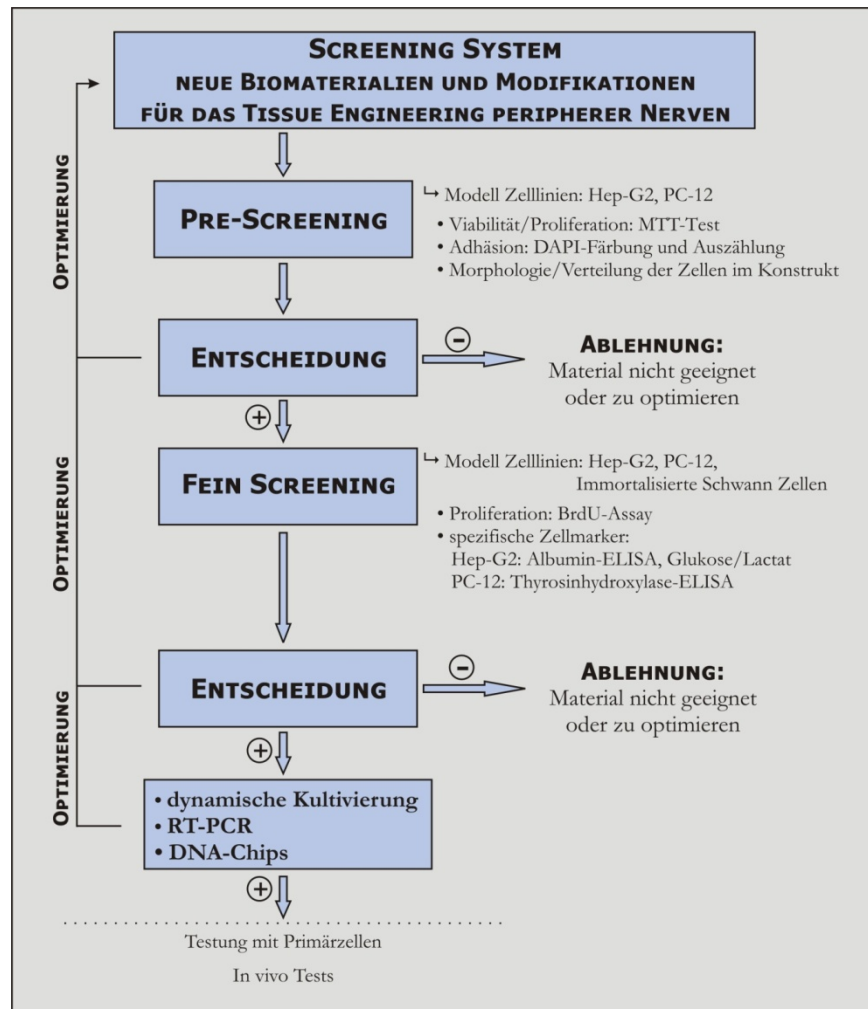


Abbildung 9: Fließschema des iterativen Screening Systems für die Testung von Biomaterialien auf ihre Eignung in der peripheren Nervenregeneration. Überblick über Methoden, Zellmodelle und Zwischenschritte.

Im Pre-Screening werden zunächst die grundlegenden Eigenschaften wie die Viabilität/Proliferation (MTT-Test), die Adhäsion (DAPI-Färbung und Auszählung definierter Bereiche) und die Morphologie und Verteilung der Zellen auf den Matrizes im 96-Well-Format untersucht. Als Basis für ein geeignetes Biomaterial stehen hier auch die Abklärung von Toxizität und Biokompatibilität im Vordergrund (Hep-G2). Hierbei sind durchaus auch toxische Substanzen des Herstellungsprozesses zu berücksichtigen und zu eliminieren. Darüber hinaus sollen die genannten Basiseigenschaften auch mit neuronalen Zellmodellen (PC-12) getestet werden, um eine Eignung für das Zielgewebe sicher stellen zu können. Eine detailliertere Studie unter Hinzunahme der ISC als das entscheidende Zellmodell in der peripheren Nervenregeneration (siehe Abschnitt 3.4.1) ist nur für ausgewählte Matrizes sinnvoll. Im Fein-Screening werden weitreichendere Studien der Zellproliferation durchgeführt (BrdU-Assay). Darüber hinaus kann die Untersuchung von spezifischen Zellmarkern im 96-Well-Format (Albumin-/Thyrosinhydroxylase-ELISA, Neuritenlänge, Glukose/Laktat) detailliertere Informationen über die Eignung der Matrizes geben. Auf der letzten Stufe des Screening Systems werden weiter ausgewählte Matrizes der Kultivierung im Bioreaktor und der Prüfung der Genexpression mittels RT-PCR und DNA-Chips unterzogen. Das Stufensystem erlaubt zum einen eine schnelle Rückkopplung für Herstellungsprozess, Modifikation und Verarbeitung der Matrizes, zum anderen werden zeit- und kostenintensive Tests ausschließlich für ausgewählt Materialien durchgeführt. Der Einsatz dieses Screening Systems verfolgt damit das Ziel, unter ökonomischen Gesichtspunkten die Eignung von Biomaterialien für die periphere Nervenregeneration *in vitro* zu untersuchen, eine schnelle Optimierung der Matrizes zu ermöglichen sowie kostenintensive *in vivo* Tests mit unzureichend getesteten Materialien zu vermeiden.

Das Screening System beinhaltet bekannte und etablierte Assays (siehe Anhang). Ein ELISA zum quantitativen Nachweis von humanem Albumin aus Proteingemischen musste entwickelt werden (Anhang 6.4.9). Die Optimierung dieses ELISA ist im Folgenden dargestellt.

4.1.4 Optimierung eines humanen Albumin-ELISA

Die zur Untersuchung der Biokompatibilität eingesetzte humane Leberzelllinie Hep-G2 sezerniert wie alle Hepatozyten Albumin. Die Quantifizierung des sezernierten Albumins ist ein Maß für die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen (Mundt 2002). Im Rahmen der Betreuung einer Diplomarbeit konnte ein Human-Albumin-ELISA für das Screening System optimiert und etabliert werden (Röker 2006). Im Fein-Screening ist die Untersuchung des spezifischen Zellmarkers vorgesehen, um die Beurteilung der zu testenden Matrizes zu vertiefen. Besondere Herausforderungen bei der Etablierung dieses ELISA waren zum einen

die Quantifizierung direkt aus dem Zellkulturmedium als Proteingemisch und zum anderen der spezifische Nachweis von humanem Albumin ohne Kreuzreaktionen mit Rinder-Albumin aus dem Serum. Aus ökonomischen Gründen wurde zunächst die Verwendung eines direkten ELISA favorisiert (Abbildung 10). Hierbei wird das Antigen direkt an die Platte gebunden, mit einem Antikörper detektiert und über eine Farbreaktion oder eine Fluoreszenzmarkierung quantifiziert.

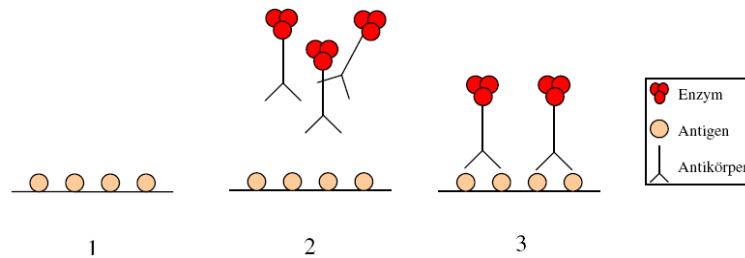


Abbildung 10: Schematisch Darstellung des Ablaufs eines nicht-kompetitiven, direkten ELISA zur Quantifizierung eines Antigens. (Röker 2006)

1. Das Antigen wird an die Platte gebunden; 2. Der markierte Antikörper wird zugegeben; 3. Der gebundene Antikörper wird detektiert.

Es konnte zwar ein reproduzierbares Protokoll etabliert werden (Röker 2006), jedoch funktionierte die Detektion des Antigens nur aus reinen Albuminlösungen. Für Proteinmischungen war der entwickelte direkte ELISA unzureichend und lieferte fehlerhafte Ergebnisse, da die Fremdproteine die unspezifischen Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche belegen konnten. Binden die gebundenen Fremdproteine dann auch noch den Antikörper oder verdrängen den Analyten von der Platte, werden falsche Ergebnisse erzielt. Da die Hep-G2 Zellen nicht serumfrei kultiviert werden konnten, musste für die quantitative Bestimmung von Albumin aus Kulturmedium eine Methode angewendet werden, mit der Albumin aus Proteingemischen bestimmt werden kann.

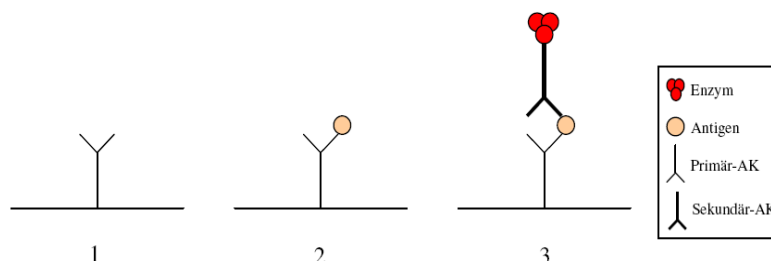


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Ablaufs eines Sandwich-ELISA (Röker 2006)

1. Der *capturing antibody* (nicht markiert) wird an die Oberfläche gebunden; 2. Das Epitop des Antigens bindet spezifisch an das Paratop des Antikörpers; 3. Das Paratop des *detection antibody* (markiert) bindet spezifisch an ein anderes Epitop des Antigens; der immobilisierte AK-AG-AK-Komplex kann quantifiziert werden.

Daher wurde ein Sandwich-ELISA optimiert (Röker 2006), der sich eignet, ein bestimmtes Protein in geringer Konzentration aus einem Proteingemisch nachzuweisen und zu quantifizieren (Lottspeich and Zorbas 1998). Hierbei erfolgt eine spezifische Bindung des Antigens an einen immobilisierten *capturing antibody*. Durch die Spezifität des Antikörpers werden Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen verhindert (Abbildung 11).

Für den Sandwich ELISA wird generell zunächst ein nicht markierter Antikörper (*capturing antibody*) auf der Oberfläche einer 96-Lochplatte immobilisiert, die Platte wird gewaschen und alle freien Bindungsplätze abgesättigt. Das Proteingemisch (Probe) wird aufgetragen, wobei das Albumin an den *capturing antibody* bindet. Abschließend wird das Antigen Albumin mit einem *detection antibody* detektiert.

Nach sorgfältiger Auswahl geeigneter Antikörper mussten daher folgende Parameter optimiert werden:

- Konzentration des *capturing antibody*
- Inkubation des *capturing antibody*
- Inkubation des Antigens
- Blockierungslösung
- Inkubation der Blockierungslösung
- Konzentration des *detection antibody*
- Verdünnung des *detection antibody*
- Inkubation des *detection antibody*
- Inkubation der Substratlösung

Zunächst sollten die optimalen Konzentrationen der Antikörper (Anhang 6.4.9) sowie die Konzentrationsbereiche von Antigen und Antikörper ermittelt werden, die in Kombination die angestrebte Farbintensität im Messbereich liefern (0-100 ng/ml Albumin; Absorptionsmaximum ca. 0,800). Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Stefanie Röker Schachbretttrationen durchgeführt. Dabei wurde das humane Albumin ausgehend von der Konzentration 2 µg/ml spaltenweise 1:1 verdünnt. Der entsprechende Antikörper wurde in vier unterschiedlichen Konzentrationen vertikal aufgetragen. Exemplarisch zeigt Abbildung 12 eine solche Optimierung von Antigen- und Antikörperkonzentration.

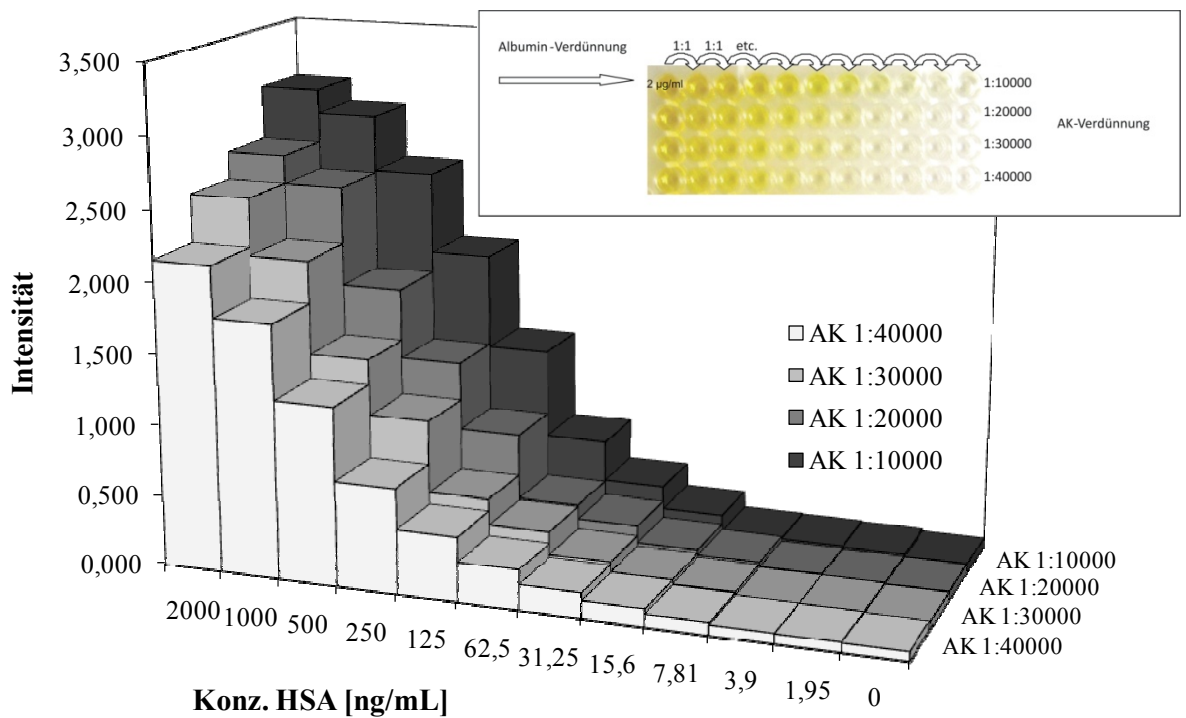


Abbildung 12: Schachbretttitration zur Optimierung von Antigen- und Antikörperkonzentration für eine optimale Auswertung der Farbreaktion. Der gewünschte Messbereich befand sich zwischen 0-100 ng/ml Albumin bei einem Absorptionsmaximum von ca. 0,800. Das Albumin wurde ausgehend von der Konzentration 2 µg/ml spaltenweise 1:1 verdünnt. Der entsprechende Antikörper wurde in vier verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. (Röker 2006)

Nach Durchführung der Schachbretttitrationen und weiterer Optimierung der oben aufgeführten Versuchsparameter konnte ein Protokoll etabliert werden, das reproduzierbare Ergebnisse aus Proteingemischen (hier aus Kulturmedium-Überstand) liefert (Details zur Optimierung aller Parameter: siehe Röker 2006). Das vollständige und etablierte Protokoll ist im Anhang, Kapitel 6.4.9 aufgeführt.

Die Standardreihe in Puffer (reine Albumin-Lösung) sowie die Standardreihe in Kulturmedium (DMEM + 10 % FKS) zeigten unter den optimierten Bedingungen die angestrebte Korrelation zwischen aufgetragener Albumin-Konzentration und erzielter Farbintensität sowie geringe Standardabweichungen (Abbildung 13). Bei der Konzentrationsbestimmung in Proben muss immer parallel eine Standardreihe aufgenommen werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass der Sandwich-ELISA für die quantitative Bestimmung von sezerniertem Human-Albumin in Kulturmedien geeignet ist. Das Protein kann in Konzentration von 0 – 100 ng/ml aus einem Proteingemisch nachgewiesen und zuverlässig

quantifiziert werden. Sogar die Kreuzreaktion mit eng verwandten Proteinen wie dem Rinder Serum Albumin kann durch die Spezifität des Fangantikörpers vermieden werden.

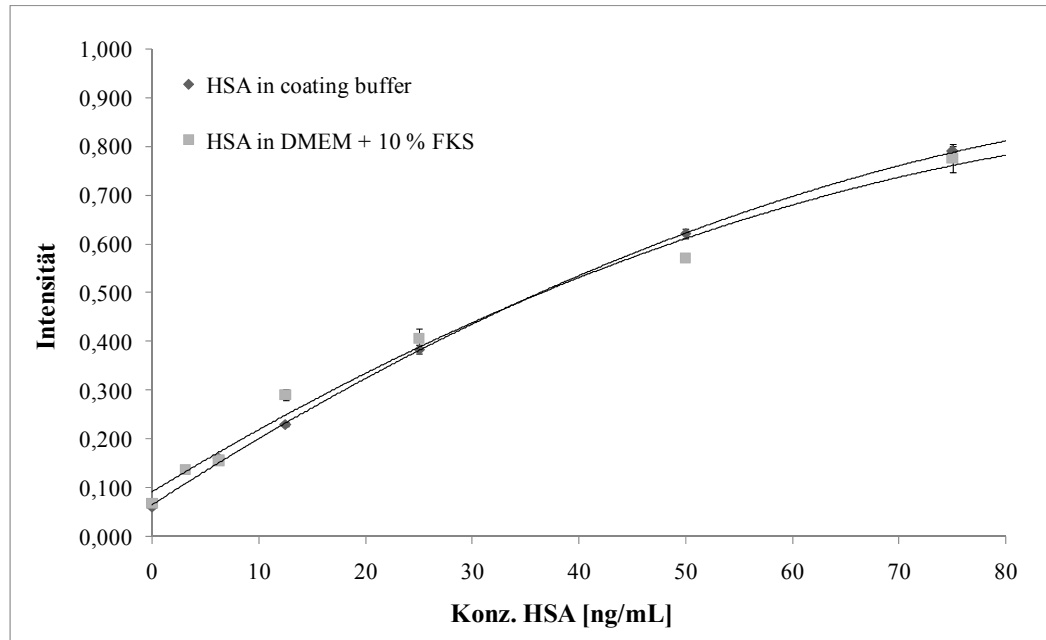


Abbildung 13: Standardreihen des optimierten Sandwich-ELISA: Humanes Serum Albumin (HSA) in DMEM + 10 % FKS, 1:100 mit *coating buffer* verdünnt (hell); HSA in *coating buffer* (dunkel). (Röker 2006)

4.1.5 Kultivierung auf Referenzmaterialien zur Ermittlung der Auswahlkriterien

Nach der Vorstellung des Testsystems (Abschnitt 4.1.3) und der Etablierung des zu entwickelnden Albumin ELISA (Abschnitt 4.1.4) wurden nun die Modellzellen PC-12 und Hep-G2 auf den Referenzmaterialien (siehe Tabelle 1, Seite 27) kultiviert. Ziel war die Festlegung einer Referenzmatrix für jede Zelllinie und die Definition von Auswahlkriterien zur einheitlichen Beurteilung der zu testenden Materialien. Für die Erarbeitung dieser Kriterien wurde das Pre-Screening durchgeführt.

Dazu wurden die Referenzmaterialien (ausgenommen Sponceram-HXA) mit einem Locheisen (Innendurchmesser: 6 mm) ausgestanzt, in 96-Lochplatten überführt und durch Einlegen in Isopropanol für mindestens 2 Stunden desinfiziert. Das poröse Sponceram-HXA wurde in vergleichbar große Stücke ähnlichen Gewichts zerteilt (ca. 15-20 mg; Größe ca. 3mm x 3 mm x 4 mm) und vor der Besiedlung autoklaviert. Alle Referenzmaterialien wurden über Nacht in entsprechendem Kulturmedium (Anhang 6.2) bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Das Medium wurde entfernt und die Modellzellen mit einer Dichte von 5 x 10³ Zellen (Hep-G2, PC-12) bzw. 3 x 10³ (ISC) pro Matrix ausplattiert. Zur besseren Anheftung wurden die Zellen

in 20 µl Medium aufgetragen, für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend das Medium vorsichtig auf 200 µl aufgefüllt. Um eine adäquate Besiedlung der Sponceram-HXA Matrices erzielen zu können, wurden die Zellen (gleiche Zelldichte) in 50 µl Kulturmedium ausplattiert und anschließend für eine halbe Stunde bei 350 rpm geschüttelt. Die restliche Inkubationszeit erfolgte analog zu den übrigen Matrices. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen auf den Referenzmatrices kultiviert und den Assays des Pre-Screenings unterzogen.

Hep-G2 Zellen

Viabilität/Proliferation

Um das Zellwachstum auf den verschiedenen (Referenz-)Materialien beurteilen zu können, wurde der MTT-Test durchgeführt (Anhang 6.4.2). Der MTT-Test dient als Messgröße für die relative Viabilität von Eukaryonten. MTT wird nur von den Mitochondrien lebender Zellen umgesetzt (Mosmann 1983). Da proliferierende Zellen eine hohe Mitochondrienaktivität aufweisen, wurde in allen folgenden Kapiteln mit dem MTT-Test die Viabilität/Proliferation bestimmt.

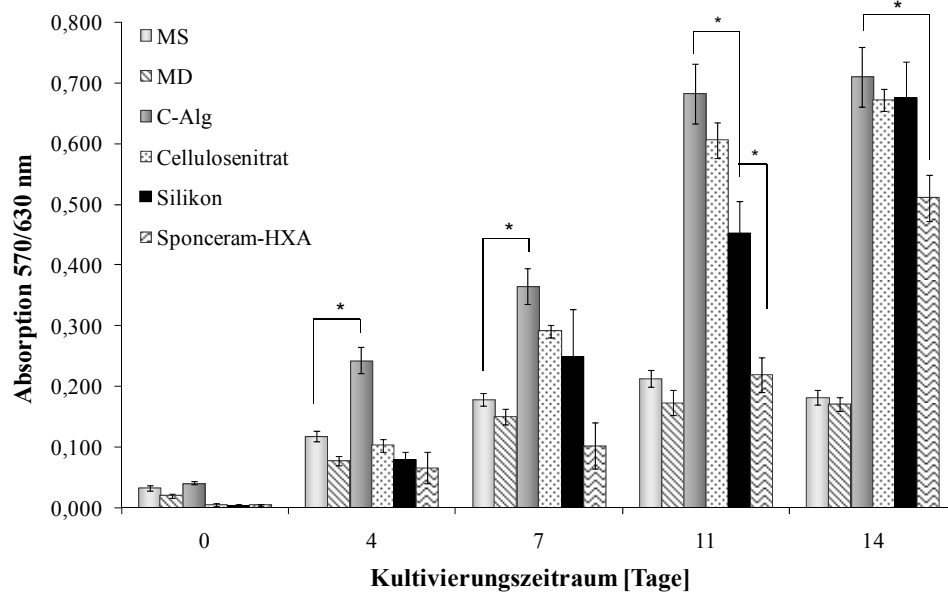


Abbildung 14: MTT-Test für Hep-G2 Zellen. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen auf verschiedenen Referenzmatrices über einen Zeitraum von 14 Tagen. 5×10^3 Zellen wurden auf Matristypt[®] (MS), Matriderm[®] (MD), Kollagen-Alginat (C-Alg), Cellulosenitrat, Silikon und Sponceram[®]-HXA ausgesät. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die Zellen wurden auf den Matrizes über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert und die Viabilität/Proliferation mit dem MTT-Test alle 3-4 Tage bestimmt. Es wurden von jeder Matrix jeweils sechs Proben parallel kultiviert und getestet ($n=6$). Zudem wurde der Versuch unter gleichen Bedingungen wiederholt (Replikat).

Abbildung 14 zeigt die unterschiedliche Viabilität der Hep-G2 Zellen auf den eingesetzten Referenzmatrizes. Die steigenden Absorptionswerte zeigen, dass die Zellen zwar auf allen Matrizes proliferierten, über den kompletten Kultivierungszeitraum war jedoch die Viabilität/Proliferation der Hep-G2 auf der Kollagenmatrix C-Alg und Cellulosenitrat Membran höher. Diese Ergebnisse sind nach Prüfung der Varianz durch einen F-Test und einen anschließenden t-Test statistisch signifikant. (Der Terminus signifikant wird auch im Folgenden ausschließlich gemäß der Statistikbeschreibung Anhang 6.1 verwendet.) Dabei erreichten die Zellen auf diesen Matrizes nach der exponentiellen Wachstumsphase bereits nach 11 Tagen ein Plateau und die Viabilität änderte sich nicht mehr. Im Gegensatz dazu wurde auf Sponceram-HXA eine verzögerte Proliferation in der Anfangsphase beobachtet, die jedoch in einer gesteigerten Proliferation ab Tag 11 mündete. Auf den übrigen Kollagenmatrizes MS und MD waren die Hep-G2 Zellen zwar vital, jedoch lassen die geringen Absorptionswerte darauf schließen, dass sie auf den Materialien kaum proliferierten.

Adhäsion

Zusätzlich zur Viabilität/Proliferation der Zellen ist die Adhäsion der Zellen auf Biomaterialien eine wichtige und entscheidende Information in der Beurteilung der Eignung von Biomaterialien für das *Tissue Engineering*. Die Adhäsion gibt dabei einen Eindruck von der Attraktivität der den Zellen zur Verfügung stehenden Materialoberfläche und ist ein schneller Test, um direkt geeignete Modifikationen der Oberfläche voranzutreiben.

Die Adhäsion der Zellen wurde nach 2 und 24 Stunden durch Auszählen der adhärenierten Zellen in zufälligen, aber definierten (über den Bildausschnitt) Bereichen des Materials bestimmt (Anhang 6.4.5). Eine Übersicht über den Einfluss der Referenzmaterialien auf die Adhäsion gibt Abbildung 15 wieder. Während nach 24 Stunden durchschnittlich 65 bis 70 Hep-G2 Zellen pro Bildausschnitt auf allen Referenzmatrizes gezählt wurden, differierte diese Zahl nach erst 2 Stunden stärker (zwischen 45 und 60 Zellen pro Bildausschnitt). Insgesamt konnte eine etwas verlangsamte Adhäsion der Leberzelllinie auf den Kollagen-Materialien MS und C-Alg beobachtet werden, während auf Cellulosenitrat fast alle Zellen bereits nach 2 Stunden adhäreniert waren. Diese Ergebnisse sind jedoch nach Überprüfung der Varianz durch einen F-Test und einen anschließenden t-Test statistisch nicht signifikant (Statistik: Anhang 6.1).

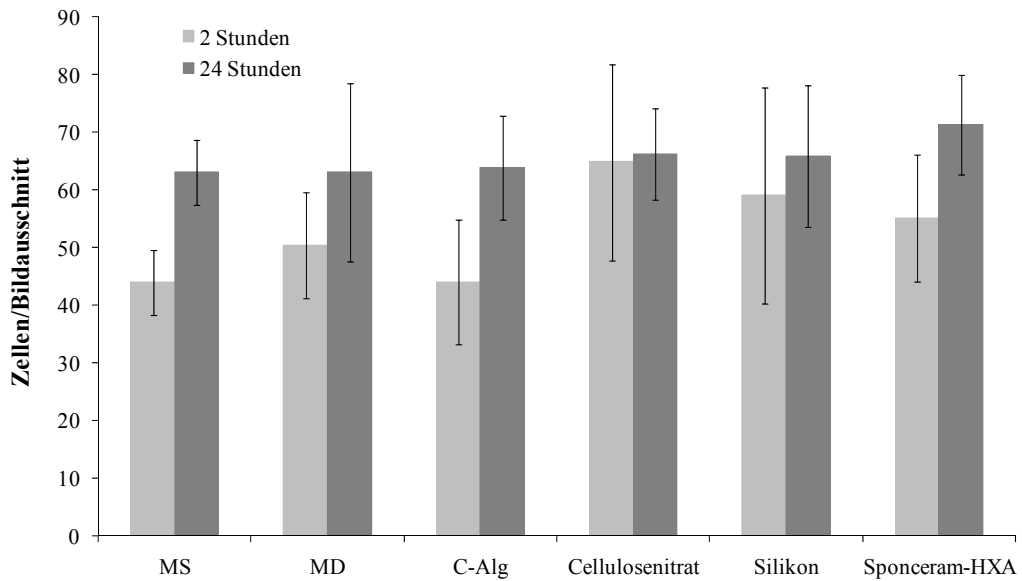


Abbildung 15: Adhäsions-Assay für Hep-G2 Zellen. Die Referenzmatrizes Matristypt[®] (MS), Matriderm[®] (MD), Kollagen-Alginat (C-Alg), Cellulosenitrat, Silikon und Sponceram[®]-HXA wurden mit 2×10^4 Zellen besiedelt. Nach einer Inkubationszeit von 2 und 24 Stunden wurden die adhärenierten Zellen fixiert und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. Von jeder Kultivierungsbedingung wurden zu den beiden Zeitpunkten jeweils sechs Bilder aus drei Kultivierungsreplikaten gemacht. Die gefärbten Zellkerne wurden anschließend ausgezählt, um die Anzahl an adhärenierten Zellen zu quantifizieren. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6).

Morphologie und Zellverteilung

Ziel des Einsatzes von porösen, dreidimensionalen Gerüstmaterialien ist eine gleichförmige Gewebebildung durch eine dreidimensionale Zellbesiedlung der Matrix und eine sich anschließende Produktion von EZM (Chen and Hu 2006). Neben den Kultivierungsbedingungen *in vitro* und den Gegebenheiten *in vivo*, die eine ausreichende Nährstoffversorgung im Inneren der Matrix gewährleisten müssen (Martin et al. 2004), hat hierauf auch die makroskopische Struktur der Matrizes einen Einfluss. So muss sie zum einen attraktiv für die Zellbesiedlung sein und die Infiltration fördern, zum anderen muss auch die Struktur eine Basis für die Nährstoffversorgung durch maximale Durchlässigkeit bieten (Hudson et al. 1999). Daher sollten die Matrizes im Screening System darauf getestet werden, wie sie die Morphologie und Verteilung der Zellen innerhalb des Konstrukts beeinflussen. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben über einen Zeitraum von 14 Tagen auf den Matrizes kultiviert. Nach 7 und 14 Tagen wurden ihr dreidimensionales Zellwachstum, die Verteilung innerhalb des Konstrukts und die Zellmorphologie mit Hilfe der DAPI-Färbung

untersucht (Anhang 6.4.4). Die Färbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff war nötig, da die Zellen auf den Matrices ohne Färbung im Mikroskop nicht sichtbar sind.

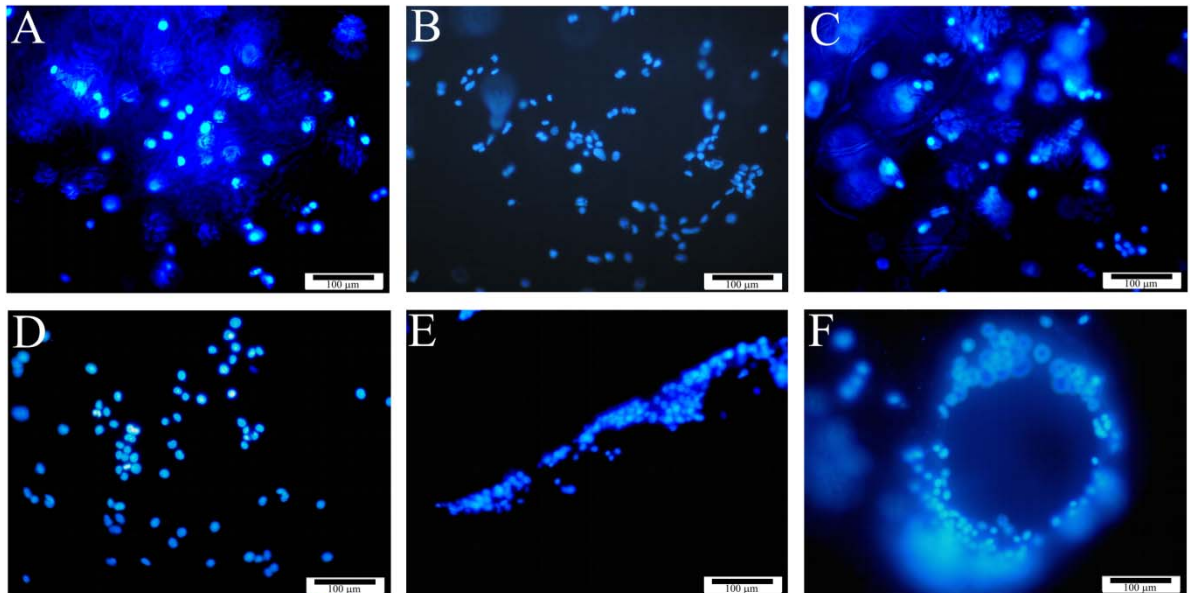


Abbildung 16: DAPI-Färbung von Hep-G2 Zellen. Die Fluoreszenz-Bilder (A-F: x200) zeigen die Ergebnisse der DAPI-Färbung der Zellkerne nach einem Kultivierungszeitraum von 14 Tagen auf den Referenzmatrices. A: Matristypt® (MS). B: Matriderm® (MD). C: Kollagen-Alginat (C-Alg). D: Cellulosenitrat. E: Silikon. F: Sponceram®-HXA.

Eine repräsentative Auswahl der angefärbten Zellkerne von Hep-G2 auf den verschiedenen Referenzmaterialien ist in Abbildung 16 dargestellt. Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Hep-G2 Zellen auf den Kollagenmatrices MS (A) und MD (B) vornehmlich zentral auf den Scaffolds wuchsen, wo die Zellsuspension beim Ausplattieren aufgetragen worden war. Darüber hinaus wuchsen die meisten Zellen außen auf der Matrix. Im Gegensatz dazu war die Verteilung der Hep-G2 Zellen auf der Kollagenmatrix C-Alg (C) gleichmäßig und ein gleichmäßiges Einwachsen der Zellen in die C-Alg Matrix konnte generell beobachtet werden. In Abbildung 16C wird dies an den diffusen Fluoreszenzsignalen außerhalb der Fokussier-Ebene deutlich. Auf Cellulosenitrat (D) wuchsen die Hep-G2 gut. Die Membran bietet den Zellen jedoch kein dreidimensional besiedelbares Konstrukt, da die Porengrößen für ein Einwachsen von Zellen zu gering sind. Die DAPI-Färbung der Zellen auf Silikon (E) und Sponceram-HXA (F) bestätigt die These, dass Zellen strukturierte und raue Oberflächen bevorzugen, um gut zu wachsen und zu adhären (Zhang et al. 2005). So wuchsen die Hep-G2 Zellen auf Silikon fast ausschließlich entlang der Textur, die durch die Gießform vorgegeben war. Auf Sponceram-HXA wurden bevorzugt die großen Poren des Materials von den Zellen besiedelt.

Ergebnis

Die guten adhäsiven Eigenschaften des Cellulosenitrat-Materials scheinen verantwortlich zu sein für die außerordentliche Adhäsion und die gute Spreitung der Hep-G2 Zellen sowie damit auch für die Förderung der Zellproliferation. Cellulosenitrat Membranen sind bekannt für die gute Adsorption von Proteinen auf der Oberfläche der Membran und werden deshalb für klassische Blotting-Methoden, Hochdurchsatz-Arrays und in der Immundiagnostik weitverbreitet eingesetzt (Tonkinson and Stillman 2002). Offensichtlich bewirkt die gute Protein Adsorption ebenso eine gute Adhäsion von Oberflächenproteinen der Zellen und fördert damit Adhäsion und Spreitung.

Das strukturierte Silikon und Sponceram-HXA bieten auf unterschiedliche Weise strukturierte und raue Oberflächen, die die Zelladhäsion und das -wachstum fördern. Dies wurde schon von Yoshikawa und Myoui sowie von Zhang et al. beobachtet und beschrieben (Yoshikawa and Myoui 2005; Zhang et al. 2005).

Obwohl Kollagen als EZM Bestandteil bereits in den verschiedensten *Tissue Engineering* Feldern wie Knorpel- (Grande et al. 1997; Riesle et al. 1998) und Nervenregeneration (Chen et al. 2000; Whitworth et al. 1995) zahlreich und erfolgreich verwendet wurde, zeigten die Hep-G2 neben einer akzeptablen Adhäsion nur kaum Wachstum in die MS- und MD-Matrizes hinein. Diese eingeschränkte Besiedlung der Matrix scheint verantwortlich für die geringe Viabilität/Proliferation der Zellen auf diesen Matrizes zu sein. Im Gegensatz zu C-Alg stellen MS und MD daher offenbar für die Hep-G2 Zellen keine optimale Struktur und Porengröße zur Verfügung.

Die Kollagenmatrix C-Alg jedoch ermöglichte nicht nur die beste Zellproliferation unter den Referenzmaterialien sondern auch eine ausgedehnte gleichförmige Besiedlung mit den Hep-G2 Zellen. Dies lässt darauf schließen, dass dieses Material eine geeignete Struktur und Porosität für das dreidimensionale Spreiten der Leberzelllinie bereit stellt. Die verlangsamte Adhäsion nach 2 Stunden könnte dadurch zu erklären sein, dass die Zellen die Matrix von Anfang an gleichmäßig besiedeln und deshalb in einer Fokussier-Ebene weniger Zellen zu finden sind.

Da auch bereits die besondere Eignung von Alginat-basierten Materialien für ein gerichtetes Axonwachstum und für eine angemessene Reinnervation des distalen Nervenstumpfs gezeigt werden konnte (Prang et al. 2006), wurde C-Alg für das Screening von Testmaterialien mit Hep-G2 als Referenzmaterial ausgewählt. Aus den durchgeführten Versuchen wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Bewertungskriterien festgelegt, um beim weiteren Einsatz von

Testmaterialien eine Beurteilung zu ermöglichen. Beispielsweise muss die Viabilität/Proliferation der Hep-G2 Zellen auf dem Testmaterial mindestens 60 % der Viabilität/Proliferation dieser Zellen auf der Referenzmatrix C-Alg betragen, um in das Fein-Screening übernommen zu werden.

Tabelle 2: Bewertungskriterien für zu testende Biomaterialien im Screening System bei Kultivierung mit Hep-G2 Zellen.

Zellsystem	Eigenschaft	Referenzmatrix	Bewertungskriterium
Hep-G2	Viabilität/Proliferation (MTT)	C-Alg	mindestens 60 %
	Adhäsion	C-Alg	mindestens 80 %
	Morphologie/Zellverteilung	C-Alg	dreidimensionales Zellwachstum erwünscht

PC-12 Zellen

Die Referenzmaterialien durchliefen das Screening System auch mit dem gewählten neuronalen Zellmodell PC-12. Die Zelllinie kann durch Zusatz von NGF zum Kulturmedium neuronal differenziert werden (Anhang 6.2), was morphologisch an der Ausbildung von Dendriten sichtbar wird.

Viabilität

Zunächst wurden die undifferenzierten PC-12 Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen in gleicher Weise wie die Hep-G2 Zellen auf den Referenzmatrizes kultiviert und die Viabilität/Proliferation mittels MTT-Test (Anhang 6.4.2) untersucht. Die mit der Zeit ansteigenden Absorptionswerte in Abbildung 17A zeigen, dass die PC-12 Zellen auf allen Materialien viabel waren. Ausnahme war die C-Alg Matrix, auf der kein nennenswertes Zellwachstum gemessen werden konnte. Auf MS, MD, Cellulosenitrat und Sponceram-HXA proliferierten die Zellen im Kultivierungszeitraum gut. Während jedoch die Viabilität/Proliferation auf MS und MD bereits nach 11 Tagen ihr Maximum erreichte und danach schnell zurückging, steigerte sich die Viabilität/Proliferation der PC-12 auf Cellulosenitrat und Sponceram-HXA stetig über Tag 11 hinaus. Auf Silikon war ein verzögertes Zellwachstum zu beobachten.

Hinsichtlich der veränderten Zellphysiologie von differenzierten Zellen, wurde auf ausgewählten Referenzmaterialien die Viabilität/Proliferation auch von neuronal differenzierten PC-12 Zellen getestet (Abbildung 17B) und die Ergebnisse mit den

undifferenzierten Zellen verglichen. Dafür wurden die PC-12 Zellen parallel auf den Matrizes ausplattiert und nach 4 Tagen die Hälfte der besiedelten Scaffolds in Differenzierungsmedium (Kulturmedium + 100 ng/ml NGF) kultiviert. Die Viabilität/Proliferation wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von 14 Tagen beobachtet.

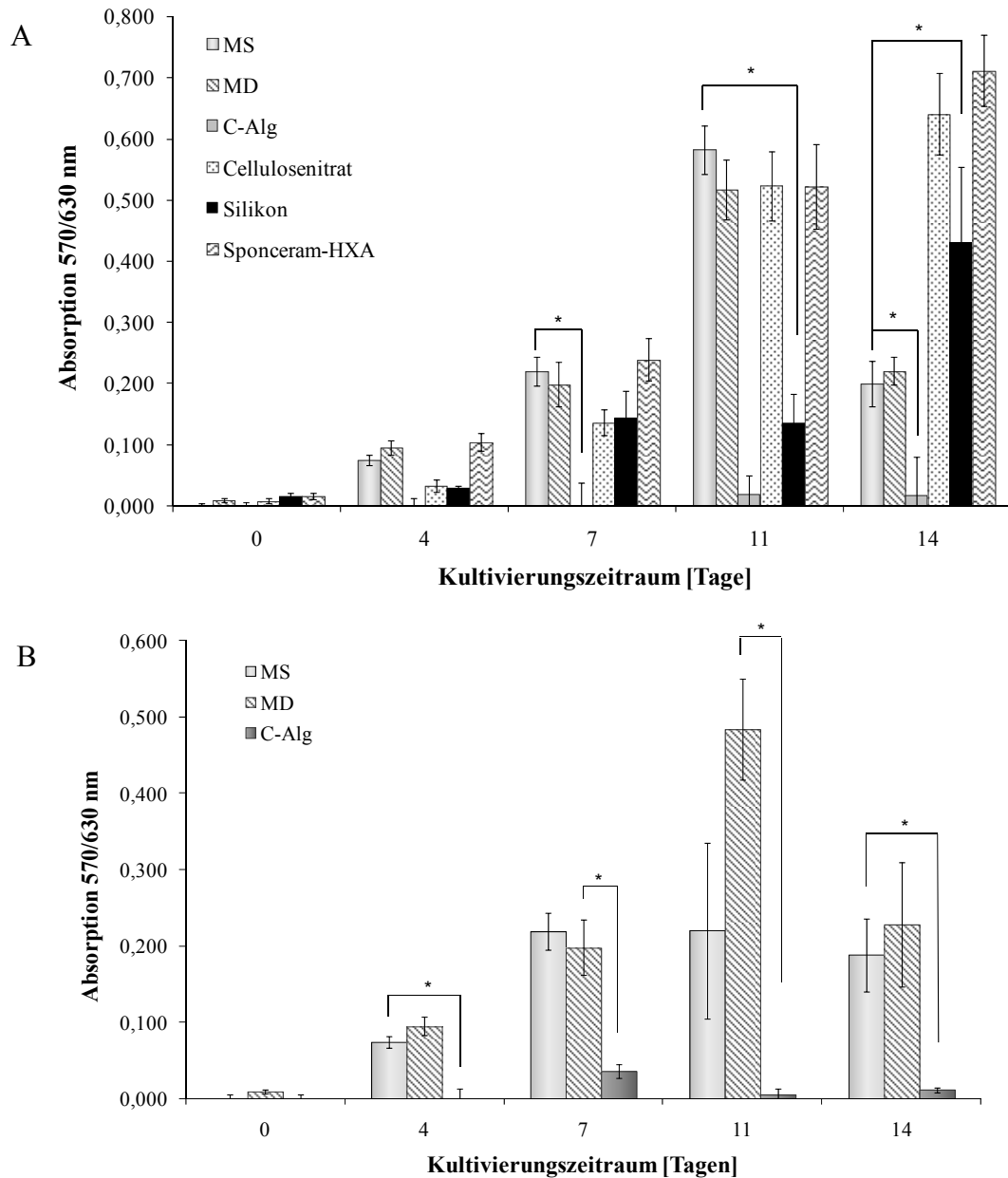


Abbildung 17: MTT-Test mit undifferenzierten (A) und ab Tag 4 mit NGF neuronal differenzierten (B) PC-12 Zellen. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen auf verschiedenen Referenzmatrizes über einen Zeitraum von 14 Tagen. 5×10^3 Zellen wurden auf Matristypt® (MS), Matriderm® (MD), Kollagen-Alginat (C-Alg), Cellulosenitrat, Silikon oder Sponceram®-HXA ausgesät. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die differenzierten PC-12 Zellen zeigten generell eine geringere Viabilität/Proliferation im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen. Während des Differenzierungsvorgangs und im differenzierten Stadium reduzieren Zellen ihre Proliferationsaktivitäten zugunsten der Differenzierungsvorgänge in der Zelle. Unabhängig davon spiegeln die Ergebnisse für die differenzierten PC-12 Zellen jedoch die Beobachtung der undifferenzierten Zellen wider: Auf MS und MD wird eine erhöhte Viabilität/Proliferation beobachtet, die bis Tag 11 ein Maximum erreicht und danach wieder zurück geht. Auf C-Alg ist analog kein nennenswertes Zellwachstum nachzuweisen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Referenzmaterialien die physiologische Differenzierung des neuronalen Zellmodells zulassen. Da jedoch die PC-12 Zellen als Konsequenz der Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp ihre Proliferationsaktivitäten reduzieren und trotzdem die gleichen relativen Reaktionen auf die verschiedenen Biomaterialien zeigen wie die undifferenzierten PC-12 Zellen, wurden die PC-12 Zellen im Folgenden bei der Untersuchung der Viabilität/Proliferation und Adhäsion generell in ihrer undifferenzierten Form verwendet. Dadurch konnten Proliferationsreaktionen auf die zu testenden Materialien intensiver beurteilt werden. Nur bei der Untersuchung charakteristischer, neuronaler Zellmarker wurden die PC-12 Zellen in ihrer neuronal differenzierten Form eingesetzt.

