

**Untersuchung zur Anwendung von
Biopolymeren und deren Derivaten
in der Zellkultur und
im *Tissue Engineering***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Yvonne Stark
geboren am 26.12.1979 in Helmstedt.

2008

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

Korreferentin: PD Dr. C. Kasper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 31.01.2008

Erklärung

Hierdurch erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Diese Dissertation wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im November 2007

Danksagung

Als erstes gebührt mein Dank Herrn Prof. Thomas Scheper für die interessante Themenstellung und die freundliche Betreuung während der Dissertation.

Frau PD Dr. Cornelia Kasper danke ich für die Übernahme des Korreferates sowie die freundliche Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Frank Stahl möchte ich mich für die Betreuung und Beantwortung vieler Fragen bezüglich der Chip-Experimente bedanken.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft, mit deren Unterstützung es mir möglich war, diese Arbeit anzufertigen. Mein Dank gebührt Frau Prof. R. Gerardy-Schahn, der Leiterin der Abteilung Zelluläre Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover, die es mir als Leiterin der Forschergruppe ermöglicht hat, meine ersten forschenden Schritte in einer interdisziplinären Forschungsgemeinschaft durchzuführen. Im Rahmen der Forschergruppe danke ich Frau Prof. Grothe, Leiterin der Abteilung Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule Hannover, für die gute Zusammenarbeit innerhalb des Teilprojektes WP 5. Den Doktoranden der Forschergruppe, insbesondere Silke Berski vom Institut für Organische Chemie, Stephanie Steinhaus vom Institut für Anorganische Chemie und Ulrike Assmann vom Deutschen Institut für Kautschuk, danke ich für die überaus gute Zusammenarbeit sowie für die Chance Einblicke in neue Themengebiete zu bekommen.

Herrn PD Dr. Joachim Wegener vom Institut für Biochemie der Universität Münster danke ich herzlichst für die Durchführung der ECIS-Messungen sowie für produktive Anregungen und Diskussionen.

Dr. Armin Feldhoff danke ich für die Bereitstellung des Rasterelektronenmikrokopes sowie ihm und den Mitarbeitern Frank Steinbach und Kerstin Janze vom Institut für Physikalische Chemie der Leibniz Universität Hannover für die Tipps bei der praktischen Durchführung der REM-Aufnahmen.

Der TCI-Werkstatt und Wilhelm Behnsen danke ich für die schnelle Unterstützung und Umsetzung diverser Ideen und beim Bau der modifizierten Spinnerflasche.

Ich DANKE allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Scheper für das hervorragende Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit:

Martin Pähler danke ich für die experimentelle Unterstützung im RNA-Labor.

Cornelia Repenning danke ich herzlichst für die ausführliche Chip-Auswertung und gute Zusammenarbeit.

Für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit und die vielen guten Tipps möchte ich mich bei PD Dr. Cornelia Kasper, Wiebke, Solvig, Stephanie und Mike bedanken.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Stephanie Bruns für drei Jahre sehr gute gemeinschaftliche und produktive Arbeit und ihre Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung diverser Aufgaben.

Den Jungs danke ich dafür, dass sie mich auf dem Fußballfeld geduldet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Meinem Freund Florian Martin danke ich ganz herzlich für seine Geduld und Unterstützung.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
2 Aufgabenstellung.....	5
3 Theorie.....	7
3.1 Biomaterialien im <i>Tissue Engineering</i>	7
3.1.1 Kollagen	10
3.1.2 Laminin	11
3.1.3 Hyaluronsäure	12
3.1.4 Sialinsäuren	14
3.1.5 Glucane	15
3.1.6 Fucoidane.....	16
3.2 ECIS.....	17
3.3 Bioreaktoren im <i>Tissue Engineering</i>	20
4 Experimenteller Teil.....	23
4.1 Zytotoxizitätsassays für innovative Biomaterialien.....	23
4.1.1 Untersuchung der Fucoidane	26
4.1.2 Untersuchung von β -Glucan.....	28
4.1.3 Untersuchung der Colominsäure	32
4.2 Untersuchung von Colominsäure Beschichtungen im Vergleich zu etablierten Zellkulturbeschichtungen	37
4.3 Beurteilung des Zellwachstums mittels ECIS.....	50
4.4 Untersuchung der Zellmigration unter dem Einfluss von Colominsäure.....	54
4.5 Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR und DNA-<i>Microarrays</i>	59
4.5.1 RT-PCR.....	60
4.5.2 DNA-Chips	62
4.6 Modifizierung von Colominsäure	77
4.6.1 Untersuchungen von quervernetzter Colominsäure.....	77
4.6.2 Untersuchung von mit Colominsäure beschichteter Keramik.....	78
4.6.3 Untersuchung von mit Colominsäure beschichteten Glasfritten	80
4.6.4 Untersuchung von elektrogenesponnenen Colominsäure Fasern	82
4.7 Dynamische Kultivierung im Bioreaktor.....	86
4.7.1 Nachweis der Colominsäure und deren Abgabe ins Medium mittels TBA-Tests	87
4.7.2 Reaktorsystem Spinnerflasche	89
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	95

6	Anhang.....	99
6.1	Statistik	99
6.2	Medien und Puffer.....	99
6.3	Säugerzellen.....	99
6.4	Methoden.....	100
6.4.1	Zellkultur.....	100
6.4.2	Kryokonservierung von Zellen	101
6.4.3	MTT.....	101
6.4.4	Beschichtungslösungen.....	102
6.4.5	Nachweis der Colominsäure/Polysialinsäure mittels ELISA	103
6.4.6	Nachweis der Colominsäure mittels TBA-Tests	103
6.4.7	Fixierung von Zellen.....	104
6.4.8	DAPI-Färbung.....	104
6.4.9	Zelladhäsions-Bestimmung.....	105
6.4.10	Glukose/Laktatbestimmung.....	105
6.4.11	Messung der Neuritenlänge	105
6.4.12	BrdU Labeling.....	106
6.4.13	ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing)	106
6.4.14	Untersuchung der Zellmigration.....	107
6.4.15	Raster-Elektronen-Mikroskopie.....	110
6.4.16	RNA Isolierung.....	110
6.4.17	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	111
6.4.18	Qualitätskontrolle der RNA.....	111
6.4.19	cDNA Synthese	111
6.4.20	RT-PCR.....	112
6.4.21	Agarosegelelektrophorese	113
6.5	DNA Chipexperimente.....	114
6.5.1	Herstellung des humanen Leberchips und des murinen ZNS-Chips	114
6.5.2	cDNA Synthese für die DNA-Chips	115
6.5.3	Aufreinigung der cDNA	115
6.5.4	Hybridisierung.....	115
6.5.5	Signalverstärkung.....	116
6.5.6	Scannen	117
6.5.7	Datenanalyse.....	117
6.5.8	Abkürzungen.....	128
6.5.9	Geräte und Reagenzien.....	130
7	Literatur	134

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konformation eines einzelnen Stranges der Kollagentripelhelix.	11
Abbildung 2: Struktur des Laminins.	12
Abbildung 3: Struktur der Hyaluronsäure.	13
Abbildung 4: Struktur der N-Acetylneuraminsäure.	14
Abbildung 5: Struktur der Polysialinsäure (PSA).....	15
Abbildung 6: Struktur von Paramylon.	16
Abbildung 7: Struktur des niedermolekularen Fucans.....	17
Abbildung 8: Modell eines ECIS Messsystems.....	18
Abbildung 9: Reaktorsysteme im <i>Tissue Engineering</i>	21
Abbildung 10: Projektskizze der DFG-Forschergruppe 548.	23
Abbildung 11: Testsystem für Biomaterialien.....	24
Abbildung 12: Zytotoxizität von <i>Fucus vesiculosus</i> und <i>Laminaria digitata</i> gegenüber PC-12 Zellen.	26
Abbildung 13: Zytotoxizität von <i>Fucus vesiculosus</i> und <i>Laminaria digitata</i> gegenüber Hep-G2 Zellen.....	27
Abbildung 14: Zytotoxizität von β -Glucan auf PC-12 Zellen und Hep-G2 Zellen.....	28
Abbildung 15: Zytotoxizität von verschiedenen β -Glucan Gelen auf PC-12 Zellen und Hep-G2 Zellen.....	30
Abbildung 16: Strukturiertes β -Glucan Gel.	30
Abbildung 17: Viabilität/Proliferation der PC-12 bzw. Hep-G2 Zellen auf einem strukturierten β -Glucan Gel.	31
Abbildung 18: Zytotoxische Analyse von Colominsäure auf PC-12 Zellen.	33
Abbildung 19: Zytotoxische Analyse von Colominsäure auf Hep-G2 Zellen.....	33
Abbildung 20: Darstellung der CA Beschichtung auf einer Zellkulturoberfläche mittels Immunozytochemie.	34
Abbildung 21: Untersuchung der CA/PSA-K1 Beschichtung auf einer Zellkulturoberfläche mittels eines direkten ELISA.....	35
Abbildung 22: Viabilität/Proliferation der PC-12, Hep-G2 und ISC auf CA/PSA-K1 beschichteten Zellkulturoberflächen.	36
Abbildung 23: Viabilität/Proliferation der PC-12 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.	38
Abbildung 24: Viabilität/Proliferation von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.	39
Abbildung 25: DAPI-Färbung von PC-12 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.	40
Abbildung 26: Zelladhäsion von PC-12 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.	40
Abbildung 27: DAPI-Färbung von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.....	42
Abbildung 28: Zelladhäsion von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.	42

Abbildung 29: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.	43
Abbildung 30: Phasenkontrastaufnahme von PC-12 auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.	44
Abbildung 31: Phasenkontrastaufnahme von PC-12 nach Stimulation mit NGF auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.	46
Abbildung 32: Neuritenausbildung der PC-12 Zellen nach drei Tagen Stimulierung mit NGF (100 ng/ml).	46
Abbildung 33: Phasenkontrastaufnahmen von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.	48
Abbildung 34: Impedanzmessung der Hep-G2 Zellen.	51
Abbildung 35: Impedanzmesung der ISC.	52
Abbildung 36: Migration der Hep-G2 Zellen mittels ECIS.	53
Abbildung 37: Model des klassischen Wundheilungsassays.	55
Abbildung 38: Zellmigration der Hep-G2 Zellen unter dem Einfluss verschiedener CA Konzentrationen.	55
Abbildung 39: Migration von ISC ohne CA Zugabe.	56
Abbildung 40: Migration von ISC nach Zugabe von 5 mg/ml CA.	57
Abbildung 41: Zellmigration der ISC unter dem Einfluss verschiedener CA Konzentrationen.	58
Abbildung 42: Agarosegelanalyse der RT-PCR von Hep-G2 Zellen.	61
Abbildung 43: Darstellung des RT-PCR Ergebnisses undifferenzierter und differenzierter PC-12 Zellen.	62
Abbildung 44: Schematische Darstellung des <i>loop</i> -Designs.	67
Abbildung 45: Zytotoxizität verschiedener CA Hydrogele auf PC-12 Zellen und Hep-G2 Zellen.	77
Abbildung 46: Viabilität/Proliferation von PC-12 und Hep-G2 auf einem CA Hydrogel bzw. einem mit PLL beschichteten CA Hydrogel.	78
Abbildung 47: Viabilität/Proliferation von ISC auf Sponceram® ohne und mit CA/ PSA-K1 Beschichtung.	79
Abbildung 48: REM-Aufnahme einer Glasfritte.	80
Abbildung 49: Beispiel für eine Kalibration des TBA-Tests.	81
Abbildung 50: Viabilität/Proliferation von ISC auf Glasfritten unterschiedlicher Porosität.	82
Abbildung 51: Färbung der Zellkerne von ISC mittels DAPI auf Glasfritten mit der Porosität 4 nach 14 Tagen.	82
Abbildung 52: Viabilität/Proliferation von ISC auf elektrogenesponnenen (PAN-PLL und PAN-PLL-CA) Fasern.	83
Abbildung 53: Phasenkontrastaufnahme von ISC nach 4 Tagen auf elektrogenesponnenen Fasern.	84
Abbildung 54: Viabilität/Proliferation von ISC auf Cellulose-Acetat Fasern.	85
Abbildung 55: Darstellung der Formazankristalle auf Cellulose-Acetat Fasern.	85
Abbildung 56: Darstellung der Spinnerflasche.	89
Abbildung 57: Spinnerflasche und technische Zeichnung der Spinnerflasche.	90

Abbildung 58: Darstellung der Formazankristalle nach 4 Wochen Kultivierung von immortalisierten Schwanzzellen auf C-CA 5 %.	91
Abbildung 59: Viabilität/Proliferation von ISC auf C-CA-5 % mittels MTT-Test, Vergleich von Spinnerflasche gegen Petrischale.	91
Abbildung 60: DAPI-Färbung von ISC auf C-CA 5 %.	92
Abbildung 61: REM-Aufnahmen von ISC auf C-CA 5 %.	93
Abbildung 62: Glukoseverbrauch und Laktatbildung von ISC auf C-CA 5 %.	94
Abbildung 63: Reaktion von MTT zum Formazan.	102
Abbildung 64: Darstellung des Cellprofiler™ Programms.	108
Abbildung 65: Auswertung mit dem Cellprofiler™ Programm.	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenhang von Zelladhäsion und dem daraus resultierenden Zellverhalten nach Bacakova.....	8
Tabelle 2: Ansätze für die Herstellung von β -Glucan Gelen.	29
Tabelle 3: Statistische Auswertung des Proliferationsassays von PC-12 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.	47
Tabelle 4: Statistische Auswertung des Proliferationsassays von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.	48
Tabelle 5: Statistische Auswertung des Proliferationsassays von ISC auf unterschiedlichen Beschichtungen.....	49
Tabelle 6: Bedingungen der <i>Microarray</i> Experimente.....	67
Tabelle 7: Qualitätskontrolle des humanen Leberchips für die Hep-G2 Zellen.	68
Tabelle 8: Auswahl von regulierten Genen der Hep-G2 Zellen.	69
Tabelle 9: Zusammenfassung der Genregulation differenzierter PC-12 Zellen.	73
Tabelle 10: Zusammenfassung der Genregulation immortalisierter Schwanzzellen.	75
Tabelle 11: Bestimmung der CA Konzentration auf Glasfritten der Porosität 4.....	81
Tabelle 12: Charakterisierung der C-CA 5 % Matrizes.	88
Tabelle 13: Vergleich einiger Werte des Glukoseverbrauchs mit der Laktatbildung.....	94
Tabelle 14: Ansätze für die Beschichtungslösungen.	102
Tabelle 15: Ansatz für die RT-PCR.	112
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten PCR Primer für die PC-12 Zellen.	113
Tabelle 17: Übersicht der verwendeten PCR Primer für die Hep-G2 Zellen.....	113
Tabelle 18: Qualitätskontrolle des ZNS-Chips für die PC-12 Zellen.	118
Tabelle 19: Qualitätskontrolle des ZNS-Chips für die ISC.	119
Tabelle 20: Auswahl an regulierten Gene der HepG2 Zellen.	120
Tabelle 21: Auswahl an regulierten Genen der differenzierten PC-12 Zellen.	123
Tabelle 22: Auswahl an regulierten Genen der ISC.	125

Zusammenfassung

Einen Bereich der Regenerativen Medizin stellt das *Tissue Engineering* dar, bei dem verschiedene Biomaterialien zusammen mit Zellen für die Herstellung von Gewebe eingesetzt werden. Für diese Anwendungen müssen die Materialien biokompatibel sein, sie sollten die Zelladhäsion, das Zellwachstum, die Differenzierung sowie die Zellmigration unterstützen und gegebenenfalls bioabbaubar sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Biopolymere für mögliche Anwendungen im *Tissue Engineering* in der Zellkultur charakterisiert. Grundlegende Eigenschaften und Einflüsse der Polysaccharide Colominsäure, β -Glucan und Fucoidan aus Algenextrakten wurden *in vitro* mit verschiedenen Zelllinien getestet. Eine mögliche zytotoxische Wirkung der Polysaccharide und deren Modifikationen wurden mittels einer humanen Leberzelllinien (Hep-G2) bewertet. Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Zugabe von Fucoidan eine Inhibierung des Zellwachstums auftritt. Die Polysaccharide Colominsäure und β -Glucan, sowie deren Modifikationen (Hydrogele, elektrogessponnene Fasern) zeigten keine zytotoxische Wirkung, was für eine gute Biokompatibilität dieser Polysaccharide spricht.

Die Colominsäure (CA), ist ein spezifisches Derivat der Polysialinsäure (PSA) und *in vivo* an der Regeneration von Nerven beteiligt. In diesem Zusammenhang fördert es die Proliferation, Migration und Neuritenbildung. Daher wurden neuronale Zellmodelle (PC-12, ISC) gewählt, um insbesondere die CA eingehender zu charakterisieren. Die detaillierte Analyse der CA als Beschichtung beinhaltete Untersuchungen der Zellviabilität, Proliferation, Zelladhäsion, Migration, spezifischen Zellmarker (z.B. die Neuritenausbildung) und eine Genexpressionsanalyse. Die Ergebnisse bestätigten die Biokompatibilität der CA. Darüber hinaus wurde eine geförderte Migration der ISC bei hohen CA Konzentrationen ausgelöst. Des Weiteren wurde ein modifiziertes, mit Zellen besiedeltes CA Material unter dynamischen Bedingungen in einer Spinnerflasche kultiviert. Dabei profitierten die ISC in der Spinnerflasche ab der dritten Kultivierungswoche von der besseren Nährstoffversorgung. Das Material wurde gleichmäßig besiedelt und konnte der durch das Rühren auf die Zell-Matrix Konstrukte wirkenden Scherbeanspruchung standhalten.

Schlagwörter: Tissue Engineering, Biomaterialien, Colominsäure

Abstract

Tissue Engineering is an important field within *Regenerative Medicine*. For *Tissue Engineering* different Biomaterials are used in combination with cells for the production of tissue. Therefore, the biomaterials have to be biocompatible; they should support cell attachment, growth, differentiation and migration. Furthermore, the biomaterials should be biodegradable.

In the present study, different investigated biopolymers were characterised with regard to their applicability in cell culture and *Tissue Engineering*. Basic properties and influences of the polysaccharides colominic acid, β -glucan and Fucoidan from algae extracts were tested *in vitro* on different cell models. Cytotoxicity studies of the polysaccharides and their modifications were evaluated with a human liver cell line (Hep-G2). The results showed an inhibition of the cell growth after addition of fucoidan. The polysaccharides colominic acid and β -glucan and their modifications showed no cytotoxic effects. This confirmed their good biocompatibility.

Colominic acid (CA) is a specific derivative of polysialic acid (PSA), which is known to be involved in nerve regeneration processes *in vivo*. In this context CA supports proliferation, migration and neurite extension of the cells. Therefore, neuronal cell models were chosen (PC-12, immortalised Schwann cells (ISC)) for an extensive study of the CA. The detailed analyses of CA included studies on cell adhesion, viability/proliferation, migration and specific cell markers (e.g. neurite extension) and gene expression analysis. The results confirmed the biocompatibility of CA. An enhanced migration of ISC under the influence of CA was monitored. Furthermore, a modified CA material was seeded with ISC and cultured in a spinner flask under the influence of dynamic conditions. The nutrient supply of the cells from the third week of cultivation was enhanced in the spinner flask. The cell distribution was regular and the material beared up under medium flow.

Keywords: Tissue Engineering, biomaterials, colominic acid

1 Einleitung

Das *Tissue Engineering* ist eine junge interdisziplinäre Wissenschaft, die es sich zur Aufgabe gemacht hat, natürliche Gewebe zu erhalten, zu verbessern oder zu erneuern. Das Prinzip dabei ist, Zellen oder auch Gewebe auf einer für die Zellen passenden Trägersubstanz (Matrix) *in vitro* zu kultivieren und das entstandene Zell-Matrix Konstrukt zurück in den Körper zu implantieren. Die Zusammenarbeit von Wissenschaftlern unterschiedlicher Fachbereiche wie Biologen, Chemiker, Biochemiker, Pharmazeuten, Materialwissenschaftler und Mediziner ist dabei nötig, besonders in Bezug auf die Entwicklung neuer Trägermaterialien für das *Tissue Engineering*. Die verwendeten Materialien sollten in erster Linie biokompatibel sein, je nach Anwendung eine definierte mechanische Stabilität besitzen, sowie bioabbaubar sein.

Eine grundlegende Idee des *Tissue Engineerings* ist es, natürliche Biopolymere als Trägermaterialien zu verwenden. Eine große Vielfalt von Polymeren wird von Organismen, hauptsächlich von Pflanzen, Tieren und Algen, produziert. Durch ihre natürliche Struktur haben z.B. viele Polysaccharide das Potenzial, während der Geweberegeneration oder Wundheilung das Zellwachstum, die Migration und die Organisation der Zellen zu steuern.

Besonders weit fortgeschritten sind die Forschungsarbeiten im Bereich des *Tissue Engineering* von Knochen- und Knorpelkonstrukten. Hier kommen sowohl natürliche Polymere wie Kollagen, Hyaluronsäure, Chitosan, Alginat und deren Derivate, als auch synthetische Polymere aus Polymilchsäure, Polyglykolsäure, Polyvinylalkohol und Polycaprolacton zum Einsatz. Die in diesem Gebiet gut erforschten Materialien wurden auch für die weniger erforschten Bereiche, wie dem *Tissue Engineering* von peripheren Nerven, übertragen und getestet.

Im *Tissue Engineering* werden verschiedene Strategien zur Bewertung und Entwicklung von Trägermaterialien verwendet. Dabei werden beschichtete „zweidimensionale“ Oberflächen von „dreidimensional“ strukturierten Trägermaterialien unterschieden. Zum einen werden grundlegende Untersuchungen auf beschichteten Zellkultur-oberflächen durchgeführt, wobei die Bewertungskriterien das Adhäsions-, Wachstums- und Differenzierungsverhalten der Zellen sind. Zum anderen werden dreidimensional strukturierte Trägermaterialien entwickelt, um das Verhalten der Zellen in einem Gewebeverband besser untersuchen zu können und die natürliche Umgebung der

Zellen nachzubilden. Als Vorbild dient hier häufig die extrazelluläre Matrix. Durch die Einbettung von Zellen in eine extrazelluläre Matrix wird ihnen ein dreidimensionales Gerüst gegeben, welches ihnen Halt gibt und die nötige mechanische Feinstruktur des Gewebes ausbildet. Durch dieses Gerüst wird den Zellen zusätzlich eine Vielzahl von biologischen Signalen vermittelt, die das Verhalten der Zellen bei regenerativen Prozessen wie Wundheilung und Wachstum unterstützen sowie Vorgänge wie Alterung oder Differenzierung steuern.

Heute gibt es bereits eine Vielzahl von Trägermaterialien die in den verschiedensten Bereichen des *Tissue Engineerings* eingesetzt werden. Hierbei ist die Wahl der Grundsubstanz abhängig vom Zielgewebe. Ein viel versprechender Ansatz bei der Konstruktion von Trägersubstanzen bietet neben der Oberflächenmodifikation/Funktionalisierung auch die Quervernetzung. Durch das physikalische oder chemische Quervernetzen können die oft hydrophilen Substanzen in wasserunlösliche Hydrogele umgewandelt werden. Hydrogele aus natürlichen Proteinen und Polysacchariden sind ideale Materialien, um extrazelluläre Matrixsysteme nachzuahmen. Die Beurteilung und Charakterisierung dieser neuen Materialien in Bezug auf Biokompatibilität, Bioabbaubarkeit und mechanische Stabilität ist unabdingbar. Derivate und funktionalisierte Materialien müssen auf ihre Zytotoxizität untersucht werden.

Ferner sind *in vitro* Untersuchungen in Hinblick auf Zellmorphologie, Zellanhaftung, Proliferation, Viabilität und spezifische Zellmarker notwendig, um die Materialien zu beurteilen. Unter der Verwendung der DNA-*Microarray* Technologie kann die Genexpression im Hochdurchsatz parallel analysiert werden. Expressionsprofile werden erhalten, die einen schnellen Überblick über die Vorgänge im Inneren der Zellen auf molekulargenetischer Ebene geben. Darüber hinaus bietet die Entwicklung neuartiger Bioreaktoren für das *Tissue Engineering* die Möglichkeit, Materialien unter dynamischen Bedingungen über einen längeren Kultivierungszeitraum zu untersuchen (Handhabung, Stabilität, Abbaubarkeit). Vor allem kann die Nährstoffversorgung auf bzw. in einem dreidimensionalen Konstrukt gegenüber der Kultivierung in einer Petrischale verbessert werden, was für die Gewebekonstruktion von Vorteil ist.

2 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der DFG-Forschergruppe 548 „Polysialinsäure: Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifizierlicher Gewebe“ erstellt. In dem Teilprojekt WP 5 (Iterative Testung und Optimierung von PolySia Matrizes durch genotypische und phänotypische Analysen und Untersuchung des Einflusses auf Proliferation und Differenzierung auf unterschiedliche Zellsysteme) sollten die grundlegenden Eigenschaften und Einflüsse der Polysialinsäure *in vitro* mit verschiedenen Zelllinien getestet werden. Frau Stephanie Bruns hat in ihrer Arbeit ein Testsystem aufgebaut, anhand dessen der Einfluss unterschiedlicher dreidimensional modifizierter Trägermaterialien auf verschiedene Zelltypen schnell und reproduzierbar untersucht werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Biopolymere Colominsäure (CA), ein spezifisches Derivat der Polysialinsäure, β -Glucan und Fucoidan auf ihre Eignung für Zellkulturanwendungen sowie als Biomaterial im *Tissue Engineering* grundlegend untersucht werden. Eine mögliche zytotoxische Wirkung der Polysaccharide sowie ihrer Derivate oder Modifikationen soll dabei mit verschiedenen Zellsystemen bewertet werden. Unter anderem sollen Hep-G2 Zellen verwendet werden, da sie oft für Biokompatibilitätstestungen eingesetzt werden.

Darüber hinaus sollen speziell die *in vivo* Eigenschaften der Polysialinsäure, wie die Förderung der Migration und Proliferation, sowie unterstützende Wirkungen bei der Nervenregeneration in den *in vitro* Experimenten mit der Colominsäure nachgewiesen werden. Als Zellsysteme werden neben Hep-G2 Zellen etablierte neuronale Zelllinien wie PC-12 und immortalisierte Schwanzzellen eingesetzt. Die Colominsäure soll zunächst in Form von Beschichtungen mit den Methoden des von Frau Bruns entwickelten Testsystems charakterisiert werden. Um Aussagen über die Zell-Matrix-Interaktionen machen zu können, werden die Zellanhaftung, -proliferation, -morphologie und spezifische Zellmarker auf einer CA Beschichtung mit verschiedenen etablierten Beschichtungen verglichen. Zum Einsatz kommen dabei etablierte Zellkulturbeschichtungen mit extrazellulären Matrixmolekülen wie Kollagen und Laminin. Mit Hilfe der DNA-*Microarray* Technologie sollen Aussagen über die Einflüsse der Colominsäure auf der Genexpressionsebene verschiedener Zellsysteme gemacht werden.

Abschließend werden durch chemische oder physikalische Verfahren 3D-Strukturen der Biopolymere erhalten, um somit den Gewebeverband *in vivo* nachzubilden. Beispielsweise wird dies durch Quervernetzung der Colominsäure zu Hydrogelen erreicht. Gemeinsam mit Frau Bruns wird für die Testung der dreidimensionalen CA Materialien ein Bioreaktorsystem entwickelt. In diesem werden die entwickelten Materialien abschließend unter Kultivierung getestet.

3 Theorie

3.1 Biomaterialien im *Tissue Engineering*

Die Regenerative Medizin gliedert sich in unterschiedliche Bereiche, wobei die Teilgebiete wie Organtransplantation, die Stammzellforschung, die Gentherapie und das *Tissue Engineering* unterschieden werden. Das *Tissue Engineering* ist eine interdisziplinäre Wissenschaft, welche die Prinzipien der Lebenswissenschaften, wie Biologie, Biochemie, Medizin und der Ingenieurwissenschaften anwendet, um biologische Ersatzstoffe zu entwickeln, die dazu dienen, Gewebefunktionen wieder herzustellen, zu erhalten oder zu verbessern. Dabei stellt die Entwicklung der Biomaterialien eine zentrale Rolle im *Tissue Engineering* dar. Abhängig vom zu ersetzenden Gewebe müssen die verwendeten Materialien unterschiedliche Anforderungen in Bezug auf ihre mechanische Stabilität, Bioabbaubarkeit, Porosität u. a. aufweisen. Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen muss gewährleistet sein. In jedem Fall müssen die Materialien biokompatibel sein und je nach Einsatz eine steuerbare Abbaubarkeit aufweisen. Die Abbauprodukte dürfen auf keinen Fall *in vivo* schädigende Wirkungen, wie z. B. Entzündungen hervorrufen.

Verschiedenste Prothesen, Implantate und Trägermaterialien sowohl synthetischen als auch natürlichen Ursprungs befinden sich in der Regenerativen Medizin im Einsatz, um die Regeneration von defektem Gewebe zu fördern bzw. kranke oder defekte Organe zu ersetzen. Dabei werden „zweidimensionale“ beschichtete Oberflächen von dreidimensional strukturierten Materialien unterschieden (Bacakova et al. 2004). Zum einen gibt es künstliche Prothesen, die eine „zweidimensionale“, d.h. inerte Oberfläche besitzen um die Anhaftung von Proteinen und Zellen zu vermeiden. Dadurch soll die Aktivierung des Immunsystems, der Blutgerinnung, die Thrombusbildung oder die Ablagerung von extrazellulärer Matrix sowie andere Interaktionen zwischen dem Material und der Umgebung verhindert werden. Diese Biomaterialien wurden z.B. zur Konstruktion von Gelenkprothesen, bioinerten Gefäßprothesen und für Katheter zur Blutwäsche entwickelt (Bacakova et al. 2001). Im Gegensatz dazu gibt es „zweidimensionale“ Materialien, die lediglich die Anhaftung der Zellen auf Substratoberflächen fördern, wie die Herzklappen und Gefäßprothesen, die mit einer semipermeablen Endothelschicht überzogen worden sind (Kim et al. 1999). Des Weiteren gibt es Knochenimplantate, welche die Bildung von knöchernem Gewebe

zwischen der Grenzfläche von dem natürlichen Gewebe und dem künstlichen Material fördern. Die Entwicklung der zweidimensionalen Materialien stützt sich auf Untersuchungen der Zellviabilität, Migration und Proliferation auf beschichteten Oberflächen. Diese Materialien erlauben kein Wachstum der Zellen in die Struktur hinein. Nach Bacakova hängt das Verhalten der Zellen davon ab, wie gut die Zellen auf der Oberfläche adhären (Tabelle 1). Haften die Zellen schlecht auf einer Oberfläche, weisen sie eine verminderte Viabilität, Migration, Proliferation und Differenzierung auf. Spreiten die Zellen hingegen stark auf einer Oberfläche, d.h. breiten sich gut auf der Oberfläche aus, sind sie vital und differenzieren. Dagegen sind die Migration und die Proliferation verringert. Maßnahmen wie Sandstrahlen, Sintern oder Bedampfung von Oberflächen erhöhen Zelladhäsion und Zellspreitung (Badami et al. 2006).