Adhäsion

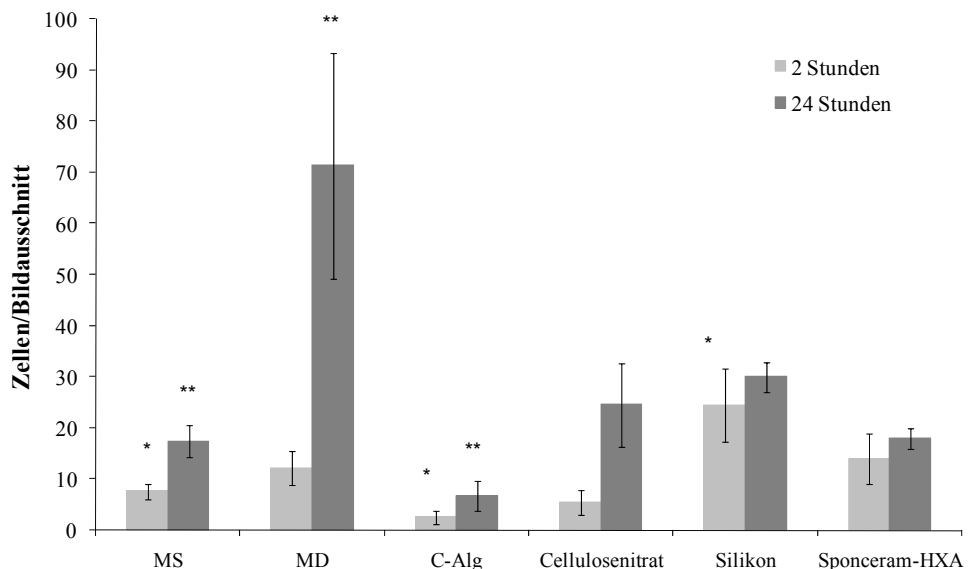


Abbildung 18: Adhäsions-Assay für PC-12 Zellen auf den Referenzmatrizes Matristypt® (MS), Matriderm® (MD), Kollagen-Alginat (C-Alg), Cellulosenitrat, Silikon und Sponceram®-HXA. Der Adhäsionsassay wurde gemäß Anhang 6.4.5 durchgeführt und ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede nach 2 Stunden (*) bzw. 24 Stunden (**) wurden mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der Adhäsion (Anhang 6.4.5) von PC-12 auf den Referenzmaterialien sind in Abbildung 18 dargestellt. Es konnten deutliche Unterschiede in der Adhäsion der Zellen beobachtet werden. Hervorzuheben sind die besonders gute Adhäsion auf MD nach 24 Stunden und die geringe Zelladhäsion auf C-Alg sowohl nach 2 als auch nach 24 Stunden. Die übrigen Matrizes zeigten einen vergleichbaren Einfluss auf die Adhäsion der PC-12 Zellen.

Morphologie und Zellverteilung

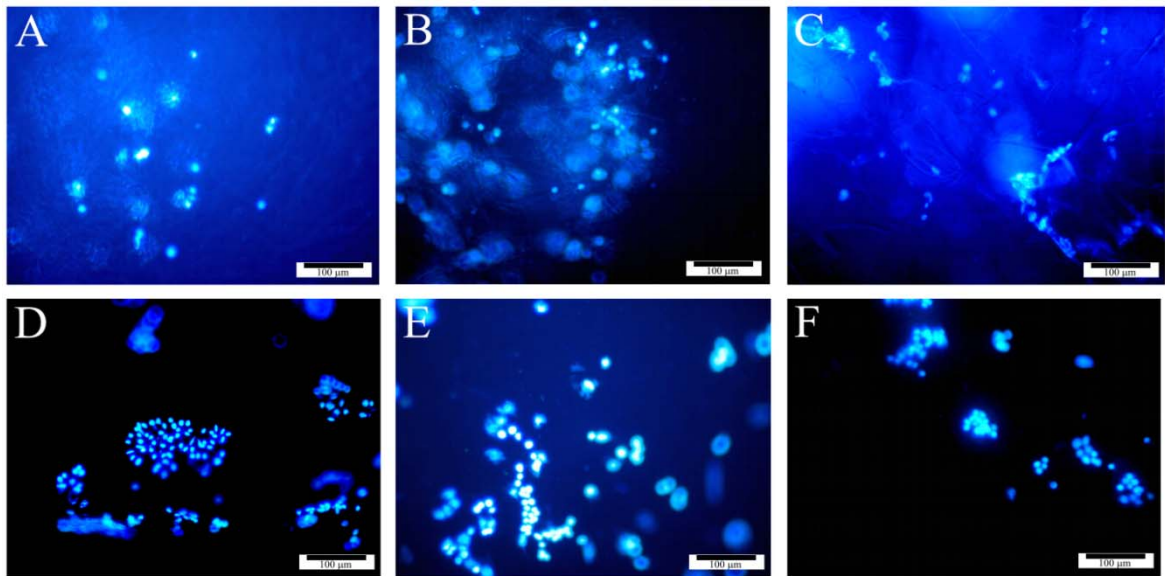


Abbildung 19: DAPI-Färbung von PC12 Zellen. Die Fluoreszenz-Bilder (A-F: x200) zeigen die Ergebnisse der DAPI-Färbung der Zellkerne nach einem Kultivierungszeitraum von 14 Tagen auf den Referenzmatrizes. A: Matristypt® (MS). B: Matriderm® (MD). C: Kollagen-Alginat (C-Alg). D: Cellulosenitrat. E: Silikon. F: Sponceram®-HXA.

Eine Zusammenfassung der Untersuchung der Zelldistribution nach einem Kultivierungszeitraum von 7 und 14 Tagen durch Färbung der Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Anhang 6.4.4) gibt Abbildung 19. Es konnte beobachtet werden, dass besonders MS (A) und MD (B) ein dreidimensionales Wachstum der Zellen in das Konstrukt hinein begünstigen. Die Matrizes waren gleichmäßig besiedelt und es konnten überall diffuse Fluoreszenzsignale außerhalb der Fokussier-Ebene festgestellt werden. Auch Cellulosenitrat und das strukturierte Silikon waren geeignete Oberflächen für Zellwachstum. Die Cellulosenitrat Membranen (D) waren gleichmäßig besiedelt und die Zellen zeigten ein charakteristisches Wachstum in Kolonien auf diesem Material. Im Gegensatz zu den Hep-G2 Zellen wuchsen die PC-12 Zellen auf Silikon nicht ausschließlich entlang der Struktur sondern auch auf unstrukturiertem Untergrund (E). Ebenso wie die Hep-G2 Zellen

bevorzugten die PC-12 Zellen das Wachstum in die weiten Poren der Sponceram-HXA Matrix (F). Nur sehr wenige PC-12 Zellen konnten auf C-Alg gefunden werden (C). Die wenigen Zellen wuchsen stark, fast klumpig, in Kolonien und kaum ein Einwachsen in das Material konnte beobachtet werden.

Ergebnis

Zusammengefasst verhielten sich die PC-12 Zellen auf Cellulosenitrat, Silikon, und Sponceram-HXA ähnlich wie die Hep-G2 Zellen. Deutlich abweichend voneinander waren aber die Ergebnisse auf den Kollagenmatrizes. Im Gegensatz zu den Hep-G2 Zellen konnte sowohl eine schlechte Viabilität/Proliferation als auch Adhäsion der PC-12 Zellen auf C-Alg nachgewiesen werden. Umgekehrt ermöglichten MS und MD eine hohe Viabilität/Proliferation und Adhäsion sowie ein ausgeprägtes dreidimensionales Wachstum im Konstrukt. Die Zellen proliferierten auf den beiden Kollagen-Materialien sogar so gut, dass bereits nach 11 Tagen keine stärkere Besiedlung der Matrizes unter statischen Bedingungen möglich war und eine Nährstofflimitierung erreicht wurde. Diese Abweichungen zwischen den beiden Zellsystemen unterstreichen, dass jedes Gewebe unterschiedliche Bedingungen für gutes Zellwachstum benötigt. Erklärbar sind die Präferenzen zwischen den Kollagenmatrizes hier möglicherweise über die unterschiedlichen Zellgrößen. Die Zusatzstoffe in den verglichenen Kollagenmatrizes führen zu Änderungen in der Morphologie der Matrix und damit auch zu Veränderungen in der Porengröße. Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Veränderung von Oberflächenladungen sein, die auf die verschiedenen Zelltypen einen unterschiedlichen Effekt ausüben.

Da Matristypt[®] eine reine Kollagenmatrix ohne Modifikation mit Zusatzbestandteilen ist, wurde für die PC-12 Zellen Matristypt[®] als Referenzmatrix zur einheitlichen Beurteilung von Testmaterialien gewählt. Folgende Bewertungskriterien wurden definiert:

Tabelle 3: Bewertungskriterien für zu testende Biomaterialien im Screening System bei Kultivierung mit PC-12 Zellen.

Zellsystem	Eigenschaft	Referenzmatrix	Bewertungskriterium
PC-12	Viabilität/Proliferation (MTT)	MS	mindestens 60 %
	Adhäsion	MS	mindestens 80 %
	Morphologie/Zellverteilung	MS	dreidimensionales Zellwachstum erwünscht

4.1.6 Fazit der Entwicklung eines Screening Systems für Biomaterialien im *Tissue Engineering* peripherer Nerven

Es konnte ein Screening System entwickelt werden, um Biomaterialien für die periphere Nervenregeneration *in vitro* reproduzierbar und schnell unter definierten Bedingungen zu testen. Das entwickelte Screening System ermöglicht durch den mehrstufigen Aufbau aus Pre- und Fein-Screening eine schnelle Rückkopplung für die Optimierung und Modifikation von Materialien und lässt so eine iterative Testung unter Berücksichtigung ökonomischer Aspekte zu. Materialien, die sich im Pre-Screening (Testung auf Viabilität/Proliferation, Adhäsion und Zellmorphologie/-verteilung) als vielversprechend erwiesen, können dann einem Fein-Screening unterzogen werden (siehe auch Kapitel 4.1.3). Hier sind weitreichendere Studien zur Zellproliferation (BrdU-Assay) sowie die Untersuchung von spezifischen Zellmarkern (Albumin-/Thyrosinhydroxylase-ELISA, Neuritenlänge, Glukose/Laktat) vorgesehen. Die Durchführung der Assays in Mikrotiterplatten ermöglicht dabei einen hohen Materialdurchsatz.

Da kein Human-Albumin-ELISA etabliert war, wurde zur quantitativen Bestimmung des von den Hep-G2 Zellen sezernierten Albumins ein spezifischer ELISA entwickelt und etabliert (Röker 2006). Der optimierte Human-Albumin-ELISA ermöglicht die Quantifizierung von sezerniertem Albumin aus Kulturüberständen.

Um die zu testenden Biomaterialien gegen definierte Referenzmaterialien beurteilen zu können, wurden diese im Screening System getestet, um so abschließend Bewertungskriterien für die zu testenden Biomaterialien zu definieren. Mit Hilfe des dargestellten Screening Systems kann nun die Vielfalt an Materialien, die vor allem im Rahmen von Materialoptimierung anfallen (Chalfoun et al. 2006), sinnvoll *in vitro* getestet werden. Über ein solch standardisiertes System können die existierenden vielversprechenden Ansätze zur Herstellung idealer Nervenkonstrukte (Hudson et al. 1999) zielgerichtet kombiniert und getestet werden.

Im Folgenden werden exemplarisch die Ergebnisse von Biomaterialien, die das Screening System durchlaufen haben, dargestellt. Auf Grundlage der Kollagen-Referenzmatrix Matritypt[®] wurden diverse Modifikationen durch Zusatz von natürlichen Polymeren durchgeführt und in dem entwickelten Screening System getestet. Neben dieser Materialoptimierung durch Modifikationen wurden zudem neue, innovative Biomaterialien wie die Spinnenseide im neuen Testsystem getestet.

4.2 Kollagenmatrix-Derivate im Screening System

Wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, werden häufig natürliche Polymere der EZM im *Tissue Engineering* eingesetzt, da sie eine hohe Biokompatibilität aufweisen, selten toxische Nebeneffekte zeigen und die Migration von Stützzellen fördern (Ciardelli and Chiono 2006; Sanghvi et al. 2004). Vor allem mit Konstrukten aus Kollagen, Fibronectin und Laminin konnten zahlreiche vielversprechende Resultate im *Tissue Engineering* peripherer Nerven erzielt werden (Bellamkonda and Aebischer 1994; Chalfoun et al. 2006; Huang and Huang 2006; Schmidt and Leach 2003), da sie auch physiologisch eine bedeutende Rolle in axonaler Entwicklung und Wiederherstellung spielen (Bunge et al. 1989; Grimpe and Silver 2002; Hirvonen et al. 1996; Rutishauser 1993; Tona et al. 1993). Laminin und Kollagen werden von den Stützzellen des peripheren Nervensystems, die auch über die Bildung der *Büngner'schen Bänder* intensiv an der intrinsischen Nervenregeneration beteiligt sind (Grothe and Nikkhah 2001), als strukturgebende und adhäsive EZM Moleküle produziert (Huang and Huang 2006). Kollagen ist eins der etabliertesten natürlichen Biomaterialien, die im *Tissue Engineering* und im Besonderen in der Regeneration peripherer Nerven vielversprechend verwendet wurden (Schmidt and Leach 2003). In letzterem Fall sind besonders die mechanische Stabilität des Materials, die gute Zelladhäsion (Ahmed and Jayakumar 2005; Chi et al. 1993) und die strukturgebende Komponente (Meek et al. 2002; Phillips et al. 2005; Yoshii et al. 2002) die entscheidenden Kriterien im Vergleich zu anderen natürlichen Biomaterialien.

Ausgehend von dem Referenzmaterial Matristypt[®], das aus Kollagen I besteht, wurden modifizierte Kollagenmatrizes durch Zusatz von natürlichen Polymeren in der Dr. Suwelack Skin & Health Care AG (Billerbeck) hergestellt. Diese durchliefen als mögliche optimierte Materialien das Screening System. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Modifikation der Kollagenmatrizes durch Zusatzbestandteile dargestellt werden und eine Beurteilung der getesteten Materialien erfolgen.

4.2.1 Kollagenmatrix-Derivate

Alle untersuchten Kollagenmatrizes bestehen aus aufgereinigtem Kollagen I und wurden freundlicherweise von der Dr. Suwelack Skin & Health Care AG (Billerbeck) zur Verfügung gestellt. Das bovine Kollagen I wird dazu in mehreren Schritten aus dem Corium (Lederhaut) von Rindern gewonnen. Nach der Beseitigung von Fremdbestandteilen wie Fett und Sehnen bleibt die charakteristische dreidimensionale Struktur des Kollagens zurück. Dieses kompakte Rohmaterial¹ (Spalt; siehe Tabelle 4) wird zerhexelt und gemahlen. Der Kollagenmasse können nun zusätzliche Komponenten hinzugefügt werden. Abschließend wird das Material nach einem patentrechtlich geschützten Verfahren der Dr. Suwelack Skin & Health Care AG

gefriergetrocknet. Durch diese Behandlung entstehen feinporige Matrizes mit reinen, nativen und unlöslichen Kollagenfasern. Die Kollagenmatrizes werden bisher für die Kosmetik und zur Wundabdeckung bei größeren Substanzverlusten der Haut wie z.B. Brandverletzungen eingesetzt. Dabei zeigen sie eine anti-irritative und blutstillende Wirkung (Gütt 2003). Durch diese Verwendung wurde die Biokompatibilität als Grundvoraussetzung für das *Tissue Engineering* bereits bestätigt.

Dem Kollagen wurden unterschiedliche Komponenten beigemischt, die sowohl die Stabilität erhöhen als auch die physiologischen Effekte und Eigenschaften modulieren sollten, um die Kollagenmatrix MS weiter zu optimieren. Eine Übersicht der beigemischten Komponente und untersuchten Matrizes gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Übersicht über die im Screening System untersuchten Kollagenmatrizes und die Komponenten, die zur Optimierung der Materialeigenschaften für das *Tissue Engineering* beigemischt wurden.

Matrix	Basis	Zusätzliche Komponente	Bemerkung
Spalt	Spalthaut		Rohmaterial ¹ : nicht aufgearbeitetes Kollagen
Matristypt® (MS)	Kollagen I		Referenzmatrix PC-12 und ISC
C-Alg	Kollagen I	10 % m/m Kalziumalginat	Referenzmatrix Hep-G2
C-CA 2,5 %	Kollagen I	2,5 % m/m Colominsäure	
C-CA 5 %	Kollagen I	5 % m/m Colominsäure	
C-CA 10 %	Kollagen I	10 % m/m Colominsäure	
C-HA 2,5 %	Kollagen I	2,5 % m/m Hyaluronsäure	
C-HA 5 %	Kollagen I	5 % m/m Hyaluronsäure	
C-HA 10 %	Kollagen I	10 % m/m Hyaluronsäure	
C-Seide	Kollagen I	Fibroin (Seidenprotein)	

Dem Kollagen wurden verschiedene Strukturgeber hinzugefügt, die alle natürlichen Ursprung haben und zusätzlich für ihre physiologischen Effekte bekannt sind.

Colominsäure (CA) als Homopolymer aus α -2,8-verknüpfter N-Acetylneuraminsäure ist ein spezifisches Derivat der Polysialinsäure (PSA), die alle Homopolymere aus Sialinsäure-

Monomeren umfasst (Mcguire and Binkley 1964). *In vivo* ist PSA eine dynamisch regulierte, posttranslationelle Modifikation des neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (NCAM) (Kleene and Schachner 2004). Im Entwicklungsstadium des Nervensystems ist PSA zunächst reichlich vorhanden, mit dem Tag der Geburt wird das PSA-Vorkommen im Körper jedoch reduziert und verbleibt ausschließlich in Regionen permanenter neuronaler Plastizität (Haile et al. 2007). Unter neuronaler Plastizität versteht man die Fähigkeit des menschlichen Gehirns, die strukturelle und funktionelle Organisation veränderten Bedingungen anpassen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass PSA die Migration neuronaler Stammzellen fördert, Neuritenwachstum begünstigt und an regenerativen Prozessen nach Traumen sowie an synaptischer Plastizität während Lern- und Gedächtnisvorgängen beteiligt ist (Kleene and Schachner 2004; Leckband 2004). Als Molekül der EZM während der Entwicklung, Regeneration und synaptischen Plastizität des Nervensystems ist PSA biokompatibel sowie mittels der PSA-spezifischen Endoneuraminidasen kontrolliert abbaubar (Miller et al. 2001; Rutishauser et al. 1985). Es bewirkt keine Immunreaktionen. Während der axonalen Richtungssuche und des Remodellings nach Nervenverletzungen fördert PSA die morphologische Plastizität von Dendriten (Landmesser et al. 1990; Muhlenhoff et al. 1996; Tang et al. 1992; Tang et al. 1994). Darüber hinaus konnten Franz et al. zeigen, dass PSA von regenerierenden Axonen produziert wird und damit an der Nervenregeneration beteiligt ist (Franz et al. 2005). Finne et al. konnten das *E.coli* KI Kapselpolysaccharid als reine Colominsäure identifizieren und zudem zeigen, dass es immunologisch identisch zur in Säugetieren produzierte PSA ist (Finne et al. 1987). Deshalb kann der Einsatz von CA *in vivo* als unbedenklich eingestuft werden. Die CA wurde aus den verwendeten Matrices über die Zeit freigesetzt. Eine genaue Untersuchung des Freisetzungsverhaltens wird in der Arbeit von Frau Stark dargestellt.

Hyaluronsäure gehört zu der Gruppe der Glycosaminoglycane (GAG), einem Bestandteil der EZM (Ma and Elisseff 2006). GAG sind als Oberflächenmoleküle *in vivo* an interzellulären Anhaftungs- und Erkennungsprozessen beteiligt (Falbe and Regnitz 1998). Durch Hydratation bildet sich schon bei relativ niedrigen Konzentrationen ein viskoses Gel. Diese Gele wurden schon mehrfach erfolgreich in Zusammenhang mit Nervenregeneration eingesetzt und konnten die intrinsische Regeneration des Gewebes fördern (Smit et al. 2004; Tian et al. 2005). Auch auf Hyaluronsäure basierende NGC wurden vielversprechend getestet (Jansen et al. 2004). Hyaluronsäure ist ein Gerüstbildner und bildet ein Netz aus Fasern, dessen Hohlräume größer als die von MS sind (Marlovits et al. 2004). Das Polysaccharid ist strukturell eng verwandt mit Colominsäure, hat jedoch viele unterschiedliche Eigenschaften.

Als dritte Substanz wurden Stücke eines Seidenfadens, der von der Seidenraupe (*Bombyx mori*) stammt, eingearbeitet. Da die bei dem Seidenfaden des Seidenspinners beobachteten Biokompatibilitätsprobleme dem leimartigen Protein Sericin zugeordnet werden (siehe Abschnitt 3.6), wurde das antigen wirkende Sericin entfernt und nur das übrige Protein Fibroin verwendet. Wie bereits zuvor ausgeführt, vereint Seide eine außergewöhnliche Kombination aus Festigkeit und Elastizität, ist biokompatibel, leicht modifizierbar durch Funktionalisierung mit Wachstumsfaktoren und anderen aktiven Molekülen und es besteht die Möglichkeit, die Sequenz genetisch maßzuschneidern (Altman et al. 2003). Diese Eigenschaften prädestinieren das Strukturprotein für das *Tissue Engineering*.

Wie in Kapitel 4.1.5 herausgearbeitet, wurden die Materialien MS bzw. C-Alg als Referenzmaterialien eingesetzt. Spalt als Ausgangsmaterial aller Kollagenmatrizes (natives Rohmaterial, siehe Tabelle 4 Seite 46) wurde zum Vergleich herangezogen.

4.2.2 Kultivierung auf den Derivaten der Kollagenmatrix

Die modifizierten Kollagenmatrizes wurden analog zu den Referenzmatrizes vorbereitet und kultiviert (Abschnitt 4.1.5). Sie wurden mit einem Lochseisen (Innendurchmesser: 6 mm) ausgestanzt, in 96-Lochplatten überführt, durch Einlegen in Isopropanol für mindestens 2 Stunden desinfiziert und über Nacht in entsprechendem Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Das Medium wurde entfernt und die Modellzellen mit einer Dichte von 5×10^3 Zellen (Hep-G2, PC-12) bzw. 3×10^3 (ISC) pro Matrix ausplattiert. Zur besseren Anheftung wurden die Zellen in 20 µl Medium aufgetragen, für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend das Medium vorsichtig auf 200 µl aufgefüllt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen auf den modifizierten Kollagenmatrizes kultiviert und, wie vorne beschrieben, im Screening System getestet.

Pre-Screening

4.2.3 Zellviabilität/-proliferation auf den Derivaten der Kollagenmatrix

Spalt

In der Literatur wird häufig beschrieben und diskutiert, dass sowohl die Herstellungsmethode als auch die dreidimensionale Struktur der eingesetzten Matrizes den Regenerationserfolg beeinflussen können (Harley et al. 2006; Wen and Tresco 2005; Zhang et al. 2005). Um die Verbesserung der Materialeigenschaften für das Zellwachstum durch die Aufarbeitung der Spalthaut zu einer dreidimensionalen Matrix (Abschnitt 4.2.1) zu untersuchen, wurde Spalt ebenfalls mit Zellen besiedelt und gegen die Referenzmaterialien verglichen.

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse des MTT-Test (Anhang 6.4.2) für die Hep-G2 Zellen (A) und die ISC (B) auf dem Rohmaterial, das zur Herstellung der Kollagenmatrizes dient. Das bovine Kollagen in Form des festen Spalts ermöglichte bereits ohne Modifikationen das Zellwachstum der beiden Zelllinien. Nach jeweils 7 Tagen war jedoch keine Steigerung der Viabilität/Proliferation mehr zu beobachten. Die Viabilität/Proliferation gegenüber den Referenzmatrizes war signifikant (Statistik: Anhang 6.1) geringer. Hohe Standardabweichungen ließen darauf schließen, dass ab diesem Zeitpunkt Zellwachstum und das Absterben von Zellen durch Nährstofflimitierung oder Platzmangel parallel vorlagen.

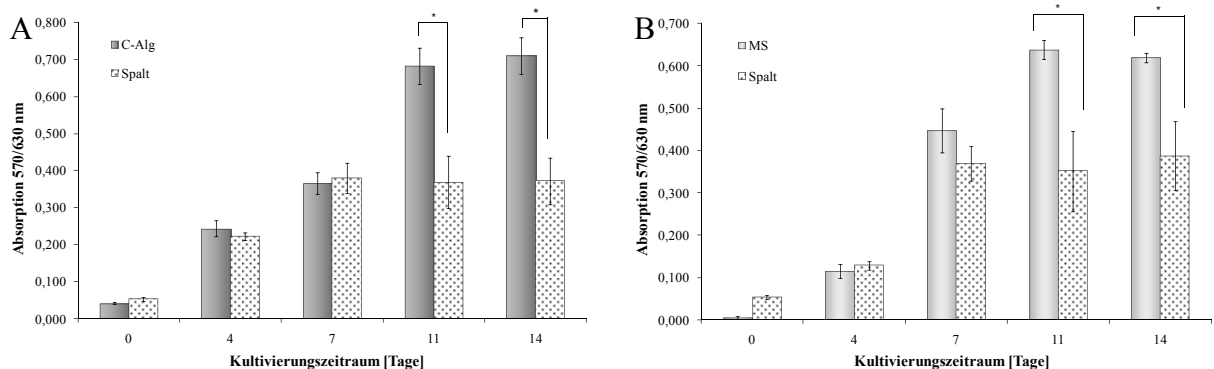


Abbildung 20: MTT-Test für Hep-G2 (A) und ISC (B) auf Spalt gegen ihre Referenz. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Diese geringeren Viabilitätswerte lassen sich ausschließlich auf die Struktur des Materials zurückführen. Spalt ist sehr fest und kompakt und weist kaum eine Porosität auf, während durch die Aufarbeitung des Rohstoffs und die Gefriertrocknung am Ende des Verarbeitungsprozesses lockere, poröse Kollagen-Matten entstehen (siehe REM-Aufnahmen, Abbildung 21). Die kompakte Zusammenlagerung der Kollagenfasern führt beim Spalt dazu, dass die Zellen nur auf der Oberfläche der Matrix wachsen können, jedoch nicht in sie hinein. So war die blaue Färbung der Formazankristalle im MTT-Test auch ausschließlich auf der Oberfläche des Materials zu beobachten. Die dadurch reduzierte Besiedlungsoberfläche führte zu einer Stagnation der Zellproliferation bereits nach sieben Tagen. Die durch den Verarbeitungsprozess poröse Kollagenmatrix liefert den Zellen im Vergleich eine größere effektive Oberfläche, da die Zellen dreidimensional in das Material hineinwachsen können. Das aufgearbeitete Material liefert also eine für Zellen zugängliche dreidimensionale Struktur, die im Hinblick auf das Scaffolding im *Tissue Engineering* eine große Verbesserung darstellt.

Die Herstellungsmethode ermöglicht zudem, zusätzliche Komponenten relativ einfach einzuarbeiten, um die Matrix weiter zu modifizieren.

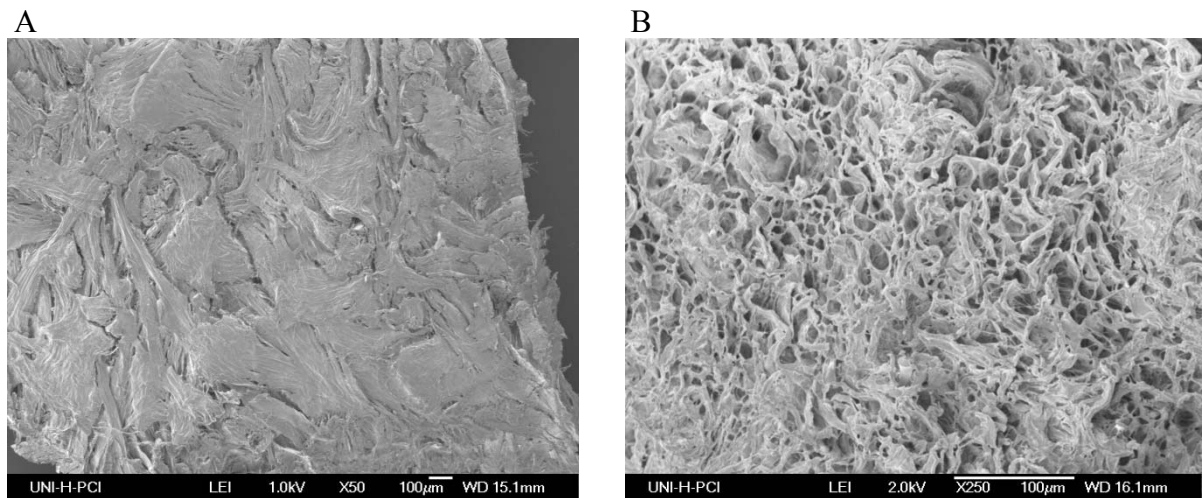


Abbildung 21: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von nativem, bovinem Spalt (A), das als Rohstoff zur Herstellung der porösen Kollagenmatrix Matristypt[®] (B) verwendet wird. Deutlich wird die kompakte Struktur der Kollagenfasern des Spalts gegenüber der lockeren, porösen Anordnung bei MS.

Im Folgenden werden nun Modifikationen der Kollagenmatrix durch Zusatz von Colominsäure, Hyaluronsäure und Seidenfibroin dargestellt und diskutiert.

Kollagen-Colominsäure (C-CA) Matrices

Verschiedene Konzentrationen (siehe Tabelle 4 Seite 46) an Colominsäure (CA) wurden der Kollagenmatrix hinzugefügt, um die Eignung der Matrix für die periphere Nervenregeneration zu verbessern. Wie der MTT-Test in Abbildung 22 deutlich macht, stellten alle drei C-CA Matrices geeignete Materialien für die Kultivierung der verwendeten Zelllinien dar. Die Viabilität/Proliferation der Zellen stieg im Kultivierungszeitraum von 14 Tagen stetig an. Mit Hep-G2 Zellen konnte an Tag 4 und 7 eine signifikant höhere Viabilität/Proliferation auf C-CA 5 % gegenüber der Referenz beobachtet werden (Abbildung 22A) und auch die undifferenzierten PC-12 Zellen zeigten an Tag 4, 7 und 11 eine höhere Viabilität/Proliferation auf C-CA 2,5 % und C-CA 5 % als auf der Referenz MS (Abbildung 22B). Die Absorptionswerte für die PC-12 Zellen stiegen von Tag 0 bis 7 deutlich gegenüber MS an und erreichten an Tag 11 auf C-CA 2,5 % und C-CA 5 % eine Plateauphase. Abbildung 22C zeigt die Ergebnisse des MTT-Tests für die ISC auf den C-CA Matrices im Vergleich zu ihrer Referenz. Auch hier stieg die Viabilität/Proliferation über den gesamten Kultivierungszeitraum an. Während an Tag 4 eine signifikant geringere

Viabilität/Proliferation auf den C-CA Matrices gegenüber MS beobachtet wurde, war diese an Tag 11 wiederum auf C-CA 5% und C-CA 10 % signifikant höher.

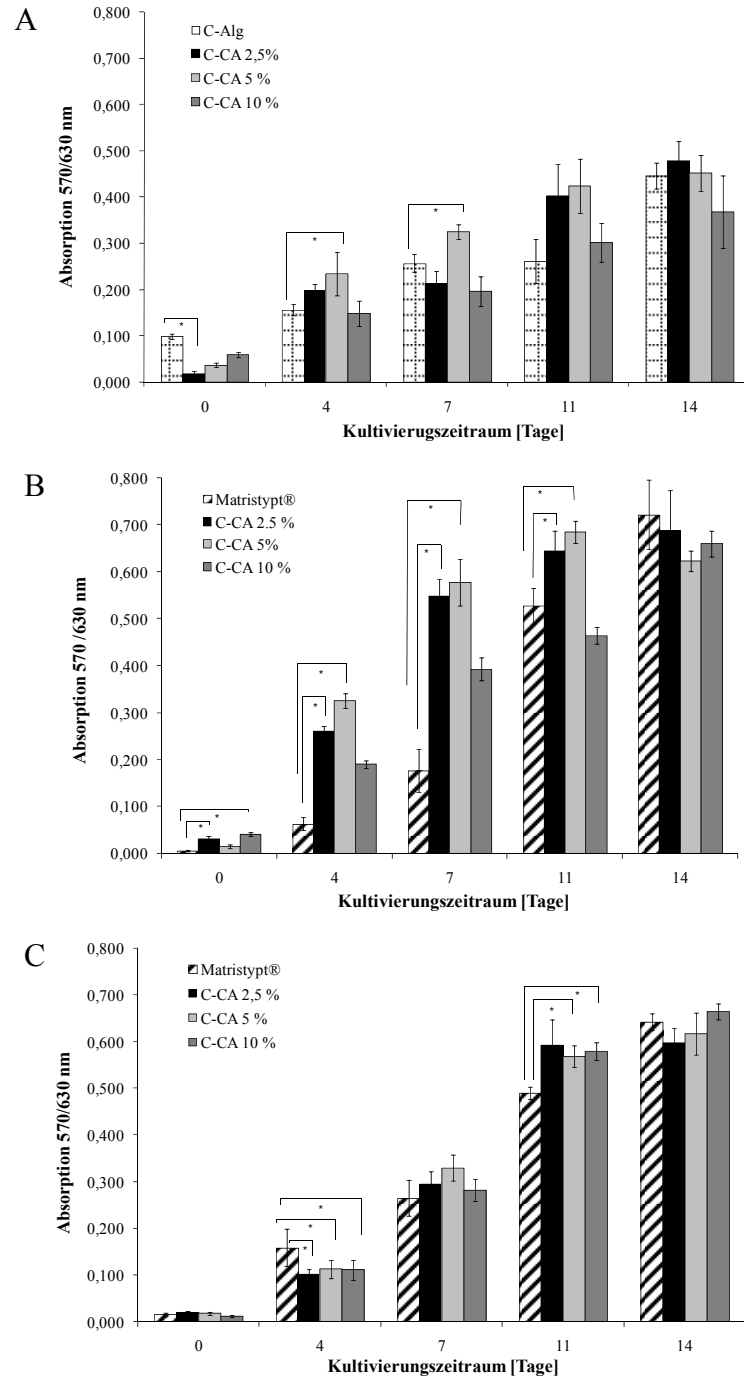


Abbildung 22: MTT-Test für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf C-CA Matrices gegen ihre Referenz. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Somit konnte vor allem in den ersten Tagen der Kultivierung der Matrizes eine höhere Viabilität/Proliferation gefunden werden, die auf die Freisetzung der CA aus der Matrix zurückzuführen sein können. Wie bereits beschrieben wird PSA *in vivo* die Beteiligung an der synaptischen Plastizität in der Embryogenese sowie während Lern- und Gedächtnisvorgängen, am *axonal pathfinding* und am Remodelling zugeschrieben (Kleene and Schachner 2004; Leckband 2004). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass PSA die Migration neuronaler Stammzellen fördert (Landmesser et al. 1990). Für die verwendeten C-CA Matrizes kann man davon ausgehen, dass so die Verteilung der Zellen im Konstrukt begünstigt und ein vermehrt dreidimensionales Wachstum der Zellen ermöglicht werden sollte. (Mehr Details zum Einfluss der CA auf die Migration von Zellen sind in der Doktorarbeit von Yvonne Stark zu finden.) Zudem zeigen die Ergebnisse eine Anregung der Viabilität/Proliferation der Zellen selber durch Zusatz von CA. Somit stellt die Modifizierung der Kollagenmatrix durch Dotierung mit CA eine Optimierung in Bezug auf die Viabilität/Proliferation gegenüber der Referenz dar.

Kollagen-Hyaluronsäure (C-HA) Matrizes

Die Ergebnisse des MTT-Tests zur Viabilität/Proliferation der Modellzellen auf den Kollagen-Hyaluronsäure (C-HA) Matrizes sind in Abbildung 23 dargestellt. Alle eingesetzten Zellen proliferierten über den Kultivierungszeitraum von 14 Tagen und die Absorptionswerte stiegen über den Beobachtungszeitraum. Während die Hep-G2 Zellen auf C-HA 2,5 % und C-HA 5 % eine signifikant geringere Viabilität/Proliferation als auf der Referenzmatrix C-Alg zeigten, konnten mit Zusatz von 10 % HA Absorptionswerte wie auf der Referenz erreicht werden (Abbildung 23A). Auch die neuronalen Zellmodelle PC-12 (Abbildung 23B) und ISC (Abbildung 23C) proliferierten vergleichbar gut auf der Referenz MS und den C-HA Matrizes. Zu Beginn der Kultivierung konnten mit den PC-12 Zellen signifikant höhere Absorptionswerte und damit eine höhere Viabilität/Proliferation gemessen werden. Hier lieferten geringere Konzentrationen an HA in den Matrizes signifikant bessere Ergebnisse. Höhere HA-Konzentrationen führten daneben auch zu hohen Standardabweichungen. Für die ISC galten diese Beobachtungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Viabilität/Proliferation nicht. Die höheren Absorptionswerte zu Beginn der Kultivierung mit PC-12 Zellen stehen möglicherweise in Verbindung mit der Eigenschaft der HA, als Oberflächenmoleküle *in vivo* an interzellulären Anhaftungs- und Erkennungsprozesse beteiligt zu sein (Falbe and Regnitz 1998). Eine Förderung der Zelladhäsion und Spreitung hat häufig auch eine beschleunigte Proliferation zur Folge. Die Adhäsion wird im Folgenden noch untersucht. Da HA schon bei niedrigen Konzentrationen Gele bildet, die den Nährstofftransport behindern, werden die

Ergebnisse mit sinkender HA-Konzentration besser. Die Schaffung größerer Hohlräume in der Kollagenmatrix durch Zusatz von HA (Marlovits et al. 2004) sollte eigentlich positive Effekte für die Kultivierung mit sich bringen. Dies konnte in den Versuchen nicht bestätigt werden.

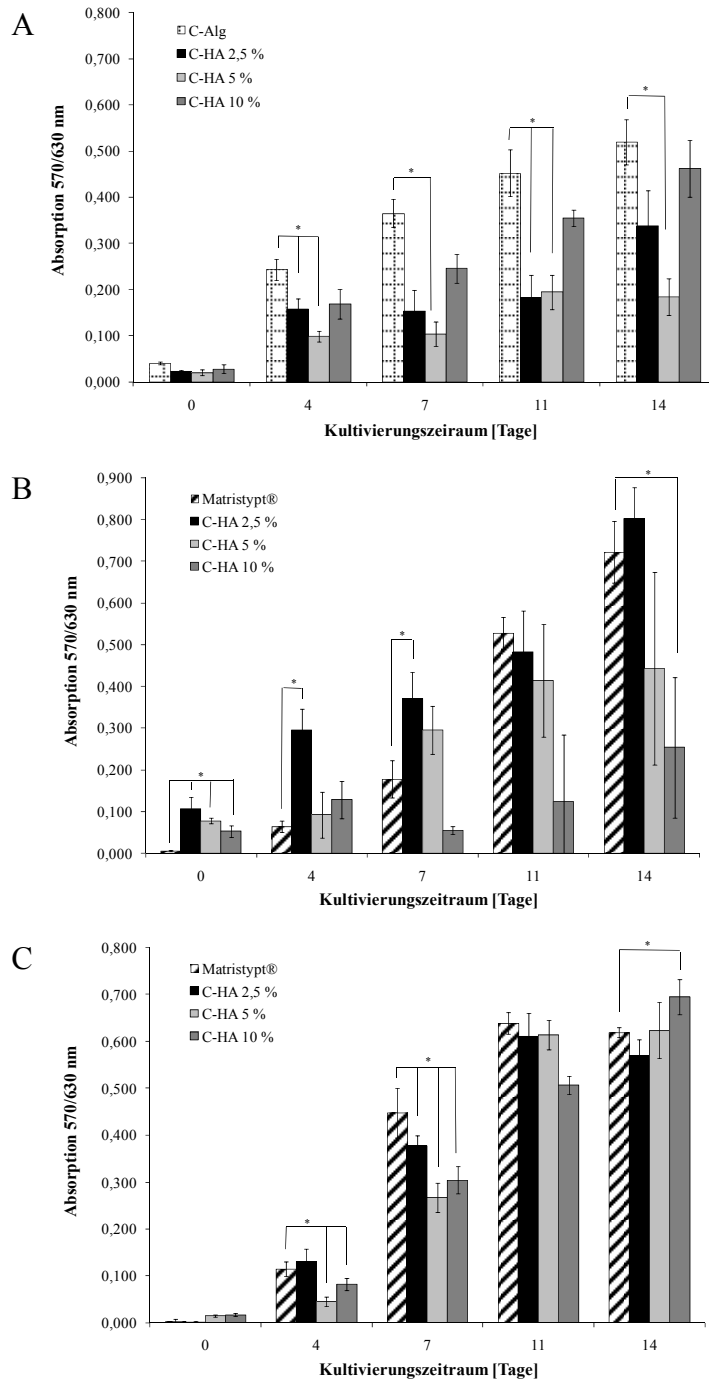


Abbildung 23: MTT-Test für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf C-HA Matrices gegen ihre Referenz. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Kollagen-Seide (C-Seide) Matrix

In Abbildung 24 sind die Ergebnisse des MTT-Tests auf C-Seide dargestellt. Die Kollagenmatrix mit eingearbeiteten Fibroinfasern ermöglichte allen verwendeten Zellmodellen eine stetige Viabilität/Proliferation.

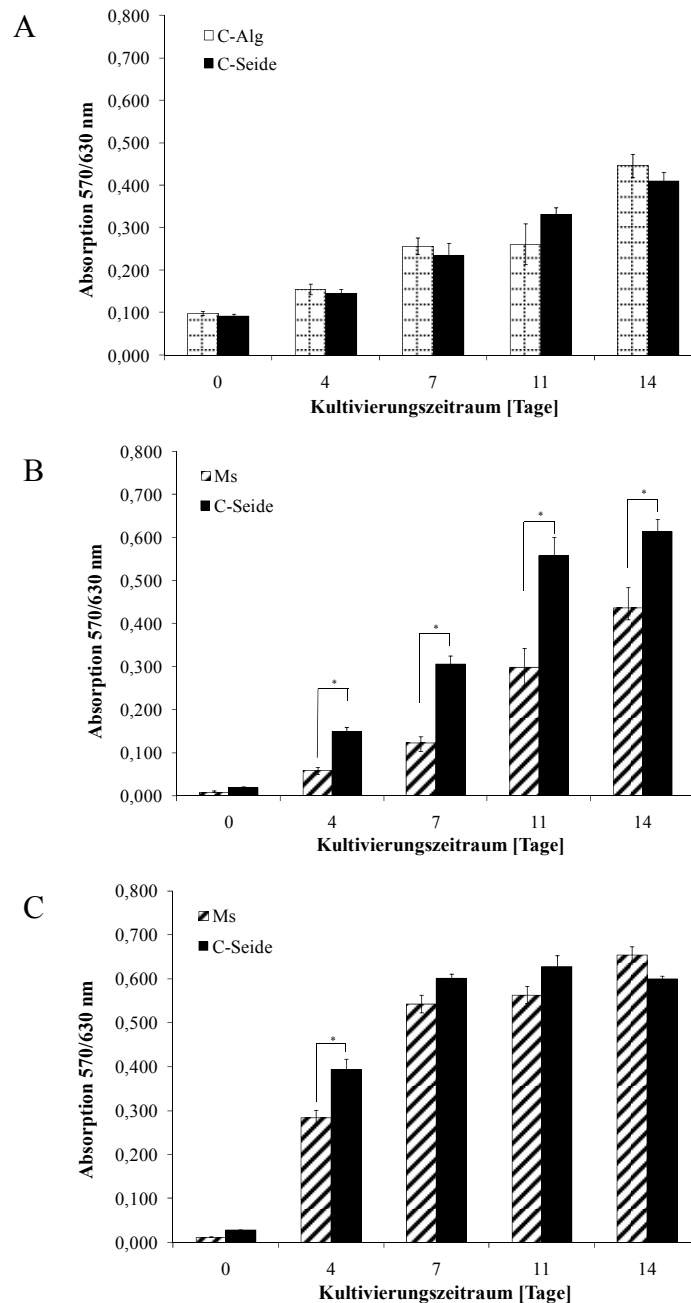


Abbildung 24: MTT-Test für Hep-G2 (A), PC-12 (B) (Marten 2006) und ISC (C) (Marten 2006) auf C-Seide gegen ihre Referenz. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Im Vergleich zur Referenzmatrix C-Alg konnten mit der Leberzelllinie Hep-G2 keine Unterschiede in der Viabilität/Proliferation beobachtet werden (Abbildung 24A). Die Zellen erreichten vergleichbare Absorptionswerte wie auf C-Alg. Es konnten also keine Biokompatibilitätsprobleme durch den Zusatz von Fibroin festgestellt werden (vgl. Altman et al. 2003). Ähnliche Ergebnisse lieferte die Untersuchung der Viabilität/Proliferation der ISC auf C-Seide gegenüber der Referenz MS (Abbildung 24C). Allerdings zeigten die immortalisierten Gliazellen zu Beginn eine signifikant höhere Viabilität/Proliferation, erreichten jedoch sowohl auf MS als auch auf C-Seide ein Plateau. Für die PC-12 Zellen konnte über den gesamten Kultivierungszeitraum eine signifikant höhere Viabilität/Proliferation gegenüber der Referenz gemessen werden (Abbildung 24B).

In Hinblick auf die neuronalen Modellzellen führte der Zusatz von Seide zu einer Verbesserung gegenüber der reinen Kollagenmatrix MS. Die zusätzlichen Fasern scheinen die Viabilität/Proliferation dieser Zellen zu begünstigen. Die Stagnation der Viabilität-/Proliferationswerte auf C-Seide sowie MS nach 7 Tagen ist durch das schnelle Wachstum der ISC und damit einer maximalen Besiedlung der Matrix nach 14 Tagen unter statischen Kultivierungsbedingungen zu erklären. Eine Toxizität des Fibroins auf die Testzellen kann anhand der Hep-G2 Zellen ausgeschlossen werden; das Material ist biokompatibel. Das Strukturprotein Seide bestätigt damit die Eignung für das *Tissue Engineering*. Die besondere Kombination aus Festigkeit und Elastizität (Altman et al. 2003) wird in Abschnitt 4.3.1 in Zusammenhang mit der Testung des nativen Materials näher untersucht.

4.2.4 Zelladhäsion auf den Derivaten der Kollagenmatrix

Gemäß dem Screening System wurde zusätzlich zur Viabilität/Proliferation die Adhäsion der Zellen auf den zu testenden Materialien im Vergleich zu ihren Referenzen untersucht (Anhang 6.4.5). Obwohl die Zellen auf Biomaterialien für das *Tissue Engineering* gut adhären sollen, ist im speziellen Fall der peripheren Nervenregeneration vor allem Zellmigration, -proliferation und synaptische Plastizität erwünscht, um eine Wiederherstellung des durchtrennten Nervens möglichst schnell zu erzielen.

Kollagen-Colominsäure (C-CA) Matrizes

Die Dotierung der Kollagenmatrix mit CA soll die Eigenschaften des Materials für die periphere Nervenregeneration verbessern, da PSA *in vivo* die Zell-Migration und die synaptische Plastizität fördert sowie an Regenerationsprozessen bei peripheren Nervenläsionen physiologisch beteiligt ist (Kleene and Schachner 2004; Leckband 2004). Die Untersuchung der Zelladhäsion ist in Abbildung 25 dargestellt.

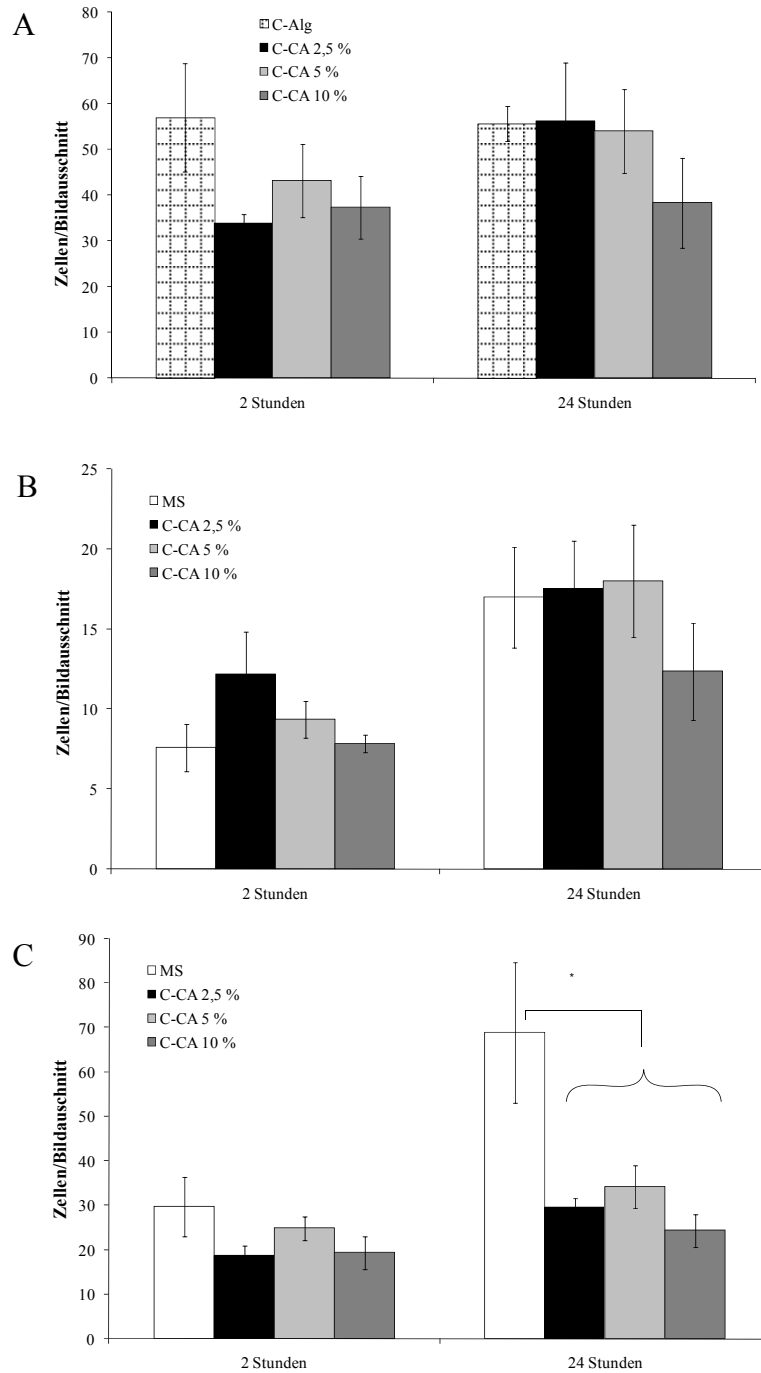


Abbildung 25: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf den C-CA Matrices gegen ihre Referenz. Der Adhäsionsassay wurde gemäß Anhang 6.4.5 durchgeführt und ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Parallel zum Viabilitäts-Assay (Abschnitt 4.2.3) war die Zelladhäsion der PC-12 Zellen auf den C-CA Matrices zu Beginn (nach 2 Stunden) besser als auf der Referenz MS (Abbildung 25B). Mit steigendem CA-Gehalt wurde die Adhäsion der PC-12 Zellen auf den Materialien reduziert. Dies ist möglicherweise auf die Eigenschaft der CA zurückzuführen, Zell-Zell-

Kontakte zugunsten der Migration und synaptischen Plastizität zu reduzieren. Nach 24 Stunden wurde kein signifikanter Unterschied zur Referenz MS mehr beobachtet. Im Gegensatz dazu hatte die Dotierung der Kollagenmatrizes mit CA einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der ISC auf den Materialien (Abbildung 25C). ISC haben generell die Eigenschaft, langsam auf Oberflächen zu adhären und brauchen sehr lange, um vollständig auf der Oberfläche zu spreiten. Dies ist auch bei der Kultivierung in T-Flaschen zu beobachten. Die Adhäsion der ISC ist somit sehr sensitiv. Nach 24 Stunden war die Adhäsion der ISC auf den C-CA Matrizes gegenüber der Referenz signifikant reduziert.

Auch die Adhäsion der Hep-G2 Zellen bestätigte die verminderte Adhäsion und Spreitung der Zellen auf den neuen Materialien (Abbildung 25A) gegenüber einer verbesserten Viabilität/Proliferation gerade zu Beginn der Kultivierung (Abschnitt 4.2.3). Nach 24 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied in der Adhäsion der Zellen zur Referenz mehr gefunden werden. Aber auch hier konnte die Tendenz reduzierter Adhäsion bei steigendem CA-Gehalt beobachtet werden, der durch die Reduktion der Zell-Zell-Kontakte im Zuge verbesserter Zellmobilität zu erklären sein könnte. Damit vermindert die Eigenschaft der C-CA Materialien, die Adhäsion zu reduzieren, die Eignung der Materialien für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven nicht. Es überwiegen die ermittelte verbesserte Viabilität/Proliferation (Abschnitt 4.2.3) und die in der Literatur beschriebenen physiologischen Eigenschaften des Materials. Daher sollte das Material im Fein-Screening weiter auf seine Eigenschaften untersucht werden.

Kollagen-Hyaluronsäure (C-HA) Matrizes

Der Zusatz von HA zur Optimierung der Kollagenmatrix soll die Eigenschaften des Materials für die periphere Nervenregeneration über seine Fähigkeiten als Gerüstbildner (Marlovits et al. 2004) verbessern. Im Gegensatz zur CA wurde durch Zusatz von HA eine Steigerung der Zelladhäsion erwartet, da HA als Bestandteil der EZM an Anhaftungs- und Erkennungsprozessen beteiligt ist (Falbe and Regnitz 1998). Dies konnte jedoch für die Adhäsion der Hep-G2 Zellen (Abbildung 26A) und der ISC (Abbildung 26C) auf den Materialien nicht nachgewiesen werden. Sie adhärten bei jeglichem Zusatz von HA zur Kollagenmatrix schlechter als auf der jeweiligen Referenz (C-Alg bzw. MS). Nach 24 Stunden war dieser Unterschied in der Adhäsion sogar signifikant (Statistik: Anhang 6.1). Auch die PC-12 Zellen zeigten nach 24 Stunden eine schlechtere Adhäsion auf C-HA als auf MS (Abbildung 26B). Allein zu Beginn konnten die PC-12 Zellen auf den C-HA Matrizes geringfügig besser adhären. Da auch die Viabilität/Proliferation zu Beginn des Kultivierungszeitraums mit PC-12 signifikant höher war (Abschnitt 4.2.3), scheint hier die

Adhäsion die Viabilität/Proliferation zu begünstigen. Die bessere Anhaftung und Spreitung hat ein schnelleres Zellwachstum zur Folge. Zusammengefasst, dokumentieren die ermittelten Ergebnisse (Viabilität/Proliferation, Adhäsion) nach Durchführung des Pre-Screenings jedoch keine Verbesserung des Basismaterials Kollagen durch Zusatz von HA. Ein Fein-Screening der C-HA Materialien wurde daher nicht vorgesehen.

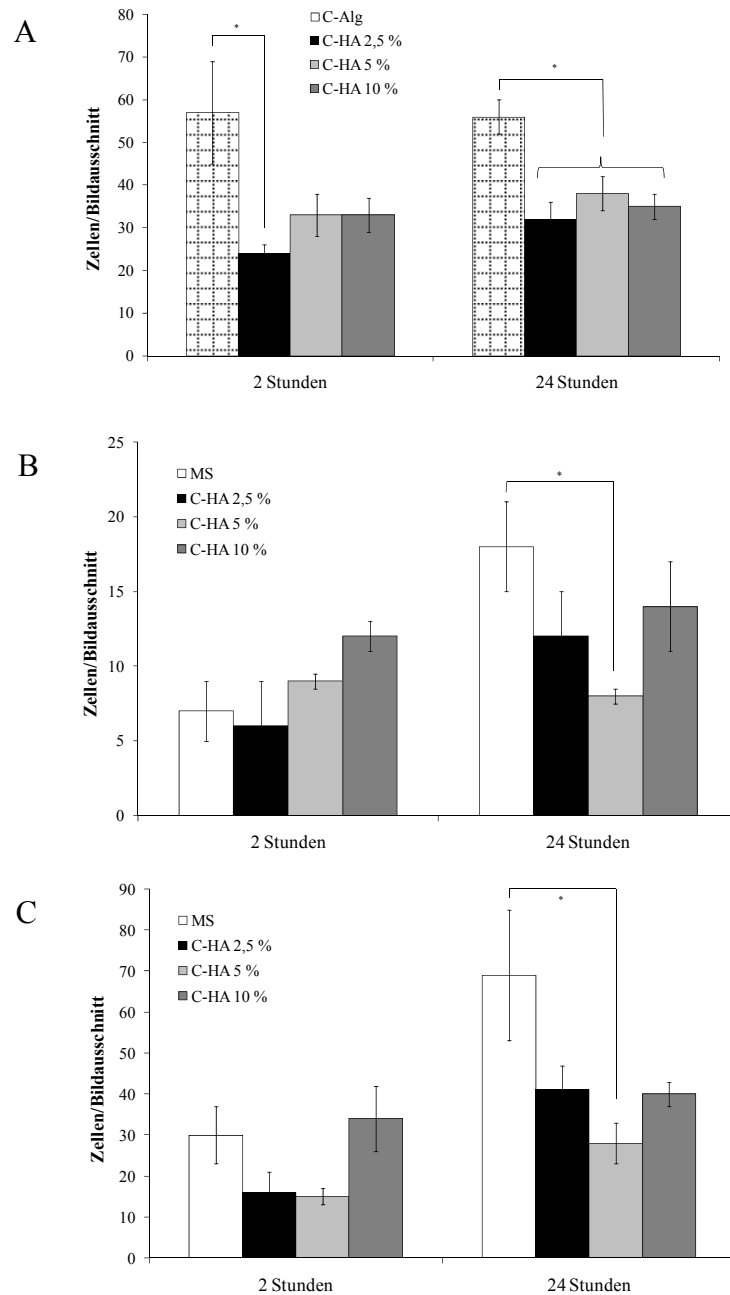


Abbildung 26: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf den C-HA Matrizes gegen ihre Referenz. Der Adhäsionsassay wurde gemäß Anhang 6.4.5 durchgeführt und ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Kollagen-Seide (C-Seide) Matrix

Der Zusatz von Seidenfasern (Fibroin) zur Kollagenmatrix soll die Eigenschaften des Materials für die periphere Nervenregeneration durch seine mechanischen und adhäsiven Eigenschaften verbessern.

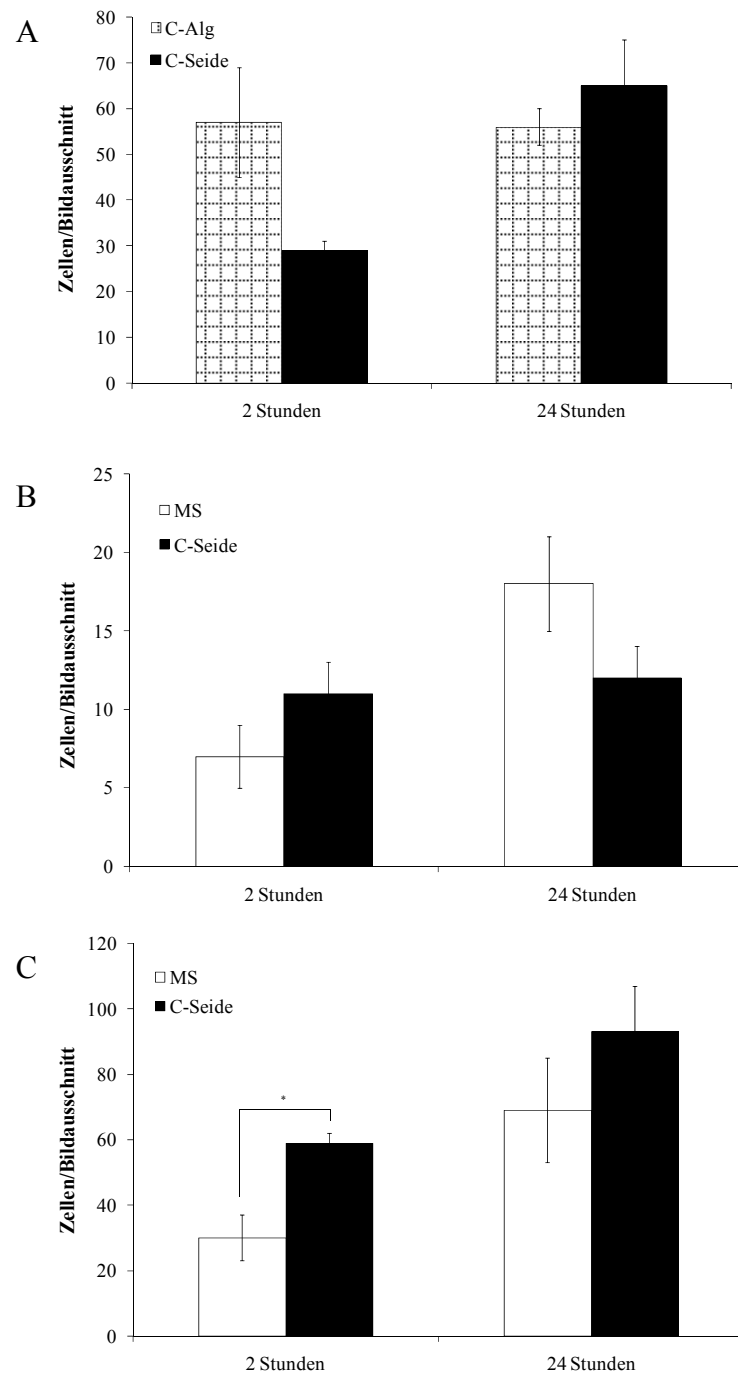


Abbildung 27: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A), PC-12 (B) und ISC (C) auf C-Seide gegen ihre Referenz. Der Adhäsionsassay wurde gemäß Anhang 6.4.5 durchgeführt und ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse des Adhäsionsassays der gewählten Modellzellen auf C-Seide im Vergleich zur Referenz. Für die Zelllinien Hep-G2 und PC-12 konnten keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion nachgewiesen werden. Die Adhäsion der ISC jedoch wurde durch den Zusatz von Fibroinfasern zur Kollagenmatrix nach 2 Stunden signifikant verbessert. Auch nach 24 Stunden ist eine bessere Adhäsion zu erkennen. Erneut scheint die gute Adhäsion die Viabilität/Proliferation zu begünstigen und zu einer gesteigerten Viabilität/Proliferation zu Beginn des Kultivierungszeitraums zu führen (vgl. Abschnitt 4.2.3).

Fein-Screening

4.2.5 Untersuchung der Proliferation mittels BrdU-Assay

Da mit dem MTT-Test nicht direkt die Proliferation der Zellen sondern allein ihre Mitochondrien- und Stoffwechselaktivität bestimmt werden kann, ist der MTT-Test zunächst eine schnelle und kostengünstige Methode, einen Eindruck von der Viabilität/Proliferation der Zellen zu bekommen. Für ausgewählte Materialien wurde jedoch im Fein-Screening ein BrdU-Assay zur weiteren Quantifizierung der Proliferation als Bewertungskriterium hinzugenommen (vgl. Abschnitt 4.1.3). BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) ist ein Pyrimidinanalogon und wird im Zuge der Zellteilung bei der Replikation der DNA wie ein Thymidin-Baustein in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Das eingebaute BrdU kann dann über Antikörperwechselwirkungen quantifiziert werden. Das Screening-System sieht die Verwendung des *colorimetrischen BrdU Proliferation ELISA* der Firma Roche vor (Anhang 6.4.6). Für die getesteten Kollagenmatrizes erbrachte die photometrische Auswertung der Farbreaktion jedoch falsche und nicht reproduzierbare Ergebnisse, da der spezifische Antikörper gegen BrdU unspezifisch an die Kollagen-Oberfläche der Matrizes band (nachgewiesen über einen Blindwert). Auch durch Blocken mit verschiedenen Blockierungsreagenzien (BSA, Hefe, Ziegen Serum, Tween) konnten keine zuverlässigen Ergebnisse erzielt werden. Daher wurde für die Quantifizierung der Proliferation von Zellen auf den Kollagenmatrizes das *5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I* (Artikelnr.: 11296736001) der Firma Roche verwendet. Dabei wird das eingebaute BrdU nicht über eine Farbreaktion quantifiziert sondern mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers detektiert. Die Problematik der unspezifischen Antikörper-Bindung bestand hier nach wie vor, visuell konnte die Fluoreszenz aber über die Intensität und die Doppelfärbung mit DAPI eindeutig den Zellen zugeordnet werden.

Die Matrizes wurden im 96-Loch-Format, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, mit Hep-G2 und ISC besiedelt und bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach 7 Tagen wurde das Medium

abgenommen und die besiedelten Matrizes für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Medium mit 10 µM BrdU inkubiert. Nun wurden gemäß des Standardprotokolls des *5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I* der Firma Roche zunächst die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen BrdU inkubiert. Die Antikörperbindung wurde schließlich mit einem fluoreszeinmarkierten anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert und konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Dazu wurden eine Doppelfärbung mit DAPI angefügt (Anhang 6.4.4), um die relative Anzahl der fluoreszeingefärbten, BrdU-markierten Zellen auszählen zu können. Die Quantifizierung der Proliferation mittels BrdU-Inkorporation wurde innerhalb des validierten Screening Systems im Fein-Screening für ausgewählte Materialien untersucht.

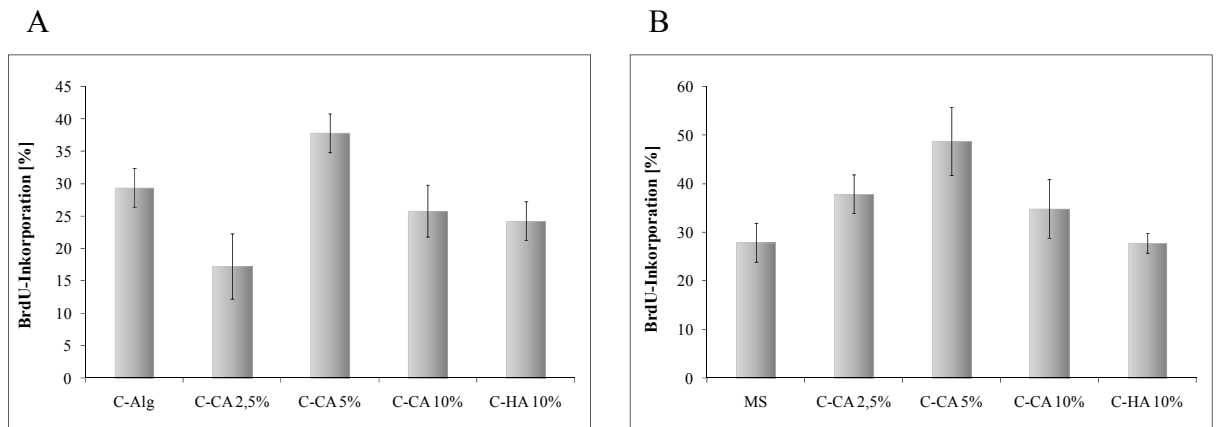


Abbildung 28: BrdU-Assay für Hep-G2 (A) und ISC (B) auf C-CA Matrizes und C-HA 10 % gegen ihre Referenz. Die y-Achse gibt die Anzahl der Fluoreszein-markierten Zellen gegenüber allen DAPI-gefärbten Zellen in Prozent an. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

In Abbildung 28 ist die Auswertung der Auszählung fluoreszeinmarkierter Zellen gegenüber allen DAPI gefärbten Zellen des Bildausschnitts in Prozent dargestellt. Die Bestimmung der Proliferation liefert im Allgemeinen vergleichbare Ergebnisse zum durchgeführten MTT-Test (siehe Pre-Screening, Abschnitt 4.2.3). Die prozentuale BrdU-Inkorporation und damit die Proliferation ist sowohl für die Hep-G2 Zellen als auch für die ISC auf C-CA 2,5 % und C-CA 10 % im Vergleich zu der entsprechenden Referenz (C-Alg bzw. MS) gleich hoch. Die Dotierung der Kollagenmatrix mit 5 % CA führte, wie bereits mittels MTT-Test beobachtet, zu einer etwas höheren Proliferationsrate. Die Kollagenmatrix mit 10 % HA führt im Vergleich zur entsprechenden Referenz zu keiner Verbesserung der Proliferation.

4.2.6 Immunhistochemischer Nachweis der Thyrosinhydroxylase

Thyrosinhydroxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Synthese von Dihydroxyphenylalanin (DOPA) aus L-Tyrosin in der wichtigen Biosynthese der Katecholamine (Parab et al. 2007). Aufgrund dieser entscheidenden Rolle bei der Synthese des Neurotransmitters Dopamin ist die Thyrosinhydroxylase ein wichtiger neuronaler Marker der PC-12 Zellen (Haycock and Haycock 1991; Nagatsu et al. 1964). Mittels eines ELISA wurde die exprimierte Thyrosinhydroxylase im Zytosol immunhistochemisch nachgewiesen (Anhang 6.4.7). Es wurde eine Doppelfärbung mit DAPI (Anhang 6.4.4) durchgeführt. Die Überlagerung der Färbungen (blau: Zellkernfärbung mit DAPI; rot: Färbung der exprimierten Thyrosinhydroxylase im Zytosol) in Abbildung 29 zeigten, dass nahezu alle PC-12 Zellen unabhängig von der neuronalen Differenzierung auf der Kollagenmatrix MS und ihren Modifikationen mit CA die Thyrosinhydroxylase exprimierten. Exemplarisch sind die immunhistochemischen Färbungen der PC-12 Zellen auf MS (Abbildung 29A) und C-CA 5 % (Abbildung 29B) dargestellt. Damit beeinflusste der Zusatz von CA in den Kollagenmatrices die Expression dieses wichtigen neuronalen Markers nicht. Eine genauere Untersuchung der Genexpression auf molekulargenetischer Ebene wurde mittels RT-PCR (Abschnitt 4.2.8) und DNA-Chips (Abschnitt 4.2.9) durchgeführt.

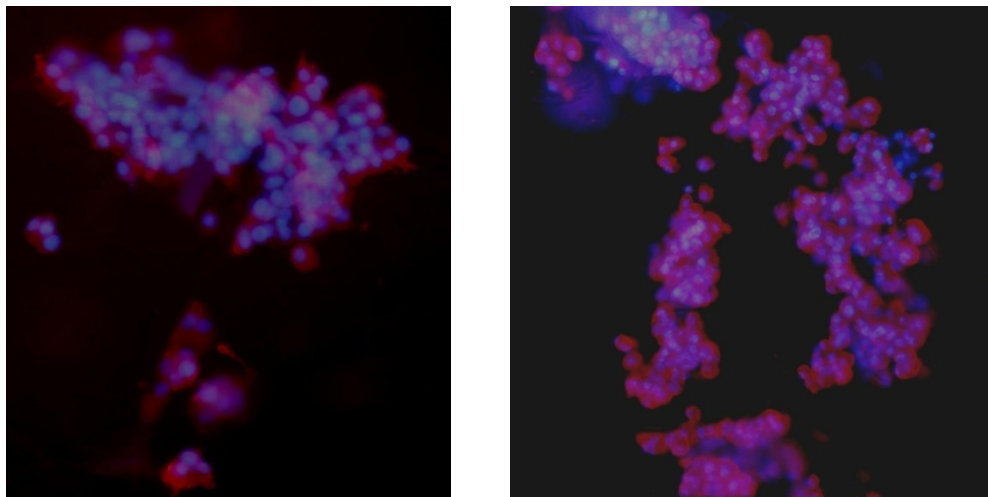


Abbildung 29: Immunhistochemische Färbung von PC-12 Zellen auf MS (A) und C-CA 5% (B). blau: Zellkernfärbung mit DAPI; rot: Färbung der exprimierten Thyrosinhydroxylase im Zytosol. Unabhängig von der neuronalen Differenzierung der PC-12 Zellen exprimieren alle PC-12 Zellen auf der Kollagenmatrix und ihren Modifikationen mit CA die Thyrosinhydroxylase.

4.2.7 Quantifizierung des sezernierten Albumins

Da die Quantifizierung des sezernierten Albumins, wie beschrieben, ein Maß für die Stoffwechselaktivität der kultivierten Zellen ist (Mundt 2002), kann die Kultivierung von Zellen auf unterschiedlichen Materialien und die anschließende Bestimmung des sezernierten Albumins einen Aufschluss über die Konformität der Stoffwechsellistung und damit ergänzend zum durchgeführten MTT-Test über die Eignung der Materialien zur Kultivierung von Zellen liefern. Das Fein-Screening sieht die Untersuchung dieses speziellen Zellmarkers der Leberzelllinie Hep-G2 nur für ausgewählte Materialien vor (vgl. Abschnitt 4.1.3).

Anhand der Ergebnisse des MTT-Tests (vgl. Abschnitt 4.2.3) wurde die Albuminproduktion der Hep-G2 Zellen als Maß für die Stoffwechselaktivität auf C-CA 5 % und C-HA 10 % gegen die Referenz C-Alg untersucht (Röker 2006). Um das sezernierte Albumin zu quantifizieren, wurden jeweils 6 Matrizes mit je 5×10^3 Hep-G2 Zellen besiedelt und in 96-Lochplatten über 15 Tage kultiviert. Als Blindwert diente eine unbesiedelte Matrix. Alle 3-4 Tage wurde der Mediumüberstand abgenommen und erneuert. Die Mediumproben wurden bei 4 °C gelagert und gemeinsam vermessen. Die Probenahme erfolgte in regelmäßigen Abständen. Die Albumin-Konzentration wurde nach dem etablierten Protokoll (vgl. 4.1.4) über einen Sandwich-ELISA für humanes Serum Albumin (HSA) bestimmt (Anhang 6.4.9). Bei der Auswertung wurde die sezernierte Albumin-Menge pro Tag berechnet. (Röker 2006)

In Abbildung 30 ist die von den Hep-G2 Zellen sezernierte HSA-Menge pro Tag in Abhängigkeit der kultivierten Matrix dargestellt. Bis Tag 13 nahmen die Albuminproduktion und damit die Stoffwechselaktivität der Zellen auf der Referenz sowie auf C-HA 10 % zu, im Folgenden war eine Abnahme der Sekretion zu erkennen. Der Rückgang der Stoffwechselaktivität kann mit einem diffusionsbedingten Nährstoffdefizit infolge der statischen Kultivierung zusammenhängen (Röker 2006). Im Vergleich dazu wurde die Albuminproduktion auf C-CA 5 % über den kompletten Zeitraum gesteigert. An Tag 11 und 13 war eine signifikant höhere Albuminproduktion auf C-Alg gegenüber C-CA 5 % zu beobachten. Nach 15 Tagen jedoch produzierten die Zellen auf C-CA 5 % und C-Alg vergleichbare Mengen an Albumin. Diese Veränderung der Albuminproduktion konnte entgegengesetzt zu der Änderung der Viabilität/Proliferation mittels MTT-Test in den ersten Tagen der Kultivierung beobachtet werden (Abbildung 22A und Abbildung 30). Zusammengefasst, steigerte sich die Viabilität zu Beginn stark, am Ende des Kultivierungszeitraums wurde jedoch eine vergleichbare Albuminproduktion erreicht. Auf C-HA 10 % konnten an Tag 15 nur verminderte Mengen an Albumin im Mediumüberstand nachgewiesen werden. Somit ist der Verlauf der Albuminproduktion auf allen drei

Materialien trotz der sehr hohen Stoffwechselaktivität auf C-Alg an Tag 13 vergleichbar zu der mit dem MTT-Test ermittelten Viabilität/Proliferation.

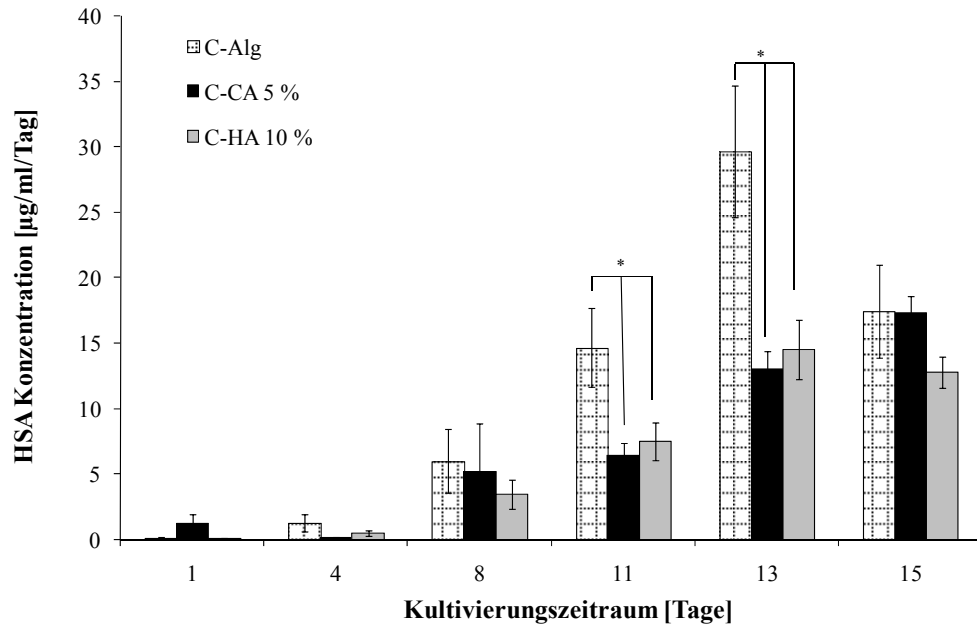


Abbildung 30: Ergebnisse des Albumin-ELISA für Hep-G2 Zellen. Die Referenzmatrix C-Alg sowie C-CA 5% und C-HA 10% wurden mit 5×10^3 Zellen besiedelt und über 15 Tage auf den Matrices kultiviert. Das ins Medium sezernierte Albumin wurde mit Hilfe des optimierten ELISA quantifiziert. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. (Röker 2006)

4.2.8 RT-PCR von Markergenen

Um den Einfluss der Matrices auf molekulargenetischer Ebene zu untersuchen, wurde eine RT-PCR von Markergenen angefertigt. Dabei sollte die Genexpressionsanalyse der ausgewählten Gene wie Albumin, Transferrin, Zytochrom P450 3A4, UDP-Glucuronosyltransferase, β -Aktin und Thyrosinhydroxylase eine Information über die Beeinflussung der Genexpression durch die zusätzlichen Komponenten in der Matrix geben. Das Fein-Screening sieht diese Untersuchung auf molekulargenetischer Ebene nur für ausgewählte Materialien vor (vgl. Abschnitt 4.1.3). Aufgrund der Ergebnisse des Fein-Screenings, in dem sich zeigte, dass die Dotierung der Kollagenmatrix mit Colominsäure eine Optimierung darstellen könnte, wurde die PCR daher ausschließlich für die C-CA Matrices mit allen Modellzellen durchgeführt.

Um eine ausreichende Menge an RNA isolieren zu können, wurden Matrices mit 30 mm Durchmesser mit 3×10^5 Zellen besiedelt und anschließend eine Woche in 6-Lochplatten bei

37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Von jedem Zell/Matrix Konstrukt wurden 3 Replikate kultiviert und abschließend gepoolt. Die RNA-Isolierung wurde nach dem *Invitrogen TRIzol Reagent*® Standard Protokoll durchgeführt (Anhang 6.4.10). Vor der Verwendung der RNA wurde eine Qualitätskontrolle der RNA mittels des *RNA Nano LabChips*® im *Agilent 2100 Bioanalyzer* durchgeführt (Daten nicht gezeigt) (Anhang 6.4.11). RNA guter Qualität wurde zunächst mittels des Enzyms MLV Reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA umgeschrieben, anschließend wurde die RT-PCR mit dem PCR-Thermocycler Px2 Thermal Cycler® der Firma Thermo Electron Corporation durchgeführt. Zur Visualisierung wurden die Proben auf 2 %ige TAE-Agarosegele aufgetragen. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein Längenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe auf die Trägermatrix aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 30-40 min durchgeführt. Die DNA-Banden wurden abschließend unter UV-Licht visualisiert (Anhang 6.4.12).

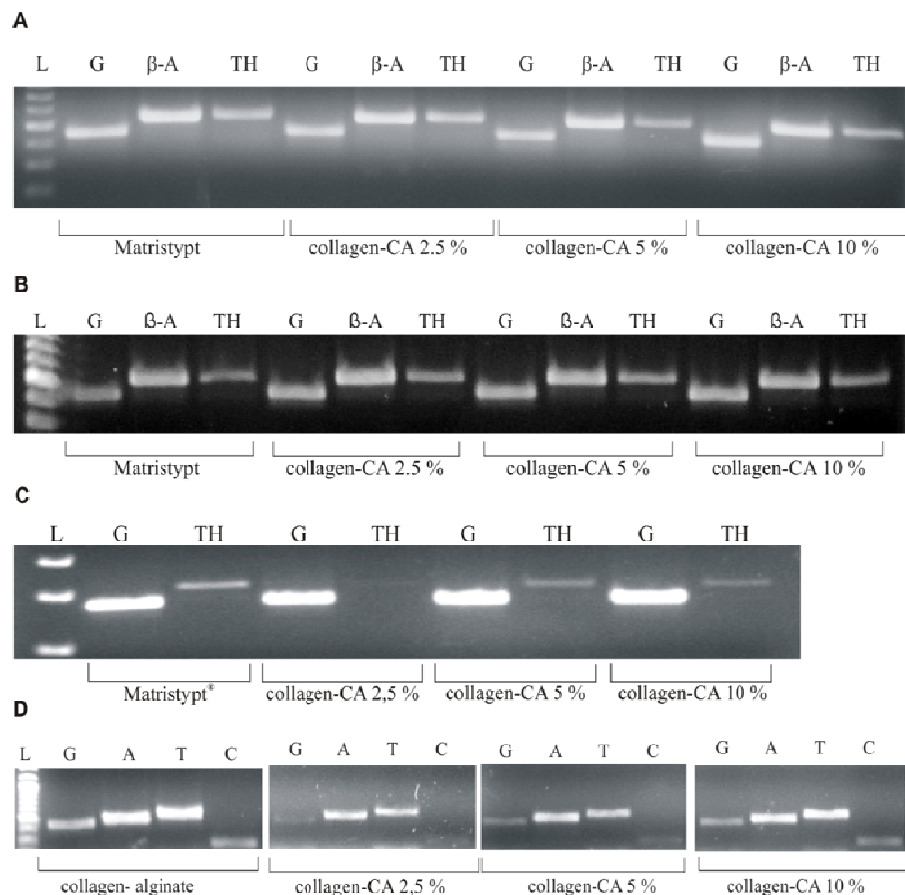


Abbildung 31: RT-PCR von Markergenen der verschiedenen Modellzellen. L: DNA Ladder; G: Housekeeping Gen *Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH)*; β -A: β -Aktin; TH: *Thyrosinhydroxylase*; A: *Albumin*; T: *Transferrin*; C: *Zytochrom P450 3A4*; U: *UDP-Glucuronosyltransferase*

A: PC-12; B: neuronale differenzierte PC-12 Zellen; C: ISC; D: Hep-G2.