Tabelle 1: Zusammenhang von Zelladhäsion und dem daraus resultierenden Zellverhalten nach Bacakova.

Zellverhalten/ Zellspreitung	Viabilität	Migration	Proliferation	Differenzierung
Geringe Spreitung	↓	↓	↓	↓
Mittlere Spreitung	↑	↑	↑	↓
Große Spreitung	↑	↓	↓	↑

Da das Verhalten der Zellen auf einer Oberfläche häufig nicht dem Verhalten einer Zelle im Gewebeverband entspricht, besteht eine weitere Strategie darin, Zellen in dreidimensionale Biomaterialien einzubetten. Dazu werden „dreidimensionale“, meist poröse Materialien und Hydrogele (Lee and Mooney 2001) entwickelt, in die die Zellen hineinwachsen können bzw. eingebettet sind. Die Wahl des Materials hängt dabei von dem zu ersetzenden Zielgewebe ab.

Ein grundlegendes Konzept des *Tissue Engineerings* besteht darin, Materialien basierend aus Biopolymeren zu entwickeln, die von lebenden Organismen produziert werden. Eine große Vielfalt von Polymeren wird von Organismen, hauptsächlich von Pflanzen, Tieren und Algen produziert (Fujimura et al. 2000). Je nach der chemischen Struktur werden sie in verschiedene Klassen eingeteilt (Mano et al. 2007):

- a. Polysaccharide
- b. Proteine
- c. Polyester

Durch den gezielten Einsatz geeigneter biotechnologischer Verfahren, z.B. durch die Fermentation von Mikroorganismen oder *in vitro* durch enzymatische Prozesse, können natürliche Polymere mit hoher Ausbeute gewonnen werden (Mano et al. 2007). Eine Vielzahl von Materialien ist bereits in den verschiedenen Bereichen des *Tissue Engineerings* hergestellt, modifiziert und getestet worden. Ein gründlich erforschter Bereich ist das *Tissue Engineering* von Knochen- und Knorpelkonstrukten (Hutmacher 2000; Risbud and Sitterling 2002; Temenoff and Mikos 2000). Die auf diesem Gebiet intensiv erforschten Materialien wie die synthetischen Polymere aus Polylaktat, Polyglykolsäure (Agrawal and Athanasiou 1997; Lavik et al. 2002), Polyvinylalkohol (Lee and Mooney 2001) und Polycaprolakton (Choong et al. 2006) und deren Derivaten sowie die natürlichen Polymere aus Kollagen (Mian et al. 1992; Shettigar et al. 1982), Hyaluronsäure (Esposito et al. 2006), Chitosan und Alginat (Coward et al. 2005) werden häufig auch für die weniger erforschten Bereiche wie dem *Tissue Engineering* von peripheren Nerven eingesetzt. Die beiden wichtigsten Eigenschaften von Polymeren sind ihre Biokompatibilität und ihre Bioabbaubarkeit. Ein Ansatz ist es, viel versprechende Substrate durch Quervernetzung in dreidimensionale Konstrukte zu überführen. Durch das Quervernetzen, entweder auf chemischem oder physikalischem Weg, können die oft hydrophilen Substanzen in wasserunlösliche Hydrogele eingebracht werden (Lee and Mooney 2001). Häufig verwendete chemische Quervernetzer sind z.B. Carbodiimide oder Epoxide. Eine physikalische Methode ist die Photoquervernetzung. Vor allem aber kommen sich selbst vernetzende Polysaccharide wie Alginat oder Gelatine zum Einsatz (Balakrishnan and Jayakrishnan 2005). Hydrogele aus Proteinen und Polysacchariden sind zusätzlich ideale Materialien, um extrazelluläre Matrixsysteme nachzuahmen, da die natürlichen Polysaccharide und ihre einzelnen Monomere sowie deren Abbauprodukte im Allgemeinen als nicht toxisch bis gering toxisch eingestuft werden. Durch ihre Struktur haben die Polysaccharide das Potenzial, während der Geweberegenerierung oder Wundheilung das Zellwachstum, die Migration und die Organisation der Zellen zu steuern.

Mit Hilfe der Technik des Elektrosplinnings ist es möglich, sowohl natürliche (Kollagen, Seide, Polylaktat) als auch synthetische Biomaterialien (Polyurethane) in eine gerichtete oder ungerichtete Faserstruktur zu überführen. Durch die Veränderung der Elektrosplinning-Konditionen (z.B. Lösungsmittel, Konzentration, Viskosität, Leitfähigkeit, Spannung) wird der Faserdurchmesser verändert (50 nm - 5 µm) (Badami et al.

2006). Somit kann die Struktur des Materials an die Anforderungen der Zelle angepasst werden.

3.1.1 Kollagen

Die extrazelluläre Matrix (EZM) stellt das von der Natur geschaffene optimale Milieu für das Zellwachstum und die Gewebebildung dar. Die Bestandteile der EZM werden im Inneren der Zellen produziert, nach außen abgegeben und dort an der Oberfläche immobilisiert (Adams and Watt 1993). Die EZM kommt in den vier Gewebetypen des Organismus vor: 1. Epithel- (Deck- und Drüsengewebe), 2. Muskel-, 3. Nerven- und 4. Binde- und Stützgewebe. Besonders im Binde- und Stützgewebe ist die extrazelluläre Matrix entscheidend für Form und Funktion des Gewebes, da hier der Anteil der EZM am Gesamtvolumen besonders groß ist. Die EZM ist ein faseriges Geflecht, bestehend aus Proteinen, Glykosaminoglykanen (GAG), Proteoglykanen (PG) und extrazellulärer Flüssigkeit (Taipale and Keski-Oja 1997). Die EZM bietet den Zellen Raum, in dem sie sich bewegen und miteinander wechselwirken können, fördert die Bildung von Zell-Zell Kontakten und sorgt für den Zusammenhalt von Zellen und Gewebe. Die extrazelluläre Matrix hält wahrscheinlich die biologischen Informationen und andere physikochemische Eigenschaften aufrecht. Ein Ziel im *Tissue Engineering* ist es daher, die extrazelluläre Matrix nachzuahmen (Roeder et al. 2002; Wang et al. 2002). Eine Strategie ist es dabei, ein extrazelluläres Matrixgerüst zu isolieren, aufzureinigen und dann zur Geweberegeneration einzusetzen (Mian et al. 1992; Shettigar et al. 1982; Still et al. 2003). Das Kollagen ist ein solches extrazelluläres Matrixprotein, welches häufig isoliert und als Biomaterial eingesetzt wurde. Kollagen ist das am häufigsten vorkommende Protein im menschlichen Körper. Zurzeit sind ca. 28 Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt. Sie machen ca. ein Drittel der im Bindegewebe vorkommenden Proteine aus, besitzen eine Faserstruktur und sind ein wesentlicher Bestandteil der Haut, Sehnen oder der organischen Grundsubstanz von Hartgeweben. Die wichtigsten chemischen Eigenschaften der Kollagene bestehen in der sich wiederholenden Aminosäuresequenz der Prokollagenkette Gly-X-Y. Die Aminosäure in der X Position ist häufig Prolin, die in der Y Position Hydroxyprolin (Abbildung 1).

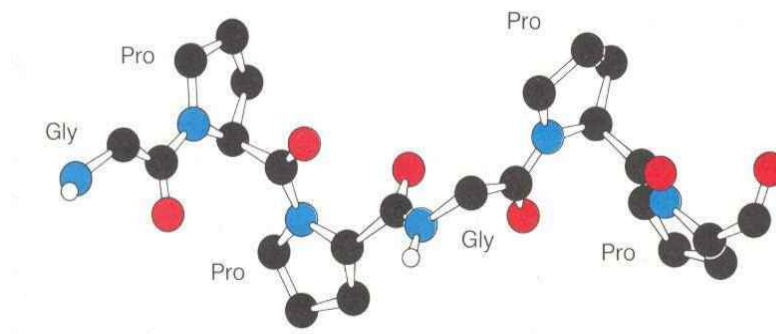


Abbildung 1: Konformation eines einzelnen Stranges der Kollagentripelhelix.
Gezeigt ist die Sequenz Gly-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro des Kollagens (Stryer 1994).

Kollagen I ist das häufigste von den über 20 verschiedenen Kollagenen und das bisher am besten charakterisierte Kollagen. Es bildet ein Heterotrimer aus zwei $\alpha 1(I)$ - und einer $\alpha 2(I)$ -Kette. Die Charakteristika sind gute Biokompatibilität, Degradierbarkeit, mechanische Belastbarkeit, geringe Antigenität und die Möglichkeit zur Quervernetzung, sowie die Aufnahme von Wasser. Durch die Verwendung von spezie fremdem Kollagen aus Rind oder Schwein kann es jedoch auch zu Infektionsgefahren kommen. Bei der Gewinnung aus Schweinehaut kommen neben der Virusproblematik (PRRS: Porcine Reproduktives und Respiratorisches Syndrom; PERV: Porciner Endogener Retrovirus) in einigen Ländern auch religiöse Vorbehalte hinzu. Kollagen wird in der Zellkultur häufig neben Fibronectin, Laminin oder Vitronectin als Beschichtung eingesetzt, um die Adhäsion von Zellen zu fördern. Des Weiteren ist Kollagen dafür bekannt, die Wundheilung zu fördern (Mian et al. 1992; Still et al. 2003). Darüber hinaus lässt sich das Kollagen mit verschiedenen Materialien kombinieren. Zum Beispiel wird es als Komponente beim *Tissue Engineering* von Nervenleitschienen eingesetzt und kann die Proliferation der Zellen unterstützen, sowie die Nervenregeneration fördern. Des Weiteren findet das Kollagen Einsatz als Material für das *Tissue Engineering* von Knorpelkonstrukten. Zusätzlich können Wachstumsfaktoren oder andere aktive Reagenzien in Kollagenmaterialien oder Gele gebracht werden, um ihre Abgaberate zu verlängern und den therapeutischen Effekt zu verbessern (Mano et al. 2007).

3.1.2 Laminin

Laminin ist ein Bestandteil der extrazellulären Matrix. Zusammen mit Fibronectin, Kollagen IV und einer Reihe von Proteoglykanen bildet es die Basalmembran. Bislang

sind 15 verschiedene Isoformen des Laminins bekannt (Hou et al. 2005). Das Trimer besteht aus einer A-Kette, einer B- und einer B₂-Kette (Alberts 1994; Sanes et al. 1990).

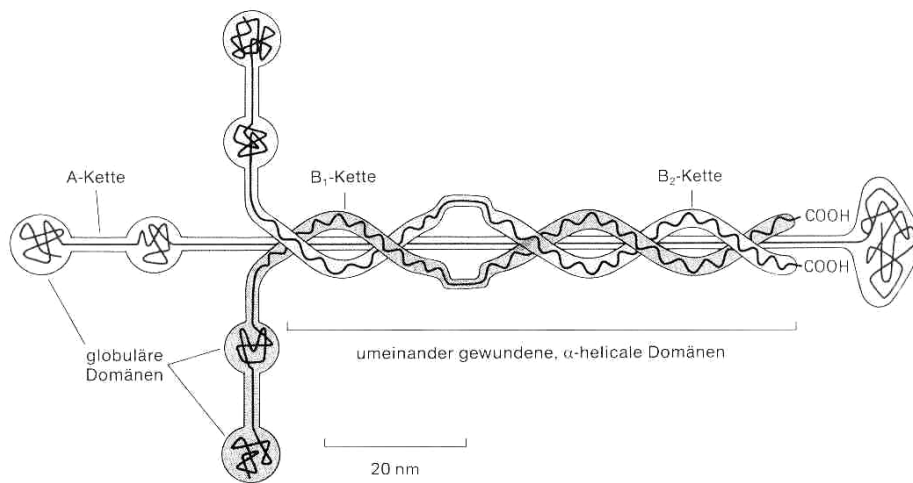


Abbildung 2: Struktur des Laminins.

Laminin besitzt eine Reihe von Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren (Mercurio and Shaw 1991). Sie fördern die Zelladhäsion, Migration, Wachstum und die Differenzierung von Zellen. Des Weiteren begünstigt Laminin die Neuritenausbildung verschiedenster neuronaler Zellen, indem es einen inhibitorischen Effekt auf die Myelin assoziierten Proteine ausübt. Laminin und seine S-Homologe werden während der Entwicklung im Zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert (Hunter et al. 1992). Im adulten Organismus werden sie hingegen im ZNS nicht mehr exprimiert, dafür aber im peripheren Nervensystem.

Laminin wird vor allem als Beschichtungsreagenz für Zellkulturoberflächen eingesetzt oder als Zusatz in Zellkulturmedien. Die Beschichtung von Biomaterialien mit Laminin schafft eine „natürlichere“ Oberfläche und fördert somit die Interaktionen zwischen den Zellen und der Materialoberfläche (Bosman and Stamenkovic 2003; Mercurio 1995; Oyane et al. 2005). Mochizuki et. al zeigten die Förderung der Zelladhäsion und der Zellspreitung *in vitro* durch die Verwendung einer Laminin Peptid konjugierten Chitosanmembran (Mochizuki et al. 2003).

3.1.3 Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure, auch bezeichnet als Hyaluron oder Hyaluronat, ist ein wichtiges Glykosaminoglykan, Bestandteil des Bindegewebes und Hauptbestandteil der Gelenkflüssigkeit (Synovia), wobei es als Schmiermittel bei Gelenkbewegungen dient

(Mano et al. 2007). Im Glaskörper des Auges binden 2 % Hyaluronsäure 98 % des Wassers. Des Weiteren spielt die Hyaluronsäure eine Rolle bei der Zellproliferation, Zellmigration, Differenzierung (Segura et al. 2005) und auch Tumorentstehung. Proliferation und Migration werden zum Beispiel ausgelöst durch die Interaktionen von Zelloberflächenrezeptoren mit der Hyaluronsäure. In der Embryonalentwicklung sind diese Stimulationen notwendig, bei Kontakt mit Tumorzellen können sie allerdings auch nachteilige Auswirkungen haben. Hyaluronsäure ist ein lineares Polysaccharid bestehend aus 250-25 000 β -1,4 verknüpften Disaccharideinheiten, D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin. Beide unterscheiden sich von der β -D-Glukose nur durch eine Substitution am 6. bzw. am 2. Kohlenstoffatom. Im Disaccharid wird die Glucuronsäure glycosidisch $\beta(1\rightarrow3)$ an das N-Acetylglucosamin geknüpft, das wiederum mit der nächsten Glucuronsäure in der polymeren Kette $\beta(1\rightarrow4)$ verbunden ist.

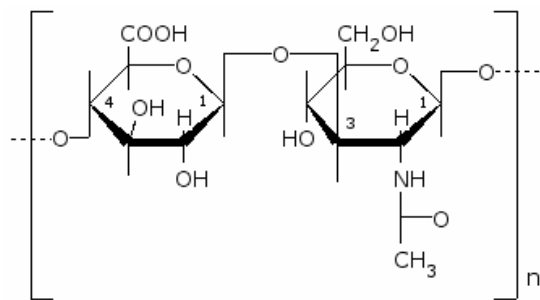


Abbildung 3: Struktur der Hyaluronsäure.

Hyaluronsäure besteht aus N-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin (Alberts 1994).

Die Hyaluronsäure findet sowohl Einsatz in der Medizin als auch in der Kosmetik. Die Hyaluronsäure kann einfach und kontrolliert durch Fermentation (*Bacillus subtilis*) gewonnen werden (Widner et al. 2005). Hyaluronsäure ist wasserlöslich und kann daher als Beschichtungssubstanz in der Zellkultur eingesetzt werden. Hauptsächlich wird es jedoch als Hydrogel verwendet. Hydrogele entstehen z.B. durch kovalente und Photoquervernetzung z.B. mit Hydrazinderivaten durch Veresterung und *Annealing* (Baier Leach et al. 2003; Drury and Mooney 2003). Durch Hyaluronidasen, welche in Zellen und Serum enthalten sind, findet ein enzymatischer Abbau statt. Eingesetzt wurde die Hyaluronsäure z.B. auch modifiziert mit Laminin als Implantat zur Reparatur von Defekten im Zentralen Nervensystem von Ratten (Hou et al. 2005).

3.1.4 Sialinsäuren

Sialinsäure ist ein Oberbegriff für eine Gruppe von substituierten Neuraminsäure Derivaten (N-Acetyl, N-Glycolyl, N,O-Diacetylneuraminsäure). Beim Menschen kommt die N-Acetylneuraminsäure (Abbildung 4), bei Mäusen die N-Glycolylneuraminsäure vor (Warren 1959).

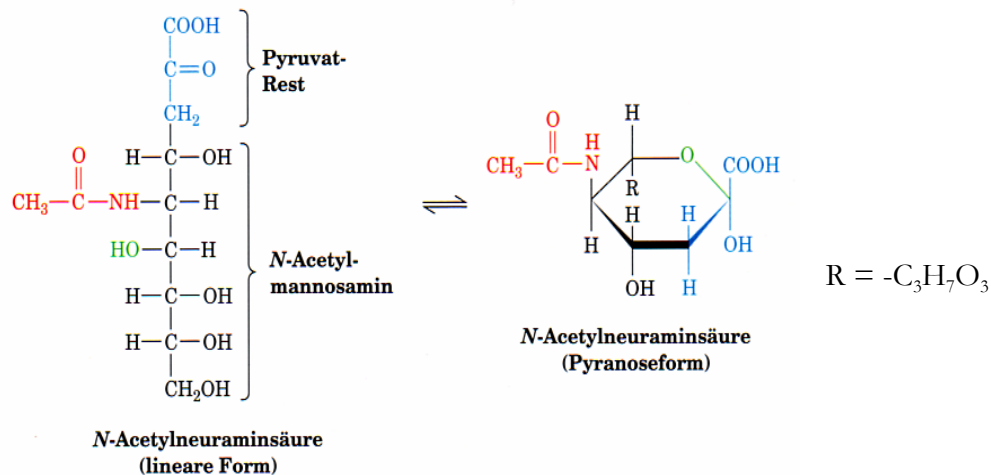


Abbildung 4: Struktur der N-Acetylneuraminsäure.

Umwandlung von der linearen Form in die cyclische Form (Voet and Voet 1995).

Sialinsäuren werden als terminale Zucker in einer Reihe von Glycokonjugaten an eukaryontischen Zelloberflächen oder Molekülen exprimiert (Traving and Schauer 1998). Dort spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Regeneration (Bork et al. 2005). Ein Beispiel für ein hochgradig sialisiertes Glycoprotein ist das neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM), an welchem Polysialinsäure (PSA) exprimiert wird (Abbildung 5). *In vivo* ist PSA eine hoch regulierte Modifikation des NCAMs (Kleene and Schachner 2004). Während der Entwicklung des Nervengewebes wird PSA exprimiert, nach der Geburt geht die Expression zurück, bis sie nur noch in Regionen gebildet wird, wo die Ausbildung der neuronalen Plastizität weiter voran geht (Haile et al. 2007). Polysialinsäure verbessert die Migration z.B. von neuronalen Stammzellen, fördert die Bildung von Neuriten, ist eingebunden in regenerative Prozesse wie Traumata und bei Synapsenverknüpfungen während Lern- und Erinnerungsprozessen (Kleene and Schachner 2004; Leckband 2004). Ono et al. und Hu et al. zeigten, dass der Abbau der Polysialinsäure von NCAM mit Endoneuraminidasen (EndoN) (Rutishauser

et al. 1985), die Zellmigration in Wildtyp Mäusen reduziert (Hu et al. 1996; Ono et al. 1994).

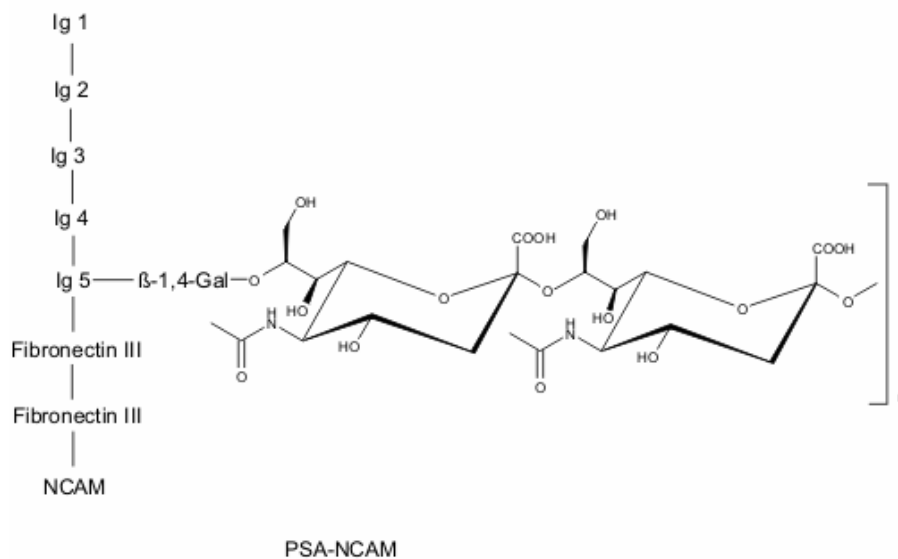


Abbildung 5: Struktur der Polysialinsäure (PSA).

Darstellung von Polysialinsäure gebunden an das Neuronale Zelladhäsionsmolekül (NCAM).

Die Colominsäure (CA) hingegen ist ein Homopolymer und besteht ausschließlich aus polymerisierten α -2,8-verknüpften N-Acetylneuraminsäuren (McGuire and Binkley 1964). Die Colominsäure ist somit ein spezifisches Derivat der Polysialinsäure (Abbildung 5). Finne et al. fanden 1987 durch Hydrolyse heraus, dass das in *E.coli*-K1 produzierte Kapselpolysaccharid der reinen Colominsäure entspricht und zeigten, dass es immunologisch identisch zu der in Säugetieren produzierten PSA ist (Finne et al. 1987). CA ist ein neues Biopolymer, welches durch die Fermentation von Mikroorganismen gewonnen werden kann. Durch seine Eigenschaften *in vivo* ist es biokompatibel, durch Endoneuraminidasen kontrolliert abbaubar und ruft keine Immunreaktion hervor. Abbauprodukte sind nicht zytotoxisch.

3.1.5 Glucane

Als Glucane werden aus Glukose aufgebaute Polysaccharide, wie Stärke, Cellulose und Glycogen bezeichnet. Die Gewinnung der Glucane erfolgt aus Getreidearten und Pilzen sowie Mikroorganismen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilze) oder auch höheren Pflanzen, wobei sie sich in ihrer chemischen Struktur unterscheiden. Die (1→3),(1→6)- β -D-Glucane mit bestimmter Anzahl und Länge der Verzweigungen sind in der Lage, die

physiologische Aktivierung des Immunsystems zu unterstützen. Bekannt für seine immunstimulierende Wirkung ist z. B. auch das Paramylon, ein β -1,3-Glucan, welches von *Euglena gracilis* produziert wird (Abbildung 6) (Fullerton et al. 2000; Miura et al. 1999; Tsuzuki et al. 1999).

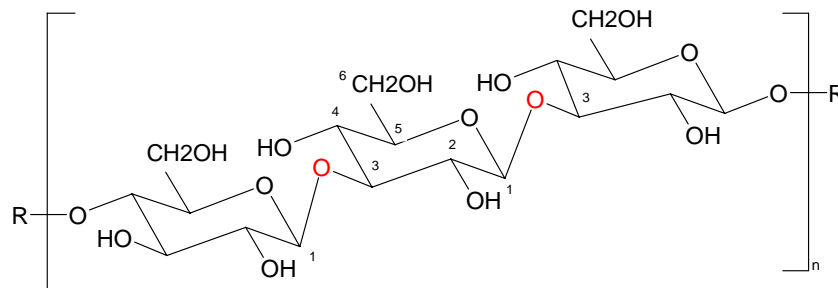


Abbildung 6: Struktur von Paramylon.
Ausschnitt von Paramylon aus einer Kette des β -1,3-D-Glucans.

In den Euglenophyceen und Kalkalgen kommt das Paramylon als Speicherstoff vor, der als Energiereserve genutzt wird. Einsatzgebiete liegen im Bereich der Medizin zur begleitenden Krebsbehandlung, als Wundauflage, in der Pharmazie zur Stärkung der Immunabwehr und als Nahrungsergänzungsmittel, sowie in der Kosmetik, als Zusatzstoff für Cremes (Heinze 2006). Aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung und der Möglichkeit zur Gewinnung der Glucane über Mikroorganismen, können β -Glucane im *Tissue Engineering* eingesetzt werden. So zeigten Lee et al. die Förderung der Reepithelisierung eines Hautdefektes unter der Verwendung eines porösen Trägermaterials aus Gelatine und β -Glucan (Lee et al. 2003).

3.1.6 Fucoideane

Fucoidean ist ein sulfatiertes Polysaccharid mit einer komplexen Struktur (Abbildung 7), welches aus der braunen Seealge gewonnen werden kann. Im Allgemeinen können Fucoideane außer Fucose auch Galaktose, Glukose, Mannose, Xylose und Uransäuren enthalten. Fucoideane fallen als Nebenprodukte bei der Alginatproduktion für die Lebensmittel- und Kosmetikindustrie an und sind leicht zu gewinnen. Reich an Fucoidean sind *Ascophyllum nodosum* und *Fucus vesiculosus*, bei denen die gleichen Struktureinheiten nachgewiesen werden $[(1\rightarrow3)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(2\text{SO}_3\text{-})\text{-}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Fuc}(2,3\text{ diSO}_3\text{-})\text{-}(1)]_n$ (Chevolot et al. 2001) (Abbildung 7). *Laminaria digitata* ist reich an

Komponenten wie Polygalactoside, Fucose Polymeren und Uransäure, die auch in der kosmetischen Industrie eingesetzt werden. Des Weiteren werden *Laminaria digitata* antibakterielle Eigenschaften zugeschrieben.

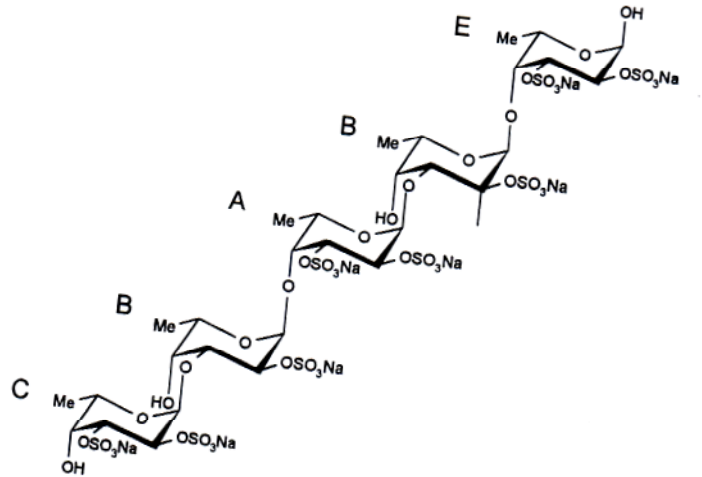


Abbildung 7: Struktur des niedermolekularen Fucans.

Fucan dargestellt als Natriumsalz. Diese Struktur stellt einen Hauptbestandteil des nativen Fucoidans dar. Die Anzahl der sich wiederholenden BA Disaccharideinheit liegt zwischen 4 und 7 (Chevolot et al. 2001).

Die sulfatierten Fucoidane marinen Ursprungs haben sowohl antikoagulatorische Wirkung als auch antibakterielle, antivirale und antitumorale Eigenschaften (Sakai et al. 2003; Yim et al. 2004; Yim et al. 2005). Die antikoagulatorische Eigenschaft macht die Polysaccharide z.B. für die Behandlung thromboembolischer Erkrankungen interessant und könnte somit eine Alternative zu der Bandlung mit Heparin darstellen (Thorlacius et al. 2000).

3.2 ECIS

Das electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) ist 1984 von *Giaever* and *Keese*, zur Charakterisierung adhärenter Zellkulturmonolayer entwickelt worden. Die ECIS Messung stellt eine alternative Methode zur mikroskopischen Beobachtung von Zellveränderung unter verschiedensten Einflüssen dar.

Diese biophysikalische Methode beruht auf der Messung der Impedanz, hervorgerufen durch Zellen auf der Oberfläche einer Goldfilmelektrode. Die Impedanz setzt sich als komplexe Größe, aus dem ohmschen Widerstand der Reaktanz und einem kapazitiven Anteil zusammen. Das Messsystem besteht aus einer Zellkulturschale, an deren Boden

sich eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode befinden, an die eine Wechselspannung angelegt wird (Abbildung 8 (Wegener et al. 2000)). Die Messkammer wird mit einer Suspension an adhären wachsenden Zellen gefüllt und die Signalveränderungen der Impedanz werden verfolgt. Aufgrund der 300fach größeren Fläche der Gegenelektrode wird die Impedanz des Gesamtsystems durch die Impedanz der kleinen Arbeitselektrode bestimmt. Die erhaltenen Impedanzspektren geben Auskunft über den elektrischen Widerstand zwischen den Zellen, somit über Zell-Zell Kontakte und über Zell-Substrat Kontakte, sowie über die Kapazität der Plasmamembran.

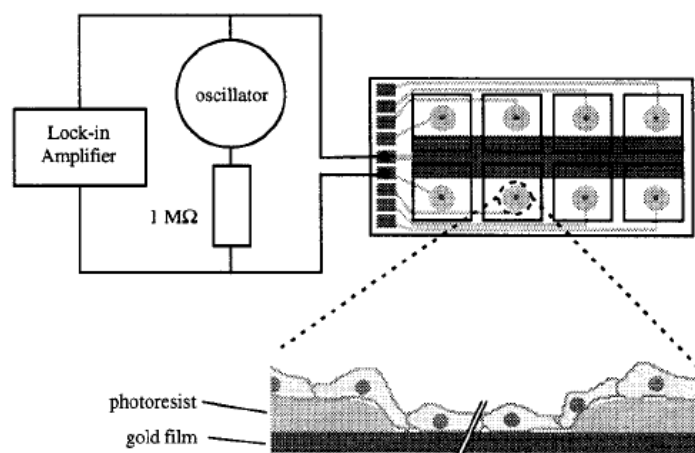


Abbildung 8: Modell eines ECIS Messsystems.