Die RT-PCR Analysen zeigen die Expression der Gene für GAPDH, β -Aktin und Thyrosinhydroxylase der undifferenzierten (Abbildung 31A) sowie der differenzierten (Abbildung 31B) PC-12 Zellen auf den C-CA Matrices gegenüber der Referenz MS. Für die Kultivierung auf allen eingesetzten Materialien konnte die mRNA-Expression dieser Gene gezeigt werden. Die Thyrosinhydroxylase konnte bereits immunhistochemisch nachgewiesen werden (Abschnitt 4.2.6). Aufgrund der entscheidenden Rolle bei der Synthese des Neurotransmitters Dopamin wird die Thyrosinhydroxylase als ein wichtiges neuronales Markergen angesehen (Haycock and Haycock 1991; Nagatsu et al. 1964). Die Expression der spezifischen Thyrosinhydroxylase sowie der beiden Housekeeping Gene GAPDH und β -Aktin belegen, dass die C-CA Matrices die Genexpression nicht negativ beeinflussen.

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression des neuronalen Markergens Thyrosinhydroxylase in ISC konnte eine steigende Thyrosinhydroxylase-Expression in Abhängigkeit des steigenden CA-Gehalts der Kollagenmatrices nachgewiesen werden (Abbildung 31C). In Gegenwart geringer CA Konzentrationen sank die mRNA-Expression gegenüber der Referenz MS. Mit steigendem CA-Gehalt in der Kollagenmatrix stieg die Genexpression jedoch wieder an und konnte vergleichbare Stärke zur Referenz erreichen. Damit wurde die Genexpression der ISC bei der Kultivierung auf Kollagenmatrices mit höherem CA-Gehalt nicht beeinflusst. Der Hintergrund des Einflusses geringer CA Konzentrationen auf die Genexpression muss in folgenden Arbeiten näher untersucht werden.

Darüber hinaus sind in Abbildung 31D die RT-PCR Analysen zur Expression der Gene für Albumin, Transferrin und CYP 3A4 von Hep-G2 Zellen auf den C-CA Matrices gegenüber der Referenz C-Alg dargestellt. Es konnte eine hohe mRNA-Expression für Albumin festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit der quantitativen Bestimmung des sezernierten Albumins mittels des HSA-ELISA (Abschnitt 4.2.7). Albumin übt wichtige Funktionen im Körper aus. So ist es an der Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks, an der Pufferung und am Transport von Hormonen, Fettsäuren und Arzneistoffen beteiligt (Doweiko and Nompoggi 1991). Darüber hinaus konnte eine hohe mRNA-Expression für Transferrin nachgewiesen werden. Transferrin ist das zentrale Transportprotein für Eisen im Blut und in allen anderen Körperflüssigkeiten. Das Phase I Enzym Zytochrom P450 3A4 (CYP 3A4) ist das am häufigsten vorkommende Enzym des Zytochrom P450 multifunktionellen Oxidasesystems im Metabolisierungsprozess des Körpers und metabolisiert diverse endogene und exogene Verbindungen. CYP 3A4 wird konstant von der Leberzelllinie exprimiert und ist in Gegenwart einiger Arzneistoffe erhöht, was zu einer Immunreaktion des Körpers führt (Usui et al. 2003). In Gegenwart der CA als dotierte Komponente der Kollagenmatrix wurde

eine reduzierte CYP 3A4 mRNA-Expression der auf den Matrizes kultivierten Hep-G2 Zellen gefunden. Zu beachten ist, dass die Aktivität und Expression besonders von Phase I Enzymen in der Zelllinie Hep-G2 generell gegenüber primärer Leberzellen reduziert ist (Andersen et al. 1998; Rodriguez-Antona et al. 2002).

4.2.9 Genexpressionsanalyse mittels eines murinen ZNS-Chips

Der Einfluss der CA in der Kollagenmatrix sollte auf molekulargenetischer Ebene für viele weitere Gene in parallel näher betrachtet werden. Um einen solchen Überblick über die Veränderung der Genexpression zu erhalten, wurden murine ZNS Chips zum Vergleich der Genexpression von ISC auf C-CA 10 % gegenüber der Referenz MS erstellt. Es wurde die maximale Konzentration an CA gewählt, um in jedem Fall einen Effekt zu erzielen.

Die Microarray Analyse ermöglicht die Beobachtung von Veränderungen in der Genexpression auf Ebene der mRNA in Abhängigkeit verschiedener Einflüsse. So können viele Gene schnell, effizient und mit hohem Durchsatz parallel untersucht werden. Damit erlaubt die Technik eine Bearbeitung komplexer biologischer und medizinischer Fragestellungen. Mit dem verwendeten murinen ZNS Chip konnten 352 Gene (low density Chip) mit jeweils 2 Replikaten parallel untersucht werden (insgesamt 1056 Spots und damit auszuwertende Datenpunkte). Es wurden zentrale neurale Gene für Neurotransmitter, Rezeptorproteine, Apoptosegene, Effektoren und Regulatorgene analysiert.

Dazu wurden zunächst immortalisierte Schwann Zellen eine Woche auf MS und C-CA 10 % kultiviert und anschließend die *total*-RNA isoliert (Anhang 6.4.10). Nach Prüfung der RNA-Qualität (Anhang 6.4.11) wurden die DNA-Chip Experimente mit Hilfe des *NEN[®] MicromaxTM TSATM Labeling and Detection Kits* von Perkin Elmer durchgeführt. Die cDNA der zu vergleichenden Proben wurde in einer reversen Transkription mit Biotin bzw. Fluoreszein markiert und anschließend mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen aufgereinigt (Anhang 6.4.13). Die so markierte cDNA wurde über Nacht auf den Chip hybridisiert und nach anschließender Signalverstärkungsreaktion detektiert. Hierzu wurden die DNA-Chips sechs Mal mit einem *GenePix[®] 4000B Fluoreszenzlaserscanner* im entsprechenden Kanal (532 nm, 635 nm) bei unterschiedlichen Einstellungen (Veränderung der PMT und der Laserstärke) ausgelesen. Die primäre Bild-Analyse wurde mit der Software *GenePixPro[®] 6.0* durchgeführt. Die hierbei generierten Daten wurden einer sekundären Analyse unterzogen. Diese Auswertung wurde von Frau Cornelia Repenning im Rahmen ihrer Doktorarbeit vorgenommen.

Der Versuch wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt, also ein biologisches Replikat erstellt. Die Gene, die übereinstimmend in den biologischen Replikaten als reguliert analysiert wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Regulierte Gene durch Zusatz von CA zur Kollagenmatrix. Es wurde die Genexpression der ISC nach Kultivierung auf C-CA 10 % gegenüber MS verglichen. Jeder Chip enthielt zwei Replikate innerhalb des Spottingmusters, zusätzlich wurde ein biologisches Replikat angefertigt. Die aufgeführten Gene stellen die übereinstimmenden exprimierten Gene nach primärer und sekundärer Datenanalyse dar. Die Angabe der Regulation bezieht sich auf die Kultivierung der ISC auf C-CA 10 %.

Gen	Funktion	Regulation
Rat alpha-1B adrenergic receptor	α_{1B} -adrenerger Rezeptor	↑
Rattus Chrng	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor	↑
Rattus Chrn2	Neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptor	↑
Rattus Htr2a	Serotonin-Rezeptor	↑
Nestin	Filament-Protein	↑
Caspasen	Apoptose	↓
T-cell death associated gene	Apoptose	↓
Rattus mRNA for Ptx3 protein	Zytokin-induzierte Akute-Phase-Proteine	↓
Synaptotagmin	Glykoprotein, das die Exozytose synaptischer Vesikel triggert	↓
Rattus Pomc mRNA	Proopiomelanocortin; Hormonvorläufer, Spaltung zu über 10 aktiven Hormonen	↓

Die Dotierung der Kollagenmatrix mit CA hatte zur Folge, dass oben aufgeführte Neurotransmitter-Rezeptoren vermehrt exprimiert wurden. Da sowohl adrenerge (zugehörige Neurotransmitter: Noradrenalin, Adrenalin) als auch cholinerge (zugehöriger Neurotransmitter: Acetylcholin) Rezeptoren reguliert waren, lässt das auf eine allgemeine Anregung der Erregungsleitung und synaptischen Plastizität durch CA schließen (Thews et al. 1999). Auch die erhöhte Expression eines Rezeptors für das Monoamin Serotonin spiegelt

diese allgemeine Anregung der Neurotransmitter-Wirkung wider. Im Speziellen konnte zudem bereits nachgewiesen werden, dass Serotonin-Rezeptoren bei peripheren Nervenläsionen herunterreguliert sind und erst bei vollständiger Regeneration den normalen Expressionsstatus wiedererlangen (Rende et al. 1999). Yoder et al. stellten durch immunhistochemische Nachweise fest, dass Serotonin-Rezeptoren in Schwann Zellen sowohl in gesunden als auch regenerierenden Nerven, nicht aber in degenerierenden Nerven exprimiert werden (Yoder et al. 1997). Die Förderung der Serotonin-Rezeptor Expression durch Zusatz von CA in der Kollagenmatrix könnte damit eine unterstützende Wirkung auf regenerierende Vorgänge nach Nervenläsionen zur Folge haben. Das Filament-Protein Nestin wird üblicherweise vor allem in neuroepithelialen Stammzellen exprimiert und spielt eine Rolle in der neuronalen Zelldifferenzierung. Da es im Zuge einer Nervenverletzung zunächst zu einer Dedifferenzierung myelinisierender Schwann Zellen (*Wallerische Degeneration*) und im Verlaufe der Regeneration eines peripheren Nerven zur Differenzierung der Schwann Zellen zurück zum myelinisierenden Phänotypen kommt, ist eine vermehrte Nestin-Produktion nach Nervenläsionen zu beobachten (Thews et al. 1999). Da auch CA die Expression dieses Proteins zu fördern schien, ist ein neuroprotektiver Effekt durch die Matrix vorstellbar.

Des Weiteren wurde durch die Modifizierung der Kollagenmatrix mit CA die Expression einiger Apoptosegene (*Caspasen, T-cell death associated gene*) reduziert. Auch die Verminderung des *pentaxin-related proteins*, das zu den Zytokin-induzierten Akute-Phase-Proteinen zählt, belegt die gute Biokompatibilität des C-CA Materials. Proopiomelanocortin ist ein Hormonvorläufer und kann zu über 10 aktiven Hormonen gespalten werden. Diese erfüllen wiederum diverse Funktionen. Proopiomelanocortin wurde durch Zusatz von CA in den ISC herunterreguliert. Aufgrund der Komplexität des Proteins kann jedoch kein sicherer Zusammenhang zwischen dem veränderten Material und der Veränderung der Genexpression hergestellt werden. Synaptotagmin ist ein membranständiges Glykoprotein neuronaler, synaptischer Vesikel und wird im ZNS sowie PNS weitverbreitet exprimiert. Das Protein triggert die Exozytose synaptischer Vesikel und ist damit an der Freisetzung der Neurotransmitter beteiligt (Yoshihara and Littleton 2002). Die Anreicherung während der peripheren Nervenregeneration ermöglicht eine Längenausdehnung des regenerierenden Axons (Ide 1996). Die Verminderung der Expression von Synaptotagmin durch die Kultivierung der ISC auf der C-CA Matrix wirkt nach diesem Kenntnisstand demnach nicht regenerationsfördernd. Es müsste geklärt werden, ob die Expression vermindert, das Gen aber noch funktionsfähig und aktiv ist oder ob es durch die CA in der Matrix komplett ausgeschaltet wird.

4.2.10 Rasterelektronenmikroskopie

Um die Veränderung und die Eignung der Struktur der Kollagen-Materialien durch zusätzliche Komponenten bewerten zu können, wurden von ausgewählten Materialien rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht. In Abbildung 32 sind die Strukturen von C-CA 5 % und C-HA 5 % gegenüber der reinen Kollagenmatrix MS gezeigt.

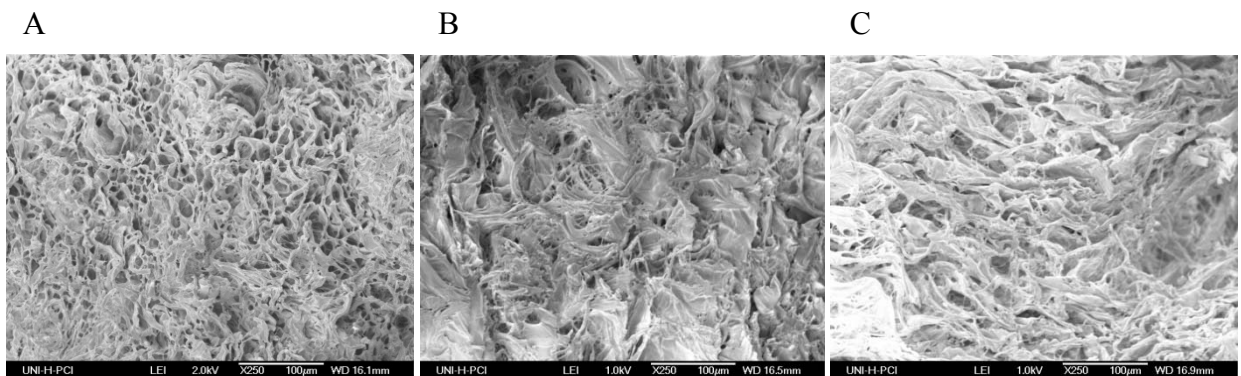


Abbildung 32: Konventionelle REM-Aufnahmen von MS (A), C-CA 5% (B) und C-HA 5% (C). Deutlich sichtbar werden die strukturellen Veränderungen der durch Zusatz von CA und HA modifizierten Matrizes gegenüber ihrer basierenden Kollagenmatrix.

Es wurde deutlich, dass die Modifizierung des Basismaterials Kollagen mit CA und HA zu einer strukturellen Veränderung führt. Allen Matrizes blieb die typisch faserige Struktur des Kollagens. Vor allem aber die Porengrößen und gerichtete Textur änderten sich durch die zusätzlichen Komponenten. Die bisher dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass alle drei Matrizes ein Zellwachstum ermöglichen. Jedoch schien vornehmlich die Modifikation durch Dotierung mit CA eine Optimierung der Kollagenmatrix im Hinblick auf periphere Nervenregeneration zu erbringen. Daher sollten die besiedelten Matrizes unter dem REM zu einer weiteren Beurteilung der C-CA Matrizes beitragen.

So wurden auch die Zell/Matrix Konstrukte nach 14 Tagen Kultivierung unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) ausgewertet. Es wurden zwei verschiedene Methoden der Probenvorbereitung und Mikroskopie verwendet. Nach der klassischen Methode mussten die Zell/Matrix Konstrukte getrocknet werden. Dazu wurden die Zellen zunächst in Karnovsky-Puffer auf den Matrizes fixiert und schließlich in einer aufsteigenden Acetonreihe getrocknet (Anhang 6.4.15).

Zum Vergleich wurde eine neuartige Technik der Firma QuantomiX LTD (Israel) verwendet, die REM-Aufnahmen von Zellen und Geweben unter vollständig hydratisierten Bedingungen möglich machen soll (Thiberge et al. 2004). Nasse Proben werden, eingebettet in spezielle

Kapseln, in ein REM eingebracht, was Artefakte durch die Präparation der Proben vermeiden soll. Dies wird erst durch das Einbringen der Probe in die *QuantomiX QX*-Kapseln möglich (Abbildung 33). Die Kapsel bietet für die nasse Probe einen vakuumdichten Raum, der durch eine einheitliche, Elektronen-durchlässige und druckresistente Membran vom Vakuumraum des REMs getrennt ist. Diese ultradünne Membran isoliert die hydratisierten Proben komplett vom Vakuum des Mikroskops und erlaubt gleichzeitig die vollständige Penetration und Reflektion des Elektronenstrahls. Dazu kann ein konventionelles REM verwendet werden. Durch Detektion rückgestreuter Elektronen und Röntgenstrahlen soll die Struktur und die Materialzusammensetzung dreidimensional sichtbar gemacht werden.

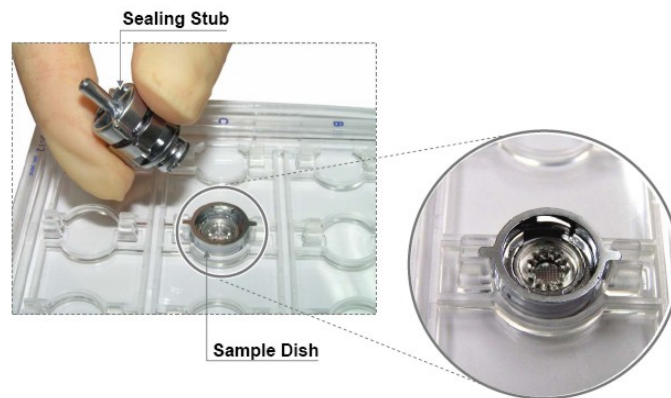


Abbildung 33: QuantomiX Kapsel QX-302 für REM-Aufnahmen feuchter Zell- und Gewebepollen (Quelle: User Manual für QuantomiX QX-302 Capsule)

Zur Testung dieses neuartigen Systems wurden Kollagen-CA 10 % Matrices, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, mit ISC kultiviert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die besiedelten Matrices zwei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen durch Einlegen des Zell/Matrix Konstrukts in 4 % Paraformaldehyd auf den Matrices fixiert. Die fixierten Zellen wurden gemäß einer von QuantomiX empfohlenen Veröffentlichung (Thiberge et al. 2004) mit Osmium bzw. Uranylacetat angefärbt. Die Metallionen werden in die Zellen eingelagert, um die Probe durch verstärkten Kontrast mikroskopieren zu können. Die *Wet SEM* Aufnahmen wurden mit freundlicher Unterstützung von Dr. Manfred Rohde am Helmholtz-Institut für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig durchgeführt. Dazu wurden die feuchten Proben entsprechend der Arbeitsanweisung für *QX-302 Kapseln* vorbereitet und in der Kapsel platziert. Eine Kalibrierkapsel wurde entsprechend der Anweisungen vorbereitet. Die bestückten Kapseln wurden in das REM-Gerät eingeführt und der Probenraum evakuiert. Entsprechend der Arbeitsanweisung wurde zunächst eine optimale Einstellung der Parameter am REM-Gerät mit Hilfe der Kalibrationskapsel eingestellt. Die Kalibrationskapsel enthält

Nanopartikel einer Größe von 500 nm und 40 nm. Diese können im REM gut sichtbar gemacht werden und liefern optimale Parameter und Einstellungen für *wet imaging* Bedingungen. Die Kalibrierung mit Hilfe der Kalibrations-Kapsel lief erfolgreich und die erhaltenen Bilder stimmen mit den Hersteller-Angaben überein (Abbildung 34).

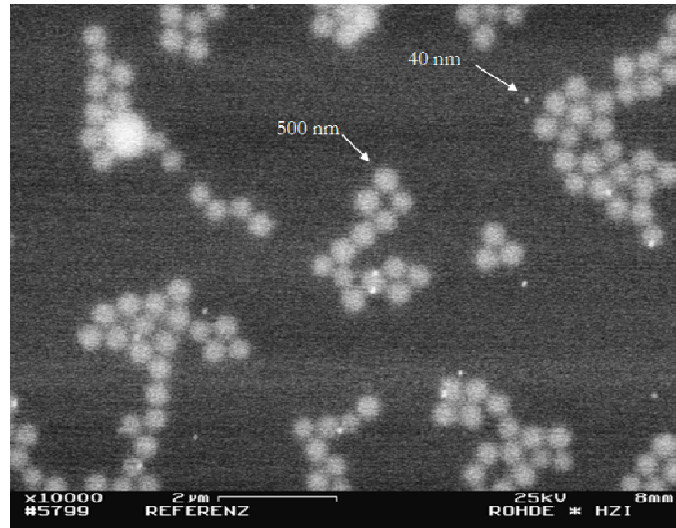


Abbildung 34: Kalibrierung mit Hilfe der QuantomiX Kalibrations-Kapsel Die Kalibrationskapsel enthält Nanopartikel einer Größe von 500 und 40 nm. Diese können im REM gut sichtbar gemacht werden und liefern optimale Parameter und Einstellungen für *wet imaging* Bedingungen Entsprechend des Manuals wurde zunächst eine optimale Einstellung der Parameter am REM-Gerät mit Hilfe der Kalibrationskapsel eingestellt. (Manfred Rohe, HZI, Braunschweig)

Nach Einstellung der Parameter wurden die feuchten Proben in der Kapsel unter dem REM betrachtet. Abbildung 35 zeigt REM-Aufnahmen von mit Osmium angereicherten (A) und mit Uranylacetat angefärbten (B) ISC auf C-CA 10 % unter Verwendung eines SE-Detektors (Sekundärelektronendetektor). In Abbildung 35B ist ein Teil des Membrangitters zur Orientierung zu sehen. Die Verwendung eines BSE-Detektors (backscattering electron; Rückstreuelektronendetektor), wie von QuantomiX empfohlen, lieferte keine Qualitätssteigerung der Aufnahmen.

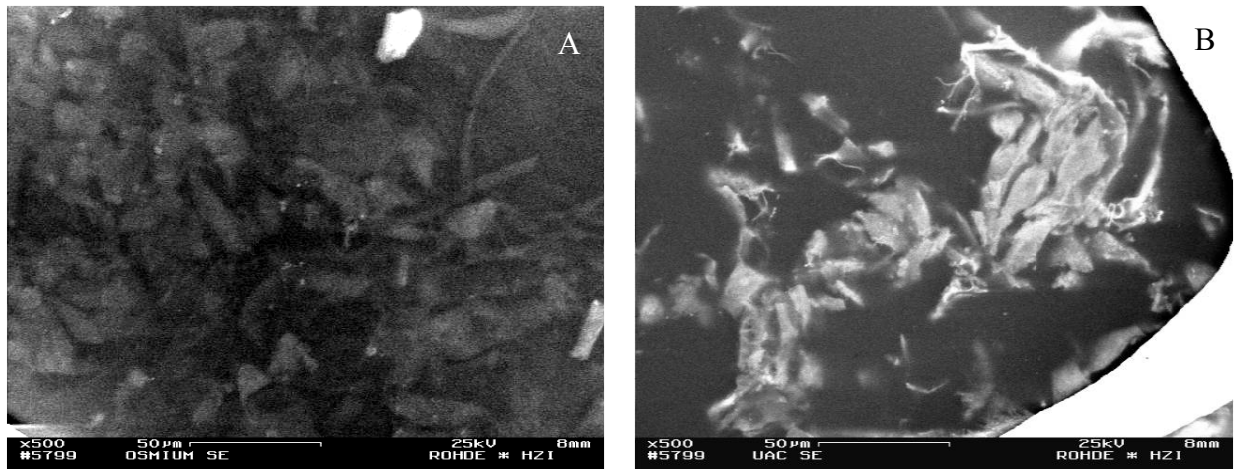


Abbildung 35: *Wet SEM* Aufnahmen mit QuantomiX QX-302 Kapseln von
A: mit Osmium angereicherten ISC auf C-CA 10 % (SE-Detektor)
B: mit Uranylacetat angefärbte ISC auf C-CA 10 % (SE-Detektor)
(Manfred Rohe, HZI, Braunschweig)

Beide Abbildungen machen deutlich, dass die Zellen auf dem Material nur schwer zu erkennen sind. Die für REM-Bilder typische und für dreidimensionale Gewebe und Gerüste wünschenswerte Tiefenwirkung der Darstellung blieb vollständig aus. Die Membran, die die feuchte Probe in der Kapsel vor dem Vakuum schützt, absorbierte entgegen der Firmenbeschreibung viele Elektronenstrahlen und verschlechterte somit die Aufnahmen. Ein Eindringen der Elektronenstrahlen in die Tiefe der Probe war nicht mehr möglich. Zumindest war die Dreidimensionalität der Probe nicht detektierbar. Das Kollagenkonstrukt konnte nur geringfügig dargestellt werden. Abbildung 36 zeigt exemplarisch zwei Aufnahmen, die durch konventionelle REM nach Trocknung der Proben erhalten wurde. Hier konnte deutlich die Dreidimensionalität der Probe nachempfunden werden. Die Zellkörper waren deutlich von den Fasern des Materials zu unterscheiden und auch die Bildung von EZM konnte hochaufgelöst sichtbar gemacht werden. Somit lieferten uns REM-Aufnahmen von konventionell präparierten und getrockneten Proben eine plastischere Darstellung der Zell/Matrix Konstrukte. Die neue Technologie bot für unsere Anwendung keinen Vorteil, da auch hier die Zellen fixiert und sogar angefärbt werden mussten. Damit war die Probenvorbereitung ähnlich aufwändig wie für REM-Aufnahmen mit getrockneten Proben. Für andere Anwendungen, wo das Trocknen der Proben ohne dramatischen Qualitätsverlust nicht möglich ist, könnte diese Technologie aber einen Lösungsansatz bieten.

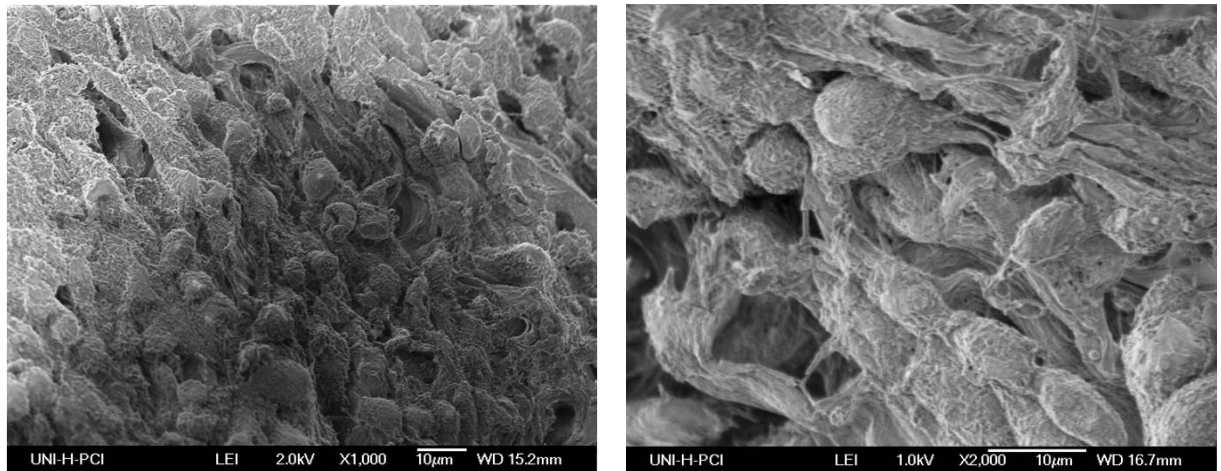


Abbildung 36: Konventionelle REM-Aufnahmen von ISC kultiviert auf C-CA 10 % nach Paraformaldehyd-Fixierung und Trocknung über eine aufsteigenden Acetonreihe. Der Zellkörper der Gliazellen ist dreidimensional auf den Fasern der Matrix zu erkennen. Auch die Bildung von EZM ist sichtbar.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 36 ließen darauf schließen, dass die C-CA Matrizes für die ISC geeignete Matrizes darstellen. Die Zellen nahmen das Gerüst an und wuchsen entlang der Fasern. Die Bildung von EZM zwischen den Zellen konnte das Verwachsen der Zellen mit dem künstlichen Gerüst zu einem einheitlichen Gewebe belegen. Eine dichte Besiedlung der mit C-CA dotierten Kollagen-Fasern war zu beobachten. Wünschenswert war dabei eine einheitliche Besiedlung in allen Schichten der Matrizes. Dazu mussten histologische Querschnitte der besiedelten Materialien angefertigt und das Zellwachstum im gesamten Konstrukt näher untersucht werden.

4.2.11 Histologische Analyse

Um von der neuen, vielversprechenden Modifikation der Kollagenmatrix mit CA einen Eindruck über die Verteilung der beiden Zelltypen in der Matrix zu bekommen, wurde zusätzlich für dieses ausgewählte Material eine histologische Analyse durchgeführt. Die dreidimensionale Besiedlung der Matrizes ist eine wichtige Anforderung im Hinblick auf die Unterstützung einer vollständigen Gewebekonstruktion. Dazu wurden histologische Querschnitte der mit Zellen besiedelten Matrizes angefertigt und eine Übersichtsfärbung mit Hämalaun & Eosin durchgeführt (Anhang 6.4.16). Dabei werden die Zellkerne blau angefärbt, während das Zytoplasma sowie das Bindegewebe rosarot erscheinen.

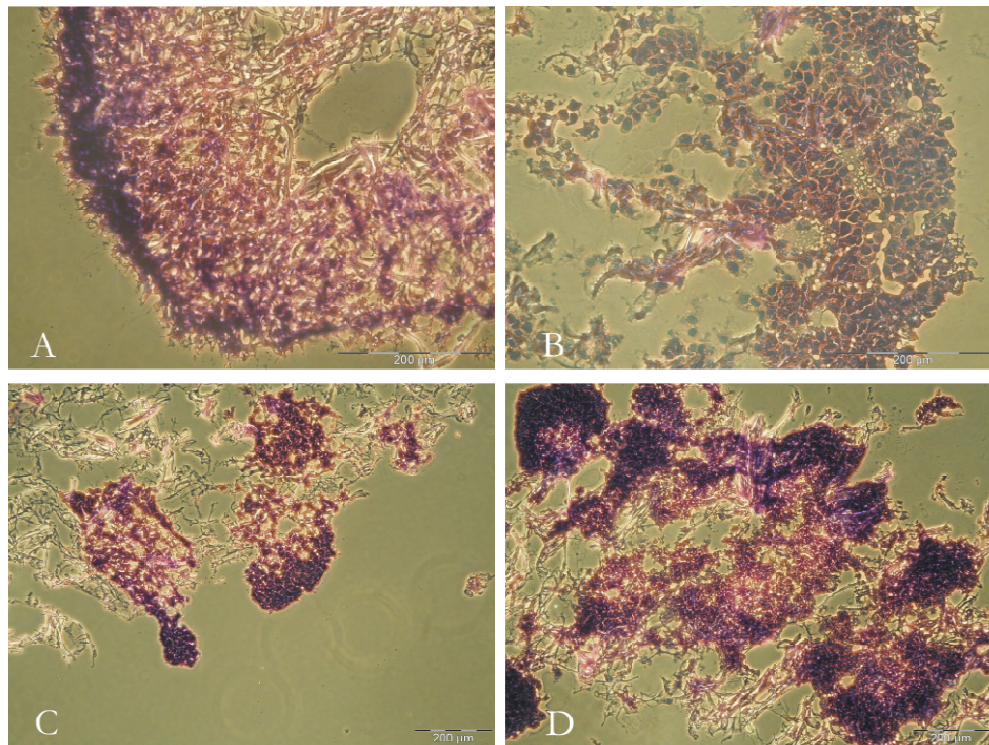


Abbildung 37: Übersichtsfärbung mit Hämalaun & Eosin von gefrorenen, histologischen Querschnitten. **A:** ISC auf Matristypt[®] (200x), **B:** ISC auf C-CA 10 % (200x), **C:** Hep-G2 Zellen auf C-Alg (100x), **D:** Hep-G2 Zellen auf C-CA 10 % (100x).

Abbildung 37 zeigt eine Zusammenfassung der durch die Hämalaun & Eosin-Färbung erhaltenen Eindrücke. Die histologischen Schnitte verdeutlichen, dass die Zellen entlang der Kollagen Fasern in das Zentrum der Matrix wanderten. Vergleicht man die Referenzmatrizes (Abbildung 37A und C) mit den C-CA Matrizes, so wuchsen die Zellen auf den Referenzmatrizes unter der durchgeführten statischen Kultivierung bevorzugt in den oberen Schichten der Matrix. Nur wenige Zellen erreichten und wuchsen in tieferen Schichten dieser Materialien. Dagegen schienen die Zellen auf C-CA dotiert mit 10 % CA ungerichtet über die Matrix verteilt und zeigten ein ausgeprägtes Einwachsen in die Kollagenmatrix. In Abbildung 37D bewuchsen die Hep-G2 die Matrix über 14 Tage sogar ohne deutliche Bevorzugung der Besiedlungsseite. Darüber hinaus machten die Querschnitte der Materialien deutlich, dass die C-CA Matrizes eine höhere Porosität aufweisen. Diese strukturelle Veränderung gegenüber dem Ausgangsmaterial MS (vgl. dazu auch Abbildung 32 Seite 70) könnte ein Grund für die verbesserte Verteilung der Zellen im gesamten Konstrukt sein. Darüber hinaus könnte das verstärkte Einwachsen der Zellen in die C-CA Matrizes gegenüber ihren Referenzen auch ein weiteres Resultat der migrationsfördernden Eigenschaften der CA sein, die in der Literatur beschrieben werden (Kleene and Schachner 2004). In jedem Fall sollte die dynamische

Kultivierung der C-CA Matrices und der Referenzmatrix die Gewebekonstruktion durch eine bessere Nährstoffversorgung weiter verbessern können.

4.2.12 Fazit der Untersuchung von Kollagenmatrix-Derivaten im Screening System

Es wurden verschiedene Modifikationen einer kommerziellen Kollagenmatrix der Dr. Suwelack Skin & Health Care AG innerhalb des Screening Systems getestet und beurteilt. Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass die Kollagenmatrix MS durch die Aufarbeitung des nativen Kollagens in Form von Spalthaut eine Optimierung hinsichtlich der für die Zellen verfügbaren Oberfläche darstellt (Viabilität, REM). Ein weiterer Vorteil des Herstellungsprozesses bietet die einfache Möglichkeit, zusätzliche Komponenten in die Kollagenmatrix einzuarbeiten. So wurden der Kollagenmatrix drei verschiedene natürliche Polymere (CA, HA, Seide/Fibronin) in variierenden Konzentrationen hinzugefügt und eine Optimierung des Materials für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven untersucht.

HA als zusätzliche Komponente beeinflusste die Viabilität (MTT), Proliferation (BrdU) und die Adhäsion der Modellzellen trotz seiner Beteiligung an interzellulären Anhaftungs- und Erkennungsprozesse *in vivo* nicht wesentlich. Das Zellwachstum auf den C-HA Matrices war vergleichbar zu den verwendeten Referenzen. Der Zusatz von HA zur Kollagenmatrix stellt also keine Verbesserung der Matrix im Sinne des Screening Systems dar.

Mit der Dotierung der Basis-Kollagenmatrix mit CA jedoch konnte eine Optimierung des Materials im Hinblick auf periphere Nervenregeneration erzielt werden. Die CA förderte die Viabilität (MTT) und Proliferation (BrdU) der Zellmodelle vor allem zu Beginn der Matrix-Besiedlung. Dies wurde auch durch die HSA-Produktion über den Kultivierungszeitraum bestätigt. Die CA-Komponente in den Matrices förderte die Adhäsion der Zellen zwar nicht, ließ sie jedoch zu und unterstützt damit möglicherweise auch charakteristische physiologische Effekte wie synaptische Plastizität und Migration (Kleene and Schachner 2004; Leckband 2004; Muhlenhoff et al. 1996). Darüber hinaus veränderte die CA die Genexpression wichtiger Markergene nicht (RT-PCR, TH-ELISA). Die detailliertere Analyse mittels DNA-Chip ergab, dass die C-CA Matrices im Vergleich zur Referenz MS eine erhöhte neuronale Anregung in Form von Neurotransmitter-Rezeptoren hervorrief. Gleichzeitig ließ die Abnahme der Expression von Apoptosegenen und die gesteigerte Expression des Filament-Proteins Nestin einen neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekt der C-CA-Matrix vermuten. Es konnten jedoch auch Veränderungen in der Genexpression nicht abschließend eingeordnet werden. Dieses Feld bedarf daher noch einer intensiveren Analyse in weiterführenden Arbeiten. Doch auch die mikroskopischen Analysen mittels REM und

immunhistochemischen Querschnitten konnten eine besondere Eignung der C-CA Matrices herausstellen. Neben einer dichten Besiedlung entlang der Kollagen-Fasern und einer ausgeprägten Bildung von EZM konnte im Gegensatz zum Ausgangsmaterial MS eine gute Verteilung der Zellen im gesamten Konstrukt nachgewiesen werden, ohne klare Bevorzugung der Besiedlungsseite. Damit bietet die C-CA Matrix beste Voraussetzungen, eine dreidimensionale Gewebekonstruktion zu gewährleisten. Da PSA von regenerierenden Axonen produziert wird und damit an der Nervenregeneration beteiligt ist (Franz et al. 2005), wurde dieses Material ausgewählt, um mittels einer dynamischen Kultivierung im Reaktor den *in vivo* Bedingungen nahe zu kommen (Kapitel 4.4).

Die Einarbeitung von Fibroin-Fasern aus Seidenfäden der Seidenraupe *Bombyx mori* in die Kollagenmatrix lieferte im Hinblick auf die neuronalen Testsysteme eine Optimierung der Viabilität/Proliferation und Adhäsion. Eine Zytotoxizität des Materials konnte aufgrund des vergleichbar guten Zellwachstums der Leberzelllinie Hep-G2 auf der C-Seide ausgeschlossen werden (vgl. Altman et al. 2003). Das Strukturprotein Seide bestätigt damit die Eignung für das *Tissue Engineering*. Daher wird in Kapitel 4.3 die C-Seide im Vergleich zum nativen Material näher getestet.

4.3 Screening von Seide zum Einsatz in der peripheren Nervenregeneration

Da die modifizierte C-Seide Matrix für die neuronalen Modellzellen im Pre-Screening vielversprechende Ergebnisse lieferte, sollte auch das native Material im Vergleich näher getestet werden. Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben besteht jedoch der Faden der Seidenraupe *Bombyx mori* aus dem Strukturprotein Fibroin umgeben von einem Mantel aus dem leimartigen Protein Sericin. Diesem Sericin werden die Bioinkompatibilitäten der Seidenspinner-Seide zugeschrieben, so dass das antigen wirkende Sericin vor Verwendung in der Medizin aufwendig entfernt werden muss (Altman et al. 2003). Die Spinnenseide der Großen Radnetzspinnen *Nephila* verzichtet auf das leimartige Protein und zeigte in der Zellkultur keinen schädigenden oder toxischen Effekt (Allmeling et al. 2006). Als das herausragende Merkmal des Fallfadens von *Nephila clavipes* gegenüber Seide der Seidenraupe und allen anderen Biomaterialien wird in der Literatur die hohe mechanische Belastbarkeit und Zugfestigkeit in Kombination mit exzellenter Elastizität beschrieben (Altman et al. 2003; Meier 2001). Spinnenseide ist nicht nur biokompatibel sondern auch langsam (über ca. 1 Jahr) bioabbaubar (Horan et al. 2005) und soll die Zelladhäsion und –spretung fördern. Zudem werden intraluminare Röhren als ideale Bausteine des optimalen NGC angesehen (Hudson et al. 1999; Yoshii et al. 2001), wobei sich die Verwendung natürlicher Fasern wie Spinnenseide anbietet. Das Strukturprotein Spinnenseide ist aufgrund all dieser Eigenschaften für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven prädestiniert und wurde deswegen in dieser Arbeit als natives Seidenmaterial gewählt und im Vergleich zur Modifikation C-Seide als neues Biomaterial im evaluierten Screening System getestet. Die Spinnenseide wurde freundlicherweise von der Forschungsabteilung der Klinik für Plastische, Hand und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Einige Arbeiten wurden im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführt und betreut.

4.3.1 Mechanische Eigenschaften

Bevor das neuartige, native Material *in vitro* gemäß dem Screening System getestet wurde, sollten die herausragenden mechanischen Eigenschaften überprüft werden. Dazu wurde die Spinnenseide direkt aus der abdominalen Spinndrüse der Spinnen (*Nephila*) gewonnen, indem die Spinne auf einer schiefen Ebene fixiert und der Fallfaden mechanisch auf einen Spulenaufsatz gewickelt wurde (Plastische, Hand und Wiederherstellungschirurgie, Medizinischen Hochschule Hannover). Die Maschine dazu wurde am Institut für Technische Chemie der Leibniz-Universität Hannover entwickelt. Der in Abbildung 38 dargestellte

Aufsatz ermöglicht die Gewinnung langer, parallel aufgewickelter Fäden, die von Hand verdrillt werden können. So konnten Fadenbündel mit einer verschiedenen Anzahl von Einzelfäden hergestellt werden, die schließlich durch manuelles Verdrehen der Stifte unter definierten Bedingungen verdrillt werden konnten.



Abbildung 38:

Maschine zur mechanischen Gewinnung von Spinnenseide direkt aus der abdominalen Spinndrüse der Spinne, die dazu auf einer schiefen Ebene fixiert wird. (Entwicklung am Institut für Technische Chemie)

Die Prüfung der mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide wurde an einer Zwicki-Tischprüfmaschine der Firma Zwick/Roell, Deutschland vom Typ TC-FR2.5TN.D09 zur Materialprüfung in Zusammenarbeit mit der Solvay Pharmaceuticals Deutschland GmbH durchgeführt (Anhang 6.4.14). Die gefertigten Spinnenseidenbündel wurden in Bezug auf maximale Dehnung und Zugfestigkeit in Abhängigkeit von Faden- bzw. Verdrillungszahl getestet. Zu diesem Zweck wurde der Faden automatisch mit 1 mm pro Minute so lange gedehnt, bis er schließlich riss. Riss der Faden nicht, wurde die Messung abgebrochen, sobald die aufzuwendende Kraft auf ein vordefiniertes Minimum (nahe Null) gesunken war.

Die in der Literatur beschriebene hohe mechanische Belastbarkeit und Zugfestigkeit in Kombination mit exzellenter Elastizität konnten durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Abbildung 39 zeigt die maximale Belastbarkeit F_{\max} und die prozentuale Dehnung der Seidenfaden-Bündel in Abhängigkeit von der Anzahl der Einzelfäden bei gleichbleibender Verdrillung (50 x) (Marten 2006). Mit steigender Fadenstärke konnte im Messbereich eine höhere Maximalkraft und damit eine höhere Zugfestigkeit des Spinnenseiden-Konstrukts gemessen werden. Parallel durchgeführte Messungen mit feuchten Fäden, um die *in vivo* Bedingungen nachzuempfinden, erbrachten vergleichbare Ergebnisse (Marten 2006). Die höhere Belastbarkeit durch die steigende Anzahl an Einzelfäden hatte keinen Verlust der enormen Dehnfähigkeit zur Folge. Es konnte eine Dehnfähigkeit von 40 % im trockenen und

sogar 80 % im feuchten Zustand nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde auch die Abhängigkeit von F_{\max} und der Dehnung vom Verdrillungsgrad bei gleichbleibender Fadenanzahl untersucht (Marten 2006). Dies ergab eine Unabhängigkeit der untersuchten Parameter vom Verdrillungsgrad.