Die Zelle kann modellhaft als Reihenschaltung aus Widerstand und Kondensator betrachtet werden (RC-Glied). Durch das Anhaften auf der Arbeitselektrode steigt die Impedanz und die Kapazität sinkt. Die Messung erfolgt bei geringen Spannungen und Strömen und ist nicht-invasiv. Bei starken elektrischen Feldern werden die Zellwände permittiert. Da die an der Messzelle abfallende Spannung proportional zur nur sehr geringen Eingangsspannung ist, muss zur Messung der abfallenden Spannung ein empfindlicher Lock-in Verstärker (LIV) verwendet werden, siehe Abbildung 8. Der LIV ermöglicht außerdem die Messung der Phasenverschiebung von Eingangsspannung und der über die Schale abfallenden Spannung, welche sich aus der elektrotechnischen Betrachtung von RC-Gliedern ableiten lässt.

Die Impedanz und die Kapazität der Messzelle berechnen sich nun nach folgenden Gleichungen:

Ohmscher Widerstand der Messzelle:
$$R = \frac{U_{0^\circ} \cdot R_i}{U_g}$$

- U_{0° Effektivspannungsabfall an der Messzelle in Phase
 U_g am Gesamtsystem angelegte Effektivspannung (i.d.R. $1V_{p-p}$, entsprechend einer Effektivspannung von 0,353V)
 R_i Vorwiderstand (1 M Ω)

Kapazitiver Widerstand der Messzelle:
$$X_c = \frac{U_{90^\circ} \cdot R_i}{U_g}$$

Impedanz der Messzelle:
$$Z = \sqrt{(X_c^2 + R^2)}$$

Kapazität der Messzelle:
$$C = \frac{1}{2\pi \cdot f \cdot X_c}$$

- Mit f Frequenz der Wechselspannung
 U_{90° Effektivspannung an der Messzelle 90° phasenverschoben zu Erregerspannung

Eine Vielzahl von zellulären Veränderungen, die Einfluss auf den elektrischen Widerstand im Wechselstromfeld haben, können über die ECIS Messungen reproduzierbar und quantitativ verfolgt werden. Einflussgrößen sind die Zellzahl (Proliferation), die Fläche, die eine Zelle auf der Elektrode einnimmt (Spreitung) und Wechselwirkungen von Zellen mit dem Elektrodenmaterial (hervorgerufen durch Zellmembran-EZM Wechselwirkungen oder Differenzierungsvorgänge). Somit eignet sich die Methode zu vielfältigen Anwendungen wie z.B. der Materialtestung, Zytotoxizitätsstudien, Wundheilungsassays, Migration und der Beobachtung von Differenzierungsvorgängen.

Unter anderem bewirkt z.B. das Spreiten der Zellen auf der Elektrode eine Veränderung des Impedanzsignals (Luong et al. 2001; Sapper et al. 2006; Wegener et al. 2000). Das Signal ist somit von dem Zelltyp und der Zellgröße abhängig. Schwankungen in der Impedanz lassen auf die Mikromotion von Zellen schließen. Aufwendige *Time Lap* Aufnahmen mit dem Lichtmikroskop werden durch die ECIS Methode einfacher auswertbar (Giaever and Keese 1991). Das mechanische Verwunden einer konfluenten Zellkultur mit einer Pippettenspitze (klassischer Wundheilungsassay) und die mikroskopische Verfolgung der Migration und somit die Aufnahme von einer Vielzahl von Bildern, wird durch das elektrische Verwunden ersetzt. Durch das Anlegen einer Spannung im Bereich von 1-5 V für wenige Sekunden, werden die Zellen auf der Arbeitselektrode permittiert, es entsteht eine zellfreie Fläche, in die die Zellen

hineinwachsen können. Die Veränderung des Impedanzsignals wird nach dem Verwunden über einen definierten Zeitraum verfolgt (Keese et al. 2004).

3.3 Bioreaktoren im *Tissue Engineering*

Als Bioreaktoren werden im Allgemeinen Apparaturen bezeichnet, in denen biologische oder biochemische Wachstumsprozesse ablaufen und kontrolliert werden. Kultivierungsparameter wie pH-Wert, Temperatur, Druck, Nährstoffversorgung und Abfallproduktion werden kontrolliert und geregelt. Klassisch werden in der Industrie Bioreaktoren zur Produktion von Nahrungszusatzstoffen, Pharmazeutika und rekombinanten Proteinen wie Wachstumsfaktoren, Antikörpern, Vakzinen und Antibiotika eingesetzt (Martin et al. 2004).

Im *Tissue Engineering* werden Bioreaktoren genutzt, um Zellen über einen definierten Zeitraum unter dynamischen Bedingungen kontrolliert zu vermehren und anschließend zu differenzieren. Dafür wird eine Trägersubstanz als Basis für Zellanhaftung, Strukturgebung und Gewebeformierung gewählt und in ein Bioreaktorsystem überführt. Zusätzlich wird ein geeignetes physiologisches Milieu geschaffen, um eine ausreichende Nährstoff- und Sauerstoffversorgung zu gewährleisten. Gegebenenfalls werden Wachstumsfaktoren zur Verfügung gestellt und für eine mechanische, hydrodynamische oder elektrische Stimulierung des Zellwachstums gesorgt. Da *in vivo* die Abläufe häufig räumlich und zeitlich gesteuert sind, stellt die Bioreaktorkultivierung eine besondere Herausforderung dar. Sie bietet gegenüber der statischen *in vitro* Kultivierung in einer Zellkulturschale einige Vorteile. In einem Bioreaktor können die genannten Parameter wie die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung und der pH-Wert besser geregelt und kontrolliert werden. Inhomogenitäten in der Nährstoffversorgung der Zellen auf porösen Materialien, so wie sie bei der statischen Kultivierung durch inhomogene Diffusion auftreten, können somit vermieden werden. Eine Vielzahl verschiedener Systeme wurde entwickelt, um diverse Gewebe, wie Knochen, Knorpel, Herz, Nerven u.a. unter optimierten Bedingungen zu „züchten“ (Martin et al. 2004). Wie bei der Wahl der Biomaterialien, die als Gerüstsubstanz dienen, muss auch hier für jeden Gewebetyp ein individueller Reaktor mit den entsprechenden Kultivierungsparametern gefertigt werden. Eine Reaktorkultivierung ist somit in Kombination mit dem für die Schaffung des gewünschten Gewebes gewählten Biomaterials am erfolgreichsten (Hutmacher 2000). Die bekanntesten Bioreaktormodelle im *Tissue Engineering* sind die Spinnerflasche,

die Perfusionskammer (Abbildung 9), sowie Hohlfaserreaktoren und rotierende Bioreaktoren.

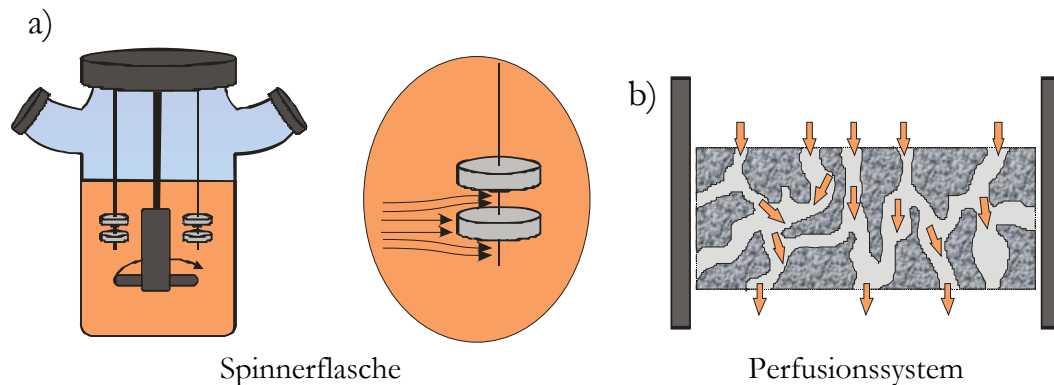


Abbildung 9: Reaktorsysteme im *Tissue Engineering*.

Darstellung der am häufigsten verwendeten Reaktorsysteme im *Tissue Engineering*: die Spinnerflasche (a), der Perfusionsbioreaktor (b).

In der Spinnerflasche werden Trägermaterialien fest an Stäben fixiert oder auf Microcarriern kultiviert, die sich im Medium befinden. Die Spinnerflasche wird dabei wie ein Batchreaktor betrieben. Der Gasaustausch findet kontinuierlich über die Oberfläche des Zellkulturmediums statt. Wird das Medium zusätzlich gerührt, liegt eine turbulente Strömung vor, und der Massentransport vom Medium zum Konstrukt findet durch Konvektion statt, innerhalb des Materials jedoch durch Diffusion. Auf die Konstrukte wird somit ein permanenter hydrodynamischer Stimulus ausgeübt (Pei et al. 2002). Des Weiteren kann eine Besiedlung der Materialien in einer gerührten Spinnerflasche erfolgen, da die Zellen so mit dem Material in Berührung kommen (Gooch et al. 2001). Eine einheitliche und effiziente Besiedlung muss dabei jedoch nicht zwingend gegeben sein (Kim et al. 1998; Sikavitsas et al. 2002; Wendt et al. 2003).

Das Rühren des Zellkulturmediums übt signifikante Einflüsse z.B. auf Herzmuskel Zell-Konstrukte aus; so weisen diese eine bessere Zellverteilung und höhere Viabilität als die unter statischen Bedingungen kultivierten Zellen auf (Carrier et al. 1999). Bei Kultivierung eines Knorpelkonstruktes wurde ebenfalls durch das Rühren des Systems eine erhöhte Produktion von Kollagen und Glykosaminoglykanen erreicht (Gooch et al. 2001).

Das Reaktorsystem, welches den Bedingungen der beim Menschen vorkommenden Gewebearten am meisten entspricht, ist der Perfusionsbioreaktor. Die Zellen werden auf einem Trägermaterial in dem Bioreaktor kultiviert. Es findet ein permanenter

konvektiver Mediumfluss über und durch das Zell-Matrixkonstrukt statt. Dabei wird eine effizientere und gleichmäßigere Besiedlung der Konstrukte erreicht, als bei der statischen oder Spinnerflaschen Kultivierung (Li et al. 2001; Wendt et al. 2003). Durch den laminaren Fluss im Perfusionsreaktor wird eine konstante laminare Scherbeanspruchung auf das Konstrukt ausgeübt (Dvir et al. 2006). Dieses Reaktorsystem wurde bereits erfolgreich eingesetzt zur Regenerierung verschiedener Gewebe unter der Verwendung von Knorpelzellen, Herzzellen (Carrier et al. 1999) und verschiedenen Tumorzellen als Modell (Becker et al. 1993; Rhee et al. 2001).

4 Experimenteller Teil

4.1 Zytotoxizitätsassays für innovative Biomaterialien

In dieser Arbeit wurden verschiedene innovative Biopolymere auf ihre Eignung in der Zellkultur und im Hinblick auf eine Anwendung im *Tissue Engineering* getestet. Im Rahmen der DFG-Forschergruppe 548 „Polysialinsäure Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifizierter Gewebe“ war es die zentrale Aufgabe, die grundlegenden Eigenschaften und Einflüsse der Polysialinsäure *in vitro* auf verschiedene Zelllinien zu testen. In Abbildung 10 ist die Projektstruktur dargestellt. Es wurden verschiedene Materialien von den Projektpartnern zur Verfügung gestellt, anhand eines Testsystems charakterisiert und anschließend beurteilt. Darauf folgte, je nach Verfügbarkeit der Materialien, eine detaillierte Analyse. Durch Modifizierungen seitens der Projektpartner, wie z.B. Quervernetzungen zu Hydrogelen und Elektrospinning wurden die Materialien modifiziert, so dass eine Annäherung an eine dreidimensionale Matrixstruktur erreicht wurde.

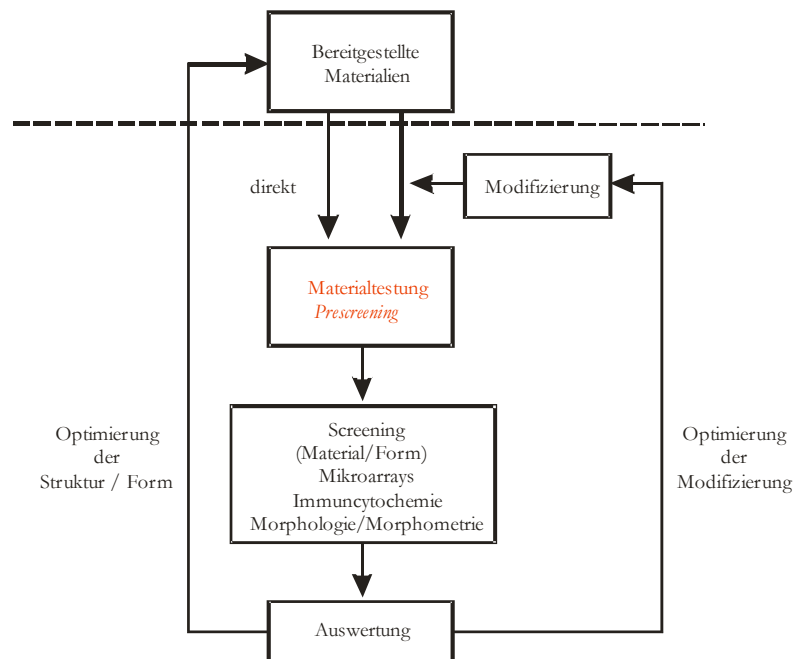


Abbildung 10: Projektskizze der DFG-Forschergruppe 548.

DFG Projekt „Polysialinsäure Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifizierter Gewebe“.

Zusätzlich wurden die Polysaccharide β -Glucan und Fucoidan im Hinblick auf einen möglichen Einsatz im *Tissue Engineering* getestet. Verglichen wurde der Einfluss der

Polysaccharide auf verschiedene Zellsysteme mit in der Zellkultur etablierten Materialien wie Kollagen, Hyaluronsäure, Laminin und Poly-L-Lysin.

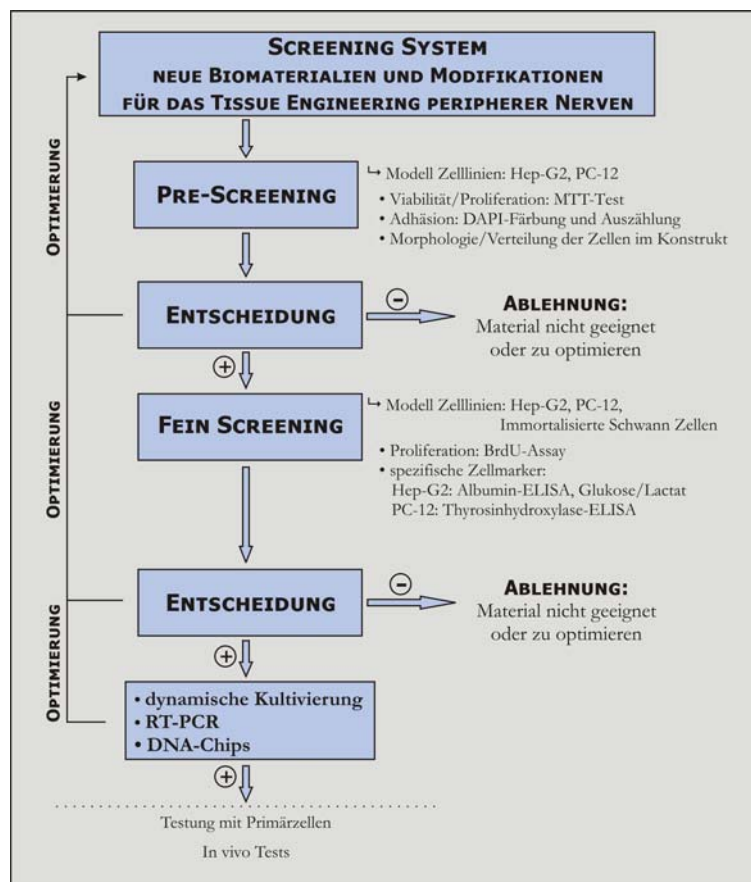


Abbildung 11: Testsystem für Biomaterialien.

Unterteilung des Testsystems in *Pre-Screening* und *Fein-Screening*.

Für eine schnelle, effiziente und kostengünstige Testung der Materialien wurde ein Testsystem aufgebaut, anhand dessen die Materialien reproduzierbar getestet werden konnten (Abbildung 11). Das Testsystem untergliedert sich in ein *Pre-Screening* und ein anschließendes *Fein-Screening*. Dabei wurden die Materialien bezüglich ihres Einflusses auf Zellviabilität/Proliferation, Zelladhäsion und Zellmorphologie getestet. Materialien die in diesem *Pre-Screening* gute Resultate lieferten, wurden im folgenden *Fein-Screening* zusätzlich auf ihren Einfluss auf spezifische Zellmarker getestet. Dieses Testsystem ist von Frau Bruns entwickelt worden, um dreidimensional strukturierte Biomaterialien im Hinblick auf die Regeneration peripherer Nerven zu testen. In dieser Arbeit erfolgte das *Pre-Screening* der Materialien (Zytotoxizität, Viabilität/Proliferation) mit Hep-G2 Zellen, einer humanen Leberzelllinie für die Biokompatibilitätstestungen, sowie PC-12 Zellen, als neuronale Modellzelllinie. Für die detaillierte Analyse und Charakterisierung (Fein-

Screening) der Materialien wurden die immortalisierten Schwanzzellen hinzugenommen, die ebenfalls als neuronales Zellmodell dienen. Bei geringen Probenmengen wurde ausschließlich mit den immortalisierten Schwanzzellen gearbeitet, da sie einer *in vivo* Situation am ähnlichsten sind. Die Testung der verschiedenen Biomaterialien und deren Derivate sollten Informationen über ihren Einfluss und ihre Eignung in der Zellkultur liefern.

Die Zellkulturversuche wurden, soweit keine weiteren Angaben gemacht werden, in 96-Lochplatten durchgeführt. In den folgenden Versuchen stellt der „Standard“ die Positivkontrolle dar. Hier handelt es sich um die Kultivierung der jeweiligen Zelllinie ohne die Zugabe zusätzlicher Reagenzien, bzw. um eine unbeschichtete Zellkulturoberfläche. Beim „PLL Standard“ handelt es sich um eine mit Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturoberfläche. Die PLL Beschichtung dient insbesondere dazu, die Zellanhaftung der PC-12 Zellen zu fördern und wird für diese als Standardbeschichtung verwendet.

In die 96-Lochplatten wurden pro Vertiefung entweder 4000 PC-12 bzw. Hep-G2 Zellen oder 3000 immortalisierte Schwanzzellen ausplattiert. Die Zugabe der Polysaccharide erfolgte nach einem Tag Kultivierung der Zellen im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

Die Ergebnisse wurden, wie in Anhang 6.1 beschrieben, statistisch ausgewertet. Nach der Überprüfung der Varianz durch einen F-Test und anschließendem *t-Test* werden die signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Standard in den Abbildungen mit einem Sternchen gekennzeichnet. Das Signifikanzniveau betrug dabei $p < 0,05$. Dargestellt sind in den Graphen die Mittelwerte +/- dem Standardfehler (SEM), mit $n=x$, wobei x für die Anzahl an parallel kultivierten *Wells* steht.

Im Folgenden werden die Untersuchungen zur Zytotoxizität (zellschädigende Wirkung) der Polysaccharide Fucoidan, β -Glucan und deren Derivate sowie der Colominsäure vorgestellt. Überprüft wurde die Lebensfähigkeit der Hep-G2 Zellen und PC-12 Zellen in Anwesenheit der verschiedenen Polysaccharide mittels MIT-Tests (*Pre-Screening*).

4.1.1 Untersuchung der Fucoideane

Im Folgenden wurden die Rohextrakte zweier verschiedener Braunalgen *Fucus vesiculosus* (Fuc) und *Laminaria digitata* (Lam) auf ihre Zytotoxizität in der Zellkultur untersucht. Die Rohextrakte wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Ulber (Fachbereichs Maschinenbau und Verfahrenstechnik, Lehrgebiet Bioverfahrenstechnik, der Technischen Universität Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt. Die Extraktion der Rohstoffe erfolgte dabei nach einer Methode von Descamps et. al (2005). Die *Laminaria* Extrakte enthalten 23 % Fucose und die *Fucus vesiculosus* Extrakte enthalten 33 % Fucose. Die Rohextrakte wurden in Medium gelöst (bei 5 mg/ml war die Sättigung erreicht) und gegen das Kultivierungsmedium ausgetauscht (Anhang 6.2). Nach fünf, sechs und sieben Tagen wurde die Viabilität/Proliferation der Zellen mit dem MTT-Test bestimmt (Anhang 6.4.3). Mit dem MTT-Test wird die Mitochondrienaktivität bestimmt, die Rückschlüsse über die Viabilität/Proliferation der Zellen gibt. Die Viabilität/Pro-liferation der PC-12 Zellen war nach Zugabe der Algen Rohextrakte gegenüber dem Standard verringert (Abbildung 12). Je höher die Konzentration der Extrakte war, desto geringer war die Viabilität der Zellen (siehe Tag 5 und 6).

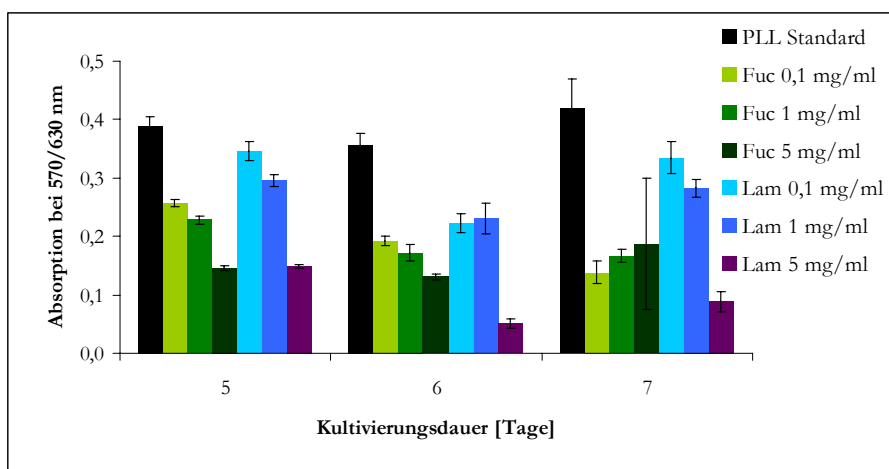


Abbildung 12: Zytotoxizität von *Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata* gegenüber PC-12 Zellen. Über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen wurde die Zytotoxizität mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6).

Für die Hep-G2 Zellen wurde ein vergleichbares Ergebnis erhalten. Die Untersuchung der Zytotoxizität ergab eine verminderte Viabilität/Proliferation der Zellen gegenüber dem Standard (Abbildung 13). Wie auch bei den PC-12 beschrieben, war hier die Viabilität/Proliferation der Zellen ebenfalls umso geringer, je höher die Konzentration der Extrakte war. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass zum Teil ungelöste

Algenextrakte ein Zellwachstum, sowie die Nährstoff- oder Sauerstoffversorgung beeinflussen. Darüber hinaus scheinen die Rohextrakte das Zellwachstum zu inhibieren, bzw. eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen zu haben.

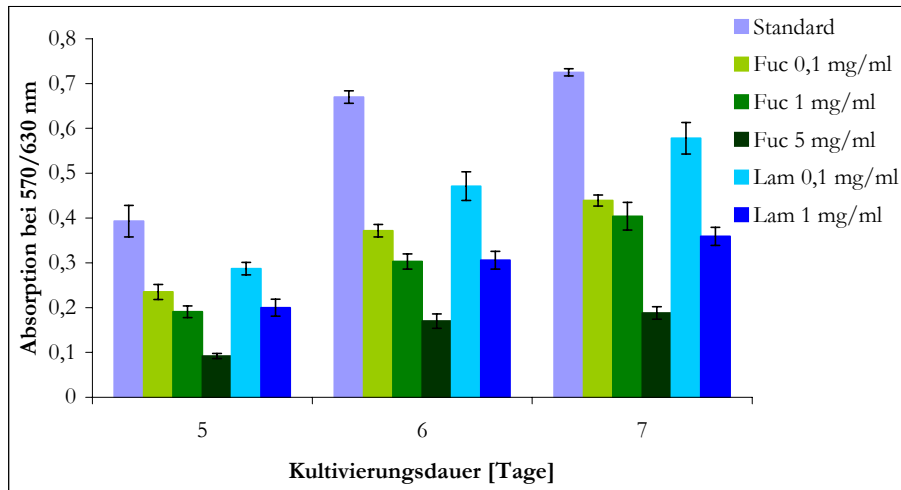


Abbildung 13: Zytotoxizität von *Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata* gegenüber Hep-G2 Zellen.

Untersuchung der Zytotoxizität über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6).

Fazit: Die Rohextrakte der Braunalgen *Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata* wurden auf ihren Einfluss in der Zellkultur getestet. Untersuchungen der Zytotoxizität zeigten eine verminderte Viabilität/Proliferation der Zellen nach der Zugabe der Rohextrakte, insbesondere bei einer Konzentration von 5 mg/ml. Geringe Konzentrationen des Rohextraktes der *Laminaria digitata* zeigten eine geringe Hemmung des Zellwachstums. Die molekulare Masse der Extraktkomponenten variierte zwischen 10 kDa und 500 kDa. Laut Literatur (Deux et al. 2002) wird zwischen niedrigmolekularem Fucoidan (LMW, <100 kDa) und hochmolekularem Fucoidan (HMW, >100 kDa) unterschieden. Die verminderte Viabilität/Proliferation ist wahrscheinlich auf die antiproliferierenden und antitumoralen Eigenschaften des LMW Fucoidans zurückzuführen. So wird z.B. die Proliferation von Fibroblasten und Gefäßmuskelzellen inhibiert (Pereira et al. 1999). Durch Fucoidane wird unter anderem auch die Infektion humaner Zelllinien mit HIV oder Herpesviren geblockt (Patankar et al. 1993). Daher wurde vermutlich auch eine zytotoxische Wirkung der Rohextrakte beobachtet, diese können jedoch auch auf andere Bestandteile des Rohextraktes zurückzuführen sein. Aufgrund der antikoagulatorischen Wirkung, der antitumoralen, antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften, sind die

Fucoidane interessante Polysaccharide für verschiedene pharmakologische Anwendungen. Ein möglicher Einsatz ist die Gabe der Fucoidane bei der Behandlung von Gefäßverengungen nach Stentimplantationen, da LMW Fucoidane die Vergrößerung von Geweben oder Organen durch abnormale Zellproliferation inhibieren (Deux et al. 2002). Aufgrund der beobachteten zytotoxischen Wirkung, sollten die Fucoidane in Konzentrationen unterhalb von 0,1 mg/ml eingesetzt werden. In weiter führenden Versuchen sollte dies näher untersucht werden.

4.1.2 Untersuchung von β -Glucan

Pulver

Nachfolgend ist die Untersuchung der Zytotoxizität von Paramylon, einem β -1,3-Glucan, auf PC-12 und Hep-G2 Zellen dargestellt. Das β -Glucan wurde im Medium dispergiert zu den Zellen gegeben. Nach 4, 6 und 7 Tagen wurde die Viabilität/Proliferation der Zellen mittels MTT-Tests bestimmt (Anhang 6.4.3). Bei den PC-12 Zellen fand an Tag 7 außer auf dem PLL Standard (Anhang 6.4.4) keine Zunahme der Viabilität/Proliferation mehr statt; ein Plateau wurde erreicht. Bei den Hep-G2 Zellen traten keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität/Proliferation zwischen dem Standard und den mit β -Glucan kultivierten Zellen auf (Abbildung 14). Das β -Glucan wirkte weder auf die PC-12 noch auf die Hep-G2 Zellen zytotoxisch. Diese Ergebnisse zeigten, dass ein Einsatz des β -Glucans in der Zellkultur möglich ist. Für den Einsatz im *Tissue Engineering* sollte das Pulver in eine dreidimensionale Form gebracht werden.

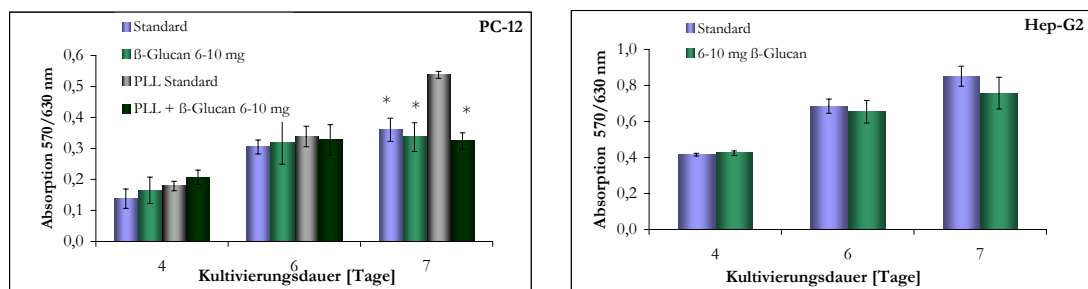


Abbildung 14: Zytotoxizität von β -Glucan auf PC-12 Zellen und Hep-G2 Zellen.

Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen. Gemessen wurde die Viabilität/Proliferation mittels MTT-Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6$), statistisch signifikante Unterschiede mit $p<0.05$ sind mit * gekennzeichnet.

Hydrogel

Durch die Quervernetzung des β -Glucans mit Diepoxyoctan ließ sich ein Hydrogel als Trägersubstanz herstellen. Im Folgenden wurden verschiedene Hydrogele hergestellt und zunächst deren Zytotoxizität getestet. Das β -Glucan Pulver wurde in 1 N Natronlauge gelöst, anschließend wurde die Lösung mit Diepoxyoctan versetzt. Das Gemisch wurde in ein Schnappdeckelgläschen (SB02) oder in eine Petrischale (SB03-SB04) überführt, mit Parafilm abgedeckt und über Nacht stehengelassen. Am nächsten Tag wurde das Gel zweimal mit ddH₂O und zweimal mit Isopropanol gewaschen, um das restliche Diepoxyoctan zu entfernen. Im Anschluss erfolgte eine Dialyse für 5 Tage gegen ddH₂O zur Entfernung von Nebenprodukten. In Tabelle 2 sind die verwendeten Gelansätze dargestellt.

Tabelle 2: Ansätze für die Herstellung von β -Glucan Gelen.

Chemikalie	β - Glucan [mg]	1 N NaOH [mL]	Diepoxyoctan [μ L]
SB02; Schnappdeckelgläschen	100	1000	80
SB03; Petrischale	100	1000	80
SB04; Petrischale	200	2000	160
SB08; strukturiertes Gel	2000	20000	1600

Vor der Testung in der Zellkultur wurden die Gele mit Isopropanol für 20 min desinfiziert und über Nacht in Medium äquilibriert. Jeweils ein kleines Stück des Gels wurde in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte zu den ausplattierten Zellen gegeben. In Abbildung 15 ist das Ergebnis der Zytotoxizitätsbestimmung der Gele auf PC-12 und Hep-G2 Zellen gezeigt. Über den Kultivierungszeitraum von 7 Tagen war eine Zunahme der Viabilität/Proliferation beider Zelllinien zu verzeichnen. Bei den Hep-G2 Zellen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Standard (ohne Zugabe von β -Glucan) und den mit den verschiedenen β -Glucan Gelen kultivierten Zellen beobachtet (Abbildung 16). Bei den PC-12 Zellen war die Viabilität der Zellen an Tag 6 und 7 bei der Zugabe des Gels SB03 signifikant höher als beim Standard. Im Vergleich zum PLL Standard waren jedoch keine signifikanten (Anhang 6.1) Unterschiede zu beobachten. Das Diepoxyoctan eignete sich zur Quervernetzung des Glucans, die Produkte waren nicht zytotoxisch. Eine Besiedlung der Gele war erfolglos, es wurde

eine geringe Viabilität/Proliferation erreicht (Daten nicht gezeigt). Die Oberfläche der Gele war vermutlich zu glatt, so dass eine Zellanhaftung nicht möglich war.

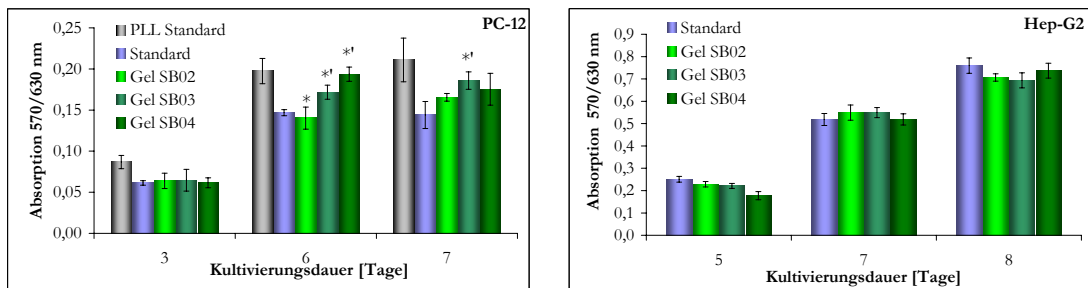


Abbildung 15: Zytotoxizität von verschiedenen β -Glucan Gelen auf PC-12 Zellen und Hep-G2 Zellen.

Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6$), statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ im Vergleich zum Standard sind mit *' und im Vergleich zum PLL Standard mit * gekennzeichnet.

Strukturierte β -Glucan Gele

Die Oberfläche der Materialien, die für die Zellkultivierung und das *Tissue Engineering* eingesetzt werden, spielt eine entscheidene Rolle für die Anhaftung der Zellen und deren Wachstum. Bei Gelen ist es auch üblich die Zellen in das Gel einzubetten und so die Zellen dreidimensional zu kultivieren. Bekannte Beispiele sind Agarose (Stokols and Tuszyński 2004) oder Alginat (Coward et al. 2005; Rowley et al. 1999; Wang et al. 2003). Auch in Kollagen (Matrigel) lassen sich Zellen problemlos einbetten. Da für die Darstellung des β -Glucan Gels das Diepoxyoctan, ein toxischer Quervernetzer eingesetzt wurde, ist die *in situ* Einbettung von Zellen in diesem Fall nicht möglich. Um eine strukturierte Oberfläche zu erhalten, wurden die Gele bei der Herstellung in eine strukturierte Form gegossen, um so eine bessere Anhaftung der Zellen durch die gebildete Oberflächenstrukturierung zu ermöglichen (Abbildung 16).

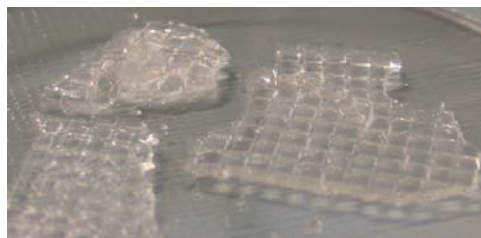


Abbildung 16: Strukturiertes β -Glucan Gel.

Das strukturierte Gel SB08 wurde wie in Tabelle 2 aufgeführt hergestellt. Für die Zellkulturexperimente wurde das Gel mit einem 6 mm Lochsisen auf den Durchmesser der Vertiefung einer 96-Lochplatte zugestanzt. Vor der Besiedlung wurde das Gel mit Isopropanol für 20 min desinfiziert und über Nacht in Medium eingelegt. Anschließend erfolgte die Besiedlung mit jeweils 5000 Zellen pro Gelmatrix. Die Viabilität/Proliferation wurde mittels MTT-Tests nach 7, 9, 14 Tagen ermittelt.

Die PC-12 Zellen zeigten über den Kultivierungszeitraum von 14 Tagen eine deutliche Zunahme der Viabilität/Proliferation auf dem Gel. Bei den Hep-G2 Zellen war die Zunahme der Viabilität/Proliferation deutlich geringer (Abbildung 17). Der Vergleich mit einem Standard war an dieser Stelle nicht möglich.

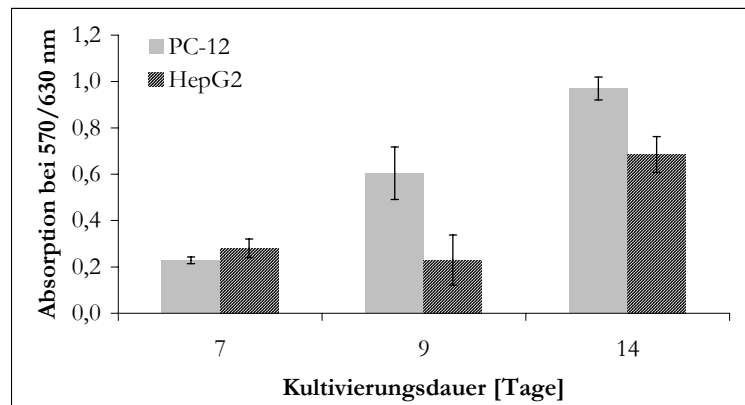


Abbildung 17: Viabilität/Proliferation der PC-12 bzw. Hep-G2 Zellen auf einem strukturierten β -Glucan Gel.

Bestimmt wurde die Viabilität/Proliferation nach 7, 9 und 14 Tagen mittels MTT-Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=5).

Fazit: Ziel der Untersuchungen war es das Polysaccharid β -Glucan, gewonnen aus *Englena gracilis*, für Anwendungen in der Zellkultur und im *Tissue Engineering* zu testen. Die Untersuchungen der Zytotoxizität zeigten, dass das β -1,3-Glucan (Paramylon) in der Zellkultur eingesetzt werden kann, da es keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen ausübte. Des Weiteren war eine Quervernetzung des Glucans möglich, es kann somit in ein unlösliches Hydrogel überführt werden, welches ebenfalls keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hatte. Der Einsatz des Gels als Trägersubstanz für das *Tissue Engineering* war jedoch nur nach der Strukturierung des Gels möglich. Die Porosität und Rauigkeit des Materials spielt eine entscheidende Rolle für die Besiedlung und das Wachstum der Zellen; aufgequollene glatte Materialien erlauben nur eine geringe Zellanhaftung. Kompositmaterialien aus Gelatine und Glucan mit Porengrößen von 90

bis 150 μm zeigen hingegen z.B. eine Förderung der Reepithelialisierung eines Hautdefektes (Lee et al. 2003).

Die Verwendung der Glucane im medizinischen Bereich für die Krebsbehandlung und in der Pharmazie als Wundauflage oder zur Stärkung der Immunabwehr zeigen die Relevanz der Glucane (Miura et al. 1999; Wolk and Danon 1985). In Abschnitt 4.2 werden weitere Untersuchungen zum β -Glucan vorgestellt, bei denen das β -Glucan als Beschichtungsreagenz eingesetzt und anschließend besiedelt wurde. Dabei wurde das Wachstum der Zellen auf dem β -Glucan mit etablierten Beschichtungsreagenzien verglichen.

4.1.3 Untersuchung der Colominsäure

Im Folgenden wurde die Zytotoxizität von verschiedenen Colominsäure (CA) Konzentrationen (0,1-10 mg/ml) auf PC-12 und Hep-G2 Zellen untersucht. Die Zytotoxizität des gelösten Pulvers wurde mittels MTT-Tests über einen Zeitraum von 7 Tagen untersucht.

In Abbildung 18 ist das Ergebnis der Zytotoxizitätsuntersuchungen auf die PC-12 Zellen dargestellt. An Tag 1, 2 und 4 waren keine deutlichen Unterschiede zwischen dem PLL Standard (PLL beschichtete Oberfläche) und den unterschiedlichen Colominsäure Konzentrationen zu beobachten. Ab Tag 7 zeigte sich eine leicht erhöhte Viabilität/Proliferation der Zellen auf dem PLL Standard gegenüber der Zugabe von CA. Die geringste Viabilität/Proliferation hatten die Zellen tendenziell bei der Zugabe von 10 mg/ml CA. Für die Hep-G2 Zellen wurde ein ähnlicher Verlauf der Viabilität/Proliferation beobachtet (Abbildung 19). An Tag 7 wurden im Bereich von 0,1-5 mg/ml höhere Viabilität/Proliferation als auf dem PLL Standard und dem Standard erreicht.

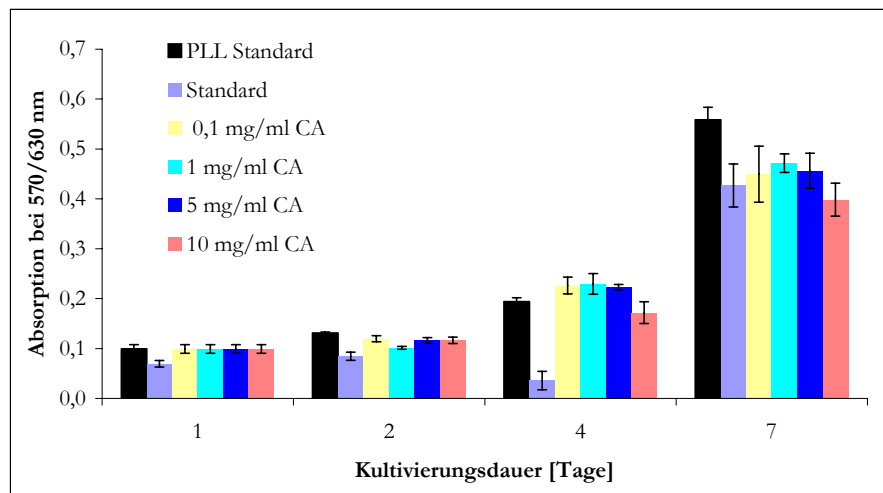


Abbildung 18: Zytotoxische Analyse von Colominsäure auf PC-12 Zellen.

Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen. Zur besseren Zellanhaftung wurden die Zellkulturoberflächen mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$).

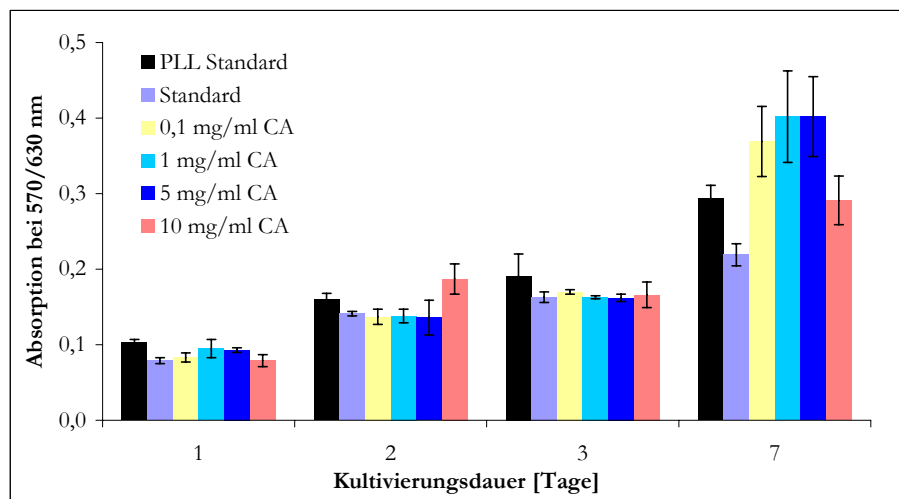


Abbildung 19: Zytotoxische Analyse von Colominsäure auf Hep-G2 Zellen.

Die Kultivierung erfolgte über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=4$).

Untersuchung auf Colominsäure beschichteten Zellkulturoberflächen

Nachdem festgestellt wurde, dass die Colominsäure keine zytotoxischen Effekte aufweist, wurde die Viabilität/Proliferation der Zellen auf den mit dem Polysaccharid beschichteten Zellkulturoberflächen untersucht. Neben der kommerziell erworbenen Colominsäure wurde die im Rahmen der Doktorarbeit von Bastian Rode am Institut für Technische Chemie (Rode) in *E.coli* K1 hergestellte Colominsäure, im Folgenden als PSA-K1 bezeichnet, getestet (Anhang 6.4.4). Die Beschichtungseffizienz mit CA und

die Anlagerung der CA an eine Zellkulturoberfläche wurde über Immunozytochemie sichtbar gemacht. Der Einfluss unterschiedlicher CA Konzentrationen in der Lösung auf die Menge an adsorbierter CA an die Zellkulturoberfläche wurde hingegen mit einem direkten ELISA nachgewiesen (Anhang 6.4.5). Für die beiden Detektionsmethoden wurde der PSA spezifische Antikörper mAK 735 verwendet. Der Maus IgM monoklonale Antikörper ist spezifisch für PSA und wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Gerardy-Schahn (Zelluläre Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

Quantitativer Nachweis der CA-Beschichtung durch Immunozytochemie

Die Vertiefungen einer 96-Lochplatte wurden mit 40 μ l einer CA-Lösung (5 mg/ml) bedeckt und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der ELISA durchgeführt (Anhang 6.4.5). Die Detektion erfolgte dabei über einen sekundären Cy-3 gekoppelten Maus IgG Antikörper und wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops bei 535 nm sichtbar gemacht.

Die Untersuchung der Colominsäurebeschichtungen mit Hilfe der Immunozytochemie zeigte eine nahezu homogene Beschichtung der Zellkulturoberfläche bei der Verwendung einer Colominsäurelösung von 5 mg/ml. Auf einer unbeschichteten Zellkulturoberfläche (Kontrolle) konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 20 ist das Fluoreszenzsignal von adsorbierter CA auf der Zellkulturoberfläche in zwei unterschiedlichen Bildausschnitten dargestellt.

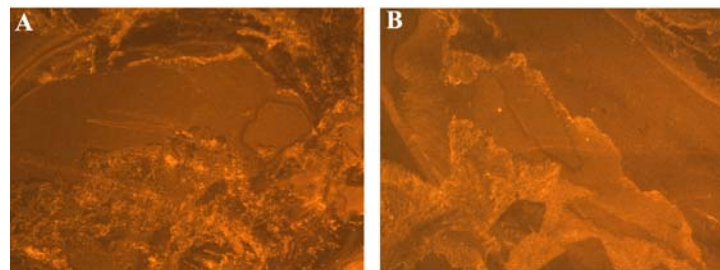


Abbildung 20: Darstellung der CA Beschichtung auf einer Zellkulturoberfläche mittels Immunozytochemie.

Die Detektion erfolgte über einen Cy-3 gekoppelten Antikörper nach der Beschichtung der Oberfläche mit 5 mg/ml CA-Lösung (400fache Vergrößerung). Die negative Kontrolle, eine unbeschichtete Oberfläche, ergab ein schwarzes Bild (Daten nicht gezeigt).

Quantitativer Nachweis der Beschichtungseffizienz mittels ELISAs

Die Vertiefungen einer 96-Lochplatte wurde mit jeweils 40 μ l CA-Lösung (2,5 mg/ml bis 20 mg/ml) bzw. PSA-K1 (5, 10 mg/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet (Anhang 6.4.4). Die Lösungen wurden abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Durchführung des ELISAs wobei die Detektion über eine Farbreaktion (Absorption bei 405 nm) erfolgte.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse zu den Beschichtungsuntersuchungen unter der Verwendung verschiedener CA Konzentrationen (Abbildung 21 links) dargestellt. Die Antikörperbindung schien dabei direkt proportional zur CA Konzentration zu sein, wobei der Anstieg bei 20 mg/ml nicht mehr so deutlich war. In Abbildung 21 rechts ist das ELISA-Ergebnis der PSA-K1 im Vergleich zu CA dargestellt. Unter der Verwendung der gleichen CA/PSA-K1 Konzentrationen wurden für PSA-K1 deutlich höhere Absorptionswerte detektiert. Die Unterschiede könnten durch unterschiedliches Adsorptionsverhalten der PSA-K1 gegenüber der CA erklärt werden. Die kommerziell erworbene CA (ca. 40 DP) und die PSA-K1 (130 DP) besitzen unterschiedliche Kettenlängen. Zu dem Zeitpunkt der Untersuchungen war nicht abschließend geklärt, ob sich z.B. ein Lipidanker an der PSA-K1 befand, der eventuell Einfluss auf das Adsorptionsverhalten des Polysaccharides hat.

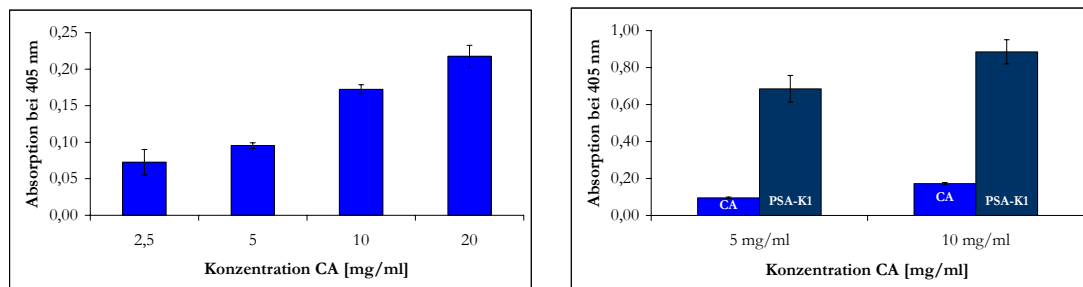


Abbildung 21: Untersuchung der CA/PSA-K1 Beschichtung auf einer Zellkulturoberfläche mittels eines direkten ELISAs.

Links ist die Absorption in Abhängigkeit verschiedener CA Konzentrationen dargestellt, rechts in Abhängigkeit verschiedener CA/PSA-K1 Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=4).

Viabilität/Proliferation

Die mit CA-Lösung (5 mg/ml) bzw. PSA-K1-Lösung (5 mg/ml) beschichteten Vertiefungen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösungen wurden abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen. Nach 1, 5, 6 und 7 Tagen wurde die Viabilität/Proliferation der PC-12, Hep-G2 und ISC auf den

beschichteten Zellkulturoberflächen bestimmt. In Abbildung 22 ist das Ergebnis der Viabilitäts-/Proliferationsbestimmung dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen der Beschichtung mit CA oder PSA-K1 und dem Standard traten nicht auf (Abbildung 22). Bei den ISC war die Viabilität/Proliferation an Tag 6 am höchsten. An Tag 7 sank sie leicht ab, da die stark proliferierenden ISC bereits nach 6 Tagen konfluent waren. Auch bei den ISC traten keine signifikanten Unterschiede in der Viabilität/Proliferation auf den verschiedenen Beschichtungen auf.

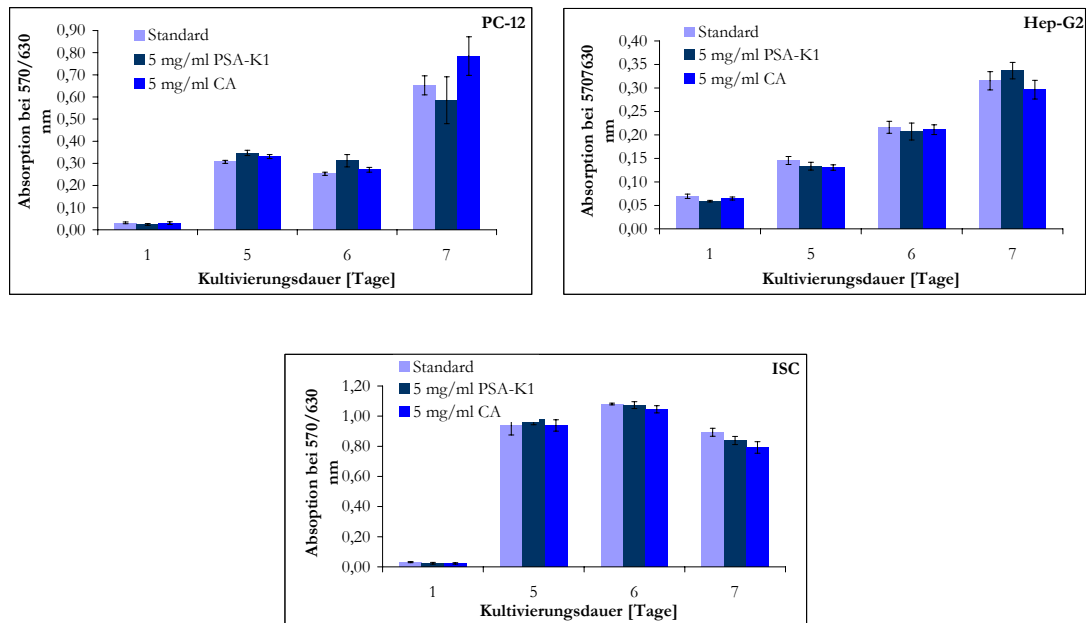


Abbildung 22: Viabilität/Proliferation der PC-12, Hep-G2 und ISC auf CA/PSA-K1 beschichteten Zellkulturoberflächen. Die Bestimmung erfolgte mittels MTT-Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6).

Fazit: Ziel der Untersuchungen war es, die Zytotoxizität der Colominsäure bzw. PSA-K1 auf verschiedene Zellsysteme zu testen, die CA und PSA-K1 Beschichtungen nachzuweisen und die Viabilität/Proliferation verschiedener Zelllinien auf den Beschichtungen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass die Colominsäure keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen hatte, wenn sie als im Medium gelöstes Pulver zugesetzt wurde. Bei Konzentrationen von 10 mg/ml im Medium schien die Viabilität/Proliferation der Zellen etwas verringert zu sein.

Durch die Immunocytochemie und den direkten ELISA konnte die Beschichtung der Zellkulturoberfläche mit CA und PSA-K1 nachgewiesen werden. Für PSA-K1 wurden dabei deutlich höhere Absorptionswerte detektiert.

Die Beschichtung mit PSA-K1 scheint somit besser zu sein. Ein Grund für eine bessere Beschichtung könnte ein Lipidanker sein, der an der PSA-K1 gebunden sein kann. Da die immunozytochemische Untersuchung der Beschichtung eine homogene Oberfläche bei der Verwendung von 5 mg/ml CA Lösung zeigte und die Ergebnisse der zytotoxischen Untersuchungen bei Konzentrationen von über 5 mg/ml CA eine verminderte Viabilität/Proliferation der Zellen zeigten, wurden für die nachfolgenden Versuche Konzentrationen von 5 mg/ml eingesetzt. Alle drei verwendeten Zelllinien wuchsen auf den beschichteten Oberflächen, Unterschiede in den Zellviabilität/Proliferation im Vergleich zum Standard konnten nicht beobachtet werden. Ähnliche Untersuchungen wurden im Rahmen der Forschergruppe unter der Verwendung von primären neuronalen Zellsystemen vorgestellt, wobei ebenfalls kein zytotoxischer Effekt der CA nachgewiesen werden konnte (Haile et al. 2007).

4.2 Untersuchung von Colominsäure Beschichtungen im Vergleich zu etablierten Zellkulturbeschichtungen

Im Folgenden wurde das Wachstum der Zellen auf mit Colominsäure beschichteten Zellkulturoberflächen näher untersucht und mit dem Wachstum der Zellen auf etablierten Zellkulturbeschichtungen verglichen (Anhang 6.4.4). Dabei wurden etablierte Beschichtungen wie Kollagen I und Hyaluronsäure gewählt (Hwang et al. 2005). Hier wurde nach dem Testsystem vorgegangen, welches in Abbildung 11 auf Seite 25 vorgestellt wurde. Zunächst erfolgten Untersuchungen der Viabilität/Proliferation und der Zelladhäsion, dann folgte die Analyse spezifischer Zellmarker und der Proliferation.

Viabilität/Proliferation

In Abbildung 23 und Abbildung 24 ist die Viabilität/Proliferation der Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen dargestellt. Sowohl bei den PC-12 als auch bei den Hep-G2 Zellen wurde eine ähnliche Viabilität/Proliferation der Zellen auf Colominsäure und Hyaluronsäure im Vergleich zum Standard erreicht. Nur an Tag sieben erreichten die PC-12 Zellen hier eine signifikant höhere Viabilität/Proliferation als auf dem Standard. Die signifikant höchste Viabilität/Proliferation erreichten die PC-12 Zellen auf den in der Zellkultur etablierten Beschichtungen von PLL (Aykin-Burns et al. 2005) und Kollagen. Das extrazelluläre Matrix Protein Kollagen ist bekannt für seine adhäsionsfördernde Wirkung (Nagai et al. 2002; Yashiki et al. 2001) und wurde

unter anderem auch für die Regeneration peripherer Nerven eingesetzt (Wang et al. 1993).

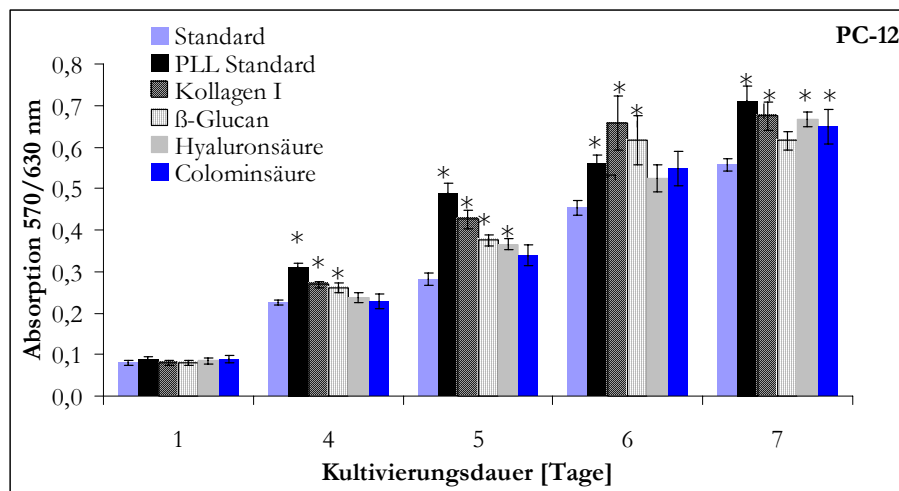


Abbildung 23: Viabilität/Proliferation der PC-12 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.

Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen und die Bestimmung der Viabilität/Proliferation erfolgte mittels MTT-Tests. Die PC-12 Zellen wurden auf eine Standard (unbeschichtete Zellkulturoberfläche), PLL Standard (mit Poly-L-Lysin beschichtete Oberfläche), Kollagen I, β-Glucan, Hyaluronsäure und Colominsäure ausplattiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM (n=6), statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit * gekennzeichnet.

Im Gegensatz zu den PC-12 Zellen erreichten die Hep-G2 Zellen auf PLL eine Viabilität/Proliferation wie bei der Verwendung einer unbeschichteten Standardzellkulturoberfläche. Bestätigt wurde der Verlauf der Viabilität/Proliferation durch die Messung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion für die Hep-G2 Zellen (Abbildung 29, S. 43). Auf β-Glucan, dessen Eignung in der Zellkultur in Abschnitt 4.1.2 gezeigt wurde, erreichen insbesondere die Hep-G2 Zellen eine hohe Viabilität/Proliferation.

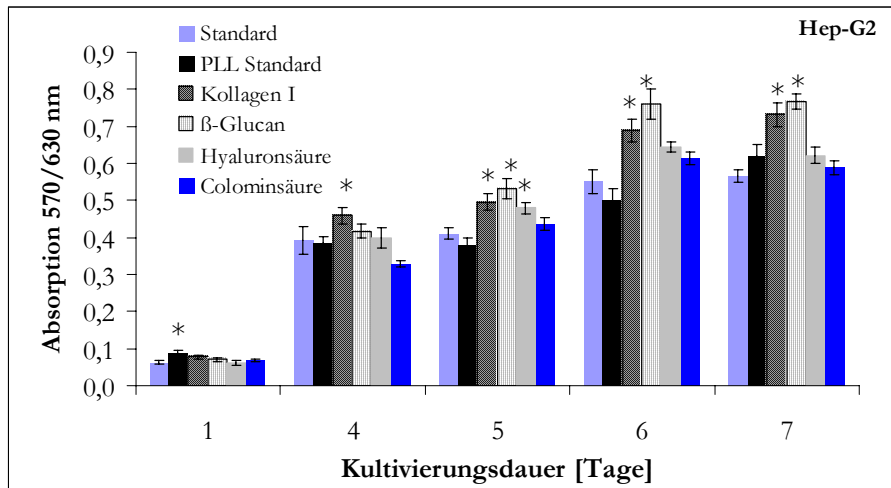


Abbildung 24: Viabilität/Proliferation von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.

Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 7 Tagen, die Bestimmung der Viabilität/Proliferation erfolgte mittels MTT-Tests. Die Hep-G2 Zellen wurden auf einen Standard, PLL Standard, Kollagen I, β -Glucan, Hyaluronsäure und Colominsäure ausplattiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6$), statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ sind mit * gekennzeichnet.

Zelladhäsion

Das Adhäsionsverhalten der Zellen auf den unterschiedlichen Beschichtungen wurde nach 2 h und 24 h mittels Zellkernfärbung durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI untersucht (Anhang 6.4.8). Pro Vertiefung wurden jeweils 40.000 PC-12 bzw. Hep-G2 Zellen ausplattiert und für 2 h und 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert bevor die DAPI-Färbung erfolgte.

In Abbildung 25 ist das Ergebnis der DAPI-Färbung der PC-12 Zellen und in Abbildung 26 die Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen nach 2 h und 24 h dargestellt. Die DAPI-Färbungen zeigten eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf den unterschiedlichen Zellkulturoberflächen. Auf β -Glucan (D) und Colominsäure (F) bildeten die Zellen große Ansammlungen. Nach 2 h Stunden adhärten relativ wenige Zellen auf der Oberfläche, die höchste Zellzahl wurde auf PLL gefunden. Nach 24 h war die Zahl der adhärten Zellen gestiegen. Die PC-12 Zellen, waren ursprünglich Suspensionszellen, daher benötigten sie vermutlich mehr als zwei Stunden, um an den Oberflächen zu adhärten und spreiteten auch nur gering. Dieses Verhalten führt auch zur Bildung der Zellansammlungen, wie sie auf den DAPI-Bildern zu beobachten sind. Die großen Standardabweichungen beruhen auf der Bildung großer Zellansammlungen. (Abbildung 26).