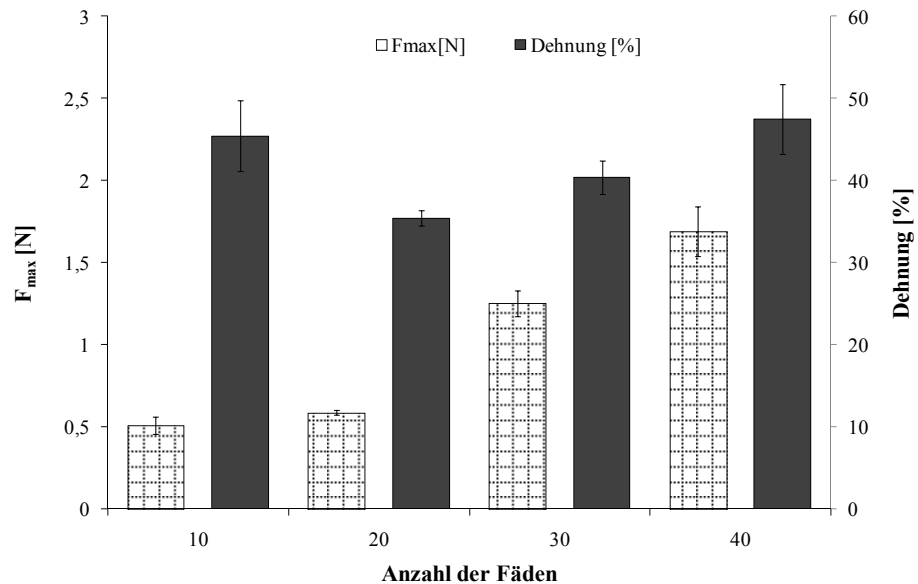


Abbildung 39: Bestimmung der mechanischen Eigenschaften (F_{\max} und maximale Dehnung in Prozent der Ausgangslänge) eines Spinnenseiden-Fadens in Abhängigkeit der Anzahl an Einzelfäden (50 Verdrillungen). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. (Marten 2006)

Damit konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Querschnitt durch Zunahme der Fadenanzahl eine zunehmende Zugfestigkeit ohne Verlust der Dehnfähigkeit des Konstrukts erreicht werden konnte. Schon bei geringer Fadenanzahl konnte eine hohe Belastbarkeit des Konstrukts erreicht werden. Die Dehnbarkeit blieb vom Querschnitt des Fadens und von der Verarbeitung unbeeinflusst, es wurde jedoch ein höherer Kraftaufwand für die gleiche Dehnung benötigt. Die Verdrillungsgrad hat keinen Einfluss auf die Zugfestigkeit und Dehnbarkeit der Spinnenseiden-Konstrukte. Die dargestellten mechanischen Eigenschaften bieten die wesentliche Grundlage für den Einsatz im *Tissue Engineering* von Geweben, die neben Stabilität vor allem auch Elastizität bieten müssen (z.B. Nerven und Sehnen).

In die modifizierte Kollagenmatrix C-Seide, die bereits in Kapitel 4.2 untersucht wurde, ist das Seidenprotein Fibroin, aus dem die Spinnenseide besteht, eingearbeitet. Es sollte daher im Vergleich untersucht werden, ob die Modifizierung der Kollagenmatrix mit dem Seidenprotein auch eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften mit sich bringt, wie sie für das native Biomaterial aus der Spinne nachgewiesen werden konnten. Die

Untersuchungen zu den mechanischen Eigenschaften der Materialien wurden freundlicherweise am Ludwig Boltzmann Institut in Wien im Auftrag angefertigt und zur Verfügung gestellt. Die Materialien wurden mit einer Geschwindigkeit von 5 mm pro Minute gedehnt und die angelegte Kraft gegen den Traversenweg aufgezeichnet.

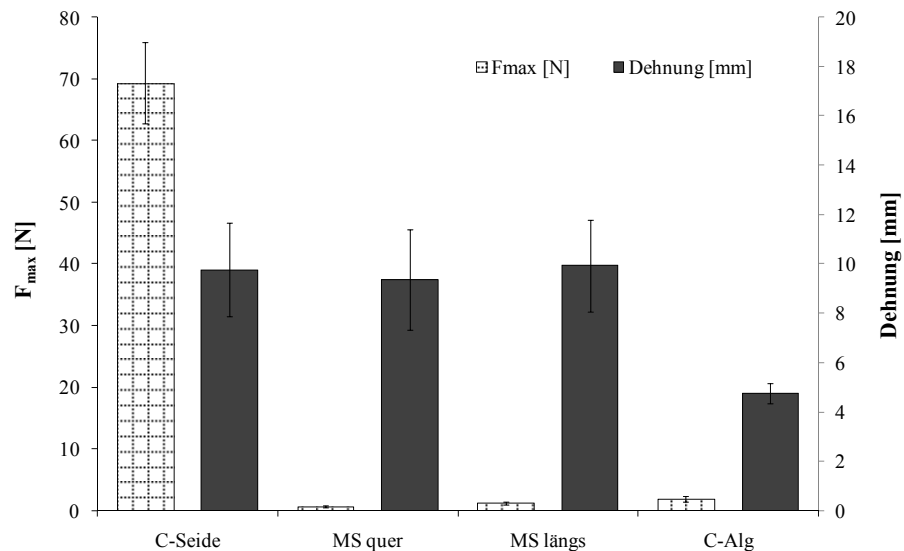


Abbildung 40: Bestimmung der mechanischen Eigenschaften (F_{\max} und Dehnung bei F_{\max}) der C-Seide Matrix im Vergleich zum Basismaterial MS und den Referenzen MS und C-Alg. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler ($n=6$) (Prof. Dr. Martijn van Griensven, Institut für experimentelle und klinische Traumatologie, Ludwig Boltzmann Institut, Wien).

Abbildung 40 zeigt die Maximalkraft und die Dehnung bei Maximalkraft, denen die getesteten Kollagenmatrizes standhielten. Es konnte eine signifikant höhere Zugfestigkeit der C-Seide Matrizes gegenüber allen Vergleichsmaterialien gemessen werden. Während das Basismaterial MS einer Last von 1 N standhalten konnte, führte die Einarbeitung der Seide in das Konstrukt zu einer Steigerung der Maximalkraft auf 69 N. Die Dehnung bei Maximalkraft veränderte sich durch die Seide als zusätzliche Komponente in der Kollagenmatrix nicht, während die Einarbeitung von Alginat zwar die Zugfestigkeit geringfügig steigern konnte, dies jedoch zu Lasten der Dehnfähigkeit ging. Damit konnte die Seide ihre außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften von hoher Zugfestigkeit bei gleichzeitiger Elastizität auf die Kollagenmatrix übertragen. Dies unterstützt die Verwendung von Seide in Konstrukten für das *Tissue Engineering* mechanisch belasteter Gewebe und führte daher zu einer Optimierung der Kollagenmatrix im Hinblick auf die Verwendung in der peripheren Nervenregeneration.

4.3.2 Kultivierung auf nativer Spinnenseide

Ein Meter Einzelfaden der aufgespulten Spinnenseide wurde per Hand zu losen Knäulen gebündelt und durch kurzes Waschen in Isopropanol desinfiziert. Die Referenz MS sowie das Vergleichsmaterial C-Seide wurden analog zu den Referenzmatrizes vorbereitet und kultiviert (Abschnitt 4.1.5). Sie wurden mit einem Lochseisen (Innendurchmesser: 6 mm) ausgestanzt, in 96-Lochplatten überführt und durch Einlegen in Isopropanol für mindestens 2 Stunden desinfiziert. Alle Materialien wurden schließlich über Nacht in entsprechendem Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert und das Medium wurde entfernt. Da die Biokompatibilität der Spinnenseide bereits belegt wurde (Allmeling et al. 2006), wurden die Materialien ausschließlich mit den neuronalen Testsystemen des Screening Systems besiedelt (5 x 10³ PC-12 bzw. 3 x 10³ ISC pro Matrix). Zur besseren Anheftung wurden die Zellen in 20 µl Medium aufgetragen, für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und anschließend das Medium vorsichtig auf 200 µl aufgefüllt. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen auf Spinnenseide kultiviert.

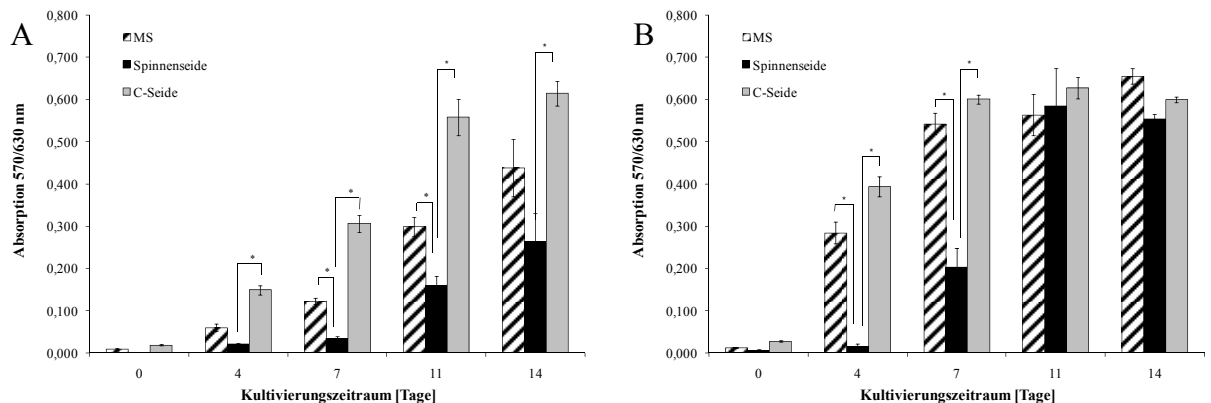


Abbildung 41: MTT-Test für PC-12 (A) und ISC (B) auf Spinnenseide gegen ihre Referenzen und C-Seide im Vergleich. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet. (Marten 2006)

In Abbildung 41 sind die Ergebnisse des MTT-Tests (Anhang 6.4.2) beider Zellmodelle dargestellt. Die ansteigenden Absorptionswerte über den Kultivierungszeitraum belegen, dass die Zellen auf der Spinnenseide ein gutes Wachstum zeigten. Es war generell eine geringe Besiedlungseffizienz auf der Spinnenseide zu beobachten. Dies ist auf das verwendete lose Fadenknäuel zurückzuführen, das im Vergleich zum engmaschigen Netzwerk der Kollagenmatrizes (siehe REM-Bilder) weniger Zellen bei der Besiedlung auffängt. Es ist

daher von einem rein geometrischen Nachteil auszugehen. Die geringere Besiedlungseffizienz bedingte gleichermaßen die verzögerte Viabilität/Proliferation zu Beginn des Kultivierungszeitraums. So wurden mit den PC-12 Zellen auf der Spinnenseide zwar signifikant geringere Absorptionswerte gemessen (Abbildung 41A), doch war ein exponentielles Wachstum der Zellen auf der Spinnenseide nach Überwindung der Besiedlungsprobleme zu beobachten. Zudem ist die signifikant höhere Viabilität/Proliferation der PC-12 Zellen auf C-Seide gegenüber der Referenz MS zu beachten (siehe auch Abschnitt 4.2.3.). Auch für die Besiedlung mit ISC war die Folge der geringeren Besiedlungseffizienz in Form einer verzögerten Proliferation/Viabilität zu Beginn auf Spinnenseide zu erkennen (Abbildung 41B). Die ISC zeigten dann jedoch im Vergleich zu den Kollagenmatrizes auf den Spinnenseide-Knäulen ein exponentielles Wachstum zwischen Tag 4 und 11 und erreichten ab Tag 11 vergleichbare Absorptionswerte.

Für eine genauere Untersuchung der Spinnenseide *in vitro* wurden die verdrehten Spinnenseide-Fasern, für die bereits die mechanischen Eigenschaften bestimmt wurden (Abschnitt 4.3.1), nach dem oben aufgeführten Protokoll mit ISC besiedelt und über 28 Tage kultiviert. Das Wachstum und die Proliferation der Zellen auf den Spinnenseide-Konstrukten wurden über den Kultivierungszeitraum mittels MTT-Test (Viabilität/Proliferation) und BrdU-Assay (Anhang 6.4.6, Proliferations-Assay) vergleichend untersucht.

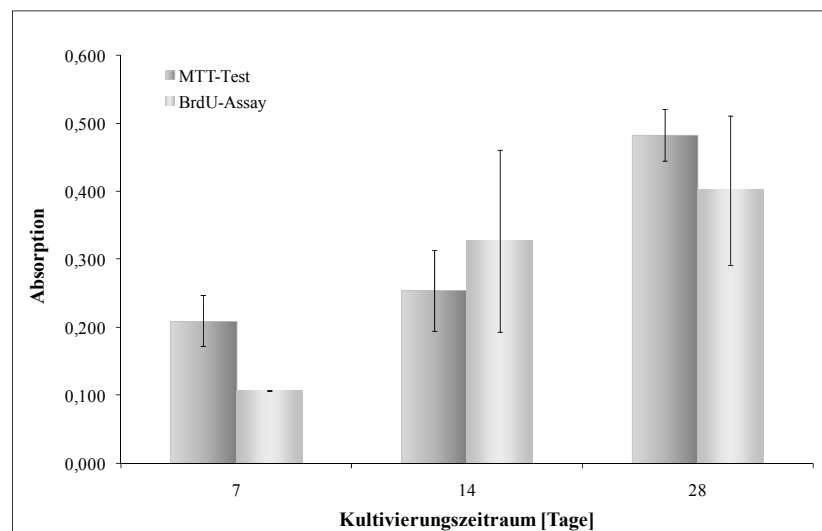


Abbildung 42: MTT-Test (Viabilität/Proliferation) und BrdU-Assay (Proliferation) für ISC auf Spinnenseide-Fasern (20 Einzelfäden, 70 Verdrillungen). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). (Marten 2006)

In Abbildung 42 ist die Entwicklung der Viabilität und Proliferation der ISC über die vierwöchige Kultivierung auf den verdrehten Spinnenseide-Fasern exemplarisch für ein

Konstrukt aus 20 Einzelfäden, die 70x verdreht wurden, zusammengestellt. Sowohl der MTT-Test als auch der spezifischere BrdU-Assay wiesen ein Wachstum der Zellen über die gesamten 28 Tage nach. Die Fasern aus Spinnenseide förderten die Zellproliferation und ermöglichten ein stetiges Wachstum der ISC entlang der Fasern.

Es konnte damit die Eignung des nativen Spinnenseiden-Fadens für die Zellkultivierung nachgewiesen werden. Die signifikant verbesserte Viabilität der PC-12 Zellen auf C-Seide gegenüber MS ist auf die Einarbeitung des Fibroins zurückzuführen. Die Fasern könnten zudem ein gerichtetes Wachstum ermöglichen und sind damit prädestiniert für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven.

4.3.3 Zelladhäsion auf nativer Spinnenseide

Gemäß dem Screening System wurde zusätzlich zur Proliferation die Adhäsion der Zellen auf der nativen Spinnenseide untersucht. Dazu wurden die Spinnenseide-Fasern und die jeweilige Referenzmatrix mit Hep-G2 und ISC besiedelt und der Adhäsions-Assay (Anhang 6.4.5) durchgeführt. Spinnenseide soll die Zelladhäsion und –spretung fördern.

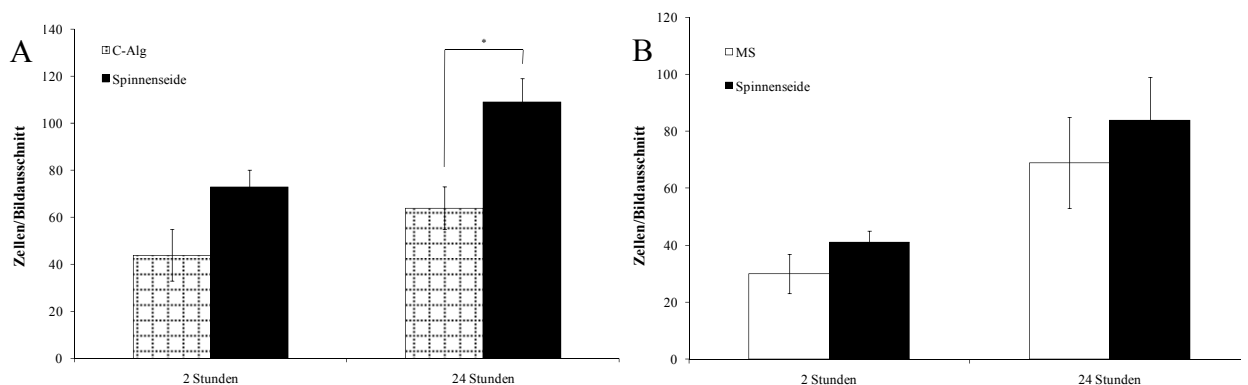


Abbildung 43: Adhäsions-Assay für Hep-G2 (A) und ISC (B) auf Spinnenseide gegen ihre Referenzen. Der Adhäsionsassay wurde gemäß Anhang 6.4.5 durchgeführt und ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n=6). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet.

Die Untersuchung der Adhäsion von Hep-G2 Zellen (Abbildung 43A) und ISC (Abbildung 43B) ergab eine gesteigerte Adhäsion der Zellen auf der Spinnenseide gegenüber den Referenzmatrizes. Mit den Adhäsions-sensitiven ISC konnten jedoch nach Berechnung des F- und t-Tests keine signifikanten Unterschiede herausgestellt werden, während die Adhäsion der Hep-G2 Zellen auf den Fasern nach 24 Stunden signifikant besser als auf der Referenz C-Alg war. Die Färbung der Zellkerne mit DAPI machte sichtbar, dass die Hep-G2 Zellen

nach 24 Stunden auf den Fasern adhären und an diesen entlang wuchsen (Abbildung 44A). Auch die ISC bevorzugten die Adhäsion entlang der Fasern (Abbildung 44B). Der Adhäsionsassay konnte allerdings nicht im Detail herausstellen, ob die Zellen die Spinnenseide gegenüber anderen Materialien bevorzugen und eine besondere Adhäsion und Spreitung auf dem nativen Spinnenfaden zeigen. Ein solcher Einfluss sollte durch time-lap und REM Aufnahmen näher beobachtet werden.

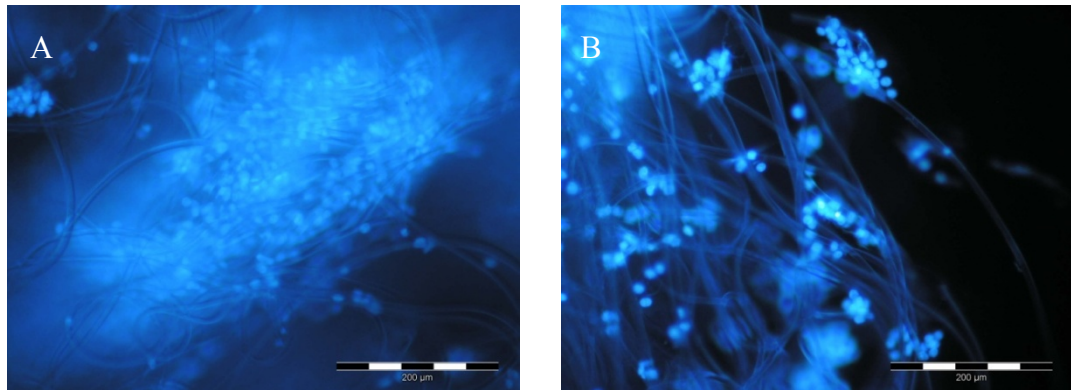


Abbildung 44: DAPI-Färbung von Hep-G2 Zellen (A) und ISC (B). Die Fluoreszenz-Bilder (x200) zeigen die Ergebnisse der DAPI-Färbung der Zellkerne nach Adhäsion von 24 Stunden auf der Spinnenseide.

4.3.4 Time-lap Aufnahmen mittels Phasenkontrastmikroskop

Um die Zell-Matrix Interaktionen im Detail beobachten zu können, wurde die Spinnenseide auf Metallrahmen gespannt (siehe Marten 2006). Dies ermöglichte die Betrachtung eines Einzelfadens unter dem Mikroskop, gleichzeitig wurde der Kontakt der Fäden zur Zellkultur-Oberfläche gewährleistet. Die bespannten Rahmen wurden in eine 24-Lochplatte platziert und die Zellsuspension aufgetragen. Für diese mikroskopischen Untersuchungen wurden die ISC verwendet, da sie den Gliazellen des Nervensystems am nächsten sind (siehe auch Abschnitt 3.4.1). Die Besiedlung der Spinnenseide wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden unter dem Phasenkontrastmikroskop sowie nach Fixierung der Zellen unter dem REM beobachtet. Die Aufnahmen wurden in freundlicher Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kurt Dittmar und Herrn Dr. Manfred Rohde am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung (HZI) in Braunschweig erstellt.

In Abbildung 45 ist exemplarisch der Beginn der Besiedlung im Phasenkontrast dargestellt. Erst das Anfärben des Zytoplasmas macht die maximal gespreitete Zelle auf der Spinnenseide richtig sichtbar. Im Querschnitt kann man erkennen, dass die Zelle annähernd um den Faden herum gewickelt war. Die gut sichtbaren abgerundeten Zellen befinden sich in unterschiedlichen Stadien des Anheftungsprozesses.

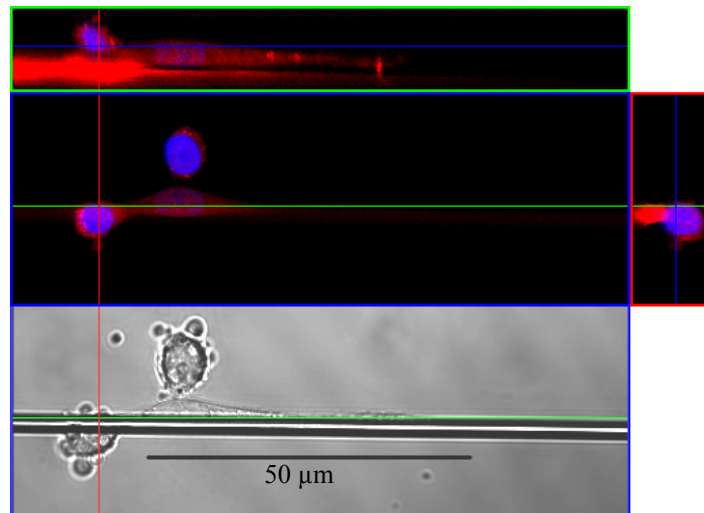


Abbildung 45: ISC auf einem Spinnseide-Faden (blau: Zellkern; rot: Zytosol). (Kurt Dittmar, HZI, Braunschweig)

Die Spreitung der ISC entlang des Seidenfadens belegt die Attraktivität des nativen Materials für die Zelladhäsion. Dies wird auch in Abbildung 46 deutlich. Es schien, als wanderten die Zellen auf den Seidenfaden zu. Folge war die dichte Besiedlung des Fadens um den kompletten Faden herum. Die ISC bevorzugten dabei die Spinnseide als Besiedlungs-Oberfläche. Die neuronale Zelllinie hatte eine hohe Affinität zu dem Faden. Dies resultierte in der Bildung einer Art Zellsäule, die an die Ausbildung der *Büngner'schen Bänder* bei der peripheren Nervenregeneration *in vivo* erinnerten.

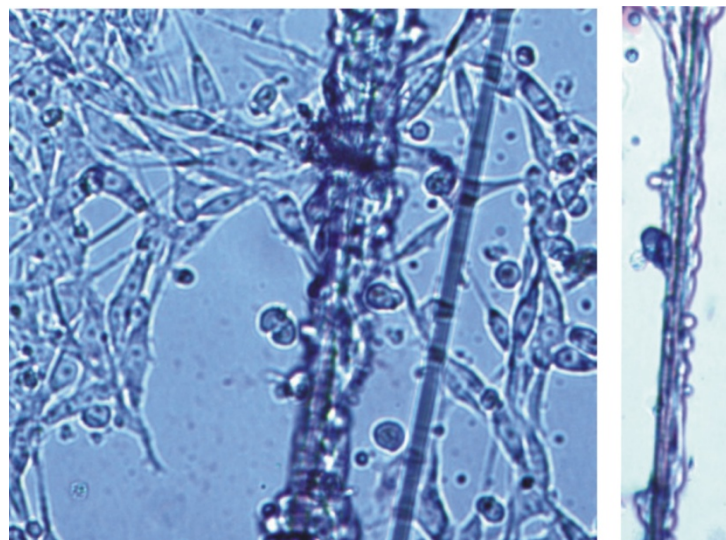


Abbildung 46: Aufnahmen von der Besiedlung eines Spinnfadens mit ISC im Phasenkontrastmikroskop (Vergrößerung: x400). ISC bevorzugten die Besiedlung des Spinnseiden-Fadens und wachsen darauf zu. Die Spinnseide ermöglicht ein gerichtetes Wachstum entlang des Fadens. Der Faden wird rundherum mit Zellen besiedelt. (Kurt Dittmar, HZI, Braunschweig) (Marten 2006)

4.3.5 Rasterelektronenmikroskopie der Besiedlung von Spinnenseide

Die hochauflösende Betrachtung der Proben im REM (Probenvorbereitung: Anhang 6.4.15) konnte die gesammelten Beobachtungen weiter stützen. Abbildung 47 zeigt deutlich den Doppelfaden, der natürlicherweise aus den Drüsen gebildet wird. Auf diesen Doppelfaden waren viele ISC flach adhärirt, was für eine optimale Zell-Matrix-Interaktion spricht, obwohl die Faden-Oberfläche glatt wirkt. Die molekulare Zusammensetzung der Spinnenseide scheint daher besonders attraktiv für die Zellen zu sein. Außerdem ist eine Zelle beim Anheften am Seidenfaden zu erkennen, die über die Expression von zahlreichen Oberflächenproteinen Kontakt mit dem Spinnenseiden-Faden aufnimmt.

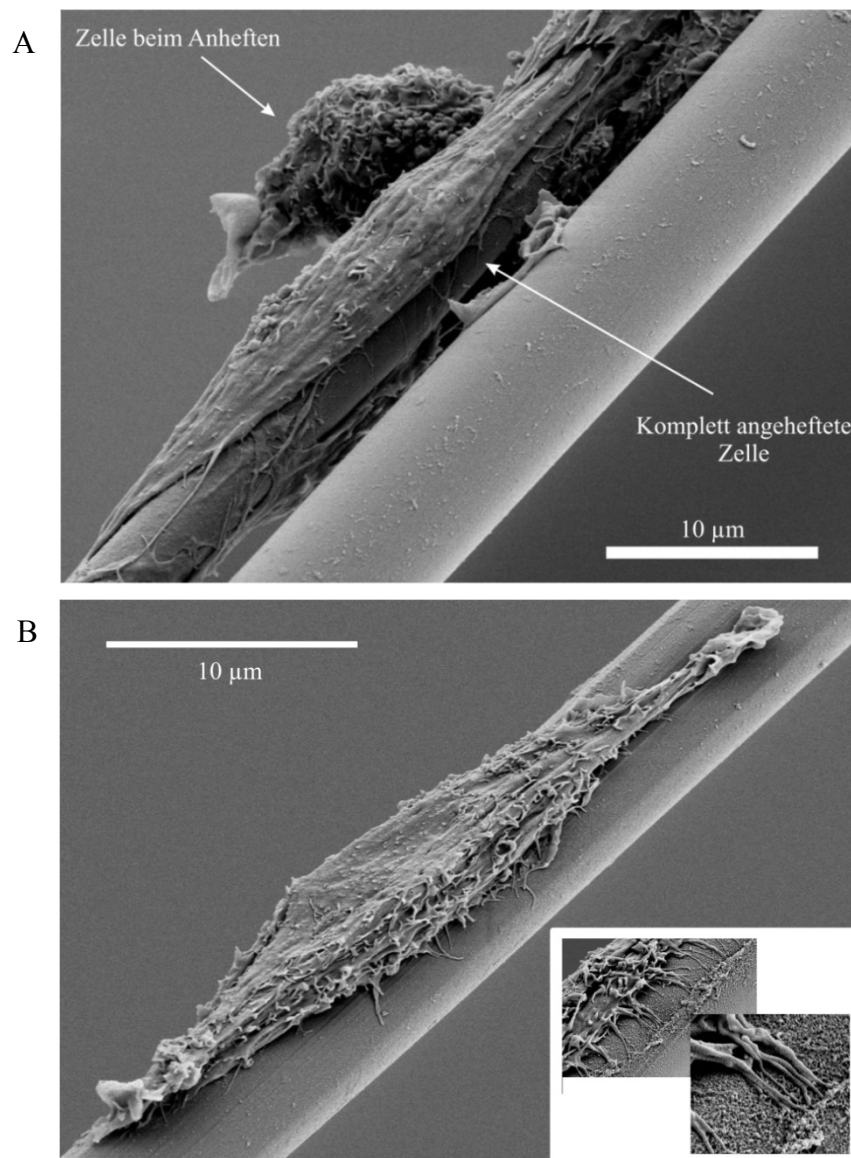


Abbildung 47: REM-Aufnahmen der Anheftung von ISC auf einem Spinnenseiden-Faden. Die ISC spreiten flach auf dem Faden, der für die Anheftung der Zellen attraktiv erscheint. Über zahlreiche Filopodien verankert sich die Zelle auf dem Material und legt sich entlang des Fadens. (Manfred Rohde, HZI, Braunschweig)

Dabei verankert sich das neuronale Zellmodell über feine Filopodien auf dem Material, was eine flache Anheftung des gesamten Zellkörpers möglich macht. Dies resultierte in dicht bewachsenen Spinnenseidenfäden, auf denen die Zellen gerichtet wuchsen (Abbildung 48). Es konnten Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden und die Ausbildung einer EZM. Diese dokumentiert eine hohe Biokompatibilität und kann die Integration des Materials in das Zielgewebe erleichtern.

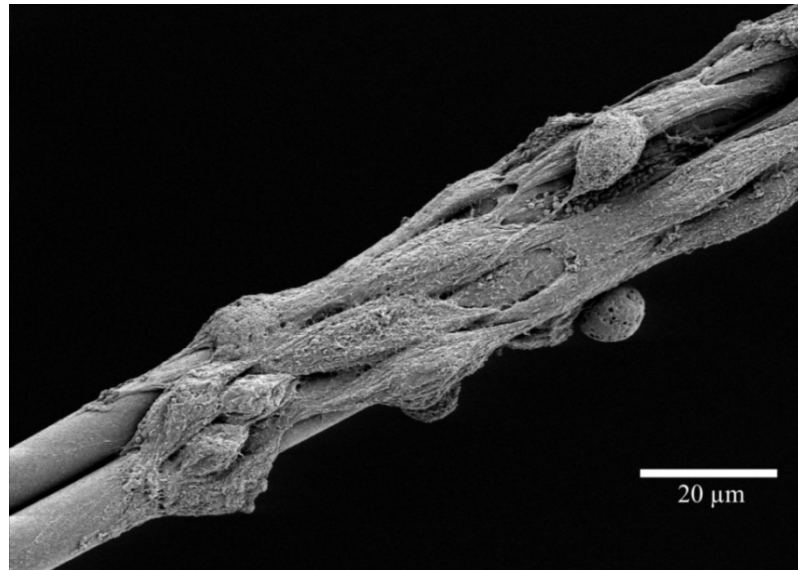


Abbildung 48: REM-Aufnahmen von ISC auf einem Spinnenseiden-Faden. Die Zellen umhüllen den Doppelfaden nahezu vollständig und bilden eine EZM aus. (Manfred Rohde, HZI, Braunschweig) (Marten 2006)

4.3.6 Fazit des Screenings von Seide zum Einsatz in der peripheren Nervenregeneration

Aufgrund vielversprechender Ergebnisse bei der Einarbeitung von Seiden-Fibroin in eine Kollagenmatrix wurde das native Material nach dem Testsystem auf seine Eigenschaften getestet. Dazu wurde Spinnenseide der goldenen Radnetzspinne *Nephila clavipes* verwendet und diese zu Fasern verarbeitet. Es zeigte sich, dass die Konstrukte eine hohe mechanische Belastbarkeit bei exzellenter Elastizität gewährleisten konnten und damit den Beschreibungen in der Literatur folgten (Altman et al. 2003; Meier 2001). Mit steigendem Faserquerschnitt wurde die Zugfestigkeit der Fasern ohne Verlust der Elastizität erhöht. Schon geringe Faserquerschnitte führten zu hoher mechanischer Beständigkeit. Damit konnte eine wesentliche Eigenschaft der Spinnenseide für den Einsatz im *Tissue Engineering* mechanisch belasteter Gewebe heraus gestellt werden. Die mechanische Belastbarkeit konnte dabei auch auf die C-Seide Materialien übertragen werden, die durch die Einarbeitung des

Strukturproteins Fibroin signifikant anstieg. Im Hinblick auf den Einfluss des nativen Materials *in vivo* konnte eine Förderung der Viabilität und Proliferation (MTT-Test, BrdU-Assay) sowie der Adhäsion neuronaler Modellzellen nachgewiesen werden. Mikroskopische Aufnahmen ließen sogar auf eine bevorzugte Anheftung der ISC auf der Spinnenseide schließen und konnten eine außergewöhnliche Spreitung der Zellen zeigen. Die Ausbildung von EZM nach kurzer Zeit belegte die hohe Biokompatibilität der Fasern und die Möglichkeit einer guten Integration der Spinnenseide in das angedachte Zielgewebe. Aufgrund des gerichteten Wachstums entlang der Fasern und der Ausbildung von dichten Zellsäulen ist die Spinnenseide prädestiniert für die intraluminare Auskleidung, wie sie für optimale NGC beschrieben werden (Hudson et al. 1999). Der positive Einfluss des Seiden-Fibroins auf etablierte Matrizes konnte durch die Optimierung der Kollagenmatrix in Form der C-Seide Matrix belegt werden (Kapitel 4.2 und 4.3).

4.4 Dynamische Kultivierung

Im Screening System ist für ausgewählte Materialien zum Abschluss eine dynamische Kultivierung vorgesehen, um so den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen. Vornehmliches Ziel der dynamischen Kultivierung war die Verbesserung der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung im gesamten Konstrukt, wie sie mehrfach in der Literatur beschrieben wird (Bilgen et al. 2006; Chen and Hu 2006). Dies sollte die stagnierende Zellschicht auf der Matrixoberfläche verhindern und ein gleichförmiges dreidimensionales Zellwachstum in der gesamten Matrix ermöglichen, was eine Grundvoraussetzung für eine funktionelle Gewebebildung darstellt. Die entwickelten Bioreaktoren zur dynamischen Kultivierung von Testmaterialien sollten in Anlehnung an die Literatur (Chen and Hu 2006; Vance et al. 2005) eine hydrodynamische Belastung in Form von Scherbeanspruchung durch Flüssigkeitsfluss integrieren, da dies die Gewebebildung nachweislich beschleunigen soll (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005; Chen and Hu 2006; Portner et al. 2005).

Für die dynamische Kultivierung zum Abschluss des Screening Systems wurde zunächst der einfachste Bioreaktor zur dynamischen Kultivierung von regenerierendem Gewebe, die Spinnerflasche, modifiziert und mit der Referenzmatrix MS validiert. Als Weiterentwicklung wurde ein Perfusionssystem entwickelt, da es ein bewährtes Bioreaktor-Design im *Tissue Engineering* darstellt (Holtorf et al. 2005; Martin et al. 2004). Die Kultivierungsergebnisse beider Systeme wurden anhand der Basis-Kollagenmatrix MS mit der statischen Kultivierung verglichen.

Innerhalb des Screening Systems übernimmt die dynamische Kultivierung vor allem die Aufgabe, ein Testsystem zur Züchtung des Gewebes in Annäherung an *in vivo* darzustellen. Dabei kann parallel ein Scale-up aus dem Forschungs-Maßstab stattfinden (Chaudhuri and Al-Rubeai 2005). Über das Screening hinaus könnten die entwickelten Systeme zur Züchtung von künstlichem Gewebes als Vorbereitung für die Implantation genutzt werden.

4.4.1 Entwicklung einer modifizierten Spinnerflasche

Spinnerflaschen stellen den einfachsten Bioreaktor zur dynamischen Kultivierung von *in vitro* hergestelltem Gewebe dar. Die konventionelle Spinnerflasche für diesen Einsatz wurde in Abschnitt 3.7.1 vorgestellt. Dabei wird grundsätzlich das Medium mit einem Magnetrührkern kontinuierlich vermischt. Ziel der Spinnerflasche war eine gute Durchmischung des Nährmediums (Carrier et al. 1999; Freed and Vunjak-Novakovic 1997) für eine verbesserte Versorgung und einen erhöhten Sauerstoffaustausch der Zellen (Kellner et al. 2002) im Vergleich zur statischen Kultivierung. Die Durchmischung des Mediums sollte zudem für

eine mechanische Stimulation der Zellen durch die erzeugten hydrodynamischen Kräfte sorgen. Nach heutigem Entwicklungsstand besteht bei der Spinnerflasche jedoch die Gefahr eines turbulenten Mediumflusses und damit einer zu hohen Scherbeanspruchung für die Zellen im Konstrukt. Daher wurde auf Basis der etablierten Spinnerflasche eine modifizierte Spinnerflasche entworfen, die die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung der Zellen in der Matrix maximal gewährleisten jedoch und einen turbulenten Mediumfluss vermeiden sollte.

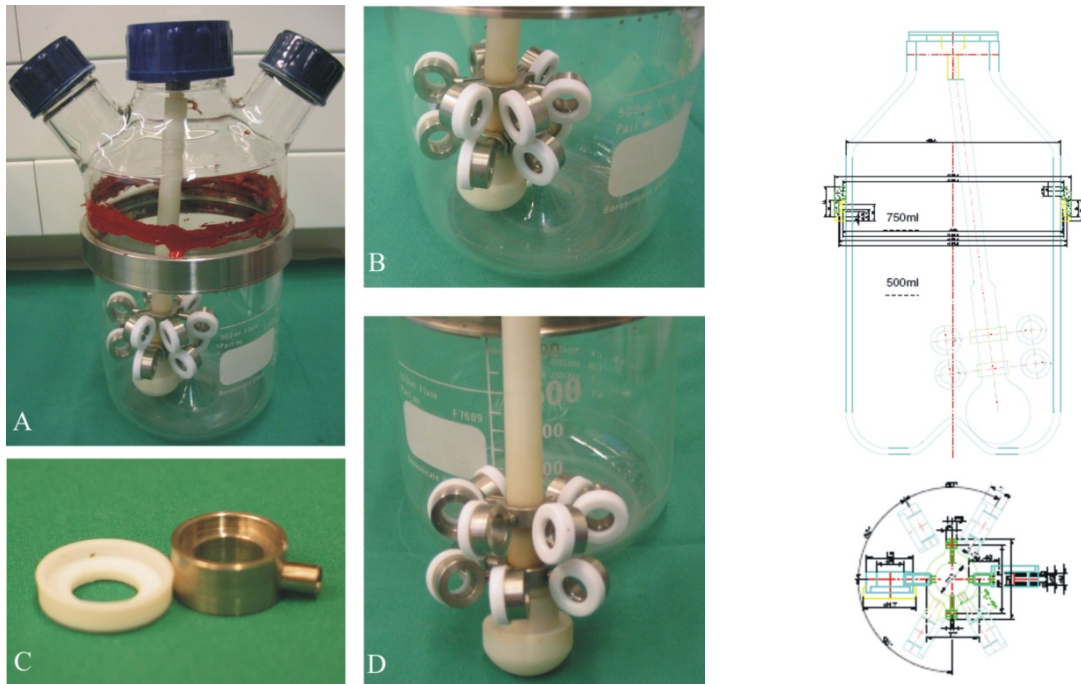


Abbildung 49: Erster Prototyp der entwickelten Spinnerflasche zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. Hergestellt in der Feinmechanik-Werkstatt, TCI, Hannover.

Der erste entwickelte Prototyp (Abbildung 49) basierte auf dem Spinnersystem der Techne Corporation (Cambridge, Großbritannien), das üblicherweise für die Kultivierung von Suspensionszellen verwendet wird. Er bestand aus zwei Ringen aus rostfreiem Edelstahl, die auf den Magnetrührpendel der Spinnerflasche aufgesetzt wurden (siehe Abbildung 49B und D). Jeder Ring besaß 6 Steckplätze für die in Abbildung 49C dargestellten Matrix-Halterungen, die gegeneinander versetzt angebracht wurden. Um eine Matrix-Probenahme während der Kultivierung zu ermöglichen, wurde die Glasflasche geteilt und über ein Edelstahl-Ringsystem wiederverschließbar gestaltet (siehe Abbildung 49A). Die technische Zeichnung veranschaulicht die Details des Aufbaus. Yvonne Stark konnte erfolgreich eine Kultivierung über vier Wochen mit diesem Prototyp durchführen. Es traten jedoch Probleme im Handling und in der Mechanik des Stecksystems auf. Nach dem Autoklavieren der

Spinnerflasche waren sowohl die Stecksysteme für die Matrizes als auch das Verschluss-System schwer zu handhaben, was zu Sterilitätsproblemen und zu einer unruhigen Rührbewegung führte. Zudem zeigte sich das Verschluss-System als instabil, da die Materialien (Edelstahl, Glas, Kleber) unterschiedliche Ausdehnungseigenschaften beim Autoklavieren besaßen. Dies führte schließlich zu einem Riss des Glases oberhalb des Edelstahlverschlusses, der mit einem roten Silikonkleber geklebt wurde (siehe Abbildung 49A). Aufgrund dieser technischen Probleme wurde daher ein weiteres Spinnersystem entwickelt, in dem die Ideen für die Matrix-Platzierung in der Flasche aufgenommen wurden.

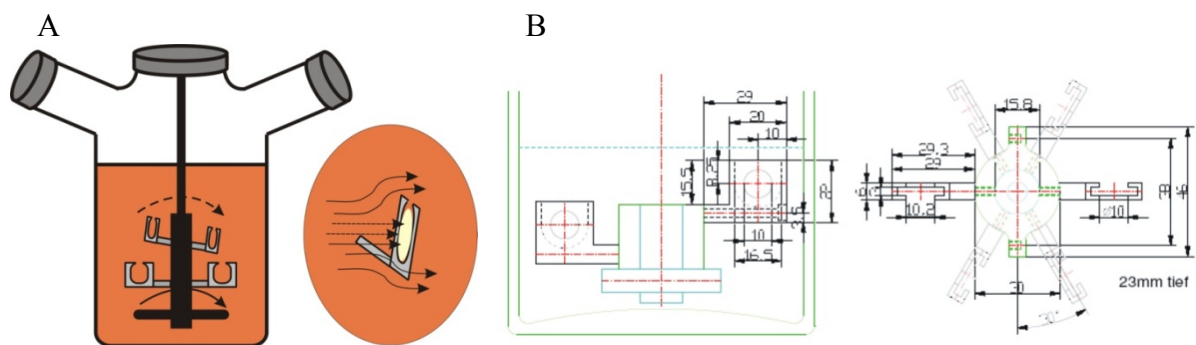


Abbildung 50: Zweiter Prototyp der entwickelten Spinnerflasche zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes. A: schematische Darstellung; B: technische Zeichnung. Hergestellt in der Feinmechanik-Werkstatt, TCI, Hannover.

Abbildung 50 zeigt die entwickelte modifizierte Spinnerflasche (zweiter Prototyp) in der schematischen Darstellung (A) und als technische Zeichnung (B). Es wurde eine normale Spinnerflasche ohne Bodenkonus verwendet, die mittig einen frei schwebenden Rührkern besaß. An den Rühraufsatz mit Magnetkern wurden Aufsätze aus autoklavierbarem Material versetzt in zwei Ebenen angebracht (siehe auch Abbildung 51C und D). Jede Ebene hatte 6 Steckplätze für Matrizes. Die Matrizes wurden ausgestanzt und in einen runden Rahmen (Innendurchmesser: 9 mm, Außendurchmesser: 13 mm) eingespannt (Abbildung 51E). Die eingespannten Rahmen konnten nun passgenau in die Steckplätze von oben eingesteckt werden (Abbildung 51B). Bei Antrieb des Magnetrührers drehten sich die Matrizes in Rührgeschwindigkeit mit. Dabei standen sie senkrecht zur Fließgeschwindigkeit und nicht parallel zur Fließgeschwindigkeit, wie in Abschnitt 3.7.1 dargestellt. Damit konnte die komplette Fläche der Matrix dem Flüssigkeitsfluss ausgesetzt und eine maximale Mediumpenetration durch das Konstrukt erzeugt werden. Ein turbulenter Mediumfluss konnte insofern vermieden werden, dass die Matrizes nicht durch eine gute Durchmischung des Mediums besser versorgt wurden, sondern die Versorgung durch die eigene Bewegung im Medium gewährleistet wurde. Somit konnten die Rührgeschwindigkeiten gesenkt werden. Die

12 Steckplätze ermöglichten die parallele Kultivierung von mehreren Konstrukten und die Probenentnahme zu mehreren Zeitpunkten der Kultivierung, um die Besiedlung der Matrizes mit den Zellen über den Zeitraum unter verschiedenen Aspekten (verschiedene Analysemethoden) beobachten zu können (Probenentnahme: siehe Abbildung 51B). Eine Anwendung dieser Spinnerflasche wird in Abschnitt 4.4.3 beschrieben.

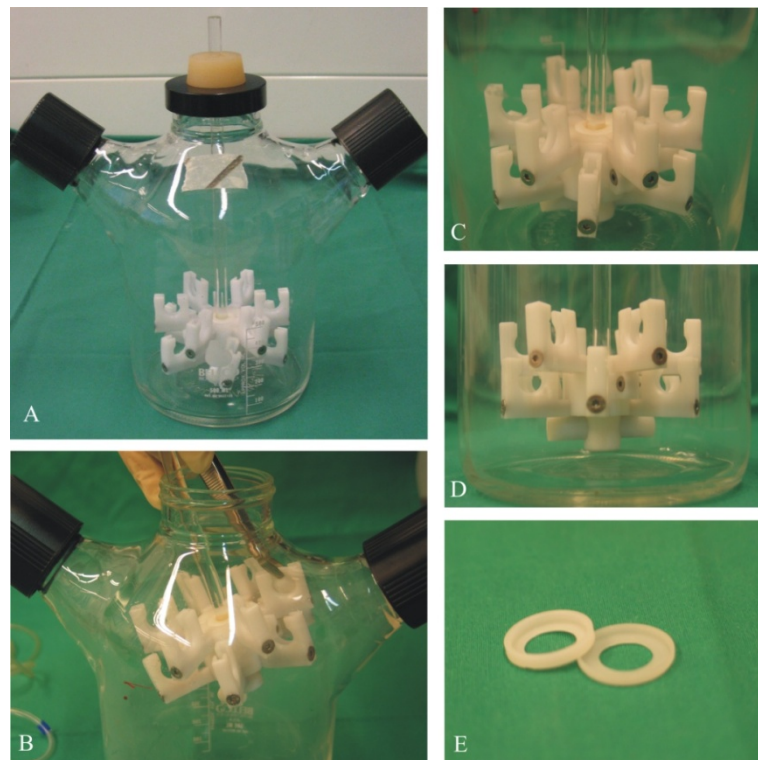


Abbildung 51: Zweiter Prototyp der entwickelten Spinnerflasche zur dynamischen Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes (Fotografien).

4.4.2 Entwicklung eines Perfusionsreaktors

Als bewährtes Bioreaktor-Design im *Tissue Engineering* werden Perfusionsysteme verwendet (Holtorf et al. 2005; Martin et al. 2004), bei denen mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe das Medium gleichmäßig durch das Kultursystem (Kammern, Säulen, Kartuschen) und damit unausweichlich auch durch das Scaffold gepumpt wird. Dieser Mediumfluss soll ebenfalls den Nährstoff- und Sauerstofftransport verbessern (Holtorf et al. 2005; Kim et al. 2000), eine Stimulation durch hydrodynamische Effekte hervorrufen (Bilgen et al. 2006) sowie durch die gleichbleibende Flussrichtung eine Ausrichtung der Zellen bewirken (Chen and Hu 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein solcher Perfusionsreaktor entwickelt. Abbildung 52 zeigt die schematische Darstellung (A) sowie die technische Zeichnung (B) des entwickelten

Die Kammer besaß am Boden einen Mediumzufluss, durch den das Medium in die Kammer gepumpt wurde. Das Medium wurde mit Hilfe der Pumpe durch die Matrices hindurch gedrückt und konnte am Deckel über einen Abfluss zurück gepumpt werden. Das Medium wurde aus einer auf 37 °C und 5 % CO₂ vortemperierten Vorratsflasche im Kreis gepumpt (Abbildung 53A). Das Reaktorsystem befand sich während der Kultivierung im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Aufbau des Perfusionsreaktors ermöglichte einen gerichteten Mediumfluss durch die Matrices und sollte damit alle oben genannten Anforderungen erfüllen. Eine ausweichende Flussrichtung um die eingespannten Matrices herum, wie es bei der modifizierten Spinnerflasche möglich ist, wurde durch den gewählten Aufbau vermindert. Das komplette System konnte geschlossen autoklaviert werden. Die parallele Kultivierung von 8 Matrices ermöglichte eine Probenahme im Kultivierungszeitraum und damit eine Analyse des Wachstumsverhaltens über die Zeit.

Für die exakte Einstellung der Flussrate im Reaktor wurde die peristaltische Pumpe im System kalibriert (Abbildung 54). Zunächst wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min begonnen. Dies musste jedoch weiter optimiert werden.

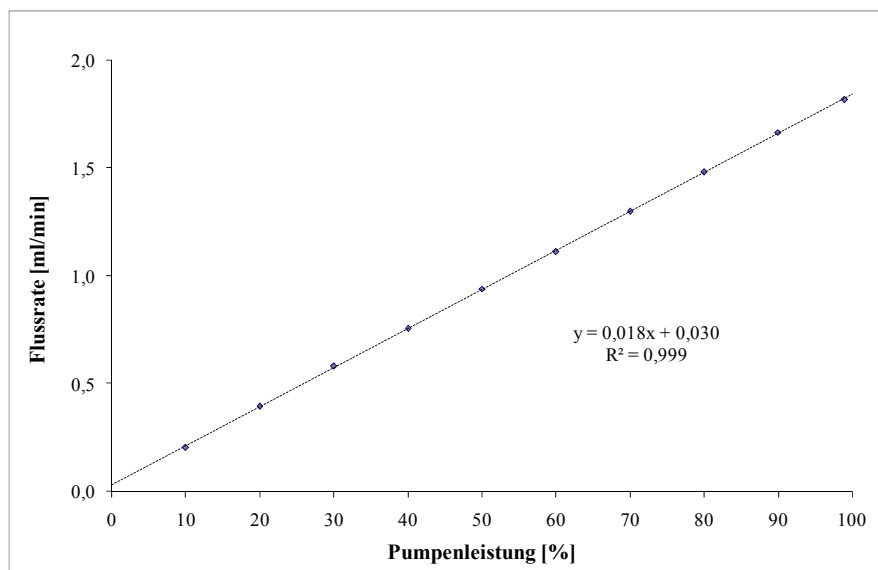


Abbildung 54: Kalibration der peristaltischen Pumpe im geschlossenen System des Perfusionsreaktors

4.4.3 Vergleich der statischen und dynamischen Kultivierung anhand der Referenzmatrix Matristypt®

Um die Systeme zur dynamischen Kultivierung auf ihre Eignung zu testen und sie im Screening System zu etablieren, wurde zunächst die Referenzmatrix MS sowohl in der

Spinnerflasche als auch im Perfusionsreaktor im Vergleich zur statischen Kultivierung kultiviert. Dazu wurden Matrizes von MS mit einem Lochseisen (Innendurchmesser: 18 mm) ausgestanzt, durch Einlegen in Isopropanol für mindestens 2 Stunden desinfiziert und über Nacht in entsprechendem Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Gleichzeitig wurden die Spinnerflasche, das geschlossene Reaktorsystem und die Steckrahmen für die Matrizes bei 121 °C und 1 bar über gespanntem Wasserdampf autoklaviert. Die vorbereiteten Matrizes wurden unter sterilen Bedingungen in die Rahmen eingespannt und nochmals für einige Stunden in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ äquilibriert. Um dieselben Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurden die Matrizes statisch in 24 Lochplatten mit einer Dichte von 1×10^5 ISC in 1 ml Kulturmedium ankultiviert. Nach 4 Tagen wurden die eingespannten Zell/Matrix Konstrukte schließlich in ihr Kultivierungssystem (6-Lochplatte, Spinnerflasche, Perfusionsreaktor) überführt und über einen Zeitraum von vier Wochen kultiviert. Nach zwei, drei und vier Wochen wurden Matrix-Proben entnommen und die Viabilität/Proliferation (MTT-Test, Anhang 6.4.2) sowie die Morphologie (histologische Schnitte, Anhang 6.4.16; REM, Anhang 6.4.15) der Zellen auf den Matrizes untersucht. Zusätzlich wurden alle zwei Tage Medien-Proben entnommen, die auf den Glukose- und Laktatgehalt untersucht wurden (Anhang 6.4.8).

Die Wahl der richtigen Rührgeschwindigkeit (Spinnerflasche) bzw. Flussrate (Perfusionsreaktor) zeigte sich von Beginn an als maßgeblicher Faktor für den Kultivierungserfolg in den Systemen zur dynamischen Kultivierung. Auch in der Literatur sind hierzu keine absoluten Angaben zu finden und eine optimale hydrodynamische Beanspruchung konnte noch nicht beschrieben werden (Martin et al. 2004). Bei der anfänglichen Flussrate von 1 ml/min (Perfusionsreaktor) bzw. einer Rührgeschwindigkeit von 23 rpm (Spinnerflasche) konnten mit den vorgestellten Systemen keine Zellen kultiviert werden. Die Zellen, die dem Einfluss der Scherkräfte ausgesetzt waren, starben ab. Es resultierten Matrizes, auf denen in der Mitte der Rahmen keine Zellen wuchsen, im geschützten Bereich unter den Rahmen konnten jedoch vitale Zellen nachgewiesen werden. Nach schrittweiser Reduktion der hydrodynamischen Kräfte wurde schließlich eine Flussrate von 0,2 ml/min bzw. eine Rührgeschwindigkeit von 2 rpm gewählt.

Viabilität/Proliferation

In Abbildung 55 sind die Ergebnisse des MTT-Tests nach dynamischer Kultivierung unter den genannten Bedingungen im Vergleich zur statischen Kultivierung zusammengefasst. Sowohl die Absorptionswerte als auch das makroskopische Bild machten deutlich, dass die ISC zunächst unter den dynamischen Bedingungen nicht proliferierten. Es schien, dass die

Scherbeanspruchung trotz der beschriebenen Reduktion noch zu groß war für die Zellen. Für die statische Kultivierung auf den Kollagenmatrizes wurde eine signifikant höhere Viabilität/Proliferation der Zellen als auf den dynamisch kultivierten Matrizes nachgewiesen. Besonders auffällig war die lokal konzentrierte Matrix-Besiedlung in der Spinnerflasche. Dieses Wachsen der Zellen in Kolonien könnte eine Reaktion auf die Scherbeanspruchung sein. Über den Beobachtungszeitraum zwischen Woche zwei und vier der Kultivierung stagnierte die Viabilität/Proliferation auf den statisch kultivierten Kollagenmatrizes. Dies entspricht den Beobachtungen aus Abschnitt 4.1.5 und lässt sich durch die in der Literatur beschriebene stagnierende Zellschicht auf der Matrixoberfläche (Chen and Hu 2006; Portner et al. 2005) erklären. Trotz höherer Viabilitäten gegenüber den dynamisch kultivierten Matrizes ist daher auf den statisch kultivierten Matrizes nicht von einer gleichmäßigen Zellbesiedlung des gesamten Konstrukts auszugehen. Dies wurde durch histologische Schnitte näher untersucht (siehe Seite 99). Dagegen stieg die Viabilität/Proliferation auf den dynamisch kultivierten Matrizes über den Zeitraum an und konnte nach 4 Wochen vergleichbare Absorptionswerte zu den statisch kultivierten Matrizes erreichen. Dies lässt auf eine kontinuierliche Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen unter dynamischen Kultivierungsbedingungen schließen. Die makroskopischen Aufnahmen belegten nach anfänglichen Anpassungsschwierigkeiten eine gleichmäßige Verteilung der ISC nach Kultivierung im Perfusionsreaktor. In der Spinnerflasche blieb das Wachstum in Kolonien bestehen und die Matrix wurde nicht gleichmäßig besiedelt. Die hohen Standardabweichungen bei der Analyse der dynamisch kultivierten Matrizes belegen die Schwankungen, die innerhalb der Kultivierung erhalten wurden.

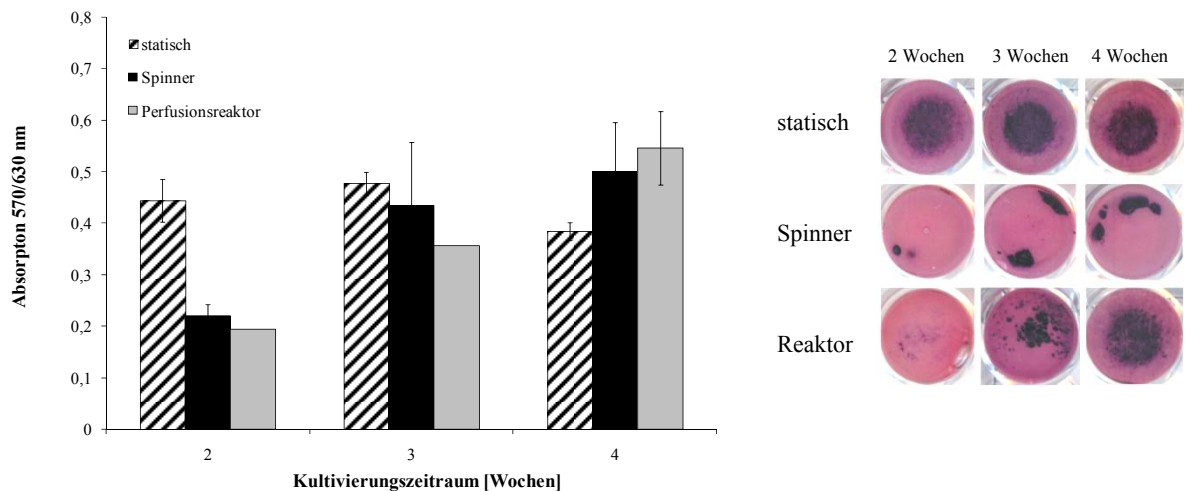


Abbildung 55: MTT-Test für ISC auf der Referenzmatrix MS im Vergleich von statischer und dynamischer Kultivierung in der modifizierten Spinnerflasche und im Perfusionsreaktor. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Glukose/Laktat-Bestimmung

Eine zusätzliche Aussage über die Stoffwechselaktivität der sich in Kultur befindenden Zellen wurde über die Untersuchung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion erhalten. Die Messung erfolgte direkt aus dem zellfreien Zellkulturmedium. Der kumulative Glukoseverbrauch der auf MS kultivierten Zellen unter statischen und dynamischen Bedingungen ist in Abbildung 56A dargestellt. Die lineare Zunahme des kumulativen Glukoseverbrauchs unter statischen Kultivierungsbedingungen bedeutete, dass die ISC über den Kultivierungszeitraum kontinuierlich dieselben Mengen an Glukose verstoffwechselt haben. Da nach zwei Wochen keine Zunahme der Viabilität beobachtet werden konnte, ist von einer stagnierenden Zellzahl auszugehen. Dies lässt erneut auf eine Nährstoff-Unterversorgung an der Grenzschicht des nicht durchmischten Mediums schließen. Die in der Spinnerflasche kultivierten Zellen verbrauchten geringfügig mehr Glukose als unter statischen Bedingungen. Die Schwankungen über die Zeit sind möglicherweise auf das Wachstum in Kolonien zurückzuführen, in denen die Zellen einerseits gut proliferierten jedoch innerhalb des Zellclusters zeitweise unterversorgt wurden und daher abstarben. Für die Kultivierung im Perfusionsreaktor wurde analog zum MTT-Test zu Beginn ein geringerer Glukoseverbrauch im Vergleich zur statischen Kultivierung beobachtet. Dieser stieg jedoch nach ca. drei Wochen an, was durch Zellwachstum zu erklären ist. Nach vier Wochen wurden sowohl unter statischen als auch dynamischen Bedingungen vergleichbare Glukose-Verbrauchsdaten gemessen. Auch dies deckt sich mit den Ergebnissen des MTT-Tests.

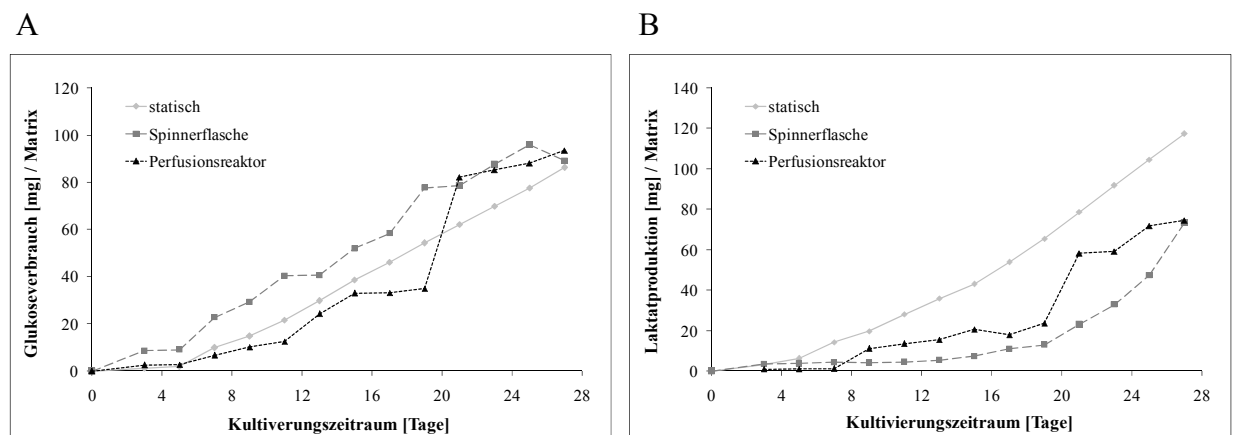


Abbildung 56: Kumulativer Glukoseverbrauch (A) und Laktatproduktion (B) von dynamisch kultivierten ISC auf MS gegenüber einer statischen Kultivierung über einen Zeitraum von vier Wochen.

Die Untersuchung der Laktatproduktion (Abbildung 56B) ergab analog zum Glukoseverbrauch unter statischen Kultivierungsbedingungen einen linearen Zusammenhang

zur Kultivierungsdauer. Dies stützt die These, dass das Zellwachstum schnell stagnierte, da es zu einer Unterversorgung im Inneren der Matrix kam. Auffällig ist die signifikant höhere Laktatproduktion gegenüber den dynamischen Kultivierungsbedingungen. Auch diese Beobachtung lässt vermuten, dass es unter statischen Bedingungen zu einer Sauerstoffunterversorgung der Zellen auf dem Konstrukt kam, die zu einem vermehrten anaeroben Stoffwechsel der Zellen führte. Das exponentielle Zellwachstum nach drei Wochen Kultivierungsdauer unter dynamischen Bedingungen wird durch die exponentielle Zunahme der Laktatproduktion deutlich. Die Sauerstoffversorgung schien dennoch deutlich verbessert, da nicht die Laktatmengen der statischen Kultivierung erreicht wurden.

Morphologie

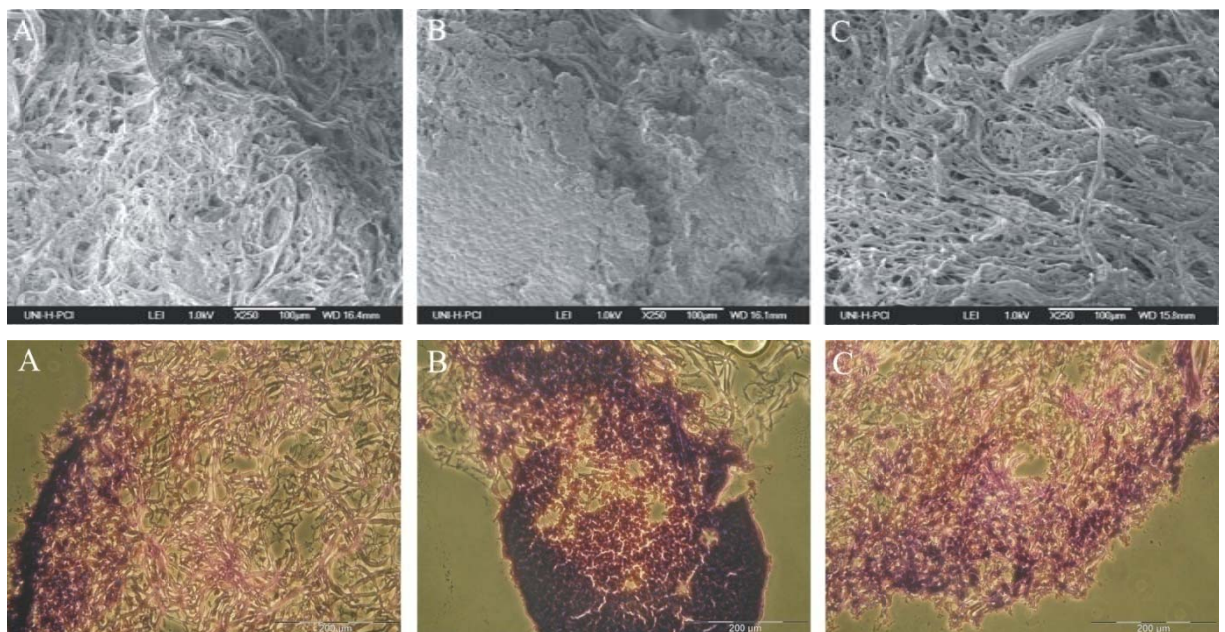


Abbildung 57: REM-Aufnahmen von einer Matrix-Aufsicht (oben) und Übersichtsfärbung mit Hämalaun & Eosin von gefrorenen, histologischen Querschnitten (unten). **A:** ISC auf Matristypt[®] nach statischer Kultivierung (4 Wochen), **B:** ISC auf Matristypt[®] nach dynamischer Kultivierung in der Spinnerflasche (4 Wochen), **C:** ISC auf Matristypt[®] nach dynamischer Kultivierung im Perfusionsreaktor (REM: 3 Wochen, Histo: 4 Wochen).

Die Untersuchung der Morphologie sollte vor allem über die Besiedlung der Matrices Aufschluss geben (Abbildung 57). Sowohl die REM-Aufnahmen als auch die histologischen Querschnitte konnten die These bekräftigen, dass die ISC bei statischer Kultivierung dazu neigten, auf der Oberfläche der Matrix zu wachsen und kaum in das Innere der Matrix einzuwandern (Abbildung 57A). Dies liegt in der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung allein durch Diffusion begründet, die in einer Grenzschicht an der Matrixoberfläche resultiert und zu

einer Unterversorgung in den Tiefen des Konstrukts führt. In der Aufsicht war im REM demzufolge eine stagnierende, dichte Zellschicht an der Matrixoberfläche zu erkennen. Die überwiegende Besiedlung der Oberfläche konnte auch in den histologischen Querschnitten erkannt werden. Da nur noch wenige Poren zur Verfügung standen, wurde deutlich, dass eine Nährstoffversorgung in unteren Zellschichten fast unmöglich war. Von der Kultivierung in der Spinnerflasche wurden die Bereiche dichter Zellcluster ausgewählt (Abbildung 57B). Es wurden gleichermaßen auch Bereiche der Matrices ohne jegliche Zellbesiedlung beobachtet (nicht dargestellt). Die REM-Aufnahmen zeigten eine dichte Zellschicht, die die Matrixstruktur komplett überdeckte. Auch die Bildung von EZM war deutlich sichtbar. Im Querschnitt waren diese isolierten Bereiche starker Zellbesiedlung ebenfalls zu erkennen. Im Vergleich zur statischen Kultivierung war jedoch tendenziell ein stärkeres Tiefenwachstum an diesen Stellen zu beobachten. Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Zellen in Reaktion auf die Scherbeanspruchung in Clustern wachsen, die hydrodynamischen Kräfte gleichermaßen aber auch das Einwachsen in die Tiefen des Konstrukts ermöglicht. Die Rührgeschwindigkeit wurde scheinbar jedoch immer noch zu hoch gewählt. Dabei muss beachtet werden, dass in der modifizierte Spinnerflasche in zweifacher Form Scherkräfte auf die Zellen wirken: Durch die Bewegung in der Spinnerflasche werden einmal die Matrices selbst gedreht und gleichzeitig durchströmt. Diese beiden Scherbeanspruchungen scheinen sich zu addieren. Daher muss die Rührgeschwindigkeit optimal gewählt werden, um einen maximalen Sauerstoffeintrag und eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten und gleichzeitig den Einfluss der Scherkräfte zur Förderung der Gewebekonstruktion (EZM) zu nutzen. Dies ist sicherlich auch abhängig von der verwendeten Zelle. Bestimmte sensible Zellmodelle bevorzugen vielleicht eher die dynamische Kultivierung im Perfusionsreaktor. Zellen die auf Scherbeanspruchung vermehrt positiv mit EZM-Bildung reagieren, könnten möglicherweise erfolgreicher mit der Spinnerflasche kultiviert werden. Die dynamische Kultivierung im Perfusionsreaktor (Abbildung 57C) führte nämlich im Vergleich zu der gleichmäßigsten Zellverteilung im Konstrukt. Es war keine geschlossener Zellmantel auf der Matrix-Oberfläche zu erkennen und die REM-Aufnahmen zeigten deutlich, dass die Porosität gewahrt blieb und damit eine Nährstoffversorgung gewährleistet werden konnte. Auch eine geringe Abscheidung von EZM konnte beobachtet werden.

4.4.4 Fazit der dynamischen Kultivierung anhand der Referenzmatrix Matristypt®

Die Testung der entwickelten Systeme zur dynamischen Kultivierung anhand der Referenzmatrix Matristypt® machte deutlich, dass die gewählte Rührgeschwindigkeit (Spinner) bzw. die Flussrate (Perfusionsreaktor) nach wie vor eine zu hohe

Scherbeanspruchung zur Folge hatten. Dies zeigte sich in der Bildung von Zellclustern bei der Kultivierung in der entwickelten Spinnerflasche und in einem stark verzögerten Zellwachstum im Perfusionsreaktor. Diese Problematik ist möglicherweise jedoch nicht nur auf die Prozessparameter zurückzuführen, sondern auch eine Problematik des verwendeten Zellmodells. Wie schon bei der Beurteilung der Adhäsion in Kapitel 4.2 beschrieben, sind die ISC ein sensibles Modell in Bezug auf die Anheftung an Oberflächen. Auch auf Scherkräfte reagieren die Zellen mit einer schnellen Ablösung von ihrer Oberfläche. Dies könnte die hohe Sensibilität gegenüber der Scherbeanspruchung erklären. Da die ISC jedoch den Gliazellen des Nervengewebes am nächsten sind (siehe auch Abschnitt 3.4.1), ist ihre Verwendung bei der dynamischen Kultivierung im Rahmen dieser Fragestellung besonders wichtig. Trotz der zu hohen Scherbeanspruchung waren dennoch positive Effekte der dynamischen Kultivierung zu erkennen. So konnte nach einer Anpassungszeit der Zellen an die Scherkräfte eine gute Proliferation beobachtet werden. Zudem wurde die Sauerstoffversorgung im gesamten Konstrukt nachweislich an der gesenkten Laktatproduktion erhöht. Die verbesserte Nährstoffversorgung durch die dynamische Kultivierung in allen Bereichen der Matrix äußerte sich gleichermaßen in einem gesteigerten Tiefenwachstum und einer gleichmäßigeren Besiedlung des Konstrukts (Perfusionsreaktor). Auch eine vermehrte Abscheidung von EZM (REM) konnte in Konsequenz der dynamischen Kultivierung beobachtet werden. Bilgen et al beschreiben dieses Phänomen als Folge von Scherbeanspruchung (Bilgen et al. 2006). Das Potenzial der dynamischen Kultivierung konnte somit dargestellt werden, jedoch ist der optimale Einsatz der Scherbeanspruchung im Rahmen folgender Arbeiten weiter zu optimieren. Die Problematik der optimalen Belastung (Frequenz, Stärke) durch hydrodynamische Stimulation ist in der Literatur jedoch bereits bekannt und somit kein spezielles Problem der entwickelten Systeme (Martin et al. 2004).

4.4.5 Anwendung der dynamischen Kultivierung im Perfusionsreaktor an einer Kollagen-CA Matrix

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse innerhalb des Screening Systems (vgl. Kapitel 4.2) wurde die Matrix C-CA 10 % im entwickelten Perfusionsreaktor dynamisch kultiviert. Dies sollte eine Annäherung der Kultivierungsbedingungen an die *in vivo* Bedingungen ermöglichen. Dazu wurden die C-CA Matrizes analog zur Referenzmatrix MS vorbereitet (siehe Abschnitt 4.4.3), mit 1×10^5 ISC in 1 ml Kulturmedium statisch ankultiviert, nach 4 Tagen in die Kultivierungssysteme (6-Lochplatte, Perfusionsreaktor) überführt und über einen Zeitraum von vier Wochen kultiviert. Über den Kultivierungszeitraum wurde dieselbe Analytik im Vergleich zur statischen Kultivierung durchgeführt.

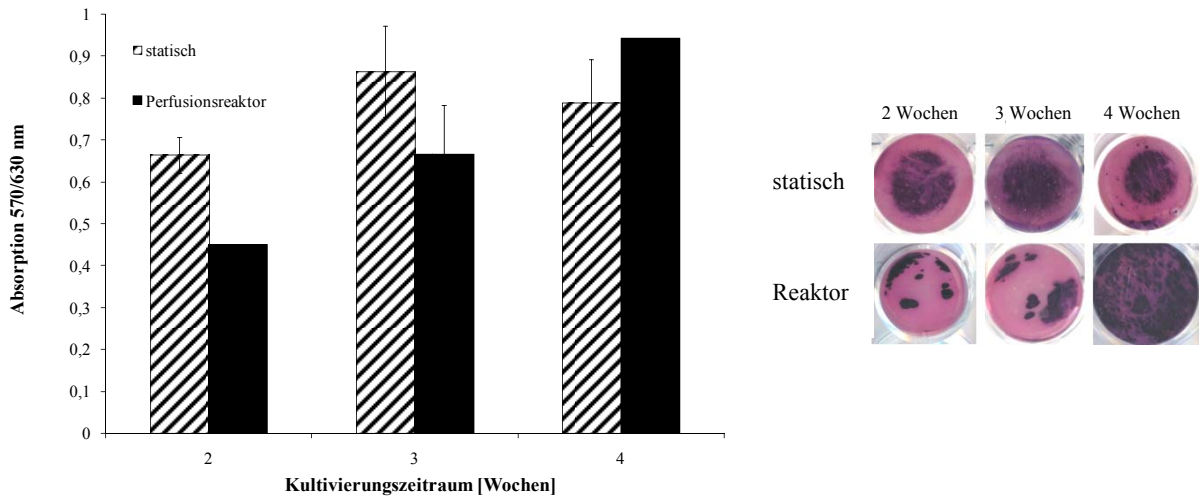


Abbildung 58: MTT-Test für ISC auf C-CA 10 % im Vergleich von statischer und dynamischer Kultivierung im Perfusionsreaktor. Spektrophotometrische Messung des Zellwachstums als Funktion der mitochondrialen Aktivität der Zellen über einen Zeitraum von 4 Wochen. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler.

Nach Auswertung des MTT-Tests (Abbildung 58) wurde deutlich, dass die statisch kultivierten Zellen auf C-CA 10 % ein Plateau erreichten. Hier schien die Oberfläche der Matrizes so dicht besiedelt, dass über reine Diffusion des Mediums keine ausreichende Versorgung im Inneren der Matrizes zu gewährleisten war. An der Matrixoberfläche sank die Nährstoffkonzentration auf null ab. Dies führte zu einer stagnierenden Zellschicht an der Oberfläche der Matrizes. Analog zur Kultivierung der Referenzmatrix MS konnte eine Steigerung der Viabilität bei dynamischer Kultivierung beobachtet werden, die nach anfänglichem Wachstum in Zellclustern nach 4 Wochen auf eine relativ einheitliche Besiedlung zurückzuführen war. Trotz gesteigerter Viabilitäten nach 4 Wochen unter dynamischen Kultivierungsbedingungen zeigte sich erneut eine lange Anpassungsphase an die veränderten Wachstumsbedingungen. Zusätzlich zu der uneinheitlichen Besiedlung nach zwei und drei Wochen kann wiederum von einer sehr hohen Scherbeanspruchung für die ISC ausgegangen werden. Dieser äußerte sich zudem in einer bevorzugten Rand-Besiedlung (unter dem Rahmen). Diese beschriebene Anpassungsphase schlug sich auch im kumulativen Glukoseverbrauch der Zellen als Maß für ihr Wachstum nieder (Abbildung 59A). Die Zellen unter statischen Kultivierungsbedingungen verbrauchten über den Kultivierungszeitraum annähernd dieselbe Menge an Glukose über die Zeit, was bei steigenden Zellzahlen eine Stoffwechselreduktion bedeutete, die vermutlich auf eine Unterversorgung der Zellen im Inneren der Matrizes zurückzuführen war. Dagegen steigert sich unter dynamischen Kultivierungsbedingungen im Perfusionsreaktor der Glukoseverbrauch nur langsam, bis er

nach knapp drei Wochen stark anstieg und vergleichbare Werte zur dynamischen Kultivierung erreicht wurden. Diese verzögerte Steigerung des Glukoseverbrauchs ist durch die Scherbeanspruchung bedingte reduzierte Proliferation der Zellen zu Beginn der Kultivierung zu erklären. Obwohl die ISC nach vier Wochen vergleichbare Viabilitäten und Glukoseverbrauch unter dynamischer gegenüber statischer Kultivierung zeigten, müssen Laktatproduktion und Morphologie Aufschluss über eine mögliche Verbesserung der Matrix-Besiedlung geben. Die kumulative Laktatproduktion über den Kultivierungszeitraum ist in Abbildung 59B dargestellt. Wie schon für die Referenzmatrix MS war die Laktatproduktion unter dynamischen Kultivierungsbedingungen signifikant geringer als unter statischen Bedingungen. Dies kann ein Hinweis auf die bessere Sauerstoffversorgung der Zellen auf der Matrix unter dynamischen Bedingungen sein, da diese auch unter dichter Besiedlung nach vier Wochen weniger Laktat im Zuge eines anaeroben Stoffwechsels produzieren.

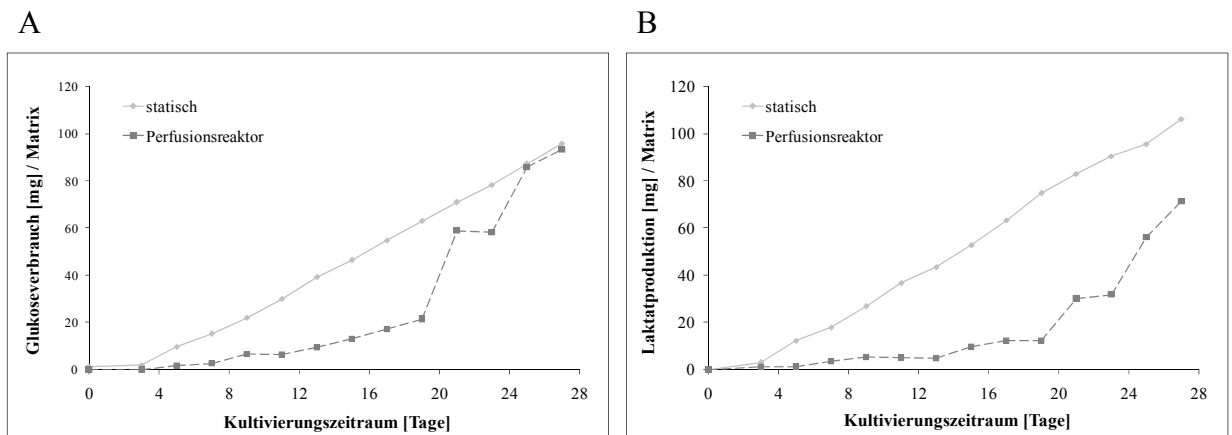


Abbildung 59: Kumulativer Glukoseverbrauch (A) und Laktatproduktion (B) von im Perfusionsreaktor dynamisch kultivierten ISC auf C-CA 10 % gegenüber einer statischen Kultivierung über einen Zeitraum von vier Wochen.

Bei der Betrachtung der Zellbesiedlung mittels histologischer Färbungen von Querschnitten (Abbildung 60) ist wiederum zu erkennen, dass es unter statischen Bedingungen zu einer verstärkten Besiedlung der Matrixoberfläche kam, während die dynamischen Kultivierungsbedingungen ein Tiefenwachstum der Zellen ermöglichten. Die REM-Aufnahmen protokollieren zudem eine verstärkte Bildung von EZM unter dynamischen Kultivierungsbedingungen. Es konnte eine dichte Zellbesiedlung beobachtet werden, die die ursprüngliche Struktur des Kollagen-Gerüsts teilweise vollständig überdeckte. Die mit Hämalaun & Eosin gefärbten Querschnitte machten jedoch deutlich, dass das Tiefenwachstum unter dynamischen Bedingungen ebenfalls noch nicht zu einer gleichmäßigen Gewebekonstruktion geführt hatte. Es müsste in weiterführenden Arbeiten

untersucht werden, ob diese in Langzeitversuchen erreicht werden kann und damit allein die Verzögerung der Zellproliferation unter Einfluss von Scherkräften zu diesem Ergebnis nach 4-wöchiger Kultivierung geführt hat. Gleichzeitig müsste in diesem Zuge die Scherbeanspruchung reduziert werden, um die Clusterbildung zu vermeiden. Nach Optimierung dieser Parameter scheint jedoch eine erfolgreiche Gewebebildung mit der C-CA Matrix generell möglich und kann durch die dynamische Kultivierung weiter verbessert werden.

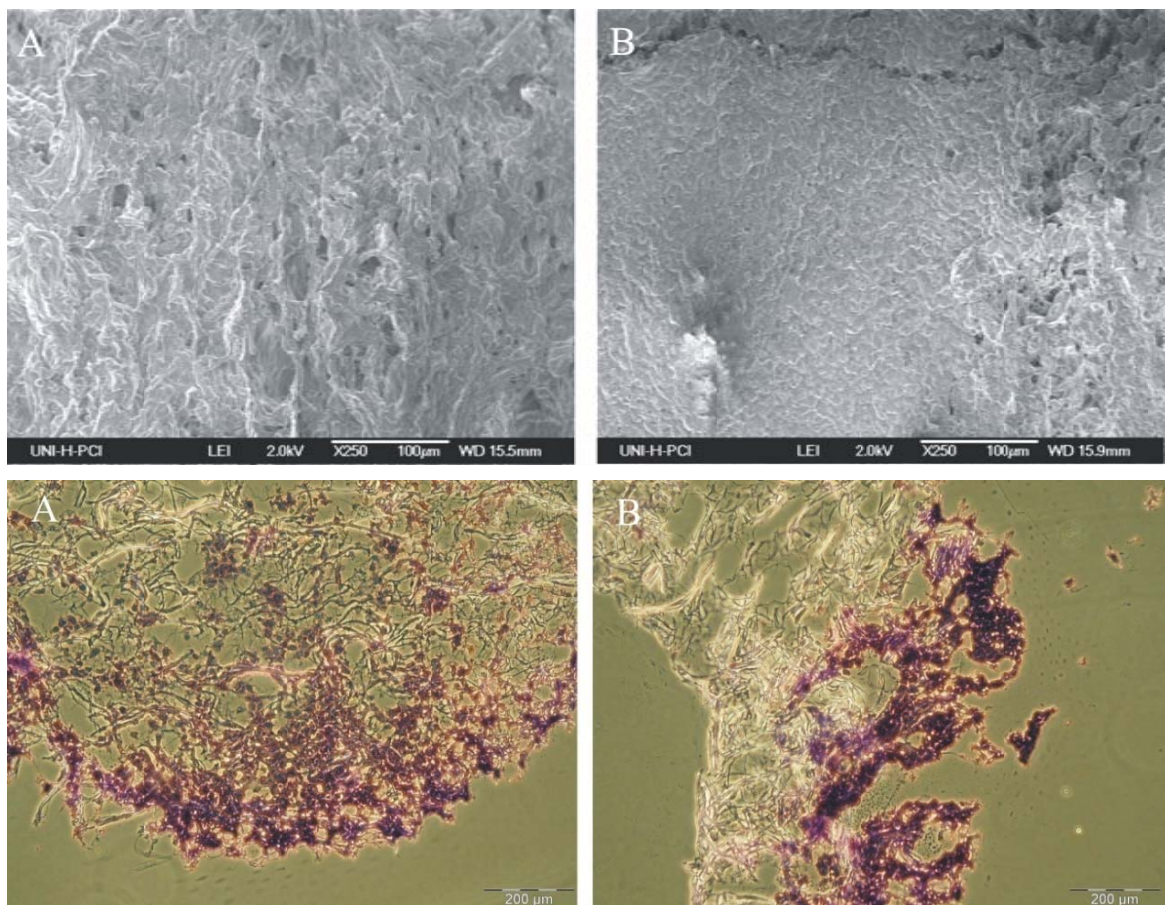


Abbildung 60: REM-Aufnahmen von einer Matrix-Aufsicht (oben) und Übersichtsfärbung mit Hämalaun & Eosin von gefrorenen, histologischen Querschnitten (unten). **A:** ISC auf C-CA 10 % nach statischer Kultivierung (REM: 3 Wochen, Histo: 4 Wochen), **B:** ISC auf C-CA 10% nach dynamischer Kultivierung im Perfusionsreaktor (REM: 3 Wochen, Histo: 4 Wochen).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Behandlung schwerwiegender peripherer Nervenläsionen kann das *Tissue Engineering* eine Alternative zur üblichen Transplantation autologer Nerven bieten, indem Schwann Zellen *in vitro* auf formgebenden, biokompatiblen Leitschienen kultiviert und anschließend zur Unterstützung der gerichteten peripheren Nervenregeneration in den Menschen implantiert werden.

Es wurden bereits diverse Materialien für diese Anwendung getestet, ein optimales Konstrukt konnte jedoch noch nicht entwickelt werden. In dieser Arbeit wurde ein Screening System anhand von Referenzmaterialien entwickelt, das eine reproduzierbare und schnelle Testung von Biomaterialien und ihren Modifikationen für die periphere Nervenregeneration *in vitro* ermöglicht. Das entwickelte System ermöglicht durch den mehrstufigen Aufbau aus Pre- und Fein-Screening eine schnelle Rückkopplung für die Optimierung und Modifikation von Materialien und lässt so eine iterative Testung unter Berücksichtigung ökonomischer Aspekte zu. Materialien, die sich im Pre-Screening (Testung auf Viabilität/Proliferation, Adhäsion und Zellmorphologie/-verteilung) als vielversprechend erwiesen, können dann einem Fein-Screening unterzogen werden. Hier sind weitreichender Studien zur Zellproliferation sowie die Untersuchung von spezifischen Zellmarkern vorgesehen. Die Durchführung der Assays in Mikrotiterplatten ermöglicht dabei einen hohen Materialdurchsatz. Da kein Human-Albumin-ELISA entwickelt war, wurde ein spezifischer ELISA entwickelt und etabliert, der die Quantifizierung von sezerniertem Albumin aus Kulturüberständen ermöglicht. Für reproduzierbare Beurteilung konnten erfolgreich Referenzmaterialien sowie Bewertungskriterien definiert werden.