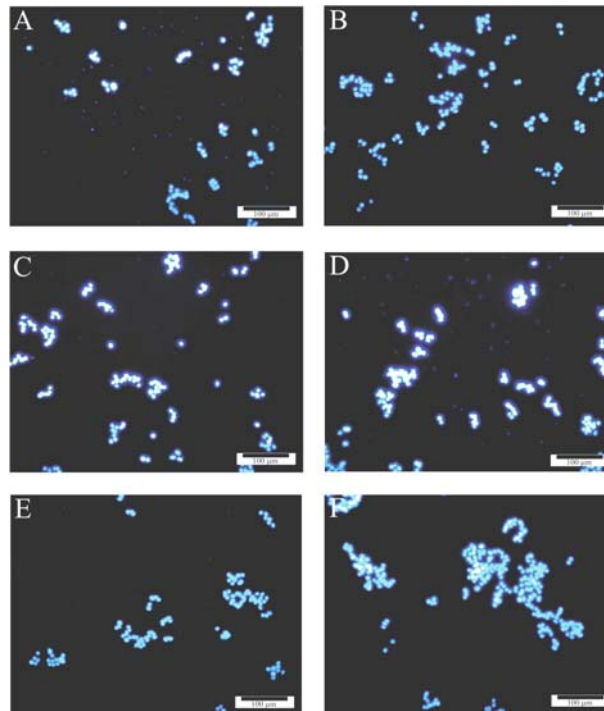


Abbildung 25: DAPI-Färbung von PC-12 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen. Ausplattiert wurden 40.000 Zellen, die Fluoreszenzaufnahmen (A-F) zeigen das Ergebnis der DAPI-Färbung nach 24 h auf einer unbeschichteten Zellkulturoberfläche (A), Poly-L-Lysin (B), Kollagen I (C), β -Glucan (D), Hyaluronsäure (E) und Colominsäure (F) bei 200facher Vergrößerung.

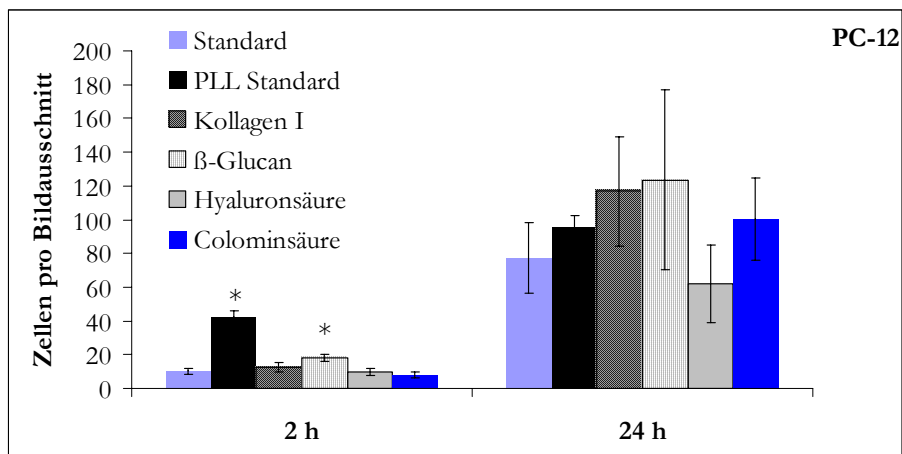


Abbildung 26: Zelladhäsion von PC-12 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen. 40.000 Zellen wurden auf einer unbeschichteten Zellkulturoberfläche (Standard) und verschiedenen beschichteten Zellkulturoberflächen ausplattiert: Poly-L-Lysin, Kollagen I, β -Glucan, Hyaluronsäure und Colominsäure. Nach einer Inkubationszeit von 2 h und 24 h wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Pro Material wurden sechs Aufnahmen gemacht und die Zellkerne pro Bildausschnitt gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6), statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ sind mit * gekennzeichnet.

In Abbildung 27 ist das Ergebnis der DAPI-Färbung und in Abbildung 28 die Auswertung der Zelladhäsion für die Hep-G2 Zellen dargestellt.

Für die Hep-G2 Zellen wurden sowohl nach 2 h als auch nach 24 h vergleichbare Werte für die Zelladhäsion auf den unterschiedlichen Beschichtungen erhalten. Die Zellen zeigten nur auf der Hyaluronsäure nach 2 h eine verminderte Adhäsion. Hier waren 18 Zellen pro Bildausschnitt adhäriert, während auf den anderen Beschichtungen zwischen 39 und 44 Zellen gezählt wurden. Nach 24 h waren keine signifikanten ($p < 0.05$) Unterschiede zwischen den Zellen auf HA (44 pro Bildausschnitt) und den anderen Beschichtungen (46-57 Zellen pro Bildausschnitte) zu beobachten (Abbildung 28). Das geringe Adhäsionsverhalten von Zellen auf HA ist bereits in der Literatur beschreiben. Daher wurden HA Beschichtungen genutzt, um der Adhäsion nach chirurgischen Eingriffen vorzubeugen (Mitchell et al. 1994) oder um die Adhäsion von Blutplättchen und Thrombusbildung auf *Stents* zu reduzieren (Verheye et al. 2000). Die Ergebnisse der DAPI-Färbung zeigten eine gleichmäßige Besiedlung der Oberfläche auf dem Standard, PLL und Kollagen. Auf β -Glucan, Hyaluronsäure und Colominsäure findet wie auch bei den PC-12 Zellen die Ausbildung von Zellagglomeraten statt (vergleiche Abbildung 27 mit Abbildung 25). Die unterschiedlichen Beschichtungen beeinflussen die initiale Anheftung der Zellen, daher sind Unterschiede in den Zellzahlen nach 2 h und 24 h besonders deutlich. Die Studie zeigte vergleichbar gute Zelladhäsionen auf den Zielmaterialien CA und β -Glucan im Vergleich zu den Standardzellkulturoberflächen. Modifikationen der Materialien könnten die initiale Besiedlung mit Zellen in den ersten 24 h verbessern.

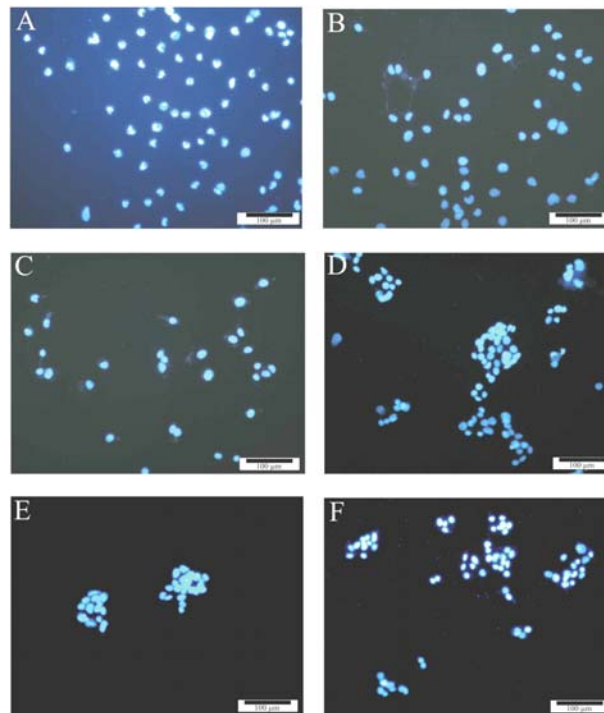


Abbildung 27: DAPI-Färbung von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen. 40.000 Zellen wurden ausplattiert. Die Fluoreszenzaufnahmen (A-F) zeigen das Ergebnis der DAPI-Färbung nach 24 h auf einer unbeschichteten Zellkulturoberfläche (A), Poly-L-Lysin (B), Kollagen I (C), β -Glucan (D), Hyaluronsäure (E) und Colominsäure (F) bei 200facher Vergrößerung.

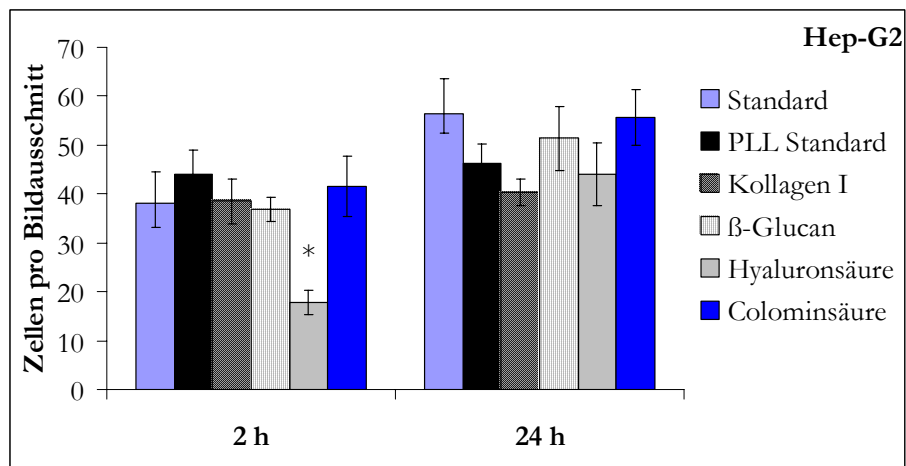


Abbildung 28: Zelladhäsion von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen. 40.000 Zellen wurden auf einer unbeschichteten Zellkulturoberfläche (Standard und verschiedenen beschichteten Zellkulturoberflächen) ausplattiert: Poly-L-Lysin, Kollagen I, β -Glucan, Hyaluronsäure und Colominsäure. Nach einer Inkubationszeit von 2 h und 24 h wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Sechs Aufnahmen wurden gemacht und die Zellkerne pro Bildausschnitt gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6), statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ sind mit * gekennzeichnet.

Glukose/Laktatbestimmung

Die Hep-G2 Zellen wurden wie in Abschnitt 4.2 beschrieben in beschichtete 96-Lochplatten ausplattiert und kultiviert. An Tag 3, 5, 7 und 10 wurden der Glukose und der Laktatgehalt im Zellkulturmedium bestimmt. Aus den Messungen wurden der kumulative Glukoseverbrauch und die kumulative Laktatproduktion berechnet (Anhang 6.4.10). In Abbildung 29 ist das Ergebnis der Berechnungen dargestellt.

Es wurde ein vergleichbarer Verlauf wie bei der Bestimmung der Viabilität/Proliferation erhalten (Abbildung 24). Die Hep-G2 Zellen verbrauchten auf PLL am Tag 7 und 10 am wenigsten Glukose und zeigten hier auch im Vergleich zu der Kollagen und β -Glucan Beschichtung eine geringere Viabilität/Proliferation. Untersuchungen der Zellproliferation mittels BrdU zeigten auch eine verminderte Proliferation der Zellen auf PLL gegenüber Kollagen, β -Glucan und HA, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (vergl. Tabelle 3, S.50)

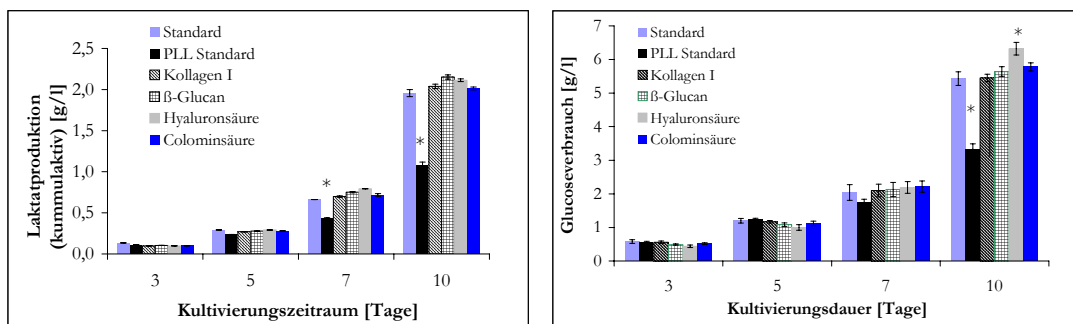


Abbildung 29: Laktatproduktion und Glukoseverbrauch von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen. Die Bestimmung erfolgte innerhalb eines Kultivierungszeitraums von 10 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6$), statistisch signifikante Unterschiede mit $p<0.05$ sind mit * gekennzeichnet.

Neuritenausbildung der PC-12 Zellen

Die Ausbildung der Neuriten der PC-12 Zellen wurde nach 5 Tagen Kultivierung der Zellen auf den unterschiedlichen Beschichtungen bestimmt. Dazu wurden 40.000 Zellen in die unterschiedlich beschichteten Vertiefungen einer 24-Lochplatte ausplattiert. Nach zwei Tagen Kultivierung erfolgte der Wechsel auf Differenzierungsmedium (Anhang 6.2). Nach weiteren drei Tagen Stimulierung der Zellen mit dem Nervenwachstumsfaktor (NGF) wurde die Länge der Neuriten vermessen (Anhang 6.4.11). Zusätzlich wurde die Zahl der Zellen gezählt, die Neuriten ausbilden.

In Abbildung 30 sind die PC-12, kultiviert ohne die Zugabe des Nervenwachstumsfaktors, im Phasenkontrast dargestellt. Ohne die Zugabe von NGF fand keine Neuritenausbildung statt. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 31 die Ausbildung der Neuriten auf den verschiedenen Beschichtungen dargestellt. Auf der PLL Beschichtung sah man deutlich die Ausbildung der Neuriten, die ohne die Zugabe von NGF nicht vorhanden sind (vergl. Abbildung 30 mit Abbildung 31). Die Länge der Neuriten lag nach drei Tagen zwischen 11 μm auf der Kollagen Beschichtung und 19 μm auf β -Glucan. Die Anzahl der Neuriten ausbildenden Zellen lag zwischen 2 auf Colominsäure und 22 auf PLL beschichteten Oberflächen.

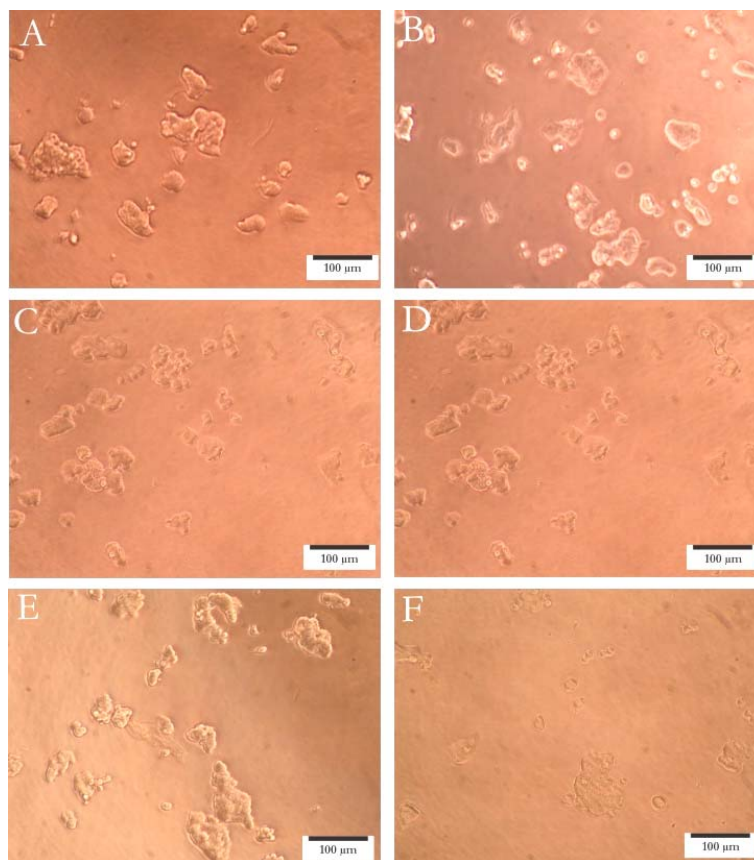


Abbildung 30: Phasenkontrastaufnahme von PC-12 auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen.
PC-12 auf einer unbeschichteten Oberfläche (A), Poly-L-Lysin (B), Kollagen I (C), β -Glucan (D), Hyaluronsäure (E), Colominsäure (F) ohne Zugabe von NGF bei 200facher Vergrößerung.

Die prozentuale Anteil an Neuriten ausbildenden Zellen war auf Kollagen und PLL Beschichtungen am höchsten. Auf den anderen Beschichtungen war der Anteil an Neuriten ausbildenden Zellen vergleichbar mit dem Standard. Auf β -Glucan bildeten ca. 32 % der Zellen Neuriten aus. Im Gegensatz dazu bildeten 86 % der Zellen auf PLL Neuriten. Auf Colominsäure bildeten ca. 37 % der Zellen Neuriten, die Länge der Neuriten betrug 18 μm , wie bei den Zellen auf PLL (siehe Abbildung 32). Dass Colominsäure die Neuritenausbildung inhibieren kann wurde bereits in der Literatur beschrieben (Rauvala 1984). Hier fand eine Inhibierung des Neuritenwachstums in der Weise statt, dass die Anzahl der Zellen, die Neuriten ausbildeten, geringer war als bei PLL und Kollagen. Untypisch war die Neuritenlänge der Zellen auf Kollagen. Kollagen wird eingesetzt, um das Neuritenwachstum zu stimulieren, daher wurde die Ausbildung längerer Neuriten erwartet. Die Gabe des Wachstumsfaktors kann nicht optimal erfolgt sein oder der Zeitpunkt der Neuritenmessung war eventuell ungünstig gewählt. Durch eine Optimierung des Mediums könnten an dieser Stelle eindeutigere Ergebnisse erzielt werden. Untersuchungen zeigten z.B., dass Ionen wie Eisen und Magnesium einen starken Einfluss auf die Neuritenausbildung haben (Turner et al. 1987; Yoo et al. 2004) und das das Neuritenwachstum fördern.

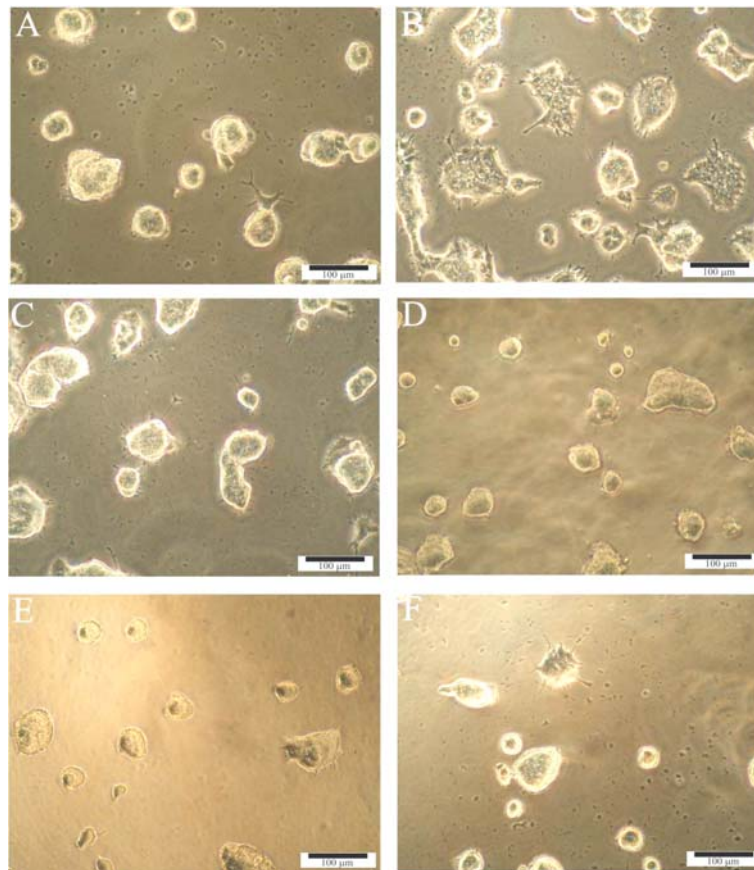


Abbildung 31: Phasenkontrastaufnahme von PC-12 nach Stimulation mit NGF auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen. PC-12 wurden auf einer unbeschichteten Oberfläche (A), Poly-L-Lysin (B), Kollagen I (C), β -Glucan (D), Hyaluronsäure (E), Colominsäure (F) kultiviert und für 3 Tagen mit NGF (100 ng/ml) stimuliert, 200fache Vergrößerung.

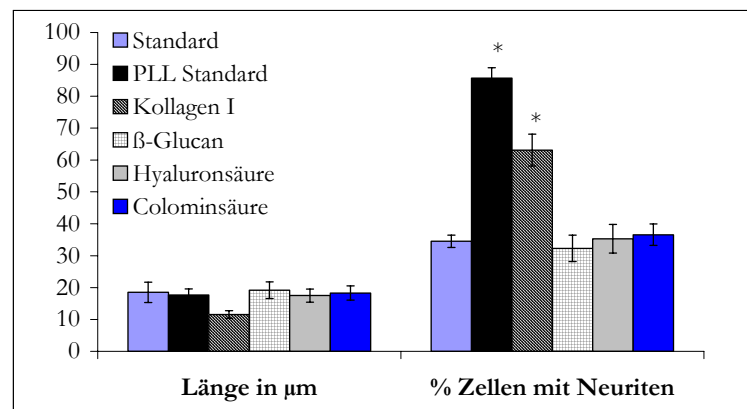


Abbildung 32: Neuritenausbildung der PC-12 Zellen nach drei Tagen Stimulierung mit NGF (100 ng/ml). Die Werte repräsentieren den Mittelwert der Neuritenlänge (μm) von 40 Neuriten im Vergleich zu dem Prozentsatz von Zellen die Neuriten ausbilden. Die Werte wurden mit dem Standard verglichen und statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ wurden mit einem * gekennzeichnet.

Proliferation

Ergänzend zum MTT-Test wurde die Proliferation der Zellen auf den unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen mittels BrdU-Assay (Anhang 6.4.12) nach 4, 5 und 7 Tagen bestimmt. Zusätzlich zu den zuvor untersuchten Beschichtungen wurden weitere Oberflächenbeschichtungen mit PSA-K1 und Laminin untersucht (Anhang 6.4.4). Auf die Darstellung der Graphik wurde verzichtet, nur die signifikanten Unterschiede werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse nach der Überprüfung der Varianz durch einen F-Test und anschließendem *t-Test* für die PC-12 Zellen tabellarisch dargestellt. Unterschiede mit $p < 0.05$ wurden mit einem Stern (*) versehen (Anhang 6.1), (*↓signifikant niedriger, *↑signifikant höher). Die PC-12 Zellen proliferierten auf allen Beschichtungen. Signifikante Unterschiede waren vor allem an Tag 4 zwischen den Standards und dem β -Glucan zu beobachten. Die geringste Proliferation zeigten die Zellen an allen Tagen auf Laminin, sie war signifikant niedriger als auf der Standardzellkulturoberfläche.

Tabelle 3: Statistische Auswertung des Proliferationsassays von PC-12 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen.
 Jeweils 4000 Zellen wurden pro Vertiefung ausplattiert. Die Werte wurden mit dem Standard verglichen und statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ wurden mit einem (*) gekennzeichnet mit *↓signifikant niedriger, *↑signifikant höher.

Tag		PLL	Koll I	β -Glucan	HA	CA	PSA-K1	Laminin
4	Standard	-	-	*↑	*↑	-	*↓	*↓
	PLL Stand.	-	-	*↑	-	-	-	-
5	Standard	*↓	-	*↑	-	*↑	*↑	*↓
	PLL Stand.	-	-	-	-	-	-	*↓
7	Standard	-	-	-	-	-	-	*↓
	PLLStand.	-	-	-	*↓	*↓	-	*↓

Phasenkontrastaufnahmen von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen

In Abbildung 33 sind Hep-G2 Zellen im Phasenkontrast auf den unterschiedlichen Beschichtungen dargestellt. Da der Unterschied in den Zellmorphologien bei den Hep-G2 Zellen am stärksten war, sind die Ergebnisse für die PC-12 und ICS hier nicht dargestellt, wobei auch hier geringe Unterschiede beobachtet worden sind. Insbesondere auf PLL und Kollagen zeigten die Hep-G2 Zellen eine gleichmäßige Besiedlung der

Oberfläche. Die Zellen spreiteten stärker als auf allen anderen Beschichtungen, wo ein deutliches Wachstum in Zellansammlungen zu beobachten war.

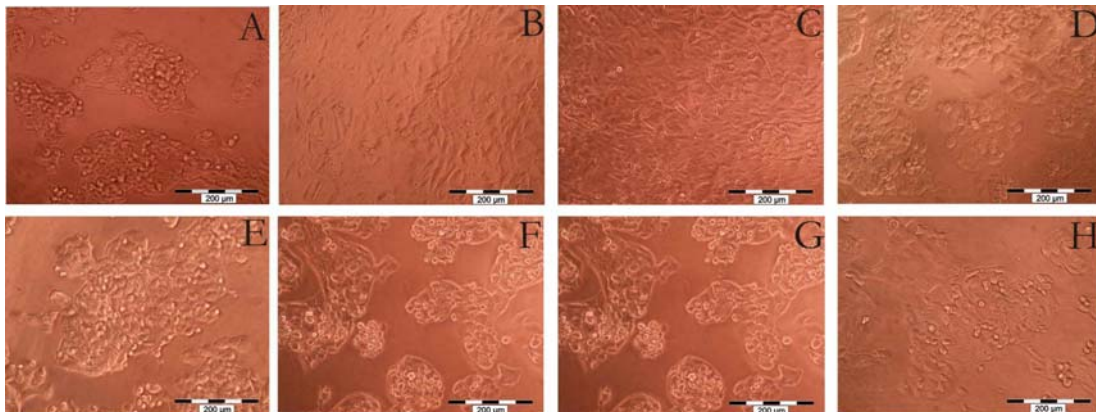


Abbildung 33: Phasenkontrastaufnahmen von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlich beschichteten Zellkulturoberflächen. Die Zellen wurden auf einem Standard (A), PLL Standard (B), Kollagen I (C), β -Glucan (D), Hyaluronsäure (E), Colominsäure (F), PSA-K1 (G), Laminin (H) kultiviert und mit 200facher Vergrößerung aufgenommen.

Für die Hep-G2 Zellen wurden vergleichbare Werte der Proliferationen auf den unterschiedlichen Beschichtungen wie bei den PC-12 Zellen erhalten. Auch hier wurde auf die Darstellung der Graphen verzichtet, die signifikanten Unterschiede sind in Tabelle 4 dargestellt. Unterschiede mit $p < 0.05$ wurden mit einem Stern (*) versehen, (*) \downarrow signifikant niedriger, $*\uparrow$ signifikant höher im Vergleich zu den Standards (Anhang 6.1). An Tag 4 proliferierten die Zellen am stärksten auf β -Glucan. An Tag 5 war die Proliferation der Zellen auf dem Standard (Tabelle 4) am geringsten.

Tabelle 4: Statistische Auswertung des Proliferationsassays von Hep-G2 Zellen auf unterschiedlichen Beschichtungen. Jeweils 4000 Zellen wurden pro Vertiefung ausplattiert. Die Werte wurden mit dem Standard verglichen und statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ wurden mit einem (*) gekennzeichnet mit $*\downarrow$ signifikant niedriger, $*\uparrow$ signifikant höher.

Tag		PLL	Koll I	β -Glucan	HA	CA	PSA-K1	Laminin
4	Standard	$*\uparrow$	$*\uparrow$	$*\uparrow$	-	$*\uparrow$	-	$*\uparrow$
	PLL Stand.	-	-	$*\uparrow$	-	-	-	-
5	Standard	$*\uparrow$	$*\uparrow$	$*\uparrow$	$*\uparrow$	$*\uparrow$	$*\uparrow$	-
	PLL Stand.	-	-	-	-	-	-	-
7	Standard	-	-	-	-	-	-	$*\uparrow$
	PLLStand.	-	-	-	-	-	$*\downarrow$	-

Die ISC proliferierten ebenfalls auf den unterschiedlichen Beschichtungen. Die signifikanten Unterschiede sind in Tabelle 5 dargestellt. Besonders stark proliferierten sie auf PLL und Laminin (siehe Tabelle 5). Auf den anderen Beschichtungen proliferierten die Zellen wie auf dem Standard. Die statistische Auswertung der Daten verdeutlichte die hohe Proliferation der Zellen auf PLL gegenüber den Zellen auf Kollagen, HA, und CA im Laufe der Kultivierung.

Tabelle 5: Statistische Auswertung des Proliferationsassays von ISC auf unterschiedlichen Beschichtungen.

Jeweils 4000 Zellen wurden pro Vertiefung ausplattiert. Die Werte wurden mit dem Standard verglichen und statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0.05$ wurden mit einem (*) gekennzeichnet mit *↓ signifikant niedriger, *↑ signifikant höher als der Standard.

Tag		PLL	Koll I	β-Glucan	HA	CA	PSA-K1	Laminin
4	Standard	*↑	-	-	-	-	-	*↑
	PLL Stand.	-	*↓	-	*↓	*↓	*↓	-
5	Standard	*↑	-	-	-	-	-	*↑
	PLL Stand.	-	*↓	*↓	*↓	*↓	*↓	-
7	Standard	-	-	*↓	*↓	-	-	*↑
	PLLStand.	-	*↓	*↓	*↓	*↓	-	-

Fazit: Ziel der Versuche war es, das Wachstum verschiedener Zelllinien auf unterschiedlichen Zellkulturbeschichtungen zu testen und untereinander zu vergleichen. Parameter wie die Zelladhäsion, Zellviabilität und Proliferation sowie spezifische Zellmarker wurden untersucht.

Die Ergebnisse des MTT-Tests und des BrdU-Assays zeigten, dass die verwendeten Zelllinien auf allen Materialien viabel sind und proliferieren. Über den Kultivierungszeitraum von sieben Tagen stieg die Viabilität/Proliferation der PC-12 und Hep-G2 Zellen an. Die Messungen des Glukose-/Laktatgehalts der Hep-G2 Zellen bestätigten die Ergebnisse der Viabilität/Proliferationsbestimmung. Die PC-12 zeigten auf PLL ein besonders gutes Wachstum und schnelles Adhäsionsverhalten, wie es auch in der Literatur beschrieben ist (Turner et al. 1987). Bei den Hep-G2 Zellen war dies hingegen nicht zu beobachten. Besonders große Unterschiede wurden bei der Beschichtung mit Laminin beobachtet, die Proliferation war hier bei den PC-12 Zellen verringert, bei den ISC jedoch gegenüber den anderen Beschichtungen besonders hoch. Schwanzzellen produzieren EZM, die unter anderem aus Laminin und Kollagen besteht.

Des Weiteren exprimieren sie Zelladhäsionsrezeptoren für Laminin und Kollagen, so findet bei den ISC wahrscheinlich eine besonders gute Bindung an die verschiedenen Bindungsdomänen des Laminins statt (Ciardelli and Chiono 2006), was zu einer guten Adhäsion führte. Unterschiede wurden vor allem nach der Differenzierung der PC-12 Zellen mit NGF beobachtet. Dies verdeutlicht die Abhängigkeit zwischen Zelladhäsion und Neuritenausbildung besonders. Wie bei Bacakova beschrieben (Tabelle 1, S. 8), führt eine geringe Zellspreitung zu einer verringerten Differenzierung. Auch auf Kollagen, welches die Überlebensfähigkeit von Zellen, sowie die Proliferation und Angiogenese fördert (Chi et al. 1993), zeigten alle Zelltypen ein gutes Wachstum. PLL und Kollagen sind für die PC-12 Zellen besonders gut geeignet.

Zusammengefasst haben sich alle Materialien als mögliche Kandidaten für die Zellkulturanwendungen und dem *Tissue Engineering* herausgestellt. Die deutlichen Unterschiede der Ergebnisse der einzelnen Zelltypen zeigten dabei, dass die Wahl des Materials je nach Anwendung überdacht und getestet werden muss. Die Topographie, Elastizität und die Möglichkeit der Zellen zur Ausbildung von Rezeptor-Liganden Wechselwirkungen sind entscheidend für Zelladhäsion und Wachstum. Die Proteine Laminin, Kollagen und Poly-L-Lysin vermitteln die Adhäsion, β -Glucan und Colominsäure hingegen nicht.

4.3 Beurteilung des Zellwachstums mittels ECIS

Eine neue Methode zur Charakterisierung adhärenter Zellkulturmonolayer bietet das electric cell-substrate impedance sensing (ECIS). Bei dieser biophysikalischen Methode wird der elektrische Widerstand als Funktion der Frequenz einer Wechselspannung von Zellen auf der Oberfläche einer Goldelektrode gemessen. Das Anhaftungsverhalten, Spreitungs- und Wundheilungsverhalten von Säugetierzellen kann quantitativ untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten der Hep-G2 und ISC auf mit CA, PLL und Laminin beschichteten Oberflächen verglichen (Anhang 6.4.13). Die Versuche wurden freundlicherweise mit PD Dr. Wegener an der Universität Münster durchgeführt.

In Abbildung 34 ist der zeitliche Verlauf der Elektrodenkapazität (8W1E-Slide) bei dem Versuch mit den Hep-G2 Zellen auf verschiedenen Beschichtungen über einen Zeitraum von 20 h dargestellt. Bei PLL und Kollagen wurde innerhalb der ersten zwei

Stunden nur noch eine geringe Kapazität gemessen. Die Zellen spreiteten sehr schnell (auf PLL noch etwas schneller als auf Kollagen). Auf Colominsäure war die Kapazität der Elektrode noch sehr hoch. Dies weist auf das deutlich langsamere Spreiten der Zellen auf CA hin.

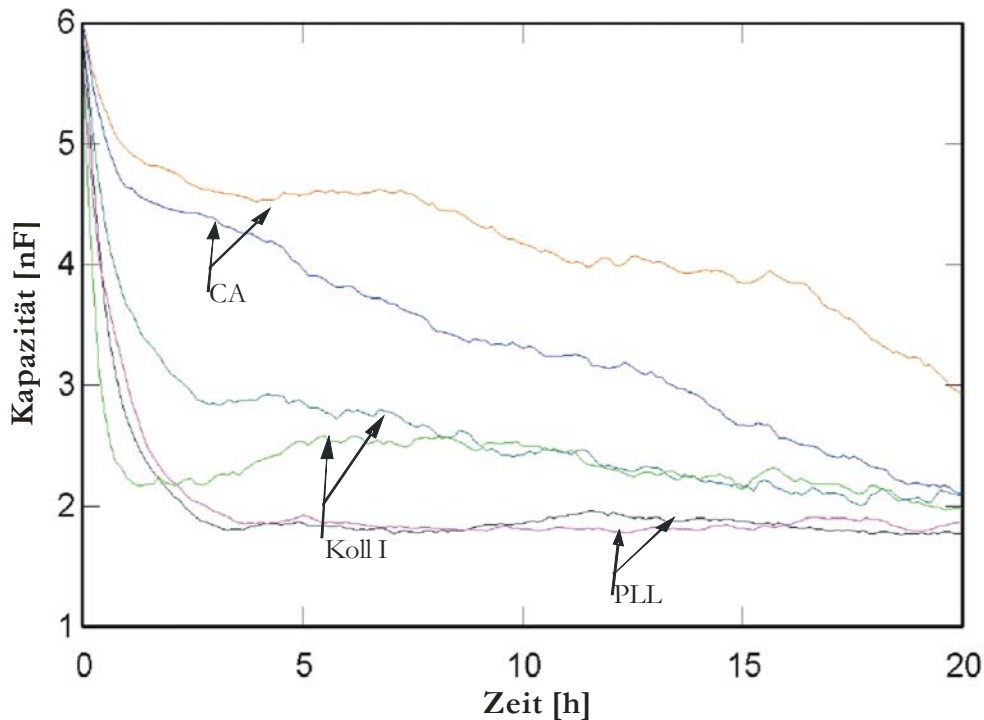


Abbildung 34: Impedanzmessung der Hep-G2 Zellen.

Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Elektrodenkapazität der Hep-G2 Zellen (Doppelbestimmung) auf Colominsäure (braun, blau), Kollagen I (grün, hellblau) und Poly-L-Lysin (lila, blau) beschichteten Oberflächen, bei 40 kHz und 1 Volt.

In Abbildung 35 ist der zeitliche Verlauf der Elektrodenkapazität der ISC auf verschiedenen Beschichtungen dargestellt. Die Absolutwerte der Kapazität lagen hier zu Beginn der Messung unter 6 nF was für diese Messungen untypische Startwerte sind. Der Beginn der Adhäsion wurde etwas verspätet aufgenommen. Unterhalb von 5 h unterschied sich das Verhalten der ISC auf der CA von dem Verhalten auf der Kollagen und PLL Beschichtung. Der Verlauf der Messungen deutete auf ein schnelles Anhaften der Zellen aber ein langsames Spreiten hin. Die Kapazität sank auf CA bis zum Erreichen der 1. Stufe schnell ab. Das Spreiten der Zellen setzte jedoch erst nach ca. 3 h ein (2.Stufe), ab da begann die Kapazität wieder langsam zu sinken. Die Zellen haben vermutlich keine Rezeptoren für die CA, die den Vorgang der Zellspreitung wie bei Kollagen und PLL schnell ermöglichen.

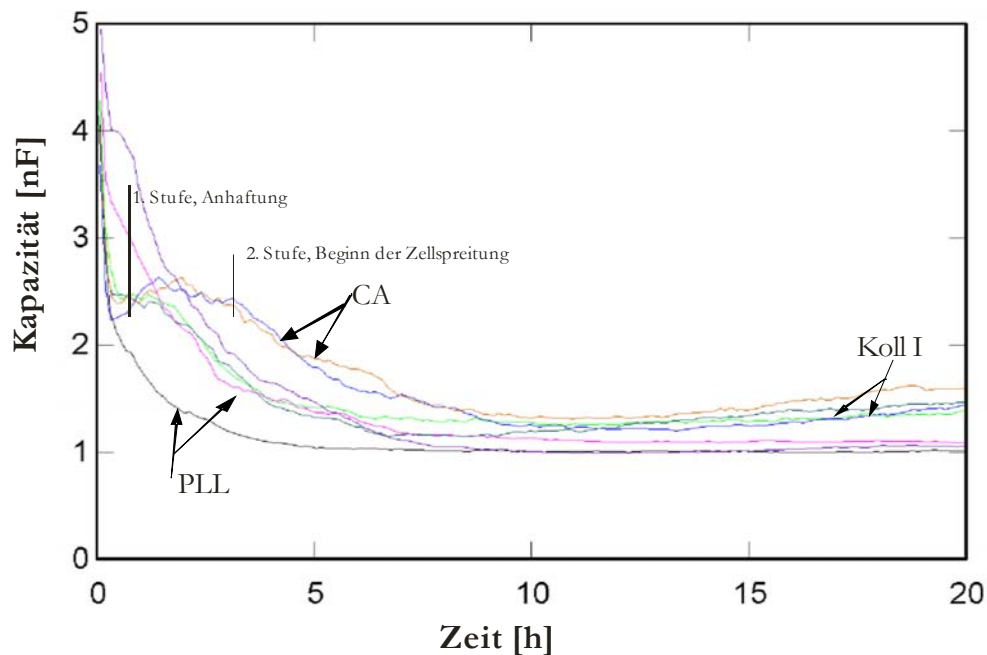


Abbildung 35: Impedanzmessung der ISC.

Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Elektrodenkapazität der ISC auf Colominsäure, Kollagen und Poly-L-Lysin beschichteten Oberflächen, bei 40 kHz und einem Volt.

Migrationsverhalten der Hep-G2 Zellen

Mit dem ECIS kann die Migration der Zellen verfolgt werden. Dabei werden die Zellen so ausplattiert, dass ein konfluenter Zelllayer vorliegt. Durch das Anlegen einer Spannung im Bereich von 1-5 V für wenige Sekunden werden die Zellen von der Elektrode permittiert. Es findet eine so genannte elektrische Verwundung der Zellen statt und eine zellfreie Elektrode entsteht. Im Anschluss wird die Veränderung des Widerstands der Elektrode verfolgt. Die Zellen migrieren in die Verwundung (die zellfreie Elektrodenfläche) und der Widerstand der Elektrode verändert sich.

Das Migrationsverhalten der ISC konnte nicht mit der ECIS-Methode untersucht werden da eine elektrische Verwundung nicht erreicht werden konnte. Daher sind hier exemplarisch die Ergebnisse mit den Hep-G2 Zellen dargestellt. Die Migration der Hep-G2 Zellen wurde unter dem Einfluss von Colominsäure (0,1-5 mg/ml) mit der ECIS Methode untersucht (Anhang 6.4.14). In Abbildung 36 ist der normierte Widerstand in Abhängigkeit von der Zeit für die Hep-G2 Zellen nach der elektrischen Verwundung aufgezeichnet. Die Hep-G2 Zellen wurden zum Zeitpunkt $t=0$ in die *Wells* des ECIS Elektroden Arrays (8W1E) überführt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert.

Für eine Dauer von 30 s wurde ein Signal von 40 kHz und 5 V angelegt, wodurch die Zellen elektrisch von der Elektrode gebrannt wurden (Verwundung). Dann erfolgte die erneute Datenaufnahme über einen Zeitraum von 20 h. Zur Kontrolle wurden die Zellen in einem *Well* des 8W1E-*Slides* nicht elektrisch verwundet.

Die Werte für den Widerstand nahmen bei der Verwundung deutlich ab, (die Werte sanken jedoch nicht auf die üblichen niedrigeren Werte einer elektrischen Verwundung (Daten nicht gezeigt). Durch Zellen, die nicht von der Elektrode permittiert wurden, wurde eine schnelle Zunahme des Widerstands der Elektrode gemessen. Wären die Zellen vollständig von der Elektrode permittiert worden, wäre der Widerstand der Elektrode nicht sofort angestiegen. Nach der Verwundung bewuchsen die Hep-G2 Zellen die Elektrode erneut und der Widerstand der Elektrode nahm deutlich zu. Es wurden vergleichbare Werte, wie bei der Elektrode gemessen, auf der die Zellen nicht verwundet wurden. Die Colominsäure schien kein Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen zu nehmen. Die Widerstandswerte waren auf allen Elektroden bei der Zugabe unterschiedlicher CA Konzentrationen (0-5 mg/ml) vergleichbar.

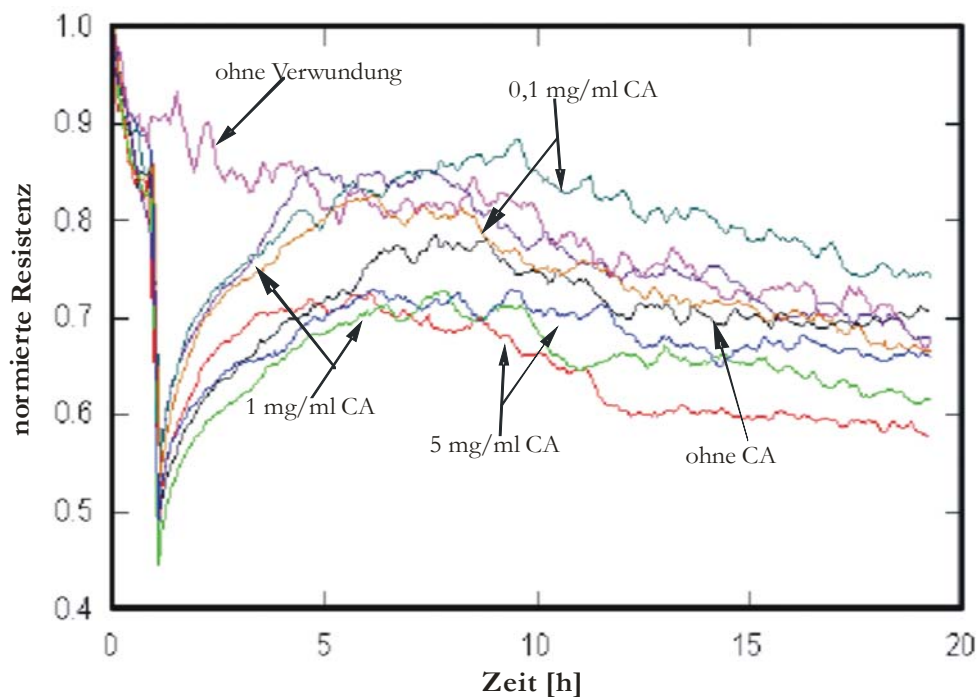


Abbildung 36: Migration der Hep-G2 Zellen mittels ECIS.

Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Elektrodenkapazität nach Anhaftung der Hep-G2 Zellen auf den Elektroden und anschließender Verwundung bei 40 kHz und 5 V für 30 sec. lila = BW ohne Verwundung; schwarz = 5 mg/ml CA, keine Verwundung der Zellen; rot, blau = 5 mg/ml CA, Verwundung; grün, dunkelblau = 1 mg/ml CA, Verwundung; blau, braun = 0.1 mg/ml CA, Verwundung

Fazit: Die Verläufe der Elektrodenkapazität hängen von der Größe des Zelltypes, seinem Spreitungs- und Wachstumsverhalten ab. Sowohl die Hep-G2 Zellen als auch die immortalisierten Schwanzzellen zeigten auf der Colominsäure im Vergleich zu den Beschichtungen mit Kollagen und Poly-L-Lysin eine verlangsamte Spreitung. Dieses Verhalten kann zum Beispiel verglichen werden mit dem Verhalten von Madin-Darby canine kidney (MDCK) Zellen auf Fibronectin. Die Zellen besitzen spezifische Rezeptoren und können somit gut anhaften und schnell spreiten. Im Gegensatz dazu spreiten die Zellen auf Rinderserumalbumin nur langsam, weil keine entsprechenden Rezeptoren vorhanden sind (Wegener et al. 2000). Die Hep-G2 Zellen konnten nach der elektrischen Verwundung vollständig permittiert werden. Das Migrationsverhalten war auf den verwendeten Beschichtungen (CA, PLL, Koll I) vergleichbar.

4.4 Untersuchung der Zellmigration unter dem Einfluss von Colominsäure

Im Abschnitt 4.3 wurde die Migration der Zellen mittels ECIS untersucht, wobei die Zellen elektrisch verwundet wurden. Da der CA Eigenschaften zur Förderung der Migration zugeschrieben werden, wurde wie im Anhang 6.4.13 beschrieben die Migration (Cao et al. 2006) der Hep-G2 Zellen und ISC unter dem Einfluss verschiedener CA Konzentrationen mittels eines klassischen Wundheilungsassays untersucht. Die PC-12 Zellen sind für solche Untersuchungen nicht geeignet, da die Zellen in Zellansammlungen wachsen und keinen dichten Monolayer erreichen.

In Abbildung 37 ist der Wundheilungsassay modellhaft dargestellt. Bei dem klassischen Wundheilungsassay werden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert (Abbildung 37 A), anschließend wird mit einer Pipettenspitze ein Strich durch die Zellschicht gezogen (mechanische Verwundung). Dadurch entsteht eine zellfreie Zone (Abbildung 37 B), in diese Zone hinein wird das Wachstum der Zellen beobachtet (Abbildung 37 C).

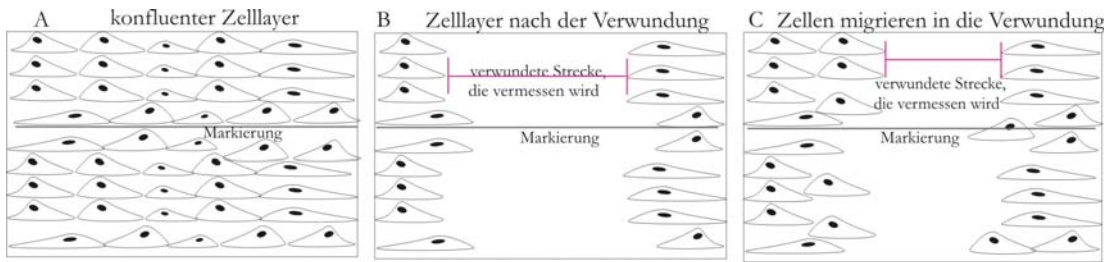


Abbildung 37: Modell des klassischen Wundheilungsassays.

Ein konfluenter Zellschicht (A) wird mit einer Pipette mechanisch verwundet. Auf der Unterseite der Zellschicht wird eine Markierung gezogen, um nach der Verwundung (B) und nach der Migration der Zellen die gleiche Stelle aufzunehmen (C). Die Strecke die durch die mechanische Verwundung entsteht wird jeweils vermessen.

Optisch konnten keine Unterschiede zwischen den verwundeten Zellen nach einer Inkubationszeit von 46 h bei den unterschiedlichen CA Konzentrationen auf den mikroskopischen Bildern beobachtet (Daten nicht gezeigt) werden. Die Strecke der Verwundung war innerhalb von 46 h im Vergleich zu 0 h etwas geringer geworden. In Abbildung 38 ist die Auswertung der Zellmigration grafisch dargestellt. Die Auswertung zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Migration der Zellen unter der Verwundung verschiedener CA Konzentrationen. Prinzipiell waren die Hep-G2 Zellen zu Migration fähig, es wurden nur geringe Unterschiede zwischen 0 h und 46 h und den Zellen, kultiviert mit verschiedenen CA Konzentrationen, gemessen. Die CA scheint auf die Migration der Hep-G2 Zellen keinen Einfluss zu haben. Eine Konzentration von 10 mg/ml und höher könnte zu einer Förderung der Migration beitragen, dies müsste jedoch durch weitere Studien belegt werden.

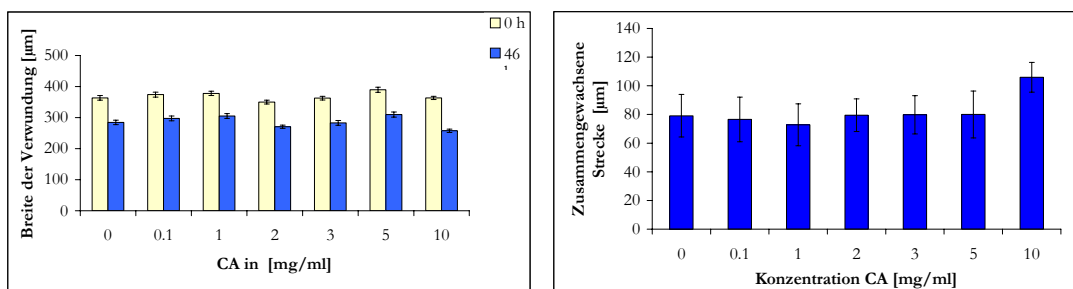


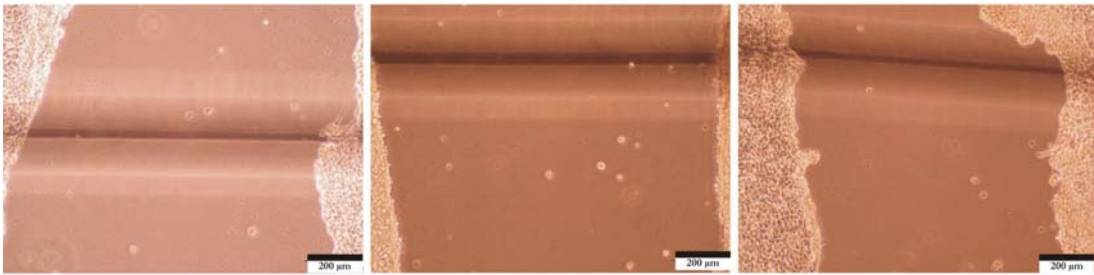
Abbildung 38: Zellmigration der Hep-G2 Zellen unter dem Einfluss verschiedener CA Konzentrationen.

Links die Darstellung der Strecke der Verwundung nach 0 h bzw. 46 h. Rechts die Differenz aus den Strecken.

ISC

Analog zu den Hep-G2 Zellen wurde die Migration der ISC nach der Zugabe verschiedener CA Konzentrationen (0,1-20 mg/ml) untersucht (Anhang 6.4.13). Da die ISC stark proliferieren betrug die Inkubationszeit der Colominsäure 24 h. Nach 0 h und 24 h wurde die Größe der Verwundung gemessen. Die Abbildung 39 und 40 zeigen, dass die ISC in die Verwundung hinein wachsen. Unter dem Einfluss der Colominsäure ist die Verwundung nach 24 h kaum noch zu erkennen (Abbildung 40).

0 h



24 h

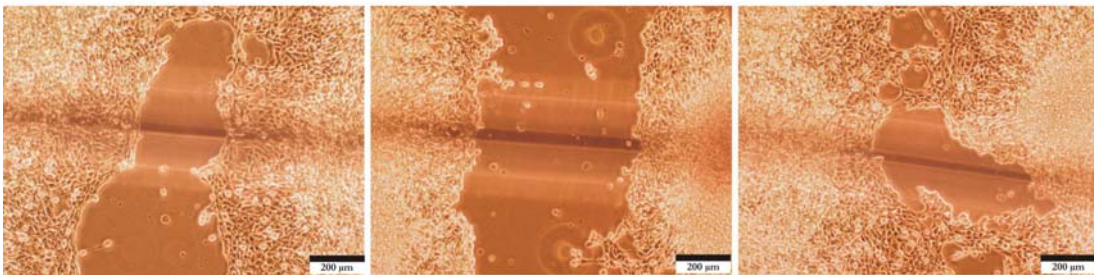


Abbildung 39: Migration von ISC ohne CA Zugabe.

Phasenkontrastaufnahmen von ISC direkt nach der Verwundung (0 h) und nach 24 h ohne die Zugabe von Colominsäure (100fache Vergrößerung).

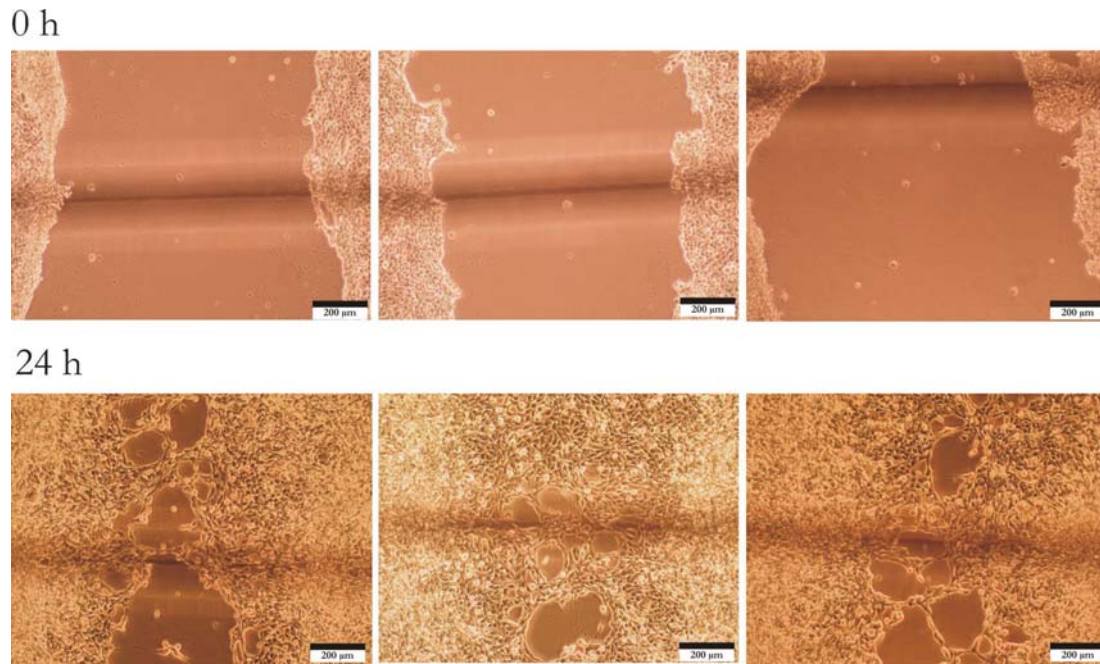


Abbildung 40: Migration von ISC nach Zugabe von 5 mg/ml CA.

Phasenkontrastaufnahmen von ISC direkt nach der Verwundung (0 h) und nach 24 h nach Zugabe von 5 mg/ml Colominsäure (100fache Vergrößerung). Nach 24 h bilden die ISC Zellbrücken aus, so dass zwischen den Zellen zellfrei Zonen entstehen.

Unter der Zugabe von Colominsäure scheinen einzelne Zellen aus dem Verband den Weg in die Verwundung zu suchen. Dieses Verhalten wurde vor allem bei hohen Konzentrationen von 5-20 mg/ml CA beobachtet. Die Zellen wuchsen nicht wie die Hep-G2 Zellen gleichmäßig in die zellfreie Zone sondern bildeten zunächst einzelne Zellbrücken, wobei die Verwundung nach 24 h noch nicht ganz geschlossen war. Dieses Wachstumsverhalten der Zellen erschwerte die Auswertung der Bilder. Dies Wachstum ist jedoch auf die Migration und nicht auf die Proliferation der Zellen zurück zu führen. Eine Messung der Größe der Verwundung war schwierig. Alternativ wurden die Bilder mit der CellProfiler™ Software ausgewertet (Anhang 6.4.13). Diese Software zur Analyse von Zellaufnahmen ermöglicht es, eine Vielzahl von biologischen Objekten automatisch zu identifizieren und zu vermessen (Carpenter et al. 2006; Lamprecht et al. 2007). Die Software kann z.B. eingesetzt werden um Kolonien von Hefezellen zu klassifizieren und zu zählen, zum Zählen und Vermessen von Zellen, zur Vermessung von Gewebestrukturen, zur Analyse von Farbtensitäten von Fluoreszenzaufnahmen (z.B. Zellkernzählung von DAPI eingefärbten Zellkernen) und für Ausmessung von Bildern des klassischen Wundheilungsassays.

In Abbildung 41 ist die Auswertung der Zellmigration der ISC sowohl mit der klassischen Methode (Vermessung der Strecken) als auch mit der CellProfiler™ Software (Berechnung der von Zellen bedeckten Fläche) dargestellt. Im Anhang 6.4.14 ist auf Seite 112 exemplarisch gezeigt, wie die Bilder in das Programm geladen werden. Dargestellt ist zusätzlich das Ergebnis einer Softwareberechnung.

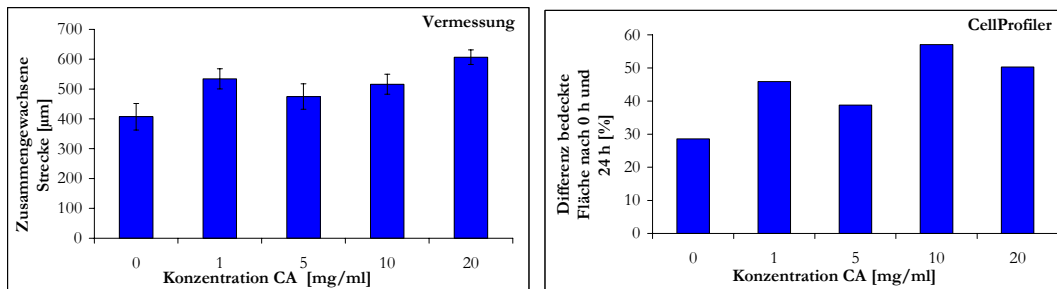


Abbildung 41: Zellmigration der ISC unter dem Einfluss verschiedener CA Konzentrationen. Darstellung der zusammengewachsenen Strecken nach der Vermessung. Rechts Darstellung der Differenz der bedeckten Flächen mit der CellProfiler™ Software.

Die ISC wuchsen in die Verwundung hinein. Ohne die Zugabe von Colominsäure betrug die zusammengewachsene Strecke ca. 400 µm, bei 5 mg CA 470 µm und bei 20 mg CA ca. 600 µm. Die Auswertung mit dem Cellprofiler™ Programm bestätigte die Tendenz. Nach 24 h war die von den Zellen bedeckte Fläche unter der Zugabe von CA größer (zwischen 38-50 %) als ohne die Zugabe von CA (28 %). Die Colominsäure scheint das Wachstum der Zellen in die Verwundung zu fördern.

Fazit: Im Gegensatz zu den Hep-G2 Zellen wurden bei den ISC Unterschiede im Migrationsverhalten (siehe Phasenkontrastaufnahmen) beobachtet, welche durch Messungen der Verwundung und Berechnung der bedeckten Fläche bestätigt wurden. Insbesondere die hohen Konzentrationen von 10 und 20 mg CA schienen einen Einfluss auf die Zellen zu haben. Die Cellprofiler™ Software konnte als alternative Methode zur Bestimmung der Zellmigration eingesetzt werden. Das Programm ist jedoch sehr stark von der Qualität der Bilder abhängig. Die Bilder sollten scharf sein und gleichmäßig ausgeleuchtet. Die Markierung der Unterseite der Zellkulturschale bereitete ebenfalls Schwierigkeiten bei der Berechnung: Flächen mit Zellen wurden als Flächen ohne Zellen erkannt und umgekehrt. Ein Fehler für die Berechnung wurde

nicht angegeben (siehe auch Anhang 6.4.13). dass die CA das Wachstum der verschiedenen Zelltypen unterschiedlich beeinflusst.