Das standardisierte Testsystem könnte Grundlage einer zielgerichteten Materialoptimierung für die Generierung eines optimalen Nervenkonstrukts sein. So können die in der Literatur beschriebenen vielversprechenden Ansätze zur Herstellung solch idealer Nervenkonstrukte zielgerichtet kombiniert und anschließend reproduzierbar und schnell getestet werden.

Exemplarisch wurden hier auf Grundlage der Kollagen-Referenz-Matrix MS drei verschiedene Modifikationen in Form zugesetzter, natürlicher Polymere innerhalb des entwickelten Screening Systems getestet und beurteilt. Hyaluronsäure als zusätzliche Komponente förderte die Viabilität, Proliferation und Adhäsion der Modell-Zellen trotz seiner Beteiligung an interzellulären Anhaftungs- und Erkennungsprozessen *in vivo* nicht wesentlich. Möglich wäre, dass die Verarbeitung im Kollagen-Gerüst zu einer Strukturänderung der HA führt oder wichtige Erkennungssequenzen für Zell-

Oberflächenproteine nicht zugänglich sind. Der Zusatz von HA zur Kollagenmatrix stellte somit in diesem Fall keine Verbesserung der Matrices im Hinblick auf die periphere Nervenregeneration dar.

Colominsäure fördert *in vivo* (hier als PSA am NCAM) als entwicklungsphysiologische Modifikation am NCAM die synaptische Plastizität sowie Zellmigration und ist an regenerierenden Prozessen im PNS beteiligt. In dieser Arbeit wurde die Basis-Kollagenmatrix mit CA dotiert und im Hinblick auf eine Optimierung mit Hilfe des Screening Systems getestet. Der Zusatz von CA zur Kollagenmatrix förderte die Viabilität und Proliferation der Zellmodelle vor allem zu Beginn der Kultivierung. Die Bestimmung der HSA-Produktion konnte diese Beobachtungen bestätigen. Zudem war der Einfluss von CA auf die Adhäsion nicht gravierend. Die Förderung der Viabilität und Proliferation sind daher die entscheidenden Aspekte bei der Beurteilung der Matrix. Die Genexpression wichtiger Markergene wurde durch die Modifikation mit CA nicht negativ verändert. Die parallele Analyse der Expression wichtiger neuronaler Gene mittels DNA-Chip konnte eine erhöhte neuronale Anregung in Form von Neurotransmitter-Rezeptoren sowie die gesteigerte Expression des Filament-Proteins Nestin in Gegenwart von CA nachweisen. Zudem konnte eine Abnahme der Expression einiger Apoptosegene durch CA-Zusatz beobachtet werden. Damit schien die Modifikation der Kollagenmatrix mit CA einen neuroprotektiven und regenerationsfördernden Effekt zur Folge zu haben. Im Hinblick auf die Morphologie der Zellen konnte eine gleichmäßige Besiedlung des Konstrukts sowie eine Verbesserung der EZM-Absonderung gegenüber dem Ausgangsmaterial MS nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die C-CA Matrix somit beste Voraussetzungen für eine dreidimensionale Gewebebildung gewährleistet und CA aufgrund seiner physiologischen Effekte *in vivo* ein vielversprechender Zusatz für die Modifikation von Biomaterialien darstellt.

Die Effekte der CA innerhalb der Kollagenmatrix auf molekularer Ebene der Zellen bedarf einer intensiveren Analyse. Dabei könnten DNA-Chip Analysen durch real time PCR markanter Gene weiter verifiziert werden. Die erlangten Ergebnisse könnten durch die Kultivierung mit Primärzellen gestützt werden. Wie es das Screening System für vielversprechende Materialien vorsieht, wäre als nächster Schritt zudem der *in vivo* Einsatz der Matrix sinnvoll. Auch weitere Möglichkeiten zur Immobilisierung und Freisetzung der CA im Kollagengerüst sind denkbar. So könnte das Polysaccharid in kontrolliert abbaubaren Polymeren verkapselt werden, um dann kontrolliert in die Umgebung freigesetzt zu werden.

Fibroin-Fasern aus Seidenfäden der Seidenraupe *Bombyx mori* eingearbeitet in die Kollagenmatrix lieferten im Hinblick auf die neuronalen Testsysteme eine Verbesserung der

Viabilität und Zelladhäsion. Eine Toxizität des Materials auf die Testzellen konnte ausgeschlossen werden. Dieser optimierende Einfluss des Strukturproteins Seide wurde daher anhand des nativen Materials näher getestet, da native Seidenfäden in Form intraluminarer Röhren ein idealer Baustein von NGC sein könnten. Die verwendeten Fasern der goldenen Radnetzspinne *Nephila clavipes* zeigten herausragende mechanische Eigenschaften auch gegenüber dem Seidenfaden der Seidenraupe. Es konnte eine hohe Zugfestigkeit bei exzellenter Elastizität nachgewiesen werden. Damit konnte die Eignung der Spinnenseide für den Einsatz im *Tissue Engineering* mechanisch belasteter Gewebe herausgestellt werden. Die herausragenden mechanischen Eigenschaften von Seide konnten auch auf die mit Fibroin modifizierte Kollagenmatrix übertragen werden und führten damit zu einer interessanten Optimierung des Kollagenmaterials. Die native Spinnenseide förderte zudem die Viabilität, Proliferation und Adhäsion neuronaler Modell-Zellen, die vermutlich auf eine bevorzugte Anheftung auf der Spinnenseide (mikroskopische Aufnahmen) zurückzuführen ist. Auch die Ausbildung von EZM nach kurzer Zeit belegte die gute Biokompatibilität sowie die gute Integration der Fasern in das Zielgewebe. Damit konnte die Verarbeitung von Seide zur Förderung einer gerichteten Nervenregeneration nachgewiesen werden.

Für die Verwendung von Spinnenseide in der regenerativen Medizin wäre es wünschenswert, reproduzierbare Konstrukte aus der geernteten Seide herstellen zu können. Denkbar wären die Herstellung von Matten durch Webtechniken und die Knüpfung fester Seile aus mehreren Fasern. Diese Verarbeitung würde die Verwendung der Seide vereinfachen. Zudem könnte die verarbeitete Seide als Gerüstmatrix auch einer dynamischen Kultivierung unterzogen werden.

Im Screening System ist für ausgewählte Materialien zum Abschluss eine dynamische Kultivierung vorgesehen, um so den *in vivo* Bedingungen möglichst nahe zu kommen. Es konnten erfolgreich zwei Systeme zur dynamischen Kultivierung der Zell/Matrix Konstrukte entwickelt werden. Das einfacherere Modell der Spinnerflasche ermöglichte eine verbesserte Nährstoffversorgung im Inneren der Matrix durch Konvektion des Mediums. Die Steigerung der Proliferation konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht erreicht werden, da der Einfluss der Scherkräfte auf die Zellen zu groß war. Es konnten jedoch vergleichbare Wachstumsraten bei verbessertem Tiefenwachstum erzielt werden. Bedingt durch die hohe Scherbeanspruchung wuchsen die Zellen in Clustern, so dass keine gleichmäßige Gewebekonstruktion erreicht wurde.

Der entwickelte Perfusionsreaktor konnte durch kontinuierlichen Mediumfluss durch die Matrizes ebenfalls die Nährstoffversorgung verbessern. Die Scherbeanspruchung führte bei

diesem System jedoch dazu, dass die Zellen zunächst eine Anpassungsphase benötigten, um schließlich zu proliferieren.

Die Prozessparameter zur dynamischen Kultivierung in den entwickelten Systemen bedürfen einer weiteren Optimierung. Vor allem müssen die hydrodynamischen Kräfte so eingestellt werden, dass sie die Proliferation der Zellen auf den Matrices maximal begünstigt ohne die Zellphysiologie und Adhäsion zu stören. Dies ist auch abhängig vom gewählten Zellmodell.

Die dynamische Kultivierung der C-CA Matrix spiegelte die genannten methodischen Probleme wider, konnte jedoch die Eignung des Materials unterstreichen. Damit wurde gezeigt, dass C-CA Matrices geeignet sind, um darauf neuronale Testzellen zu kultivieren, und in Zukunft im klinischen Bereich als Trägermaterialien für das *Tissue Engineering* peripherer Nerven *in vivo* getestet werden könnten.

6. Anhang

6.1 Statistik

Für alle Ergebnisse wurden ab vier Messwerten der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler berechnet. Ab sechs Messwerten wurde die Varianz der Gruppen mittels F-Test bestimmt. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde ein zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, um die Signifikanz der Abweichung zu überprüfen. Der t-Test wurde abhängig vom Ergebnis des F-Tests für gleiche oder ungleiche Varianzen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich gewertet bei $p < 0,05$. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse der ELISA-Messungen einem Ausreißertest nach Nalimov (Kaiser and Gottschalk 1972; Ross 2006) unterzogen und Ausreißer gegebenenfalls entfernt.

6.2 Medien und Puffer

Alle im Folgenden beschriebenen Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (ARIUM, Sartorius AG, Göttingen) hergestellt, welches im Folgenden als ddH₂O bezeichnet wird.

DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)

134,73 g DMEM-Pulver wurde mit 37 g NaHCO₃ versetzt und in 10 l ddH₂O gelöst, der pH mit 1 M HCl auf 7,2 eingestellt und steril filtriert. Der pH Wert erhöht sich durch das Filtrieren um 0,1-0,2 Einheiten.

Hep-G2 Zellen (DSMZ: ACC 180):

DMEM + 10% Fötale Kälber Serum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml).

PC-12 Zellen (DSMZ: ACC 159):

DMEM + 10 % Hitze-inaktiviertes Pferdeserum (horse serum, HOS), 5 % FKS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml).

Neuronales Differenzierungsmedium für PC-12 Zellen:

DMEM + 1 % HOS, 1 % FKS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), 100 ng/ml neuronaler Wachstumsfaktor (neuronal growth factor, NGF)

Immortalisierte Schwann Zellen (ISC):

DMEM + 10 % FKS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml).

RPMI-1640 Medium:

104 g RPMI-Pulver wurde mit 20 g NaHCO₃ versetzt und in 10 l ddH₂O gelöst, der pH mit 1 M HCl auf 7,2 eingestellt und steril filtriert. Der pH Wert erhöht sich durch das Filtrieren um 0,1-0,2 Einheiten. Bei Verwendung des Fertigmediums (flüssig) wurde zusätzlich 1 % L-Glutamin (200 mM) hinzugefügt.

PBS (phosphate buffered saline)	140 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,2 mM Na ₂ HPO ₄ ; 14,7 mM KH ₂ PO ₄ , ad 1000 ml mit ddH ₂ O, pH = 7,4
PLL-Lösung	0,05 % Poly-L-Lysin (PLL) in ddH ₂ O
Trypsin	0,2 % Trypsin, pH = 7,5 in PBS, 0,02 % EDTA
MTT-Lösung	5 mg/ml MTT in PBS, sterilfiltriert
Solubilisierungslösung	1 g SDS in 10 ml 0,01 M HCl, sterilfiltriert
DAPI-Stammlösung	500 µg/ml DAPI in ddH ₂ O
DAPI-Färbepuffer	10 mM Tris pH 7, 150 mM NaCl, 1mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 0,1 % Nonidet-P40

6.3 Säugerzelllinien**Hep-G2 Zellen**

Hep-G2 Zellen sind humane Zellen, die im Jahr 1975 aus dem Leberzellkarzinom eines 15-jährigen argentinischen Jungens isoliert wurden (DSMZ-Nr.: ACC 180).

PC-12 Zellen

PC-12 Zellen wurden 1976 aus den Zellen eines Phäochromozytoms (Tumor der chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks) einer Ratte isoliert und als Modellzellen etabliert (Greene and Tischler 1976). Die PC-12 Zellen lassen sich zum einen glandulär und zum anderen, durch Zugabe des neuronalen Wachstumsfaktors NGF, neuronal differenzieren wobei eine Neuritenbildung induziert wird. PC-12 Zellen wachsen schwach adhärent, da sie

ursprünglich Suspensionszellen sind (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Grothe, Medizinische Hochschule Hannover).

Immortalisierte Schwann Zellen (ISC)

Präparation aus Nn. Ischiadici (Ischias Nerven) neonataler Ratten (3 Tage post natu) und anschließende Immortalisierung (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Grothe, Medizinische Hochschule Hannover).

6.4 Methoden

6.4.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen fand unter sterilen Bedingungen statt. Alle verwendeten Materialien (Flaschen, Pipettenspitzen, Pasteurpipetten) sowie Medien und Lösungen wurden daher vor Gebrauch durch Autoklavieren (121 °C, 1 bar, 30 min) bzw. durch Filtration sterilisiert. Die Lagerung der Medien und Lösungen erfolgte bei 4 °C. Vor dem Kontakt mit Zellen wurden alle Medien und Puffer im Wasserbad auf 37 °C erwärmt (Lindl 2002).

Die verwendeten Zellen wurden in T-Flaschen mit 75 cm² Bodenfläche (T75) bei 37 °C und Begasung mit 5 % CO₂ kultiviert. Die ISC und Hep-G2 wurden alle 3 – 4 und die PC-12 alle 6 – 7 Tage passagiert, wobei alle 3 – 4 Tage ein Mediumwechsel erfolgt. Alle kultivierten Zellen wachsen adhärent in den verwendeten Zellkulturflaschen. Die PC-12 Zellen wachsen jedoch nur schwach adhärent, da sie ursprünglich Suspensionszellen sind. Daher wurden die Zellkulturgefäße vor der Kultivierung mit Poly-L-Lysin (PLL) (Anhang 6.2 Medien und Puffer) beschichtet, um die Adhäsion und Spreitung der PC-12 Zellen zu verbessern. Dazu wurde mit 2 ml einer 0,05 %igen PLL-Lösung die Oberfläche einer T75-Flasche bedeckt, für 30 min. bei 37 °C (oder 1 h bei Raumtemperatur) inkubiert und die Kulturflasche anschließend zweimal mit sterilem PBS gewaschen.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium vollständig abgenommen, die Zellen einmal mit 4-5 ml PBS gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (Anhang 6.2 Medien und Puffer) bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, bis die Zellen vollständig vom Kulturboden abgelöst waren (3-10 min). Daraufhin wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen und 4 min bei 2000 g zentrifugiert. Der Medienüberstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert, entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und in neue Kulturflaschen ausplattiert. Um die Zellen, die während des Passagierens leicht verklumpen können, wieder zu vereinzeln, wurde die Suspension mehrmals mit einer Glaspipette auf und ab pipettiert.

Von den ISC werden jeweils $1,5 - 3 \times 10^6$ Zellen in eine neue Kulturflasche ausgesät und mit etwa 20 ml Medium bedeckt, von den PC-12 und Hep-G2 werden etwa $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt und ebenfalls in etwa 20 ml Medium subkultiviert.

Bestimmung der Zellzahl

Die trypsinisierten und vereinzelter Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer am Mikroskop gezählt. Dazu wurden 20 μ l der Zellsuspension, die gegebenenfalls verdünnt wird, in eine Neubauer-Zählkammer eingezogen und die Zellen in den Großquadraten gezählt. Die Zelldichte (Zellzahl/ml) wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zelldichte} \left[\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right] = \left(\frac{\text{ermittelte Zellzahl}}{\text{Anzahl Großquadrate}} \right) * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

6.4.2 MTT-Test

Zur Überprüfung der Viabilität/Proliferation von Zellen wurde der MTT-Test durchgeführt, mit dem die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen wird. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) ist ein gelbes, wasserlösliches Tetrazolium-Salz, welches von Dehydrogenasen in Mitochondrien lebender Eukaryonten zu einem wasserunlöslichen, blau-violetten Formazankomplex reduziert werden kann (

Abbildung 61). MTT dringt in die Zellen ein, sein Tetrazoliumring wird durch die Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien aufgebrochen: Es entsteht das alkohollösliche, dunkelblaue Formazan. Der blaue Farbstoff fällt aus und reichert sich in den Zellen an. Das Detergenz SDS lysiert die Zellen und setzt das Formazan frei. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung wird photometrisch bestimmt. Die bestimmte optische Dichte dient als Maß für die Viabilität/Proliferation der eingesetzten Zellen (Denizot and Lang 1986; Slater et al. 1963). Der Test wird in den Vertiefungen von Lochplatten durchgeführt und in 96-Lochplatten photometrisch vermessen.

Vor der Durchführung des Tests wurden die kultivierten Matrizes in eine neue Lochplatte überführt, damit kein Transmissionssignal am Boden haftender Zellen mit gemessen wurde. Die Matrizes wurden im 96/24-Loch-Format mit 100/300 μ l frischem DMEM sowie 10/30 μ l einer MTT-Lösung ($5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in PBS, steril filtriert) für 4 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Um die Formazankristalle aufzulösen wurde 100 μ l Solubilisierungslösung (10 %

SDS in 0,01 M HCl, steril filtriert) zugesetzt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor der photometrischen Messung wurden die Matrizes aus der Lösung entfernt und die Absorption des Formazans beim lokalen Absorptionsminimum von 570 nm gegen 630 nm als Referenzsignal gemessen. Als Negativkontrolle diente eine Matrix ohne Zellen.

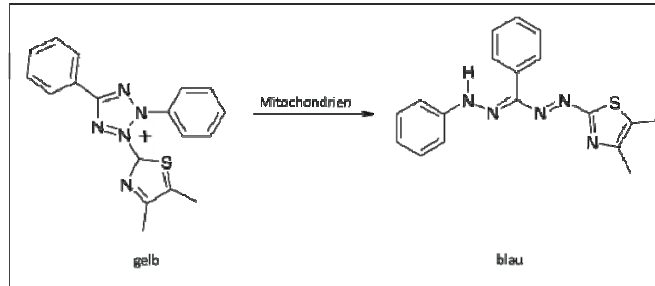


Abbildung 61: Reduktion von MTT zu Formazan

6.4.3 Fixierung von Zellen

Zur Fixierung der Zellen in den Lochplatten und auf den verwendeten Matrizes wurden diese zunächst vorsichtig zweimal mit PBS gewaschen und dann 20 min bei -20 °C in 100 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

6.4.4 DAPI-Färbung

Die Färbung der Zellkerne (Färbung doppelsträngiger DNA) mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid) wird zur Übersichtsfärbung und zur genauen Detektion aller Zellen verwendet. Die Zellen in den Platten und auf den Matrizes wurden nach der Fixierung dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 20 Minuten bei 37 °C in der DAPI-Färbelösung (2 µl DAPI Stammlösung in 1 ml DAPI-Färbepuffer, siehe Anhang 6.2 Medien und Puffer) inkubiert. Nach der Färbung wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen, um Farbreste zu entfernen und den Hintergrund zu entfärben. Die Färbung konnte nun im Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht visuell analysiert werden.

6.4.5 Adhäsionsassay

Die Adhäsion der ausplattierten Zellen auf den verschiedenen Matrizes wurde über die Auszählung der angewachsenen Zellen nach 2 und 24 Stunden bestimmt, da ein vollständiges Ablösen der adhären Zellen und anschließendes Auszählen nicht reproduzierbar möglich war. Um die angewachsenen Zellen auf den dreidimensionalen Matrizes sichtbar machen zu können, wurde die doppelsträngige DNA in den Zellkernen mit DAPI histologisch gefärbt.

Der Adhäsionsassay wurde für jede Matrix parallel in 6 Wells einer 96-Lochplatte durchgeführt. Um ausreichend zählbare Zellzahlen innerhalb des 24 Stunden Zeitfensters zu erreichen, wurde die ausplattierte Zellzahl gegenüber der Untersuchung von Zell-Viabilität und –Morphologie vierfach erhöht (2×10^4 Zellen in 20 μ l pro Well). Nach 2 und 24 Stunden Inkubation wurden die kultivierten Matrizes jeweils vorsichtig mit PBS gewaschen, um die nicht adhären Zellen zu entfernen und in eine neue Lochplatte überführt. Die angewachsenen Zellen wurden nun fixiert und mit DAPI (Anhang 6.4.4) gefärbt. Von jeder verglichenen Kultivierungsbedingung wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei einer 200fachen Vergrößerung (das entspricht ungefähr 1 % der Scaffold Oberfläche ohne Beachtung der Materialdicke) 6 Aufnahmen, die zufällig und weder vom Rand noch von der Mitte stammen sollten, gemacht. Abschließend wurden die gefärbten Zellkerne auf den Bildern gezählt und ausgewertet.

6.4.6 BrdU-Assay

Zur Quantifizierung der Proliferation von Zellen wurde der BrdU-Assay angewendet. BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuridin) ist ein Pyrimidinanalogon und wird im Zuge der Zellteilung bei der Replikation der DNA wie ein Thymidin-Baustein in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Anschließend werden die Zellen fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen BrdU, der seinerseits an eine Peroxidase gekoppelt ist, inkubiert. Der Immunkomplex, der sich nun gebildet hat, kann über eine Substratreaktion der gekoppelten Peroxidase nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Farbreaktion geschieht photometrisch. In dieser Arbeit wird der Assay mit einem Kit von Roche [Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetisch); Artikelnr.: 11647229001] entsprechend der Vorschrift durchgeführt.

Die mit Zellen besiedelten Konstrukte wurden in neue Lochplatten überführt und mit 100 μ l frischem Medium sowie 10 μ l der BrdU-Markierungslösung versetzt (Endkonzentration 10 μ M BrdU). Nach zweistündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde das Markierungsreagenz entfernt und die Zellen mit 200 μ l Ethanol pro Well durch 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Proliferierende Zellen trugen nun markierte BrdU-Bausteine in ihrer DNA, die sie bei der Verdopplung der DNA selber inkorporiert hatten. Nachdem die Fixierungslösung entfernt wurde, wurden 100 μ l der nach Anleitung hergestellten Anti-BrdU-POD-Lösung (monoklonaler Antikörper, spezifisch gegen BrdU, mit einer Peroxidase (POD) konjugiert) zu den fixierten Zellen gegeben und für weitere 90 Minuten inkubiert (RT). Die spezifische Antikörper-Bindung an die BrdU-Moleküle in Form von Immunkomplexen wurde schließlich durch eine Substrat-Reaktion nachgewiesen. Dazu wurde dreimal mit PBS gewaschen und dann je Well 100 μ l der Substratlösung

zugegeben. Als Substrat diente Tetramethylbenzidin (TMB), welches unter Einwirkung von Sauerstoff von der Peroxidase aus der farblosen Leukoform (TMBH₂) zu dem blauen Farbstoff (TMB) oxidiert wurde. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 25 µl 1 M Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt und die Intensität der Farbentwicklung am Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzmessung bei 655 nm quantifiziert. Die gemessenen Absorptionswerte korrelieren direkt mit der Menge synthetisierter DNA und damit mit der Anzahl an proliferierenden Zellen.

6.4.7 TH-ELISA

Für den immunhistochemischen Nachweis der Thyrosinhydroxylase wurde ein ELISA gegen die von den PC-12 Zellen exprimierte Thyrosinhydroxylase im Zytosol der Zellen durchgeführt. Dazu wurden die PC-12 Zellen zunächst auf den Materialien fixiert (Anhang 6.4.3), im Anschluss drei Mal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen mit 100 µl Ziegen Serum oder 1 % BSA in PBS/96-Well für 1 Stunde bei 4 °C blockiert. Nach erneutem Waschen wurden die fixierten Zellen mit 0,3 % Triton-X (in PBS) in Ziegen Serum (1:4) für 30 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurde mit 200 µl 1:1000 verdünntem Maus-anti-TH-Antikörper (T2928, Sigma-Aldrich GmbH) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion wurde durch einstündige Inkubation von 200 µl 1:400 verdünntem, Cy-3-markiertem anti-Maus-IgG bei Raumtemperatur nach einem erneuten Waschvorgang durchgeführt. Abschließend wurde eine Doppelfärbung mit DAPI (Anhang 6.4.4) angeschlossen.

6.4.8 Glukose/Laktat-Bestimmung

Die Untersuchung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion ist eine sinnvolle Möglichkeit, eine Aussage über die Stoffwechselaktivität der sich in Kultur befindenden Zellen treffen zu können. Die Messung kann direkt aus dem zellfreien Zellkulturmedium erfolgen. Hierzu wurde ein automatisches Analysesystem benutzt, das auf einer enzymatischen und elektrochemischen Reaktion basiert (YSI 2700 SELECT, Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA).

Die Enzymelektrode besteht aus Glukoseoxidase bzw. L-Laktatoxidase, die als immobilisierte Enzyme zwischen einer Membran aus Polycarbonat und einer zweiten Membran, bestehend aus Celluloseacetat, vorliegen. Die Membranen sind für Glukose bzw. Laktat und Sauerstoff durchlässig, weshalb in Abhängigkeit von der Glukose- bzw. Laktatkonzentration Wasserstoffperoxid gebildet wird. Wasserstoffperoxid, diffundiert durch die

Cellulosemembran und oxidiert an einer Elektrode (Platinanode). Durch die Abgabe von zwei Elektronen pro Molekül Wasserstoffperoxid wird ein elektrisches Signal gesetzt, das über eine entsprechende Elektronik im YSI gemessen werden kann.

Glukose Messung: In Anwesenheit von Glukoseoxidase wird D-Glukose zu Wasserstoffperoxid und D-Glucano-lacton oxidiert.



Laktat Messung: Laktat oxidiert in Anwesenheit von Laktatoxidase unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Pyruvat.



Die Matrizes wurden mit 5×10^3 Zellen besiedelt und über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. Die abgenommene Zellkulturprobe wurde bei 400 g für 3 Minuten zentrifugiert, anschließend wurde die Glukose und Laktat Konzentration mit Hilfe des YSI 2700 select bestimmt. Es wurden 6 Matrizes parallel kultiviert und der Überstand aus 2 Wells wurde vereinigt, so dass drei Messungen durchgeführt wurden. Aus den ermittelten Konzentrationen wurden der kumulativen Glukose Verbrauch und die Laktat Produktion über den Kultivierungszeitraum berechnet.

6.4.9 Albumin-ELISA

Die Stoffwechselaktivität von Hepatozyten kann über die Quantifizierung des von ihnen sezernierten Albumins bestimmt werden. Die Menge des Albumins wurde mittels eines ELISA quantifiziert. Dazu wurden 6 Matrizes mit jeweils 5000 Hep-G2 Zellen besiedelt und über einen Zeitraum von 15 Tagen kultiviert. Im Abstand von 2-3 Tagen wurde das überstehende Medium abgenommen und erneuert. Das abgenommene Medium wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und im Kühlschrank aufbewahrt. Ebenso wurde mit dem Medium einer nicht besiedelten Matrix als Blindwert verfahren.

Die Konzentration des gebildeten Albumins wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISA bestimmt. Der ELISA wurde in 96-Lochplatten der Firma Nunc (Maxisorp™) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte nach folgendem optimierten Protokoll:

- Fangantikörper (Ziege-anti-Human Albumin Antikörper, Bethyl Laboratories, Inc., Newberg, USA) 1:1000 mit Bindungspuffer verdünnen, Platte mit je 100 µl/Well beschichten, 1 h im Dunkeln bei RT inkubieren
- Platte dreimal mit je 100 µl/Well TPBS waschen und ausklopfen
- Platte mit je 100 µl/Well 5% Hefe-Extrakt in Bindungspuffer (Block-Puffer) blocken, Platte 30 min im Dunkeln bei RT inkubieren
- Platte dreimal mit je 100 µl/Well TPBS waschen und ausklopfen
- Proben 1:100 mit Bindungspuffer verdünnen, je 100 µl/Well pipettieren, 1 h im Dunkeln bei RT inkubieren
- Platte fünfmal mit je 100 µl/Well TPBS waschen und ausklopfen
- HRP-markierten Antikörper (Meerrettich-Peroxidase markierter Ziege-anti-Human Albumin Antikörper, Immunology Consultants Laboratory, Inc., Newberg, USA) 1:10000 mit Bindungspuffer verdünnen, AK 1 h bei RT im Dunkeln inkubieren
- Nach Inkubation fünfmal mit je 100 µl/Well TPBS waschen und ausklopfen
- Zugabe je 100 µl/Well Substratlösung TMB (RT), direktes Licht vermeiden, Platte im Dunkeln inkubieren
- Nach 10 Minuten Farbreaktion mit 1M HCl stoppen
- Farbintensität bei 450 nm im Plattenlesegerät messen

Bindungspuffer (<i>coating buffer</i>)	1,61 g Na ₂ CO ₃ 2,93 g NaHCO ₃	Ad 1000 ml a.d. mit ddH ₂ O, mit 1 M HCl auf pH 9,6 Filtrieren durch 2 µm Filter Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer (1xTPBS)	8 g NaCl 0,20 g KCl 0,20 g KH ₂ PO ₄ 1,43 g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 0,45 ml TWEEN 20	Ad 1000 ml a.d. mit ddH ₂ O, mit 1 M NaOH auf pH 7,4 Filtrieren durch 2 µm Filter Lagerung bei 4 °C
Block-Puffer (<i>blocking buffer</i>)	5 % Hefeextrakt in Bindungspuffer	Filtrieren durch 2 µm Filter Lagerung bei 4 °C

6.4.10 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde nach dem *Invitrogen TRIzol Reagent*[®] Standard Protokoll durchgeführt. Um eine ausreichende Menge an RNA isolieren zu können, wurden Matrizes mit 30 mm Durchmesser mit 3×10^5 Zellen besiedelt und anschließend eine Woche in 6-Lochplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Von jedem Zell/Matrix Konstrukt wurden 3 Replikate kultiviert und abschließend gepoolt. Nach einer Woche wurde jedes Zell/Matrix Konstrukt in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Falcontube) überführt und mit 1 ml *Invitrogen TRIzol Reagent*[®] überschichtet. Für Zell/Matrix Konstrukte aus Kollagen wurde zusätzlich zunächst ein Kollagenase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Replikate mit 3 ml einer Kollagenase I (250 U/mg) –Lösung (1 mg/ml) überschichtet und 4 Stunden bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden die Zell/Matrix Konstrukte bzw. der Verdauungsansatz im Homogenisator Ultra Turrax[®] (3 x 30 s bei maximaler Leistung) aufgeschlossen. Die Proben wurden währenddessen auf Eis gekühlt. Um Proteine und (extrazelluläre) grob abzutrennen, wurde die homogenisierte Masse für 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Der wässrige Überstand mit der freigesetzten RNA wurde abgenommen und mit 200 µl Chloroform (pro ml eingesetztes Trizol) zur Phasenseparation versetzt, 15 s per Hand geschüttelt und 3 min inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, wodurch es zur Phasenseparation kommt, bei der sich in der oberen wässrigen Phase die RNA befindet. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0,5 ml Isopropylalkohol (pro ml eingesetztes Trizol) vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und 4 °C hat sich ein RNA Pellet abgesetzt. Der Pellet-Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol (pro ml eingesetztes Trizol) gewaschen und anschließend 5 min bei 12000 g und 4 °C erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde nun an der Luft getrocknet. Die aufgereinigte RNA wurde in Rnase-freiem Wasser (pH 8) aufgenommen. Der RNA-Gehalt und die – Reinheit wurden mit Hilfe des Spektralphotometers *NanoDrop-1000*[®] über die optische Dichte der Probe bestimmt.

6.4.11 Qualitätskontrolle der RNA

Der *Agilent 2100 Bioanalyzer* ermöglicht mit dem RNA Nano LabChip[®] die parallele Analyse von 12 RNA-Proben. Dabei werden die RNA-Konzentration und die Qualität, also das Verhältnis der RNA-Untereinheiten, bestimmt.

Das fluidische System des LabChip[®] wurde mit 9 µl *Gel-Dye-Mix* gefüllt. Die Reagenzien für das Gel wurden 30 min vor Gebrauch bei Raumtemperatur äquilibriert. 65 µl *RNA 6000 Nano gel matrix* wurden 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Das *dye concentrate* wurde 10 s gevortext und anschließend herunter zentrifugiert. 1 µl der Farbstofflösung wurde zum Gel gegeben, vermischt und direkt vor Gebrauch 10 min bei 13000 g zentrifugiert. 9 µl *Gel-Dye-Mix* wurden in eine der Vertiefungen gegeben und mit der speziellen *Priming Station* in das fluidische System appliziert. 9 µl des *Gel-Dye-Mixes* wurden in zwei weitere Vertiefungen pipettiert. Die übrigen 9 Vertiefungen wurden mit 5 µl *RNA 6000 Nano Marker* und 1 µl RNA, bzw. dem *RNA 6000 Ladder* befüllt. Die 12 Proben und der Marker wurden zuvor 2 min bei 70 °C denaturiert. Der fertig befüllte LabChip[®] wurde für 1 min auf einem Vortexer mit einem speziellen LabChip[®]-Aufsatz bei 2400 min⁻¹ geschüttelt. Anschließend wurde der LabChip[®] in dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* fixiert und gemessen.

6.4.12 RT-PCR

cDNA-Synthese

Nach der Isolierung der RNA wurde die mRNA mittels des Enzyms MLV Reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA umgeschrieben.

2 µg RNA wurden mit 3 µl Oligo dT Primer (100 µM) versetzt und mit ddH₂O auf 21 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Durch Hinzufügen folgender Reagenzien wurde der Transkriptionsansatz vervollständigt und die Transkription gestartet:

8 µl	5-fach Puffer
4 µl	dNTP-Mix (2,5 mM)
1 µl	Reverse Transkriptase (200 U/µl)
6 µl	ddH ₂ O
<hr/>	
40 µl	Gesamtvolumen

Die Reaktion wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 5 min bei 65 °C abgestoppt.

RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit dem PCR-Thermocycler *Px2 Thermal Cycler*[®] der Firma Thermo Electron Corporation durchgeführt. Dazu wurden Gen-spezifische Primer für Albumin, Transferrin, Zytochrom P450 3A4, UDP-Glucuronosyltransferase, β -Aktin und Thyrosinhydroxylase verwendet. Die Zell-spezifische Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) wurde als house keeping Gen eingesetzt.

Zunächst wurde folgender Reaktionsansatz zusammengestellt:

	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen [μl]
5 x PCR-Puffer	5 x	1 x	10
Vorwärts Primer	10 pmol/ μ l	0,2 pmol/ μ l	1
Rückwärts Primer	10 pmol/ μ l	0,2 pmol/ μ l	1
dNTPs	5 mM	0,2 mM	4
cDNA		100 ng (RNA)	1
Taq-Polymerase	1 U/ μ l	0,25 U	0,25
ddH ₂ O			ad 50

Folgende Primer wurden verwendet:

Primer für Hep-G2 Zellen:

	Primersequenzen 5'-3'	Annealing-temperatur	Produkt-größe	Accission. Nummer
GAPDH	ACC AGA GTC CAT GCC ATC AC TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	53 °C	452 bp	NM_002046
Albumin	CTC GGC TTA TTC CAG GGG TGT G AAA GGA GTT CCG GGG CAT AAA AG	63 °C	497 bp	AY728024
Transferrin	AAG AGC GAT AAT TGT GAG GA AAG AGC GAT AAT TGT GAG GA	52 °C	543 bp	NM_001063
CYP 3A4	ATA CAC ACC CTT TGG AAG TG GAG CAA AGC AGA AGT CCT TA	54°C	247 bp	NM_017460
UDP	AAT GTT GTG CTT ATG GCT AC GCC ATG TTT CAG AGT AAG AA	53 °C	383 bp	NM_205862

Primer für PC-12 Zellen:

	Primersequenz 5'-3'	Annealing-temp.[°C]	Produktgröße	Accission.Nummer
GAPDH	GAA ACC TAG TGG GTC T	59.1 °C	451 bp	NM_017008
	ATC TCT GCA ATC AGG A			
β-Aktin	GTC CAC ACC CGC CAC CAG T	55.5 °C	535 bp	NM_031144
	AGC GCG TAA CCC TCA TAG AT			
TH	TCG GGC TAT GTA AAC AGA AT	55.2 °C	596 bp	NM_012740
	CTG GAG TGC ATG CAG TAG TA			

Primer für ISC:

	Primersequenz 5'-3'	Annealing-temp.[°C]	Produktgröße	Accission.Nummer
GAPDH	GAA ACC TAG TGG GTC T	59.1 °C	451 bp	NM_017008
	ATC TCT GCA ATC AGG A			
TH	TCG GGC TAT GTA AAC AGA AT	55.2 °C	596 bp	NM_012740
	CTG GAG TGC ATG CAG TAG TA			

Anschließend wurde die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

1 Zyklus	94 °C	5 min	Denaturierung
	94 °C	30 s	
35 Zyklen	Annealingtemp.	30 s	Annealing
	72 °C	30 s	
1 Zyklus	72 °C	5 min	

Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung und Kontrolle wurden die Proben auf 2 %ige TAE-Agarosegele aufgetragen. Die Agarose wurde dazu eingewogen, durch Erwärmen in TAE-Puffer gelöst, auf ca. 70 °C abgekühlt und schließlich in eine mit Kämmen bestückte Gelkammer gegossen. Das Gel wurde mit TAE-Puffer überschichtet und eine Mischung aus je 7 bzw. 10 µl PCR-Produkt und 2-fach Auftragspuffer (10 µg/ml Ethidiumbromid) je nach Taschengröße in die Probentaschen aufgetragen. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten DNA-Fragmente

wurde zusätzlich ein Längenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Größe auf die Trägermatrix aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 30-40 min durchgeführt. Die DNA-Banden wurden abschließend unter UV-Licht visualisiert.

50-fach TAE (Tris-Acetat)-Puffer:	Tris	242 g
	Essigsäure (konz.)	57,1 ml
	0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
	ddH ₂ O	ad 1000 ml

2-fach Auftragspuffer:	Formamid	9,5 ml	95 %
	SDS (10 %)	25 µl	0,025 %
	Bromphenolblau	2,5 mg	0,025 %
	Xylencyanol FF	2,5 mg	0,025 %
	Ethidiumbromid (1 %)	250 µl	0,025 %
	0,5 M EDTA	10 µl	0,5 mM

6.4.13 DNA-Chip Technologie

Für die Durchführung der DNA-Chip Experimente wurde das *NEN[®] MicromaxTM TSATM Labeling and Detection Kit* von Perkin Elmer verwendet, die dabei synthetisierte cDNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt.

cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

x	µl	RNA (4 µg)
2	µl	<i>Reaction Mix Concentrate</i> (Vial Y) / dNTP-Mix (2,5 mM)
1	µl	Biotin- bzw. Fluorescein-Nukleotid
1	µl	Random Hexamer Primer
1	µl	Oligo dT Primer (100 µM)
<hr/>		
ad 14	µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde für 10 min bei 65°C inkubiert, kurz anzentrifugiert und für 5 min bei 25 °C und 3 min bei 42 °C temperiert.

Die cDNA Synthese wurde durch Zusatz von:

5 μ l	<i>5 x RT reaction buffer</i>
3 μ l	DTT
1 μ l	<i>RNase out</i>
2 μ l	<i>Superskript III</i>

und Inkubation für 2 Stunden bei 42 °C durchgeführt.

Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz für 5 min auf Eis abgekühlt und nach Zusatz von je 2,5 μ l 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8) und 1 N NaOH für 30 min bei 65 °C erneut inkubiert. Nach 5 minütigem Abkühlen auf dem Eis wurden 6,5 μ l 1 M Tris-HCl (pH 7,5) zur pH-Senkung auf \leq pH 6 hinzugefügt und die synthetisierte cDNA mit den *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt.

Reinigung der cDNA über PCR Purification Kit

Die gelabelte cDNA wurde nach Vorschrift des *QIAquick PCR Purification Kits* von Qiagen aufgereinigt. Dazu wurde die Probe zunächst mit 300 μ l PBI-Puffer vermischt und auf die Säule gegeben. Es folgten die Reinigung mit 700 μ l 35 % Guanidin-Hydrochlorid und 700 μ l PE-Puffer. Zwischen allen Reinigungsschritten wurde jeweils eine Minute bei 16200 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Abschließend wurde erneut eine Minute bei 16200 g trocken zentrifugiert und mit zweimal je 25 μ l 1:10 verdünntem EB-Puffer (pH 8,5) und je einer Minute Zentrifugation bei 16200 g eluiert.

Hybridisierung

Die aufgereinigte cDNA wurde für ca. 45 min in der Vakuumzentrifuge (*Speedvac*[®]) einrotiert und anschließend in 13 μ l Hybridisierungspuffer II aufgenommen, für 3 min bei 95 °C denaturiert und mit der gegensätzlich gelabelten Probe vereinigt. Nach kurzem Abkühlen in Eis wurden weitere 4 μ l TopBlock zum Hybridisierungs-Ansatz hinzugefügt. Die komplette Probe wurde anschließend auf den Chip (gespotteter Slide) transferiert, eingedeckelt und mit *Fixogum* versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer feuchten 4-fach Schüttelkammer für Slides bei 42 °C.

Waschen und TSA Detektion

Nach der Hybridisierung über Nacht wurden die Slides nacheinander jeweils 5 min in 2 x SSC mit 0,1 % SDS, 1 x SSC und 0,5 x SSC unter vorsichtigem Schütteln gewaschen. Das gespottete und hybridisierte Feld wurde mittels *ImmEdgeTM Pen* eingerahmt und mit 300 µl TNB-G Blocking Puffer für 10 min inkubiert. Nach einminütigem Waschen unter Schütteln in TNT Puffer wurde mit der TSA Detektion begonnen:

Zeit	Volumen	Inkubationslösung/Waschpuffer	Zusammensetzung/Anleitung
10 min	200 µl	Anti-F1-HRP Konjugat Lösung	2 µl Anti-F1-HRP Konjugat (Z) in 200 µl TNB-G (frisch angesetzt)
3 x 1 min		TNT Puffer	Waschen unter Schütteln
10 min	250 µl	Cyanin-3-Tyramide Lösung	0,5 µl Cyanin-3-Tyramid Lösung I in 250 µl <i>Amplification Diluent</i> (S)
3 x 5 min		TNT Puffer	Waschen unter Schütteln
10 min	200 µl	HRP Inaktivierungs-Lösung	10 µl 3 M Natriumacetat (U) in 290 µl <i>HRP Inactivation Reagent</i> (T)
3 x 1 min		TNT Puffer	Waschen unter Schütteln
10 min	200 µl	Streptavidin-HRP Konjugat Lösung	2 µl Streptavidin-HRP Konjugat (J) in 200 µl TNB-G (frisch angesetzt)
3 x 1 min		TNT Puffer	Waschen unter Schütteln
10 min	250 µl	Cyanin-5-Tyramide Lösung	0,5 µl Cyanin-5-Tyramid Lösung (V) in 250 µl <i>Amplification Diluent</i> (S)
3 x 5 min		1 x SSC Puffer	
1 min		1:10 verdünnter 0,5 x SSC in ddH ₂ O	Waschen unter Schütteln

Die hybridisierten und gelabelten DNA-Chips wurden abschließend bei 1200 rpm für 2 min trocken zentrifugiert und sechs Mal mit einem *GenePix[®] 4000B microarray scanner* im entsprechenden Kanal (532 nm, 635 nm) bei unterschiedlichen Einstellungen (Veränderung der PMT und der Laserstärke) ausgelesen. Die primäre Bild-Analyse wurde mit der Software *GenePixPro[®] 6.0* durchgeführt. Die hierbei generierten Daten wurden einer sekundären

Analyse unterzogen. Diese Auswertung wurde von Frau Cornelia Repenning im Rahmen ihrer Doktorarbeit vorgenommen. In der sekundären Datenanalyse wurden die Daten der verschiedenen Scans zunächst anhand der Mediane aller Spot-Intensitäten normalisiert und auf Ausreißer untersucht. Dabei wurden auch die Replikate für jedes Gen berücksichtigt. Ausreißer unter den Gen-Replikaten wurden gemäß des Ausreisertests nach *Nalimov* eliminiert und von den übrigen Werten ein Mittelwert gebildet. Nun wurde die Ratio der verglichenen Zustände für jedes individuelle Gen berechnet. Abschließend wurde der t-Test (5 % Fehlerwahrscheinlichkeit) angewandt, um Unterschiede in der Genexpression bestimmen zu können.