Bei den Leberzellen konnte kein Einfluss der CA auf die Migration beobachtet werden im Gegensatz zu den neuronalen ISC. Da CA *in vivo* z.B. die Neuritenbildung fördert und bei Prozessen wie *axonal pathfinding* und in regenerative Prozesse nach Verletzungen eingebunden ist (Landmesser et al. 1990; Muhlenhoff et al. 1996; Tang et al. 1992), war ein Einfluss der CA auf die Zellmigration vorrangig bei der neuronalen Zelllinie zu erwarten. Da CA auch die Proliferation von neuronalen Stammzellen fördert (Leckband 2004), könnten die beobachteten Unterschiede auch auf die proliferationsfördernde Wirkung der CA zurückgeführt werden. Um die Proliferation zu unterbinden und ausschließlich die Migration zu untersuchen sollte in weiter führenden Experimenten die Proliferation der Zellen durch Zugabe von Mitomycin-C inhibiert werden (Nasca et al. 1999).

4.5 Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR und DNA-Microarrays

In den vorangegangenen Abschnitten ist der Einfluss der Colominsäure auf Zelladhäsion, Viabilität/Proliferation, Wachstum, Differenzierung und Migration auf verschiedene Zelllinien eingehend beschrieben worden. Die verwendeten Analysemethoden beruhen in erster Linie auf phänotypischen Veränderungen der Zellen. Durch die Genexpressionsanalysen sollte die Expression organspezifischer Gene auf verschiedene Zelltypen unter dem Einfluss von CA Beschichtungen untersucht und mit etablierten Beschichtungen verglichen werden. Als Beschichtungen wurden, sowohl für die RT-PCR als auch für die DNA-Microarrays, Kollagen und Laminin verwendet. Laminin wurde gewählt, weil es für seine adhäsions- und migrationsfördernden Eigenschaften gegenüber neuronalen Zellen bekannt ist (Mochizuki et al. 2003). Darüber hinaus besitzt Laminin eine Reihe von Bindungsstellen für Zelloberflächenrezeptoren (Mercurio and Shaw 1991) Kollagen wurde ausgewählt, weil es Immunreaktionen hervorzurufen kann, die sich in der Expression von akute Phase Proteinen zeigt (Schiffer et al. 1999).

Der Einfluss von Beschichtungen auf Genexpressionsebene wurde an Hep-G2, ISC, undifferenzierten und differenzierten PC-12 Zellen durchgeführt. An differenzierten Zellen können besonders gut Veränderungen in der Expression von Genen der

Membranrezeptoren oder von Genen, die in Signalwegen von Ionenkanälen involviert sind, untersucht werden (Shafer and Atchison 1991). Die PC-12 Zellen ähneln bei der Kultivierung in Anwesenheit von NGF oder anderen Komponenten den sympathetischen Neuronen in Morphologie und Funktionalität (siehe auch Abbildung 31, S.46). Die neuronale Differenzierung und die daraus resultierenden physiologischen und biochemischen Änderungen machen Untersuchungen an den PC-12 Zellen besonders interessant.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen einzelner Gene mittels RT-PCR vorgestellt. Anschließend erfolgt die Vorstellung der verwendeten *Microarray* und der Ergebnisse der Genexpressionsanalysen mittels DNA-Chiptechnologie (Abschnitt 4.5.2).

4.5.1 RT-PCR

Untersucht wurde mit der humanen leberspezifischen Zelllinie Hep-G2 die Expression der Gene Albumin, Transferrin und CYP 3A4. Diese Proteine und Enzyme übernehmen im Leberstoffwechsel wichtige Funktionen (siehe S.65, DNA-Chip). Bei der neuronalen Zelllinie PC-12 wurde die Expression des Gens Tyrosinhydroxylase von differenzierten und undifferenzierten Zellen untersucht. Tyrosinhydroxylase ist das limitierende Enzym bei der katalytischen Umwandlung von L-Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA) einem Schritt der Catecholaminbiosynthese (Parab et al. 2007). Aufgrund der Rolle der Tyrosinhydroxylase bei der Dopaminsynthese wird es als spezifischer neuronaler Marker untersucht (Haycock and Haycock 1991; Nagatsu et al. 1964). Zusätzlich wurden die *housekeeping Gene* Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Hep-G2, PC-12) und β -Actin (PC-12) auf den verschiedenen Beschichtungen mit amplifiziert. Zunächst wurden Hep-G2 Zellen auf unbeschichtete, CA und Kollagen beschichteten Oberfläche kultiviert. Die PC-12 Zellen wurden auf PLL, CA und Laminin beschichteten Oberflächen kultiviert. Die RNA-Isolierung erfolgte von Zellen einer konfluenten Kultur. Die Qualität der RNA wurde mittels *Bioanalyzers* (Anhang 6.4.18) überprüft und der RNA Gehalt wurde mittels Nanodrop (Anhang 6.4.17) bestimmt. Die Durchführung der RT-PCR erfolgte in zwei Schritten: Synthese der cDNA und PCR.

Die Ergebnisse der RT-PCR Untersuchungen sind in den folgenden Abbildung 42 und 43 dargestellt. Die RT-PCR Untersuchung zeigte die Expression der Transportproteine Albumin und Transferrin sowie des Phase I Enzyms CYP 3A4 der Hep-G2 Zellen. Die Expression war auf den Beschichtungen Colominsäure, Kollagen I und der unbeschichteten Zellkulturoberfläche vergleichbar. Die Expression des CYP 3A4 war sehr gering, es ist jedoch bekannt, dass die Expression des Phase I Enzyms in Hep-G2 Zellen im Vergleich zu auf Kollagen kultivierten primären Hepatozyten sehr gering ist.

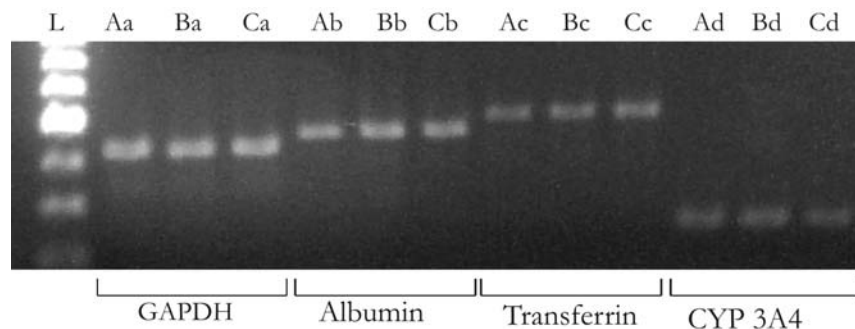


Abbildung 42: Agarosegelanalyse der RT-PCR von Hep-G2 Zellen.

Die Proben sind auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetragen. L: Marker 1 kb; A_{a-d}: Hep-G2 kultiviert auf Zellkultur-Plastik; B_{a-d}: Hep-G2 kultiviert auf Colominsäure; C_{a-d}: Hep-G2 kultiviert auf Kollagen I

In Abbildung 43 (S. 62) ist das Ergebnis der Genexpressionsanalyse der mit NGF stimulierten Zellen und undifferenzierten PC-12 Zellen dargestellt. Die auf den Beschichtungen von PLL, Colominsäure und Laminin kultivierten PC-12 zeigten die mRNA Expression der *housekeeping* Gene GAPDH und β -Actin und der Tyrosinhydroxylase. Die Expression der Gene fand sowohl bei den undifferenzierten als auch nach den für drei Tage mit NGF stimulierten Zellen statt.

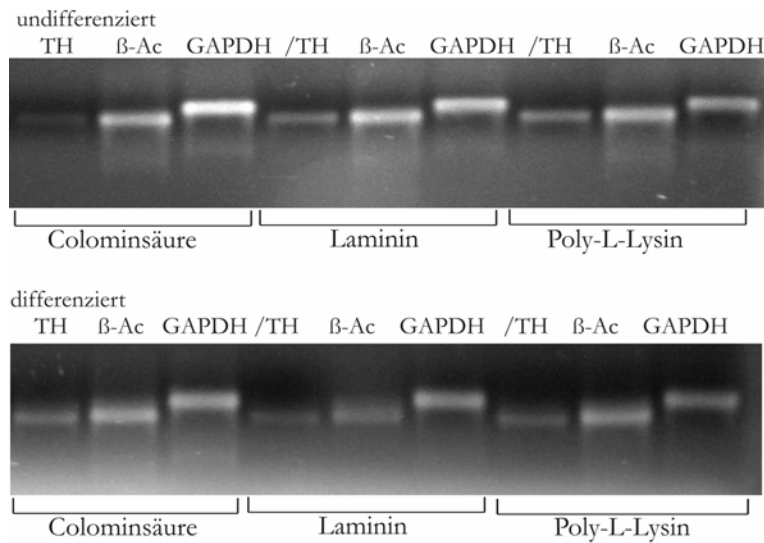


Abbildung 43: Darstellung des RT-PCR Ergebnisses undifferenzierter und differenzierter PC-12 Zellen.

Die Differenzierung erfolgte für 3 d mit NGF (100 µg/ml). Die Proben sind auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetragen. TH steht für die Expression der Tyrosinhydroxylase, β -Ac für das *housekeeping Gen* β -Actin und GAPDH für das *housekeeping Gen* Glycerinaldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase.

Fazit: Sowohl die Hep-G2 Zellen als auch die PC-12 Zellen exprimierten die untersuchten organspezifischen Gene. Bei den Hep-G2 Zellen wurde die Expression der Gene Albumin, Transferrin und CYP 3A4 nachgewiesen. Bei den PC-12 Zellen die Expression des Gens Tyrosinhydroxylase. Die Beschichtungen hatten somit keinen Einfluss auf die Genexpression der spezifischen Marker.

4.5.2 DNA-Chips

Mit Hilfe der DNA-Chiptechnologie sollten im Rahmen dieser Arbeit Beschichtungen auf ihre Differenzierungskompetenz und ihre Zytotoxizität/Biokompatibilität auf Zellen überprüft werden. Um derartige Analysensysteme entwickeln zu können, sind Kenntnisse über die Steuerbarkeit der molekularen Differenzierungsfaktoren der Zellen wichtig. Durch Veränderungen der extrazellulären Umgebung können die Zellen beeinflusst werden. Hierzu zählen (a) die extrazelluläre Matrix, (b) die Mediumzusammensetzung und (c) Kultivierungssysteme (z.B. Bioreaktoren). Weiterhin ist der Einfluss von Biomaterialien auf den Differenzierungszustand der Zellkultursysteme für einen möglichen Einsatz als Implantat von großer Bedeutung. Das Ziel solcher Untersuchungen ist es, über kinetische Analysen der Genexpression komplexe Veränderungen zu detektieren, die einzelnen Mechanismen zugeordnet

werden können. Die Auswirkungen der Mikroumgebung, die phänotypisch nicht sofort zu erkennen sind, können auf biologische Mechanismen untersucht werden. Die Arbeitshypothese beinhaltet, dass durch die Veränderung der extrazellulären Mikroumgebung eine Veränderung des Reifungszustandes der Zellen erreicht werden kann. Darüber hinaus kann mit Hilfe der Chiptechnologie erstmals auf Genexpressionsebene die Analyse wichtiger Differenzierungsparameter schnell und auf breiter Ebene durchgeführt werden: Während sich herkömmliche Methoden auf die Untersuchung einzelner Gene beschränken, liefert ein DNA-*Microarray* ein komplettes Genexpressionsprofil der untersuchten Zelle bzw. des untersuchten Gewebes. Besonders interessant ist die hierdurch gegebene Möglichkeit, die Interaktion verschiedener Gene zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene *Microarrays* verwendet, unter deren Zuhilfenahme der Einfluss der Colominsäure untersucht wurde. Im Folgenden werden die verwendeten selbstgespotteten *Microarrays* vorgestellt.

Genexpressionsanalysen mit der humanen, leberspezifischen HepG2 Zelllinie

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Biokompatibilität der CA Beschichtung mit der humanen Leberzelllinie Hep-G2 unter Zuhilfenahme eines mit 249 Genen gespotteten leberspezifischen *Microarrays* durchgeführt. Mit Hilfe des *Microarrays* sollte ein *monitoring* der Hep-G2 Zellen bezüglich Differenzierung, Wachstum und Metabolismus auf verschiedenen Beschichtungen erfolgen. Gleichzeitig wurde die Biokompatibilität dieser Beschichtungen mitgetestet. Hierfür wurden die für die Entwicklung, das Wachstums und die Funktion der Leber relevanten Gene aus Datenbanken ausgewählt. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene lassen sich in folgende funktionelle Gruppen einteilen:

akute Phase des Leberstoffwechsels

Die akute Phase des Leberstoffwechsels beinhaltet alle Enzyme und Proteine, die für die „Entzündungsreaktion“ in der Leber zuständig sind. Hierzu zählen: Antitrypsin, Glycoprotein, Macroglobulin, Microglobulin. Die akute Phase Reaktionen sind systematische Antworten auf komplexe unspezifische Wirkungen und eine Schutzreaktion des Organismus. Die Leberzellen reagieren auf eine Immunstimulation, indem die akute Phase Proteine hoch reguliert werden (Nieto et al. 2001).

Phase I des Leberstoffwechsels

In der Phase I des Leberstoffwechsels finden Oxidations-, Reduktions-, Methylierungs-, Desulfurierungsreaktionen und hydrolytische Spaltungen statt. Diese Reaktionen dienen der Umwandlung von Giftstoffen bzw. körperfremden Stoffen. Dabei wird die biologische Aktivität der Stoffe verringert und ihre Polarität erhöht. An diesem Prozess sind z.B. Aldehyd Dehydrogenase und Cytochrom P 450 beteiligt.

Phase II des Leberstoffwechsels

Die Phase II des Leberstoffwechsels stellt die Fortsetzung der Phase I dar. In Phase II kommt es zur Konjugatbildung der Giftstoffe. Bei der Reaktion in Phase II werden verschiedene Substrate an sehr polare, negativ geladene Moleküle gekoppelt. Die entstehenden Konjugate sind gegenüber unkonjugierten Verbindungen wesentlich besser wasserlöslich und somit ausscheidungsfähiger. Zur Phase II des Leberstoffwechsels gehört z.B. Glutathion S-Transferase.

Matrix der Leber

Zu der Matrix der Leber gehören die Strukturproteine der extrazellulären Lebermatrix, z.B. Kollagen, Entactin, Fibrillin und Laminin.

metabolische Enzyme und Enzyme der Atmungskette in der Leber

Diese Enzyme erfüllen wichtige leberstoffwechselspezifische Aufgaben, dazu gehören ebenfalls mitochondriale Enzyme der Atmungskette, z.B.: Afamin, ACOX, AOX, ATPase 6/8 und Cytochrom Oxidase.

Exemplarisch sind nachfolgend die Funktionen einiger wichtiger Enzyme und Proteine im Leberstoffwechsel dargestellt:

Albumin ist ein primäres Serumprotein im adulten Organismus. Von Albumin ist bekannt, dass es an einer Vielzahl von wichtigen Funktionen im Körper beteiligt ist. Es ist an der Aufrechterhaltung des kolloid osmotischen Drucks beteiligt, an der Pufferung und dem Transport von Hormonen, Fettsäuren und Arzneimittel (Doweiko and Nompleggi 1991). **Glutathion-S-Transferase** ist ein Phase II Enzym (Konjugation) der Detoxifikation. Es konjugiert Glutathion an lipophile Xenobiotika zur Inaktivierung und Exkretion dieser Substanzen. **Cytochrom P450 Enzyme** gehören zu den Phase-1 Enzymen (Oxygenierung) und sind für die Detoxifikation von Xenobiotika zuständig. Diese Monooxygenasen des Cytochrom P450 Systems sind integrale Membranproteine mit einem reaktiven Zentrum, dem Häm. **Transferrin** ist eines der Haupteisentransport Proteine im Serum und anderen Körperflüssigkeiten (Usui et al. 2003). **Apolipoprotein**

gehört zu den Apoproteinen. Lipoprotein-Komplexe tragen auf ihrer Außenseite charakteristische Apoproteine, welche sich in der Hüllschicht befinden. Sie dienen als Erkennungsmoleküle für Membranrezeptoren und als essenzielle Partner für Enzyme und Proteine, die am Lipid-Stoffwechsel und Austausch beteiligt sind.

Genexpressionsanalysen mit neurospezifischen PC-12 Zellen und ISC

Mit Hilfe eines neurospezifischen *Microarrays* sollte der Differenzierungszustand, das Wachstum und die Interaktion verschiedener Gene untersucht werden. Diese Analysen wurden mit verschiedenen neuronalen Zelltypen (PC-12, ISC) durchgeführt. Zusammen mit Frau Prof. Grothe (Leiterin des Instituts für Neuroanatomie der Medizinischen Hochschule Hannover) wurde ein 352 Gene umfassender ZNS-Chip optimiert.

Aus Datenbanken wurden neurorelevante Gene ausgewählt, die sich in folgende funktionelle Gruppen einteilen lassen:

Signaltransduktion

Als Signaltransduktion bzw. Signalübertragung werden biochemische und physiologische Prozesse bezeichnet, wobei Zellen auf äußere (z.B. Sehen, Hören, Riechen) oder innere Reize (z.B. Hormone, Neurotransmitter) reagieren. Die Reize werden umgewandelt und in das Innere der Zelle weitergeleitet. An diesen Prozessen sind oft eine Vielzahl von Enzymen und Botenstoffen (z.B. Zytokine (EGF, FGF, IGF), Wachstumshormone) beteiligt. Durch die Bindung der Botenstoffe an ihren spezifischen Rezeptor kommt es zu dessen Aktivierung. Durch eine oder mehrere nacheinander geschaltete Reaktionen (Signalkaskade) wird das ursprüngliche Signal in der Regel verstärkt (Signalamplifikation). An der Signaltransduktion beteiligte Enzyme sind z.B. die Proteinkinasen (z.B. Proteinkinase A, B, C) und MAP-Kinasen.

Rezeptoren

Rezeptoren können sich sowohl außerhalb der Zelle als auch innerhalb der Zelle befinden, dort lösen sie biochemische Signalprozesse aus. Der Rezeptor besitzt eine spezifische Bindungsstelle für einen Liganden (z.B. Neurotransmitter wie Acetylcholin, Dopamin, Adrenalin, Glutamat, γ -Aminobutyrat, Serotonin). Die Rezeptoren in der Zellmembran unterscheidet man in kanalgebundene und nicht kanalgebundene Rezeptoren. Kanalgebundene Rezeptoren ändern bei der Bindung des Liganden ihre Konformation, dadurch ändert sich die Leitfähigkeit der Membran und ein Ionenkanal öffnet sich (z.B. NMDA-(N-methyl-D-aspartat) Rezeptor, Nikotinischer

Acetylcholinrezeptor, Glycinrezeptor, GABA_A-Rezeptor). Nicht kanalgebundene Rezeptoren (z.B. GABA_B-Rezeptor, Dopaminrezeptoren) werden bei Bindung ihres Liganden aktiviert, welcher ein nachgeschaltetes G-Protein (Guaninnucleotid bindene Proteine) ist. Auf der intrazellulären Seite des Rezeptors schließt sich eine weitere Signalkaskade unter der Beteiligung sekundärer Botenstoffe (Neurotransmitter) an, wobei sich ein Ionenkanal öffnet.

Zytokine

Die Zytokine können eingeteilt werden in Wachstumsfaktoren (z.B. epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), transformierender Wachstumsfaktor (TGF- β), Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)), Interleukine (z.B. Interleukin-1, Interleukin-2, TNF- α), Interferone und Chemokine. Sie regulieren überwiegend das Wachstum und die Differenzierung spezifischer Zellen und Gewebe. Besondere Bedeutung haben sie für die Wundheilung, die Entzündungsreaktionen und die Immunantwort.

Neuropeptide

Neuropeptide sind Peptide, die als Botenstoffe (Neurotransmitter) von Nervenzellen freigesetzt werden, dazu gehören z.B. die körpereigenen Opiate. Neuropeptid Y ist das am häufigsten vorkommende Neuropeptid im Gehirn. So spielt es z.B. eine Rolle bei physiologischen Funktionen wie Epilepsie, Nahrungsaufnahme, Gedächtnis, Wahrnehmung und Angst.

Aufbau und Durchführung der Microarrayexperimente

Unter Verwendung der oben beschriebenen *Microarrays* wurde eine Genexpressionsanalyse verschiedener Zellen unter dem Einfluss von Colominsäure durchgeführt. Die Zellen wurden auf Colominsäure beschichteten Oberflächen und dem jeweiligen Standard kultiviert. Für die PC-12 Zellen ist dies eine PLL Beschichtung, bei den Hep-G2 und ISC eine unbeschichtete Oberfläche. Zusätzlich wurden die Zellen auf etablierten Beschichtungen wie Laminin (ISC, PC-12) und Kollagen (Hep-G2) kultiviert. In Tabelle 6 sind die genauen Versuchsbedingungen für jeden Zelltyp dargestellt. Nach der parallelen Kultivierung der Zelltypen auf den unterschiedlichen Substratoberflächen begann das Mikroarrayexperiment mit der RNA-Isolierung (Anhang 6.4.16). Anschließend folgte die reverse Transkription mit gleichzeitigem

Labeling der cDNA durch die Inkorporation fluoreszenzmarkierter dCTP Nukleotide (Anhang 6.5.2-6.5.3).

Tabelle 6: Bedingungen der *Microarray* Experimente.

Bedingung Zelltyp	Standardkultivierung	CA Beschichtung	Kontrolle
PC-12 (4 d differenziert)	Poly-L-Lysin (PLL)	Colominsäure (CA)	Laminin (Lam)
ISC	Zellkulturplastik (PL)	Colominsäure (CA)	Laminin (Lam)
Hep-G2	Zellkulturplastik (PL)	Colominsäure (CA)	Kollagen I (Koll)

Die Chips wurden in einem so genannten *loop*-Design (Altman and Hua 2006; Yang and Speed 2002) hybridisiert, welches in Abbildung 44 schematisch dargestellt ist (Anhang 6.5.4). Dies ist eine spezielle Form des *dye-swap* Designs, wodurch die Anzahl der benötigten Chips minimiert wird. Nach der Hybridisierung erfolgte die Signalverstärkung mittels TSA-Kit und das Waschen der Chips (Anhang 6.5.5). Im Anschluss erfolgten das Scannen der Chips (6.5.6) und die Datenanalyse. Datenanalyse wurde von Cornelia Repenning (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt.

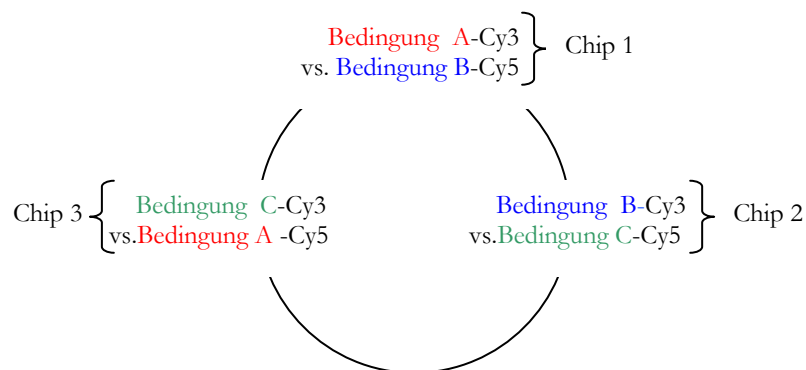


Abbildung 44: Schematische Darstellung des *loop*-Designs.

Dieses experimentelle Format wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Chipexperimente genutzt.

Nach der primären Datenanalyse erfolgte die Qualitätskontrolle der Hybridisierungssignale (Anhang 6.5.7). Diese beinhaltete die Berechnung der Zirkularität der Spots, deren Standardabweichung und den Prozentsatz an geflaggt Daten. Der Prozentsatz an geflaggt Daten (z.B. Hintergrund des Signals größer als das Signal des Spots) lag insgesamt zwischen 11 und 19 %, somit waren ca. 80-90 % der Daten verlässlich auswertbar. In Tabelle 7 ist exemplarisch das Ergebnis der

Qualitätskontrolle des humanen Leberchips dargestellt. Danach wurden die Daten einer sekundären Datenanalyse unterzogen (Anhang 6.5.7).

Tabelle 7: Qualitätskontrolle des humanen Leberchips für die Hep-G2 Zellen.

	Scans	Zirkularität	Spots mit hoher Standardabweichung	geflaggte Daten [%]
Chip 1	1. Scan	83	315 (241)	27
	2. Scan	75	360 (308)	27
	3. Scan	75	360 (308)	27
	4. Scan	77	314 (248)	18
	5. Scan	78	363 (313)	17
			Mittelwert	19
Chip 2	1. Scan	37	259 (165)	19
	2. Scan	76	302 (251)	12
	3. Scan	64	284 (203)	12
	4. Scan	42	259 (168)	6
	5. Scan	68	309 (205)	6
			Mittelwert	11
Chip 3	1. Scan	71	244 (193)	32
	2. Scan	89	329 (297)	18
	3. Scan	93	271 (242)	18
	4. Scan	86	243 (205)	12
	5. Scan	99	289 (247)	10
			Mittelwert	18

Zur Interpretation der Daten wurde die KEGG Datenbank herangezogen, da mit Hilfe der KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Datenbank den Genen ihre biologische Funktion zugeordnet werden kann. Dies erleichtert die Interpretation der Genexpressionsdaten. Gerade durch die Entwicklung der *High-Throughput* Techniken, wie der DNA-Sequenzierung und den *Microarrays* ist der Bedarf für automatische Kommentierung und Analysen von großen Datensätzen entstanden. Als ein mögliches Portal kann dafür die KEGG Datenbank genutzt werden. Die KEGG Orthologie (KO) ist ein Teil dieser Datenbank. In diesem Bereich sind die biologischen Pfade mit den genomischen Informationen verknüpft. Über diese Pfade können systematische Studien über die Regulation von Genexpressionen durchgeführt werden, somit geben sie Einsicht in die inneren Aktivitäten der Zellen (Kanehisa et al. 2004). Mit Hilfe der KEGG Datenbank wurden die Gene ihren Pfaden zugeordnet, die als Grundlage zur Interpretation der Genregulation dienen.

Ergebnis der Genexpressionsanalyse in Leberzellen (Hep-G2) mittels humanen Microarrays

Zur Untersuchung des transkriptionalen Einflusses der verschiedenen Beschichtungen wurden die Hep-G2 Zellen ($3\cdot 10^6$ Zellen) für 5 Tage auf den Beschichtungen kultiviert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und dann, wie in Anhang 6.5.2-6.5.5 beschrieben, in fluoreszenzmarkierte cDNA umgeschrieben und auf dem humanen Leberchip hybridisiert. Anschließend erfolgten die Primäranalyse, die Qualitätskontrolle der Hybridisierungssignale und die Sekundäranalyse (Anhang 6.5.7).

In der Tabelle 8 sind die Gene angegeben und farblich markiert, die auf allen drei bzw. auf zwei der unabhängig voneinander hybridisierten Chips des *loop*-Designs reguliert waren. Zum Beispiel ist alpha-1-Antitrypsin auf der CA vs. Kollagen Beschichtung als auch bei der CA Beschichtung vs. Plastik reguliert. Gene, die nur in einem der drei Vergleiche reguliert waren, wurden für die Analyse der Daten nicht beachtet. Die „häufiger“ regulierten Gene waren von größerem Interesse.

Tabelle 8: Auswahl von regulierten Genen der Hep-G2 Zellen.

Tabellarische Zusammenfassung ausgewählter regulierter Gene. Zahl -1/1 bedeutet schwach, -2/2 mittel, -3/3 stark reguliert. Rot markiert sind die auf CA hoch↑ bzw. runter↓ (-) regulierten Gene im Vergleich zu Koll I und PL. Blau markiert sind die auf Kollagen I hoch↑ bzw. runter↓ (-) regulierten Gene im Vergleich zu CA und PL.

Vergleich der Genregulation der Hep-G2 Zellen					
Gene	CA vs. PL	CA vs. Koll I	Koll I vs. PL	I	Anzahl reguliert
akute Phase	α-1-Antitrypsin	1	-1	2↑	3
	Antithrombin III	0	2	-2↓	2
	Fibrinogen	-1	-1↓	0	2
	Interleukin 6	-1	0	-1	2
	Alpha1-Microglobulin	1	0	2	2
	Alpha-2-HS-Glycoprotein	2	0	2	2
Phase II Enzyme	Glutathione S-transferase theta 1; GSTT1	0	-1	1↑	2
	N-Acetyl-Transferase2; NAT2	0	-2	2↑	2
Matrix Proteine	Kollagen V	-1	-2↓	0	2
	Elastin	1	1↑	0	2
	Alphatubulin	-1	0	-1	2
	Fibronectin	2	3↑	0	2
Fettstoffwechsel	Apolipoprotein; ApoB-100	1	2↑	-1↓	3
	ApolipoproteinC-III	-2	-2↓	0	2
	ApolipoproteinC-II	-2	0	-1	2
Energie-metabolismus	Cytochromoxidase III	1	-1	2↑	3
	Cytochromoxidase	2	0	2	2
	Acyl-Coenzyme A oxidase 1; AC0X	0	1	-1↓	2
	ATPase6/8	1	0	1	2

Kinase	Casein kinase 1, alpha 1; CSNK1A1	-2	0	-2	2
	Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3B)	-1	0	-1	2
Sonstige	Epidermaler Wachstumsfaktor; EGF	-1	-1↓	1↑	3
	11-Betahydroxysteroiddehydrogenase	-2	-2↓	0	2
	Dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 4; NADH4	1	0	2	2
	Constitutive aktiv Rezeptor; CAR	-3	0	-2	2
	CREB binding protein; CREBBP	1	1↑	0	2
	Signal transducer and activator of transcription; STAT5B	-1	0	-1	2
	Interferon gamma receptor 2; IFNGR2	-1	0	-1	2
	PP2A mRNA	-2	0	-1	2
	Prothrombin	-1	0	-2	2
Retinoid X Rezeptor alpha	2	0	1	2	

Auffällig in diesem Vergleich der Genregulation auf Beschichtungen von Kollagen I, Colominsäure und der unbeschichteten Zellkulturoberfläche war die Regulation der akute Phase Proteine (α -1-Antitrypsin, Fibrinogen, Antithrombin III, Albumin). Fibrinogen und α -1-Antitrypsin waren auf Kollagen I hoch reguliert und das negative akute Phase Protein Antithrombin III war herunter reguliert. Das Gen für das akute Phase Protein Albumin war ebenfalls exprimiert (vergl. RT-PCR), jedoch nicht reguliert. Das Kollagen I, welches in Makrophagen eine Immunantwort hervorruft, in Folge derer die Interleukine 1β und Interleukin 8 verstärkt exprimiert werden, ruft auch bei den Hep-G2 Zellen eine Immunantwort hervor. Ein erhöhter Anteil an Kollagen I kann auch in einer zirrhotischen Leber festgestellt werden (Seyer et al. 1977), die Hepatozyten könnten als Folge dessen verstärkt z.B. akute Phase Proteine exprimieren. Zusätzlich waren auf Kollagen I die Phase II Enzyme Glutathion-S-Transferase und N-Acetyltransferase hoch reguliert. Ihre verstärkte Expression könnte mit der Regulation der akute Phase Proteine in Zusammenhang stehen. Die Cytochrome (Phase I Enzyme) wurden von den Hep-G2 Zellen auf allen Beschichtungen exprimiert, waren jedoch nicht unterschiedlich reguliert. Die Colominsäure rief hingegen keine Immunantwort hervor, da diese Gene auf CA herunter reguliert waren.