20 x SSC (pH 7):	NaCl	175,3 g
	Tri-natriumcitrat-dihydraht	88,3 g
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
2 x SSC + 0,1 % SDS	20 x SSC	100 ml
	SDS (10 %)	10 ml
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
1 x SSC	20 x SSC	50 ml
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
0,5 x SSC	20 x SSC	25 ml
	ddH ₂ O	ad 1000 ml
TNT-Puffer (pH 7,5)	Tris-HCl	15,76 g
	NaCl	8,766 g
	Tween 20 (100 %)	500 µl
	NaOH	→ pH 7,5
	ddH ₂ O	ad 1000 ml

TN-Puffer	Tris-HCl	1,576 g
	NaCl	0,8766 g
	NaOH	→ pH 7,5
	ddH ₂ O	ad 100 ml
TNB-Puffer	TN-Puffer	100 ml
	<i>Blocking Reagent I</i>	0,5 g
TNB-G-Blocking Puffer	TNB-Puffer	4,5 ml
	Ziegen Serum (goat serum)	0,5 ml

6.4.14 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Die Prüfung der mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide wurde an einer Zwicki-Tischprüfmaschine der Firma Zwick/Roell, Deutschland vom Typ TC-FR2.5TN.D09 zur Materialprüfung durchgeführt. Das verwendete Gerät besteht aus einer Prüf- und einer Steuereinheit. An die Prüfeinheit können verschiedene Prüfwerkzeuge installiert werden, so auch zwei Klemmvorrichtungen für Zugversuche, deren Abstand voneinander an der Steuereinheit definiert werden kann. Nachdem man das zu prüfende Material in den Klemmvorrichtungen befestigt hat, bewegen sich diese Klemmen mit einer vorgegebenen Geschwindigkeit auseinander, wodurch das eingespannte Material so lange gedehnt wird, bis es schließlich reißt. Für die Detektion der Kraft wurde ein Kraftaufnehmer mit einer maximalen Kraft von 500 N der Firma Angewandte System Technik GmbH, Deutschland verwendet. Die Steuerung und Ergebnisauswertung konnte mit der Software TestXpert Version 9.01 der Firma Zwick Roell durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurden die gefertigten Spinnenseidenbündel in Bezug auf maximale Dehnung und Zugfestigkeit getestet, um den Einfluss der Faden- bzw. Verdrillungszahl auf die mechanischen Eigenschaften der Spinnenseide zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde der Abstand der Klemmbanken auf 2 cm eingestellt und ein Faden eingespannt. Dabei musste auf eine exakt senkrechte Einspannung geachtet werden, um Querkräfte zu vermeiden. Nach manuellem Start der Messung wurde der Faden automatisch mit 1 mm pro Minute so lange gedehnt, bis er schließlich riss. Riss der Faden nicht, wurde die Messung abgebrochen, sobald die aufzuwendende Kraft auf ein vordefiniertes Minimum (nahe Null) gesunken war.

6.4.15 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zell/Matrix Konstrukte zur Elektronenmikroskopie wurden dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C in Karnovsky Puffer fixiert. Anschließend wurden die Konstrukte mit Cacodylat Puffer (0,2 M in ddH₂O; pH 7,3) gewaschen und konnten darin mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur Entwässerung der Zellen wurden die Konstrukte zunächst mit PBS gewaschen und anschließend schrittweise mit Lösungen ansteigender Acetonkonzentration (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) entwässert. Bei jedem Schritt wurde 15 min bei 4 °C inkubiert. Der letzte Schritt in 100 % Aceton wurde dreimal bei Raumtemperatur wiederholt. Die Acetonreste wurden vollständig entfernt und die Matrix/Zell Konstrukte für 24 h im Exsikator getrocknet. Die Zellen auf den Matrices wurden mit einem JEOL JSM-6700F Raster-Elektronen-Mikroskop (Physikalische Chemie, Universität Hannover) untersucht.

Karnovsky Puffer:	CaCl ₂	5 mg
	Cacodylatpuffer	10 ml
	Glutaraldehyd (50 %)	20 µl
	ddH ₂ O	2,48 ml

6.4.16 Hämalaun-Eosin-Färbung histologischer Schnitte

Eine histologische Übersichtsfärbung der kultivierten Zell/Matrix Konstrukte wurde mit der Hämalaun-Eosin-Färbung durchgeführt. Dabei färben sich die Zellkerne blau, während das Zytoplasma sowie das Bindegewebe rosarot erscheint. Dazu wurden die Zellen im 96-Lochformat auf den Matrices kultiviert. Anschließend wurden die Zell/Matrix Konstrukte bei -80 °C in *Richard-Allan Scientific Neg-50 Frozen Section Medium*[®] eingefroren, um histologische Schnitte anfertigen zu können. Schnitte von 20 µm Dicke wurden am Kryotom aufbereitet und auf PLL beschichteten Glasträger platziert. Die Schnitte konnten nun mit Hämalaun und Eosin entsprechend des folgenden Protokolls gefärbt werden:

- Waschen der Glasträger in destilliertem Wasser
- Entfernen des Einfriermediums in einer absteigenden Alkohol-Reihe
- Färbung der Schnitte für 5 min in Hämalaun nach Mayer
- Bläuen der Proben unter fließendem Leitungswasser für 10 min
- Färbung der Schnitte für 1-3 min in Eosin-Färbelösung
- Waschen der Glasträger in destilliertem Wasser
- Entwässern der Proben in einer aufsteigende Alkohol-Reihe
- Eindecken der Schnitte mit Roti[®]-Histokitt

Eosin-Färbelösung: 0,1 % Eosin Y (gelb) in ddH₂O
sterilfiltriert

Hämalaun: Hämalaun nach Mayer
(fertige Lösung; Merck KGaA, Darmstadt)

6.5 Geräte und Reagenzien

Gerät	Hersteller
Agilent 1200 Bioanalyzer	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
GenePix 4000B microarray scanner	Molecular Devices GmbH, München
Autoklav FV5/3	Integra Biosciences, Fernwald
Brutschrank Heracell 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Digitalkamera Olympus Camedia C-4040 Zoom	Olympus Corporation, Puchheim
Digitalkamera ELISA, Samsung Digimax 360	Samsung Electronics GmbH
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage, Analytica AC210S	Sartorius AG, Göttingen
Gelkammer Thermo Classic CSSU 1214	Thermo Electron GmbH, Dreieich
GeneQuant pro RNA/DNA Calculator	Biochrom Ltd., Cambridge
Hybridisierugsofen	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Kollagen Matrices	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck
Kraftaufnehmer	AST, Angewandte System Technik GmbH, Dresden
Kühl-Gefrier-Kombination	Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Axiopot, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer + Heizplatte Typ RCT b	IKA Werke GmbH, Staufen
Microm HM560	Techno-Med GmbH, Bielefeld
Mikrowelle Typ M1727N	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach
Px2 Thermal Cycler	Thermo Electron, Dreieich
pH-Elektrode, Checker	Hanna Instruments, USA
Phasenkontrastmikroskope	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Olympus BX 41 und Olympus IX 50	

Pipettierhilfe Accu-Jet [®] Pro	Brands GmbH & Co. KG, Wertheim
Plattenfluorimeter, Fluoroskan	Thermo Electron, Dreieich
Plattenlesegerät Microplate Reader Benchmark	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralphotometer NanoDrop [®] -1000	PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen
Sponceram [®] -HA	Zellwerk GmbH, Oberkrämer
Sterilbank Technoflow 2F150-II GS	Integra Biosciences AG, Zürich, Schweiz
Sterilbank HERAsafe KS	Kendro Laboratory Products, Boston, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transilluminator UVT-20 S/W	Herolab GmbH, Heidelberg
Ultra Turrax [®]	IKA-Werke, Staufen
UV-Tisch	Roth, Karlsruhe
UV/Vis Spektrometer Uvikon 922	Kontron Instruments, Eching
Vortex-Mixer Typ 1719	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage Arium	Sartorius AG, Göttingen
Wechselblock für 4 Slides	Eppendorf AG, Hamburg
YSI 2700 SELECT	Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA
Zählkammer Blaubrand [®] (nach Neubauer)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Zentrifuge Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415R (gekühlt)	Eppendorf AG, Hamburg
Zwicki-Tischprüfmaschine (Typ TC_FR2.5TN.D09)	Zwick/Roell GmbH & Co KG, Ulm

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6/24/96-Lochplatten (Zellkultur)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
96-Lochplatten Maxisorp™ (Albumin-ELISA)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetrisch)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Einmalhandschuhe, Semperguard	Semperit AG Holding, Wien, Österreich
Einmalpipetten 2, 10 und 25 ml (Serologische Pipetten)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Einmalspritzen 5-20 ml	Terumo Europe NV, Belgien
Eppendorf-Hütchen 1,5 und 2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Falcons 15 und 50 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
	Corning, New York, USA
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen 2ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
NEN® Micromax™ TSA™ Labeling and Detection Kit	Perkin Elmer, Waltham, USA
PCR Purification Kit QIAquick®	Qiagen, Hilden
Pipettenspitzen Spitzentyp A/B/D	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
RNA Nano LabChip®	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm) Minisart®	Sartorius AG, Göttingen
Vakuumfilter Sartolab® (0,2 µm)	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturflaschen T25/T75/T175	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Reagenzien	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Cacodylatpuffer	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetrisch)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Colominsäure	Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan
DEPC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Chloroform	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
DMEM (Pulver)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
DMSO	Merck KgaA, Darmstadt
DNA Ladder/Marker (1 kb)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eosin Y	Merck KgaA, Darmstadt
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, abs.	Merck KgaA, Darmstadt
	VWR
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Fötale Kälber Serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Formaldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Formamid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerin	Fluka Chemie AG, Buchs
HOS	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Hämalaun	Merck KgaA, Darmstadt
Hefe Extrakt	Fluka Chemie AG, Buchs

Invitrogen TRIzol Reagent®	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Meerrettich-Peroxidase markierter Ziege-anti-Human Albumin Antikörper (<i>detection antibody</i>)	Immunology Consultants Laboratory, Inc., Newberg, USA
Human Albumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Ziege-anti-Human Albumin Antikörper (<i>capturing antibody</i>)	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Buchs
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs
Kollagenase I (250 U/mg)	Worthington, Lakewood, USA
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
MTT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumcarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumchlorid	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Fluka Chemie AG, Buchs
Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Natronlauge	Fluka Chemie AG, Buchs
Neonatales Kälber Serum	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Nerve Growth Factor (NGF)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Oligo-dT-Primer (20 µm)	Qiagen, Hilden
	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

PCR-Primer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe Biomers.net GmbH, Ulm
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PLL	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Random Hexamer Primer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Richard-Allan Scientific Neg-50 Frozen Section Medium	Kalamazoo, Kanada
RNA Molecular Weight Marker I	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
RNase out	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Rnase ZAP	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Roti-Histokitt II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI 1640 (flüssig)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RPMI 1640 (Pulver)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Saccharose	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Salzsäure	Fluka Chemie AG, Buchs
SDS	Sigma Aldrich Chemie AG, München
Superskript III	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Superskript III 5 x RT reaction buffer	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Maus-anti-TH-Antikörper (T2928)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 20 (100 %)	Sigma Aldrich Chemie AG, München
TMB	Sigma Aldrich Chemie AG, München
TopBlock	Sigma Aldrich Chemie AG, München
Tri-natriumcitrat-dihydraht	Sigma Aldrich Chemie AG, München

Tris-Puffer	Fluka Chemie AG, Buchs
Triton-X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Trizol	Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Trypsin (10-fach)	Sigma Aldrich Chemie AG, Buchs
Xylencyanol FF	Sigma Aldrich Chemie AG, Buchs

6.6 Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
BDNF	brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines (Rinder-) Serum Albumin
BSE-Detektor	Rückstreuelektronendetektor (backscattering electron)
bzw.	beziehungsweise
C-Alg	Kollagen-Alginat-Matrix
C-CA	Kollagen-Colominsäure-Matrix
C-HA	Kollagen-Hyaluronsäure-Matrix
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlendioxid
CYP 3A4	Cytochrom P450 3A4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GMP	good manufacturing practice
HA	Hyaluronsäure
HXA	Hydroxylapatit
HCl	Salzsäure
HOS	Hitze-inaktiviertes Pferdeserum; horse serum
HSA	Humanes Serum Albumin
ISC	Immortalisierte Schwann Zellen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	molar
mRNA	messenger RNA
MD	Matriderm [®]
MS	Matristypt [®]
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NCAM	neurales Zelladhäsionsmolekül
NGC	nerve guidance channel
NGF	nerve growth factor
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGA	Polyglykoläure
PLA	Poly(L-Milchsäure)
PLL	Poly-L-Lysin
PSA	Polysialinsäure
REM	Rasterelektronenmikroskopie

RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SE-Detektor	Sekundärelektronendetektor
Sponceram-HXA	Hydroxylapatit beschichtetes Sponceram [®]
TAE	Tris-Acetat-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TH	Thyrosinhydroxylase
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Maß für Enzyaktivität)
UDP	UDP-Glucuronosyltransferase
u.a.	unter anderem / und andere
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- Ahmed MR, Jayakumar R. 2005. Peripheral nerve regeneration in cell adhesive peptide incorporated collagen tubes in rat sciatic nerve - early and better functional regain. *J Peripher Nerv Syst* 10(4):390-1.
- Ahmed Z, Brown RA. 1999. Adhesion, alignment, and migration of cultured Schwann cells on ultrathin fibronectin fibres. *Cell Motil Cytoskeleton* 42(4):331-43.
- Ahmed Z, Underwood S, Brown RA. 2000. Low concentrations of fibrinogen increase cell migration speed on fibronectin/fibrinogen composite cables. *Cell Motil Cytoskeleton* 46(1):6-16.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, P. W. 2002. *Molecular Biology of the Cell*: Garland Science.
- Allmeling C, Jokuszies A, Reimers K, Kall S, Vogt PM. 2006. Use of spider silk fibres as an innovative material in a biocompatible artificial nerve conduit. *J Cell Mol Med* 10(3):770-7.
- Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL. 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24(3):401-16.
- Andersen MR, Farin FM, Omiecinski CJ. 1998. Quantification of multiple human cytochrome P450 mRNA molecules using competitive reverse transcriptase-PCR. *DNA Cell Biol* 17(3):231-8.
- Arcidiacono S, Mello C, Kaplan D, Cheley S, Bayley H. 1998. Purification and characterization of recombinant spider silk expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49(1):31-8.
- Aykin-Burns N, Franklin EA, Ercal N. 2005. Effects of N-acetylcysteine on lead-exposed PC-12 cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 49(1):119-23.
- Barakat-Walter I, Kraftsik R, Schenker M, Kuntzer T. 2007. Thyroid hormone in biodegradable nerve guides stimulates sciatic nerve regeneration: a potential therapeutic approach for human peripheral nerve injuries. *J Neurotrauma* 24(3):567-77.
- Belkas JS, Munro CA, Shoichet MS, Johnston M, Midha R. 2005. Long-term in vivo biomechanical properties and biocompatibility of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) nerve conduits. *Biomaterials* 26(14):1741-9.

- Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. 2004. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res* 26(2):151-60.
- Bellamkonda R, Aebischer P. 1994. Review: Tissue Engineering in Nervous System. *Biotechnology and Bioengineering* 43:543-554.
- Bilgen B, Sucusky P, Neitzel GP, Barabino GA. 2006. Flow characterization of a wavy-walled bioreactor for cartilage tissue engineering. *Biotechnology and Bioengineering* 95(6):1009-1022.
- Bini TB, Gao S, Wang S, Ramakrishna S. 2005. Development of fibrous biodegradable polymer conduits for guided nerve regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 16(4):367-75.
- Bryan DJ, Tang JB, Doherty SA, Hile DD, Trantolo DJ, Wise DL, Summerhayes IC. 2004. Enhanced peripheral nerve regeneration through a poled bioresorbable poly(lactic-co-glycolic acid) guidance channel. *J Neural Eng* 1(2):91-8.
- Bueno EM, Bilgen B, Barabino GA. 2005. Wavy-walled bioreactor supports increased cell proliferation and matrix deposition in engineered cartilage constructs. *Tissue Engineering* 11(11-12):1699-1709.
- Bunge MB, Bunge RP, Kleitman N, Dean AC. 1989. Role of peripheral nerve extracellular matrix in Schwann cell function and in neurite regeneration. *Dev Neurosci* 11(4-5):348-60.
- Cai J, Peng X, Nelson KD, Eberhart R, Smith GM. 2005. Permeable guidance channels containing microfilament scaffolds enhance axon growth and maturation. *J Biomed Mater Res A* 75(2):374-86.
- Campbell NA, Reece JB. 2003. *Biologie*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1999. Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng* 64(5):580-9.
- Chalfoun CT, Wirth GA, Evans GRD. 2006. Tissue engineered nerve constructs: where do we stand? *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 10(2):309-317.
- Chaudhuri J, Al-Rubeai M. 2005. *Bioreactors for Tissue Engineering - Principles, Design and Operation*. Dordrecht: Springer. 375 p.
- Chen HC, Hu YC. 2006. Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnology Letters* 28(18):1415-1423.

- Chen YS, Hsieh CL, Tsai CC, Chen TH, Cheng WC, Hu CL, Yao CH. 2000. Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials* 21(15):1541-7.
- Chi H, Horie H, Hikawa N, Takenaka T. 1993. Isolation and age-related characterization of mouse Schwann cells from dorsal root ganglion explants in type I collagen gels. *J Neurosci Res* 35(2):183-7.
- Ciardelli G, Chiono V. 2006. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci* 6(1):13-26.
- Craig CL. 1997. Evolution of arthropod silks. *Annu Rev Entomol* 42:231-67.
- Craig CL, Riekel C, Herberstein ME, Weber RS, Kaplan D, Pierce NE. 2000. Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders. *Mol Biol Evol* 17(12):1904-13.
- Dahlin LB, Lundborg G. 2001. Use of tubes in peripheral nerve repair. *Neurosurg Clin N Am* 12(2):341-52.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 89(2):271-7.
- Doweiko JP, Nompleggi DJ. 1991. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 15(2):207-11.
- English AW, Schwartz G, Meador W, Sabatier MJ, Mulligan A. 2007. Electrical stimulation promotes peripheral axon regeneration by enhanced neuronal neurotrophin signaling. *Dev Neurobiol* 67(2):158-72.
- Evans GR. 2000. Challenges to nerve regeneration. *Semin Surg Oncol* 19(3):312-8.
- Falbe J, Regnitz M, editors. 1998. *Römpp kompakt - Basislexikon Chemie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 2400 p.
- Fawcett JW, Keynes RJ. 1990. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* 13:43-60.
- Finne J, Bitter-Suermann D, Goridis C, Finne U. 1987. An IgG monoclonal antibody to group B meningococci cross-reacts with developmentally regulated polysialic acid units of glycoproteins in neural and extraneural tissues. *J Immunol* 138(12):4402-7.

- Franz CK, Rutishauser U, Rafuse VF. 2005. Polysialylated neural cell adhesion molecule is necessary for selective targeting of regenerating motor neurons. *Journal of Neuroscience* 25(8):2081-2091.
- Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1995. Cultivation of cell-polymer tissue constructs in simulated microgravity. *Biotechnol Bioeng* 46:306-313.
- Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1997. Microgravity tissue engineering. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33(5):381-5.
- Geremia NM, Gordon T, Brushart TM, Al-Majed AA, Verge VM. 2007. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression. *Exp Neurol* 205(2):347-59.
- Gooch KJ, Kwon JH, Blunk T, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 2001. Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng* 72(4):402-7.
- Gosline J, Demont M, Denny M. 1986. The structure and properties of spider silk. *Endeavour* 10(1):37-43.
- Grande DA, Halberstadt C, Naughton G, Schwartz R, Manji R. 1997. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mater Res* 34(2):211-20.
- Greene LA, Tischler AS. 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(7):2424-8.
- Grimpe B, Silver J. 2002. The extracellular matrix in axon regeneration. *Prog Brain Res* 137:333-49.
- Groß M. 2001. Kollagen - Grundstoff für Haut und Knochen. *Spektrum der Wissenschaft*(9):14.
- Grothe C, Nikkhah G. 2001. The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat Embryol (Berl)* 204(3):171-7.
- Guenard V, Kleitman N, Morrissey TK, Bunge RP, Aebischer P. 1992. Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* 12(9):3310-20.
- Gütt S. 2003. Collagen - Zukunftsträchtiges Biomaterial. *KI-Magazin*(4).

- Haastert K, Grothe C. 2007. Gene therapy in peripheral nerve reconstruction approaches. *Curr Gene Ther* 7(3):221-8.
- Haastert K, Lipokatic E, Fischer M, Timmer M, Grothe C. 2005. Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2 isoforms. *Neurobiol Dis*.
- Haile Y, Haastert K, Cesnulevicius K, Stummeyer K, Timmer M, Berski S, Drager G, Gerardy-Schahn R, Grothe C. 2007. Culturing of glial and neuronal cells on polysialic acid. *Biomaterials* 28(6):1163-73.
- Harley BA, Hastings AZ, Yannas IV, Sannino A. 2006. Fabricating tubular scaffolds with a radial pore size gradient by a spinning technique. *Biomaterials* 27(6):866-74.
- Hashimoto T, Suzuki Y, Kitada M, Kataoka K, Wu S, Suzuki K, Endo K, Nishimura Y, Ide C. 2002. Peripheral nerve regeneration through alginate gel: analysis of early outgrowth and late increase in diameter of regenerating axons. *Exp Brain Res* 146(3):356-68.
- Haycock JW, Haycock DA. 1991. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J Biol Chem* 266(9):5650-7.
- Hirvonen OM, Peltonen SA, Hirvonen HE, Bjorkstrand AS, Peltonen JT. 1996. Expression of laminin and collagen genes by cells cultured from developing human sciatic nerves. *J Peripher Nerv Syst* 1(1):42-52.
- Holtorf HL, Sheffield TL, Ambrose CG, Jansen JA, Mikos AG. 2005. Flow perfusion culture of marrow stromal cells seeded on porous biphasic Kalzium phosphate ceramics. *Ann Biomed Eng* 33(9):1238-48.
- Hood EE, Jilka JM. 1999. Plant-based production of xenogenic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 10(4):382-6.
- Horan RL, Antle K, Collette AL, Wang Y, Huang J, Moreau JE, Volloch V, Kaplan DL, Altman GH. 2005. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials* 26(17):3385-93.
- Hu X, Vasanthavada K, Kohler K, McNary S, Moore AM, Vierra CA. 2006. Molecular mechanisms of spider silk. *Cell Mol Life Sci* 63(17):1986-99.
- Huang Y-C, Huang Y-Y. 2006. Tissue engineering for nerve repair. *Biomed Eng Appl Basis Comm* 18(3):100-110.

- Hudson TW, Evans GR, Schmidt CE. 1999. Engineering strategies for peripheral nerve repair. *Clin Plast Surg* 26(4):617-28, ix.
- Ide C. 1996. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25(2):101-21.
- Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. 1997. Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 36(1):17-28.
- Itoh S, Suzuki M, Yamaguchi I, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J. 2003. Development of a nerve scaffold using a tendon chitosan tube. *Artif Organs* 27(12):1079-88.
- Itoh S, Takakuda K, Kawabata S, Aso Y, Kasai K, Itoh H, Shinomiya K. 2002. Evaluation of cross-linking procedures of collagen tubes used in peripheral nerve repair. *Biomaterials* 23(23):4475-81.
- Itoh S, Yamaguchi I, Suzuki M, Ichinose S, Takakuda K, Kobayashi H, Shinomiya K, Tanaka J. 2003. Hydroxyapatite-coated tendon chitosan tubes with adsorbed laminin peptides facilitate nerve regeneration in vivo. *Brain Res* 993(1-2):111-23.
- Jansen K, Meek MF, van der Werff JF, van Wachem PB, van Luyn MJ. 2004. Long-term regeneration of the rat sciatic nerve through a biodegradable poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide: tissue reactions with focus on collagen III/IV reformation. *J Biomed Mater Res A* 69(2):334-41.
- Jansen K, van der Werff JF, van Wachem PB, Nicolai JP, de Leij LF, van Luyn MJ. 2004. A hyaluronan-based nerve guide: in vitro cytotoxicity, subcutaneous tissue reactions, and degradation in the rat. *Biomaterials* 25(3):483-9.
- Kaiser R, Gottschalk G. 1972. *Elementare Tests zur Beurteilung von Meßdaten*. Mannheim: Bibliographisches Institut AG. 67 p.
- Kato K, Utani A, Suzuki N, Mochizuki M, Yamada M, Nishi N, Matsuura H, Shinkai H, Nomizu M. 2002. Identification of neurite outgrowth promoting sites on the laminin alpha 3 chain G domain. *Biochemistry* 41(35):10747-53.
- Kauppila T, Jyvasjarvi E, Huopaniemi T, Hujanen E, Liesi P. 1993. A laminin graft replaces neurorrhaphy in the restorative surgery of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 123(2):181-91.

- Keilhoff G, Pratsch F, Wolf G, Fansa H. 2005. Bridging extra large defects of peripheral nerves: possibilities and limitations of alternative biological grafts from acellular muscle and schwann cells. *Tissue Eng* 11(7-8):1004-14.
- Kellner K, Liebsch G, Klimant I, Wolfbeis OS, Blunk T, Schulz MB, Gopferich A. 2002. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng* 80(1):73-83.
- Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, Kim TI, Park YJ, Seol YJ, Lee YM and others. 2005. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol* 120(3):327-39.
- Kim SS, Sundback CA, Kaihara S, Benvenuto MS, Kim BS, Mooney DJ, Vacanti JP. 2000. Dynamic seeding and in vitro culture of hepatocytes in a flow perfusion system. *Tissue Eng* 6(1):39-44.
- Kleene R, Schachner M. 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci* 5(3):195-208.
- Landmesser L, Dahm L, Tang JC, Rutishauser U. 1990. Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* 4(5):655-67.
- Lazaris A, Arcidiacono S, Huang Y, Zhou JF, Duguay F, Chretien N, Welsh EA, Soares JW, Karatzas CN. 2002. Spider silk fibers spun from soluble recombinant silk produced in mammalian cells. *Science* 295(5554):472-6.
- Leckband D. 2004. Nanomechanics of adhesion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 14(5):524-30.
- Lindl T. 2002. *Zell- und Gewebekultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SI, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. 2000. *Molecular Cell Biology*: W. H. Freeman & Co.
- Lottspeich F, Zorbas H. 1998. *Bioanalytik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, Gelberman RH, Longo FM, Powell HC, Varon S. 1982. Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol* 76(2):361-75.
- Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. 2007. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res* 4(2):143-51.

- Ma PX, Elisseeff J. 2006. Scaffolding in Tissue Engineering. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 638 p.
- Mackinnon SE, Dellon AL. 1990. A study of nerve regeneration across synthetic (Maxon) and biologic (collagen) nerve conduits for nerve gaps up to 5 cm in the primate. *J Reconstr Microsurg* 6(2):117-21.
- Madsen B, Shao ZZ, Vollrath F. 1999. Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *Int J Biol Macromol* 24(2-3):301-6.
- Marlovits S, Nürnberger S, Kolonja A, Singer P, Zeller P, Mandl I, Vécsei V. 2004. Matrixgekoppelte autologe Knorpelzelltransplantation. *Trauma Berufskrankh* 3:313-323.
- Marten D. 2006. In vitro-Testung und Charakterisierung seidehaltiger Biomaterialien [Masterarbeit]. Hannover: Leibniz Universität Hannover. 58 p.
- Martin I, Obradovic B, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1999. Method for quantitative analysis of glycosaminoglycan distribution in cultured natural and engineered cartilage. *Ann Biomed Eng* 27(5):656-62.
- Martin I, Wendt D, Heberer M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22(2):80-6.
- Martini R. 1994. Expression and functional roles of neural cell surface molecules and extracellular matrix components during development and regeneration of peripheral nerves. *J Neurocytol* 23(1):1-28.
- Mcguire EJ, Binkley SB. 1964. Structure + Chemistry of Colominic Acid. *Biochemistry* 3(2):247-&.
- Meek MF, Robinson PH, Coert JH. 2002. Bridging a peripheral nerve defect using collagen filaments. *J Hand Surg [Am]* 27(2):361; author reply 361-2.
- Meier BH. 2001. Das Geheimnis der Spinnenseide. *Bulletin ETH Zürich*(282):36 - 39.
- Miller C, Shanks H, Witt A, Rutkowski G, Mallapragada S. 2001. Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates. *Biomaterials* 22(11):1263-9.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Muhlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M, GerardySchahn R. 1996. Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Current Biology* 6(9):1188-1191.

- Mundt AP. 2002. Beurteilung biochemischer Stoffwechselaktivitäten eines hybriden Leberunterstützungssystems während erster klinischer Anwendungen [Dissertation]. Berlin: Humboldt Universität zu Berlin.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. 1964. Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step In Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239:2910-7.
- Oberdoerster J, Kamer AR, Rabin RA. 1998. Differential effect of ethanol on PC12 cell death. *J Pharmacol Exp Ther* 287(1):359-65.
- Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. 2001. Collagen structure and functional implications. *Micron* 32(3):251-60.
- Parab S, Nankova BB, La Gamma EF. 2007. Differential regulation of the tyrosine hydroxylase and enkephalin neuropeptide transmitter genes in rat PC12 cells by short chain fatty acids: Concentration-dependent effects on transcription and RNA stability. *Brain Res* 1132(1):42-50.
- Phillips JB, Bunting SC, Hall SM, Brown RA. 2005. Neural tissue engineering: a self-organizing collagen guidance conduit. *Tissue Eng* 11(9-10):1611-7.
- Portner R, Nagel-Heyer S, Goepfert C, Adamietz P, Meenen NM. 2005. Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 100(3):235-45.
- Prang P, Muller R, Eljaouhari A, Heckmann K, Kunz W, Weber T, Faber C, Vroemen M, Bogdahn U, Weidner N. 2006. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels. *Biomaterials* 27(19):3560-9.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia A-S, McNamara JO, Williams SM. 2001. Neuroscience: Sinauer Associates Inc.
- Ratcliffe A, Niklason LE. 2002. Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci* 961:210-5.
- Rende M, Morales M, Brizi E, Bruno R, Bloom F, Sanna PP. 1999. Modulation of serotonin 5-HT₃ receptor expression in injured adult rat spinal cord motoneurons. *Brain Res* 823(1-2):234-40.
- Ricard-Blum S, Ruggiero F. 2005. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol biol*(53):430-442.

- Riesle J, Hollander AP, Langer R, Freed LE, Vunjak-Novakovic G. 1998. Collagen in tissue-engineered cartilage: types, structure, and crosslinks. *J Cell Biochem* 71(3):313-27.
- Rodriguez-Antona C, Donato MT, Boobis A, Edwards RJ, Watts PS, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. 2002. Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanisms that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica* 32(6):505-520.
- Röker S. 2006. Untersuchungen zur Zellkultivierung auf Kollagenmatrizes [Diplomarbeit]. Hannover: Leibniz Universität Hannover. 73 p.
- Römer L, Scheibel T. 2007. Spinnenseidenproteine - Grundlagen für neue Materialien. *Chem. Unserer Zeit* 41:306-314.
- Ross SM. 2006. Statistik für Ingenieure und Naturwissenschaftler. Heinisch C, translator. München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag. 561 p.
- Rutishauser U. 1993. Adhesion molecules of the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 3(5):709-15.
- Rutishauser U, Watanabe M, Silver J, Troy FA, Vimr ER. 1985. Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase. *J Cell Biol* 101(5 Pt 1):1842-9.
- Rutka JT, Apodaca G, Stern R, Rosenblum M. 1988. The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function. *J Neurosurg* 69(2):155-70.
- Saltzman WM, Olbricht WL. 2002. Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov* 1(3):177-86.
- Sanghvi AB, Murray JL, Schmidt CE. 2004. Tissue Engineering of Peripheral Nerve. In: Dekker M, editor. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. University of Texas, Austin, Texas. p 1613-1621.
- Scheller J, Guhrs KH, Grosse F, Conrad U. 2001. Production of spider silk proteins in tobacco and potato. *Nat Biotechnol* 19(6):573-7.
- Schmidt CE, Leach JB. 2003. Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng* 5:293-347.
- Seckel BR, Jones D, Hekimian KJ, Wang KK, Chakalis DP, Costas PD. 1995. Hyaluronic acid through a new injectable nerve guide delivery system enhances peripheral nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res* 40(3):318-24.

- Shin H, Jo S, Mikos AG. 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials* 24(24):4353-64.
- Siegal GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. 1999. *Basic Neurochemistry - Molecular, Cellular and Medical Aspects*: Lippincott, Williams and Wilkins.
- Slater TF, Sawyer B, Straeuli U. 1963. Studies On Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points Of Coupling Of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta* 77:383-93.
- Smit X, van Neck JW, Afoke A, Hovius SE. 2004. Reduction of neural adhesions by biodegradable autocrosslinked hyaluronic acid gel after injury of peripheral nerves: an experimental study. *J Neurosurg* 101(4):648-52.
- Sofia S, McCarthy MB, Gronowicz G, Kaplan DL. 2001. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 54(1):139-48.
- Soldani G, Varelli G, Minnocci A, Dario P. 1998. Manufacturing and microscopical characterisation of polyurethane nerve guidance channel featuring a highly smooth internal surface. *Biomaterials* 19(21):1919-24.
- Stang F, Fansa H, Wolf G, Keilhoff G. 2005. Collagen nerve conduits--assessment of biocompatibility and axonal regeneration. *Biomed Mater Eng* 15(1-2):3-12.
- Stark Y, Suck K, Kasper C, Wieland M, van Griensven M, Scheper T. 2006. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57(4):305-311.
- Sucosky P, Osorio DF, Brown JB, Neitzel GP. 2004. Fluid mechanics of a spinner-flask bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 85(1):34-46.
- Suematsu N. 1989. Tubulation for peripheral nerve gap: its history and possibility. *Microsurgery* 10(1):71-4.
- Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P. 2005. Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* 26(4):419-31.
- Tanaka K, Kajiyama N, Ishikura K, Waga S, Kikuchi A, Ohtomo K, Takagi T, Mizuno S. 1999. Determination of the site of disulfide linkage between heavy and light chains of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta* 1432(1):92-103.

- Tang J, Landmesser L, Rutishauser U. 1992. Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron* 8(6):1031-44.
- Tang J, Rutishauser U, Landmesser L. 1994. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axons in the plexus region. *Neuron* 13(2):405-14.
- Thews G, Mutschler E, Vaupel P. 1999. *Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 605 - 608 p.
- Thiberge S, Nechushtan A, Sprinzak D, Gileadi O, Behar V, Zik O, Chowers Y, Michaeli S, Schlessinger J, Moses E. 2004. Scanning electron microscopy of cells and tissues under fully hydrated conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10):3346-51.
- Tian WM, Hou SP, Ma J, Zhang CL, Xu QY, Lee IS, Li HD, Spector M, Cui FZ. 2005. Hyaluronic acid-poly-D-lysine-based three-dimensional hydrogel for traumatic brain injury. *Tissue Eng* 11(3-4):513-25.
- Tona A, Perides G, Rahemtulla F, Dahl D. 1993. Extracellular matrix in regenerating rat sciatic nerve: a comparative study on the localization of laminin, hyaluronic acid, and chondroitin sulfate proteoglycans, including versican. *J Histochem Cytochem* 41(4):593-9.
- Tong XJ, Hirai K, Shimada H, Mizutani Y, Izumi T, Toda N, Yu P. 1994. Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats. *Brain Res* 663(1):155-62.
- Tonkinson JL, Stillman BA. 2002. Nitrocellulose: a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate. *Front Biosci* 7:c1-12.
- Usui T, Saitoh Y, Komada F. 2003. Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs. Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor. *Biol Pharm Bull* 26(4):510-7.
- Vance J, Galley S, Liu DF, Donahue SW. 2005. Mechanical stimulation of MC3T3 osteoblastic cells in a bone tissue-engineering bioreactor enhances prostaglandin E2 release. *Tissue Eng* 11(11-12):1832-9.
- Vlakh EG, Panarin EF, Tennikova TB, Suck K, Kasper C. 2005. Development of multifunctional polymer-mineral composite materials for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 75(2):333-41.
- Vollrath F. 1999. Biology of spider silk. *Int J Biol Macromol* 24(2-3):81-8.

- Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. 2006. Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials*.
- Wen X, Tresco PA. 2005. Effect of filament diameter and extracellular matrix molecule precoating on neurite outgrowth and Schwann cell behavior on multifilament entubulation bridging device in vitro. *J Biomed Mater Res A*.
- Whitworth IH, Brown RA, Dore C, Green CJ, Terenghi G. 1995. Orientated mats of fibronectin as a conduit material for use in peripheral nerve repair. *J Hand Surg [Br]* 20(4):429-36.
- Yoder EJ, Tamir H, Ellisman MH. 1997. Serotonin receptors expressed by myelinating Schwann cells in rat sciatic nerve. *Brain Res* 753(2):299-308.
- Yoshihara M, Littleton JT. 2002. Synaptotagmin I functions as a Calcium sensor to synchronize neurotransmitter release. *Neuron* 36(5):897-908.
- Yoshii S, Oka M, Ikeda N, Akagi M, Matsusue Y, Nakamura T. 2001. Bridging a peripheral nerve defect using collagen filaments. *J Hand Surg [Am]* 26(1):52-9.
- Yoshii S, Oka M, Shima M, Taniguchi A, Akagi M. 2002. 30 mm regeneration of rat sciatic nerve along collagen filaments. *Brain Res* 949(1-2):202-8.
- Yoshikawa H, Myoui A. 2005. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *J Artif Organs* 8(3):131-6.
- Yu X, Bellamkonda RV. 2003. Tissue-engineered scaffolds are effective alternatives to autografts for bridging peripheral nerve gaps. *Tissue Eng* 9(3):421-30.
- Zhang J, Oswald TM, Lineaweaver WC, Chen Z, Zhang G, Chen Z, Zhang F. 2003. Enhancement of rat sciatic nerve regeneration by fibronectin and laminin through a silicone chamber. *J Reconstr Microsurg* 19(7):467-72.
- Zhang N, Yan H, Wen X. 2005. Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Res Brain Res Rev* 49(1):48-64.
- Zhang N, Zhang C, Wen X. 2005. Fabrication of semipermeable hollow fiber membranes with highly aligned texture for nerve guidance. *J Biomed Mater Res A* 75A(4):941-949.
- Zhang Z, Yoo R, Wells M, Beebe TP, Jr., Biran R, Tresco P. 2005. Neurite outgrowth on well-characterized surfaces: preparation and characterization of chemically and spatially controlled fibronectin and RGD substrates with good bioactivity. *Biomaterials* 26(1):47-61.

Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, Jacquet M, Janin J, Duguet M, Perasso R and others. 2000. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res* 28(12):2413-9.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Bruns, Stephanie
Geburtsdatum und -ort	16.09.1980, Hannover
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Schulbildung

1986 – 1990	Grundschule „Am Sandberge“, Hannover
1990 – 1992	Orientierungsstufe Ludwig-Windthorst-Schule, Hannover
1992 – 1999	Gymnasium St. Ursula-Schule, Hannover
07/1999	Allgemeine Hochschulreife

Pharmaziestudium

10/1999 – 11/2003	Technische Universität Braunschweig
12/2003 – 05/2004	Pharmaziepraktikum in der Spitzweg-Apotheke, Braunschweig
06/2004 - 11/2004	Pharmaziepraktikum bei der Solvay Pharmaceuticals GmbH, Hannover, Abteilung F&E Enzym-Analytik
→ 12/2004	3. Staatsexamen
12/2004	Approbation als Apothekerin
07/2005	Abschluss zur Diplompharmazeutin (Dipl.-Pharm.)

Wissenschaftliche Ausbildung

Seit 01/2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität, Hannover
--------------	---

Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Journalen veröffentlicht:

Bruns S, Stark Y, Wieland M, Stahl F, Kasper C, Scheper T. 2007. *Fast and efficient screening system for new biomaterials in tissue engineering: A model for peripheral nerve repair*. J Biomed Materials Res: Part A 81A(3):736-747.

Bruns S, Stark Y, Röker S, Wieland M, Dräger G, Kirschning A, Stahl F, Kasper C, Scheper T. 2007. *Collagen biomaterial doped with colominic acid for cell culture applications with regard to peripheral nerve repair*. J Biotechnology 131(3): 335-45.

Stark Y, Bruns S, Stahl F, Kasper C, Wesemann M, Grothe C, Scheper T. 2007. *A study on polysialic acid as a biomaterial for cell culture applications*. J Biomed Materials Res: Part A: doi:10.1002/jbm.a.31406

Kongressbeiträge (Posterpräsentationen):

Bruns S, Stark Y, Kasper C, Stahl F, Scheper T. *Polysialic acid: a new bioidentical scaffold material for peripheral nerve regeneration*. 4th annual meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES), München, Germany, 31.August – 03.September 2005.

Bruns S, Stark Y, Wieland M, Kasper C, Stahl F, Scheper T. *Comparative screening of biomaterials towards tissue engineering applicability*. Biomaterials – synthesis, processing and biological evaluation, Workshop 2006 der DFG Forschergruppe 548 Polysialinsäure, Hannover, Germany, 29. März 2006.

Bruns S, Stark Y, Röker S, Wieland M, Kasper C, Stahl F, Scheper T. *Iterative biomaterial testing towards applicability for tissue engineering*. Biomaterials 2006, Annual meeting of the German Society of Biomaterials (DGBM) 2006, Essen, Germany, 05. – 08. September 2006.

Bruns S, Stark Y, Röker S, Wieland M, Stahl F, Kasper C, Scheper T. *Development of a fast and efficient screening system for new biomaterials in tissue engineering*. GVC/DECHEMA-Jahrestagungen 2006 mit 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, Germany, 26. – 28. September 2006

Bruns S, Stark Y, Marten D, Röker S, Wieland M, Hoffmeister H, Reimers K, Stahl F, Kasper C, Scheper T. *Screening of innovative biomaterials in comparison to well established towards tissue engineering applicability in peripheral nerve repair*. Annual TERMIS-EU Meeting 2006, Rotterdam, Netherlands, 08. – 11. Oktober 2006.

Bruns S, Stark Y, Marten D, Allmeling C, Kasper C, Stahl F, Scheper T. *A preliminary study on spider silk as biomaterial for peripheral nerve regeneration*. 20th Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dresden, Germany, 17. – 20. Juni 2007.