Weiterhin konnte auf der CA Beschichtung eine verminderte Expression der Matrixproteine (Kollagen V, Fibrinogen) beobachtet werden, was auf eine verminderte Adhäsion der Hep-G2 Zellen auf CA hindeutete, siehe auch Abbildung 27 auf Seite 42. Die Matrixproteine Fibronectin und Elastin sind im Gegensatz dazu auf CA hoch reguliert. Elastin ist ein natürlicher Bestandteil der Leber, es kommt in vielen

Bindegewebe vor und ist verantwortlich für biomechanische Eigenschaften der meisten Gewebe und Organe. Fibronectin ist in verschiedenen zellulären Prozessen involviert wie in Zelladhäsionsprozessen, Migration, Embryogenese, Wundheilung, Blutkoagulation und Abwehrprozessen (siehe Tabelle 20, S. 120. KEGG *Pathways*).

Darüber hinaus waren auf CA noch weitere Gene reguliert, deren Funktionen in diesem Zusammenhang nicht eindeutig interpretiert werden konnten wie z.B. die schwache Expression des Creb *Binding Proteins*. Creb ist ein gut untersuchter Transkriptionsfaktor, er koordiniert eine Reihe von Transkriptionen, ist wichtig in Prozessen wie Proliferation und Differenzierung und ist für tumorsuppressive Eigenschaften bekannt. (Tillinghast et al. 2003). Ferner kommt Creb in 12 verschiedenen *Pathways* vor (Anhang KEGG), was eine Aussage über die Rolle des Gens in diesem Vergleich erschwert. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) ist an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt (siehe Tabelle 20, S.120). *In vivo* hat er einen bedeutenden Effekt auf die Differenzierung von Zellen und ist ein wichtiger mitogener Faktor für eine Vielzahl von Zellen. Die Rolle des Apolipoproteins C-III (herunter reguliert) und des ApoB100 (hoch reguliert) ist unklar. In diesen Experimenten rief die Colominsäure keine Immunreaktionen hervor und schien somit biokompatibel zu sein. Besonders interessante Gene sollten in folgenden Arbeiten durch *real time* PCR untersucht und quantifiziert werden.

Ergebnis der Genexpressionsanalyse in neuronalen Zellen (PC-12) mittels eines ZNS-Microarrays

Die PC-12 Zellen ($6 \cdot 10^6$ Zellen) wurden in beschichteten Zellkulturflaschen (Anhang 6.4.4) ausplattiert. Nach 2 Tagen wurde auf d Differenzierungsmedium (Anhang 6.4.1) gewechselt. Nach 4 Tagen Kultivierung mit dem Differenzierungsmedium wurde die Gesamt-RNA isoliert. Die weitere Durchführung und Analyse erfolgte analog zu den Hep-G2 Zellen.

Die Unterschiede in der Genexpression der PC-12 Zellen waren zwischen der CA und PLL Beschichtung am geringsten. Die größten Effekte traten zwischen PLL und Laminin bzw. zwischen Laminin und CA Beschichtungen auf. Wie erwartet waren durch die Differenzierung eine Reihe von Rezeptoren exprimiert und auch reguliert. In Tabelle 11 ist eine Auswahl von Genen aufgeführt, die mindestens bei zwei der unabhängigen Experimente reguliert waren. Im Anhang 6.5.7 ist in Tabelle 21 (Seite 123) eine Auswahl

von regulierten Genen mit ihren dazugehörigen *Pathways* von KEGG aufgeführt. Die Tabelle wurde durch weitere Gene, die von Interesse waren, ergänzt.

Im Vergleich zu der PLL und der Laminin Beschichtung waren auf CA die folgenden Apoptose Gene, der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor und das *apoptotic death agonist BID* Gen, hoch reguliert. Die Mehrzahl der Gene war auf CA insbesondere gegen Laminin herunter reguliert. Auf Laminin waren im Vergleich zu CA und PLL eine Reihe von neurospezifischen Genen hoch reguliert. Die PC-12 schienen auf Laminin „stärker“ differenziert zu sein bzw. schien der neuronale Charakter der Zellen deutlicher ausgeprägter zu sein. Gene die für Neurotransmitterabgabe (Amino et al. 2002), Signaltransduktion, Zellmotilität (Chen et al. 1996; McCullough et al. 1998), oder an regenerativen Prozessen beteiligt sind, waren stärker transkribiert. Zum Beispiel waren die Rezeptorgene wie der Dopamin Rezeptor, Glutamat Rezeptor, Neuromedin Rezeptor, α -1A-Adrenergic Rezeptor, Adrenergic Rezeptor 2A und der Neuropeptide YY-Y2 Rezeptor auf Laminin hoch reguliert (Tabelle 11, S.25). Nach der Einteilung von KEGG sind sie an *neuroaktiven Ligand-Rezeptor Interaktionen* beteiligt (Tabelle 22, S.123). Des Weiteren wurde der Ciliary neurotrophe Faktor (CNTF) auf Laminin verstärkt exprimiert. Das Protein wird besonders stark in peripheren Nerven exprimiert und ist wichtig für das Überleben und die Regeneration von Motorneuronen. Im Widerspruch dazu steht jedoch die verminderte Expression des Gens in Ischiasnerven nach peripheren Nervenverletzungen (Rabinovsky et al. 1992). Zusätzlich war die Telomerase (TLP 1) auf Laminin schwach reguliert. Die Telomerase (TLP 1) nimmt Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Tumorzellen und neuronalen Stammzellen (Klapper et al. 2001). Durch die Differenzierung der Zellen mit NGF geht die Telomeraseaktivität in der Regel zurück (Fu et al. 1999), dadurch werden die Zellen für die Apoptose sensibler. Dies könnte ein Grund für die verstärkte Transkription der Apoptosegene auf CA sein.

Darüber hinaus war das für die Synthese von Neurotransmittern in Säugetieren verantwortliche Gen, die Histidin Decarboxylase, auf Laminin herunter reguliert. Hoch reguliert war Calcineurin-a- α , eine Ca^{2+} Calmodulin abhängige Proteinphosphatase. Sie ist an verschiedenen Signalübertragungskaskaden beteiligt, die die Entwicklung und Funktion von Immun-, Nerven-, Kardiovaskular- und Muskelskelettsystemen steuert.

Darüber hinaus ist sie in 11 verschiedene *Pathways* involviert, was eine Aussage über die Rolle des Gens in diesem Vergleich erschwert.

Es scheint, dass die Colominsäure die neuronale Differenzierung der PC-12 Zellen gegenüber Laminin nicht fördert, Neurotransmitterabgabe findet nur in geringem Maße statt. Dieses Ergebnis scheint somit mit der verminderten Ausbildung der Neuriten von PC-12 auf CA (Abbildung 30 und 31, S.44/46) überein zu stimmen. Dies bestätigte zudem die Beobachtung von Rauvala, der verminderte Neuritenausbildung von Neuroblastomazellen durch CA festgestellt hat (Rauvala 1984).

Tabelle 9: Zusammenfassung der Genregulation differenzierter PC-12 Zellen.

Tabellarische Zusammenfassung ausgewählter regulierter Gene. Zahl -1/1 bedeutet schwach, -2/2 mittel, -3/3 stark reguliert. Rot markiert sind die auf CA hoch↑ bzw. runter (-)↓, regulierten Gene im Vergleich zu Laminin und PLL. Blau markiert sind die auf Laminin hoch↑ bzw. runter (-)↓, regulierten Gene im Vergleich zu CA und PLL.

Vergleich der Genregulation differenzierter PC-12 Zellen					
Gene	CA vs. PLL	CA vs. Lam	Lam vs. PLL	Anzahl reguliert	
Rezeptor	N-methyl-D-Aspartat 2D; GRIN2D	-1	0	-1	2
	alpha-1A-adrenergic receptor	0	-2	2↑	2
	Cholinergic Rezeptor, nicotinic, beta polypeptide 2; Chrn2	0	3	-3↓	2
	Cholinergic Rezeptor, nicotinic, beta polypeptide 4; Chrn4	0	2	-2↓	2
	Glycinrezeptor beta precursor	0	-2	1↑	2
	GABA _A -alpha 4	0	-2	1↑	2
	YY-Y2 Rezeptor	0	-2	0	1
	GLUR7	0	-2	0	1
	Dopaminrezeptor ;D1	0	-2	0	1
	Neuromedin k receptor	0	-2	0	1
	GABA _A -Rezeptor alpha 5	0	-2	0	1
Zelltod	Tumor necrosis factor Rezeptor	1	2↑	-1↓	3
	Apoptotic death agonist BID	0	2	-2↓	2
Neuropeptid/ Wachstumsfaktor	ciliary neurotrophic factor; CNTF	0	-2	2	2
	Proopiomelanocortin; Pomc	0	1	-2↓	2
Enzym	Calcineurin a alpha	-2	-2↓	0	2
	Histidine decarboxylase; HDC	0	2	-2↓	2
Sonstige	Neurofilament heavy polypeptide; NF-H	-2	0	-3	2
	Proteinkinase C gamma	0	2	-2↓	2
	Telomeraseprotein component 1; TLP 1	0	-1	1↑	2

Ergebnis der Genexpressionsanalyse in neuronalen Zellen (ISC) mittels eines ZNS-Microarrays

Die immortalisierten Schwanzzellen dienen als neuronales Zellmodell und sind den Gliazellen des peripheren Nervensystems ähnlich. Darüber hinaus hat sich in dem Abschnitt 4.2 gezeigt, dass die Zell-Substrat Interaktionen zellspezifisch sind, somit sind die Untersuchungen zur Genexpression der ISC unabdingbar. Die ISC ($1,5 \cdot 10^6$ Zellen) wurden über 4 Tage auf CA und Laminin Beschichtungen sowie einer unbeschichteten Zellkulturoberfläche kultiviert (Anhang 6.4.4). Die Auswertung der Genexpression erfolgte analog zu den PC-12 und Hep-G2 Zellen. Die Gene, die bei dem Vergleich mindestens zweimal reguliert waren, waren auch hier von größerem Interesse (siehe Tabelle 10). Bei der Kultivierung der Zellen auf Zellkulturplastik waren im Vergleich zu der Beschichtung mit CA und Laminin nur wenige Gene hoch reguliert und sind daher bei der Interpretation nicht berücksichtigt worden. Im Vergleich zu den PC-12 Zellen waren bei den ISC deutlich mehr Gene auf der CA Beschichtung gegenüber PLL und Laminin reguliert, wobei auch hier wiederum eine Reihe Genen reguliert waren, die bei Apoptose und Zelltod eine Rolle spielen (Tumor Nekrosis Faktor- α , BH3 *interacting domain death agonist*, die Caspase 7, 8, und 11 und das *cell death* Gene 4). Die Apoptose kann zum einen dazu beitragen, axonale Funktionen und die Effizienz der Faserneubildung zu schwächen, zum anderen tritt Apoptose bei Schwanzzellen auch *in vivo* bei Wiederdurchblutungsprozessen und während der Regeneration des Axons auf (Iida et al. 2004). Ebenso sind die Caspasen essenzielle Enzyme, die bei der korrekten Entwicklung eines Lebewesens, aber auch bei der Antwort einer Zelle auf schwere Beschädigungen involviert sind.

Darüber hinaus waren Gene, die bei regenerativen Prozessen eine Rolle spielen, auf CA verstärkt transkribiert. Zum Beispiel die MAP-Kinasen (mitogen aktivierten Proteinkinasen). Sie spielen eine wichtige Rolle bei regenerativen Prozessen, die von der Aktivität der Schwanzzellen abhängen (Myers et al. 2003; Ogata et al. 2006). Weiterhin war die choline Acetyltransferase hoch reguliert. Das Enzym ist z.B. während der Regenerierung von Motorneuronen (Ibanez et al. 1991) reguliert.

Weiterhin waren auf CA GABA-Rezeptoren, wie GABA_A-Rezeptor- $\alpha 2$, GABA_A-Rezeptor- $\alpha 5$, GABA_A-Rezeptor- ϵ , und das GABA- $\alpha 3$ Gen insbesondere im Vergleich zu Laminin, herunter reguliert. Die GABA-Rezeptoren sind Transmembranproteine von Nervenzellen, die spezifisch den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure binden. Da

jedoch auch das Enzym Glutaminsäuredehydrogenase, eines der Enzyme, die γ -Aminobuttersäure (GABA) synthetisieren (Priest and Puche 2004), herunter reguliert war, war auch deren Expression verringert. Zusätzlich zu diesen Rezeptoren waren die Rezeptoren Neurokinin B, Neuromedin B Rezeptor und VIPR2 herunter reguliert. Diese Rezeptoren sind an den gleichen *Pathway für Neuroaktive Ligand-Rezeptor Interaktionen* (Tabelle 22, S.125) beteiligt, wie der Dopamin Rezeptor 5, GDNFR- β , POMC, Cholecystokin-B-Rezeptor, die jedoch auf CA hoch reguliert waren. Die ISC gehen somit mit Laminin und CA unterschiedliche Wechselwirkungen ein, so dass unterschiedliche Rezeptoren verschieden transkribiert werden.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Genregulation immortalisierter Schwanzzellen.

Tabellarische Zusammenfassung einiger ausgewählter regulierter Gene. Zahl -1/1 bedeutet schwach, -2/2 mittel, -3/3 stark reguliert. Rot markiert sind die auf CA hoch \uparrow bzw. runter (-) \downarrow regulierten Gene im Vergleich zu Koll I und PL. Blau markiert sind die auf Kollagen I hoch \uparrow bzw. runter (-) \downarrow regulierten Gene im Vergleich zu CA und PL.

Vergleich der Genregulation immortalisierter Schwanzzellen					
Gene	CA vs. PL	CA vs. Lam	Lam vs. Pl	Anzahl reguliert	
Rezeptor	Cholecystokinin A Rezeptor; cckbr	2	2 \uparrow	0	2
	brain-specific somatostatin Rezeptorgen	1	0	2	2
	GABA _A - α 3	-3	-2 \downarrow	0	2
	Glial cell line derived neurotrophic factor receptor- β ; GDNFR- β	2	1	0	2
	Neurokinin b	-2	-2 \downarrow	0	2
	Neuromedin-b Rezeptor	-3	-3 \downarrow	0	2
	Vasopressive intestinal peptide Rezeptor; VIPR2	0	-2	2 \uparrow	2
	Dopamin receptor D5; DRD5	2	1 \uparrow	0	2
	GABA _A -Rezeptor- α 2	0	-3	0	1
	GABA _A -Rezeptor- α 5	0	-3	0	1
GABA _A -Rezeptor- ϵ	0	-3	0	1	
Apoptose	TNF- α	2	2 \uparrow	1	3
	Caspase 7	3	2 \uparrow	0	2
	Caspase 8	2 \uparrow	0	2	2
	Apoptotic death agonist BID	2	2 \uparrow	0	2
	Programmed cell death 4	2	2 \uparrow	0	2
Neuro-peptid/ Wachstums-faktor	Proopiomelanocortin; Pomc	3	2	0	2
	Cortistatin 14	3	0	2	2
	Heparin-binding growth factor Rezeptor 2	2	0	2	2
Enzyme	2', 3'-cyclic necleotid 3-phosphodiesterase;	3	0	3	2
	Thyrosinhydroxylase	3	0	3	2
	choline acetyltransferase gene	2	2 \uparrow	0	2

Enzyme	Histidin decarboxylase; HDC	3	0	3	2
	glutamic acid decarboxylase ; GAD	-2	-2↓	0	2
Signal-trans- duktion	MAP kinase kinase	2	1↑	1	3
	MAP kinase kinase kinase 1; MEKK1	2	2↑	0	2
	nuclear factor kappa B p105 subunit	2	0	2	2
Trans- porter	Norepinephrine transporter b; NET b	-2	0	-2	2
	Glukose transporter protein	2	0	2	2
	acetylcholin transporter	-2	-2↓	0	2
	Cationic, amino acid transporter-1CAT 1	3	0	2	2
Struktur	NCAM	2	0	2	2
	Alpha-tubulin	0	-2	1↑	2
Vesikel	SNAP 25	3	0	3	2
	Synaptophysin	3	0	2	2
	Synaptotagmin	2	1↑	2	3
Sonstige	Neurexin 2	2	0	2	2
	Neuroigin 2	0	3	-2↓	2
	Neuroigin 3	3	0	2	2
	Presenilin 2	2	0	2	2
	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	0	-1	2↑	2
	Nestin	1	0	2	2

Fazit: Die Genexpressionsanalysen mit dem leberspezifischen Chip und den Hep-G2 Zellen konnte die Biokompatibilität der Colominsäure bestätigen. Akute Phase Proteine wurden auf Kollagen I hoch reguliert, nicht aber auf CA.

Die Transkriptionsanalyse der differenzierten PC-12 Zellen mittels des ZNS Chips, bestätigten die neuronale Differenzierung der Zellen. Die in der Literatur beschriebenen NGF Effekte auf die Genexpression konnten experimentell bestätigt werden. Rezeptoren und andere neurospezifische Gene wurden zwar exprimiert, jedoch etwas schwächer als auf Laminin.

Die Genexpressionsanalyse der immortalisierten Schwanzzellen mittels des ZNS-Chips zeigten ebenfalls eine verstärkte Regulation einiger Rezeptorgene aber auch eine verstärkte Transkription von Apoptose Genen auf CA. Da Gene, die in der Nervenregeneration involviert sind, wie Map-Kinasen, Apoptose Gene und der Dopamin Rezeptor 5 auf CA hoch reguliert waren, könnte CA die Regeneration von Nerven unterstützen. Zur Bestätigung dieser Hypothese müssten jedoch noch nähere Untersuchungen unter der Verwendung von primären neuronalen Zellen durchgeführt werden.

4.6 Modifizierung von Colominsäure

4.6.1 Untersuchungen von quervernetzter Colominsäure

Nach den Untersuchung der Zytotoxizität der CA und der CA Beschichtungen, in einem so genannten „zweidimensionalen“ System, wurde die CA in dreidimensionale Strukturen überführt. Durch die Quervernetzung von Colominsäure mit Diepoxyoctan entstanden Hydrogele. Die Hydrogele wurden von Silke Berski am Institut für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelt und zur Verfügung gestellt. Die Gele unterschieden sich im Verhältnis von Quervernetzer zu Colominsäure bzw. in der Aufreinigung. Die Gele (SB 263.1; SB 301 a; SB 301 b) wurden auf ihre Zytotoxizität nach 5, 6 und 7 Tagen mittels MTT-Tests analysiert.

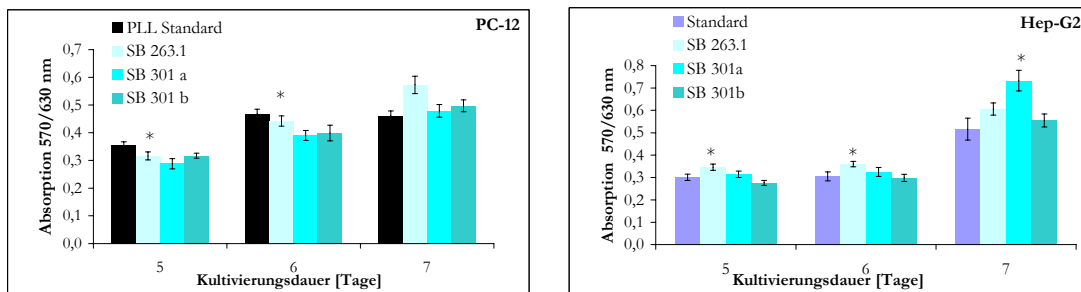


Abbildung 45: Zytotoxizität verschiedener CA Hydrogele auf PC-12 Zellen und Hep-G2 Zellen.

Die Zellen (4000) wurden in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte ausplattiert und verschiedene Gele (SB 263.1; SB 301 a; SB 301 b) wurden zu den Zellen gegeben. Nach 5, 6 und 7 Tagen wurde der MTT-Test durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=6$), statistisch signifikante Unterschiede mit $p<0.05$ sind mit * gekennzeichnet.

In Abbildung 45 sind die Resultate der Zytotoxizitätsmessung verschiedener Colominsäure Hydrogele dargestellt. Der Verlauf der Viabilität/Proliferation unterschied sich geringfügig von den Standards. Bei den Hep-G2 Zellen wurden zum Teil höhere Gesamt-Viabilität/Proliferation durch die Zugabe des Gels SB 301 a zu den Zellen als beim Standard erreicht. Die Gele SB 236.1 und 302 b hatten keinen Einfluss auf die Viabilität/Proliferation der Zellen, sie waren nicht zytotoxisch.

Die Besiedlung der Gele war nicht erfolgreich. Erste Versuche zeigten, dass die Zellen nicht auf der Oberfläche der Materialien adhärten (Daten nicht gezeigt). Für nähere Untersuchungen wurden die Gele in einer strukturierten Schale hergestellt, um dem Gel eine Oberflächenstruktur zu geben (siehe auch strukturiertes β -Glucan). Zusätzlich wurde das Gel zur Förderung der Zellanhaftung mit Poly-L-Lysin beschichtet.

Verwendet wurden die Gele 457 und 458 und die mit PLL beschichteten Gele 457+PLL und 458+PLL (fortlaufende Nummern von Silke Berski). Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Bestimmung der Zellviabilität/Proliferation nach 5 und 14 Tagen auf den Materialien dargestellt (Abbildung 46).

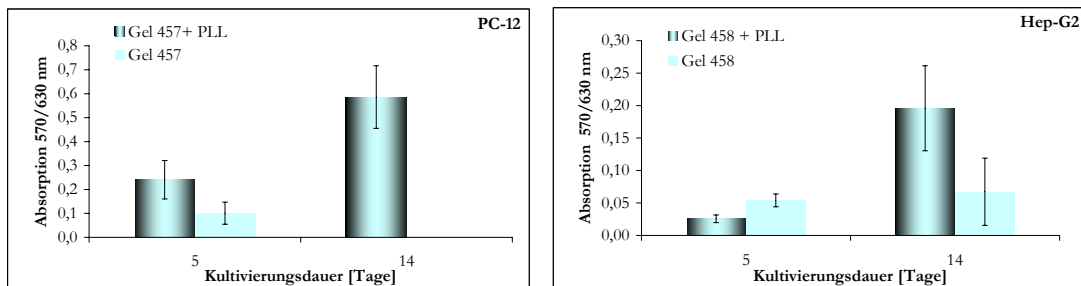


Abbildung 46: Viabilität/Proliferation von PC-12 und Hep-G2 auf einem CA Hydrogel bzw. einem mit PLL beschichteten CA Hydrogel. Bestimmt wurde die Zellviabilität/Proliferation der Zellen auf den Gelen 457/458 und den mit PLL beschichteten Gelen 457+PLL und 458+PLL mittels MTT-Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM (n=3).

Sowohl die PC-12 also auch die Hep-G2 Zellen weisen auf dem reinen Hydrogel nur eine sehr geringe Viabilität/Proliferation auf. Bei den PC-12 Zellen konnte nach 14 Tagen keine Viabilität/Proliferation mehr bestimmt werden. Durch die Beschichtung des Gels mit PLL konnte die Adhäsion der Zellen auf dem Gel verbessert werden. Die Viabilität/Proliferation der PC-12 und der Hep-G2 Zellen hatte von Tag 5 auf Tag 14 deutlich zugenommen. Die Standardabweichungen waren hingegen hoch, was für eine ungleichmäßige Besiedlung der Materialien sprach.

Durch die Quervernetzung konnte die Colominsäure in eine dreidimensionale Struktur gebracht werden. Die glatte Oberfläche des Hydrogels ermöglichte jedoch nur eine schwache Adhäsion der Zellen auf dem Material. In den folgenden Abschnitten 4.6.2-4.6.4 werden weitere Untersuchungen vorgestellt, bei denen die Colominsäure an unterschiedliche Oberflächen adsorbiert bzw. weiter modifiziert wurde.

4.6.2 Untersuchung von mit Colominsäure beschichteter Keramik

Für den folgenden Versuch wurde eine Keramik als Trägersubstanz gewählt, um die Anhaftung der Zellen auf einem mit Colominsäure beschichteten porösen dreidimensionalen Gerüst zu untersuchen. Die Keramik Sponceram[®] besteht aus Zirkondioxid und wird bereits für das *Tissue Engineering* von Knochen eingesetzt (Suck et al. 2007). Die autoklavierten Sponceram[®] Stückchen mit einer Masse von 15-20 mg

wurden jeweils mit 100 µl einer 5 mg/ml CA- bzw. PSA-K1 Lösung beschichtet. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgenommen und die Matrizes zweimal mit PBS gewaschen. Die Matrizes wurden über Nacht in Medium äquilibriert und anschließend mit 3000 immortalisierten Schwanzzellen in 50 µl Medium besiedelt. Zur Verbesserung der Adhäsion wurden die Zellen auf der Keramik zunächst eine halbe Stunde bei 350 rpm im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, dann eine weitere halbe Stunde ohne Schütteln. Nachfolgend wurde das *Well* mit 200 µl Medium aufgefüllt. Nach 4, 7, 11 und 14 Tagen wurde die Viabilität/Proliferation der Zellen auf dem Material mittels MTT-Tests bestimmt.

In Abbildung 47 ist die Bestimmung der Viabilität/Proliferation von immortalisierten Schwanzzellen auf mit CA bzw. PSA-K1 beschichtetem Sponceram[®] jeweils im Vergleich zu unbeschichtetem Sponceram[®] dargestellt. Der Vergleich der Viabilität/Proliferation zwischen dem mit CA beschichteten und dem unbeschichteten Sponceram[®] ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Zellen wiesen auf den Materialien die gleiche Viabilität/Proliferation auf. Auf dem mit PSA-K1 beschichteten Sponceram[®] zeigten die immortalisierten Schwanzzellen an Tag 4 und 7 signifikant höhere Viabilität/Proliferation auf als auf dem unbeschichteten Sponceram[®]. An Tag 11 und 14 war die Viabilität/Proliferation der Zellen vergleichbar. Somit scheint die CA in den ersten Tagen die Proliferation der Zellen zu fördern, über den weiteren Kultivierungszeitraum von 14 Tagen war dieser Effekt dann nicht mehr zu beobachten.

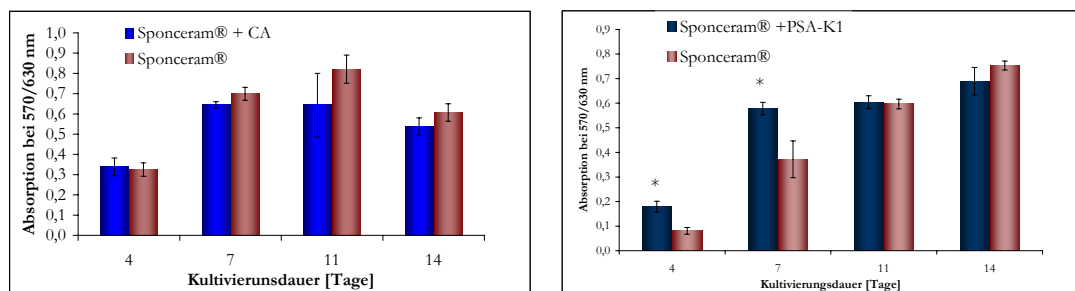


Abbildung 47: Viabilität/Proliferation von ISC auf Sponceram[®] ohne und mit CA/ PSA-K1 Beschichtung.

Sponceram[®] wurde mit CA bzw. PSA-K1 beschichtet und die Viabilität/Proliferation mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM (n=6), statistisch signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ sind mit * gekennzeichnet.

4.6.3 Untersuchung von mit Colominsäure beschichteten Glasfritten

Im Folgenden wurden Glasfritten als 3D-strukturiertes Gerüst eingesetzt und mit Colominsäure beschichtet, so dass die Zellen in einer dreidimensionalen Struktur wachsen konnten. Zusätzlich wurde der Einfluss verschiedener Porositäten der Gerüstsubstanz auf das Zellwachstum untersucht. Verwendet wurden Glasfritten der Porosität 3 (16-40 μm), 4 (10-16 μm) (Abbildung 48) und 5 (1.0-1.6 μm) der Firma Robu-Glas. Im Institut der Anorganischen Chemie der Leibniz Universität Hannover wurde die Colominsäure kovalent von S. Steinhoff über 3-Glycidyoxypropyl-Trimethoxysilan (GOPTMS) an die Glasfritten gebunden bzw. direkt auf den Fritten adsorbiert. Die Colominsäure wurde zuvor für die Kopplung entschützt (Entfernung der Acetylgruppe), und gefriergetrocknet.

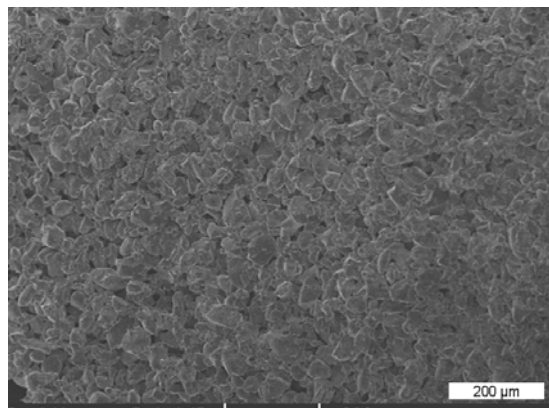


Abbildung 48: REM-Aufnahme einer Glasfritte.

Die Aufnahme einer Glasfritte der Porosität 4, wurde freundlicherweise von Frau Steinhoff aus der Anorganischen Chemie der Leibniz Universität Hannover zur Verfügung gestellt.

Mit Hilfe des TBA-Tests (Thiobarbitursäure-Test) wurde untersucht, ob die Adsorption der Colominsäure bzw. die kovalente Bindung auf den Fritten erfolgreich war. Der Nachweis beruht auf einer Reaktion hydrolysiertes monomeres Zuckermoleküle mit der Thiobarbitursäure. Diese Reaktion kann kolorimetrisch vermessen werden.

Jede Fritte wurde jeweils mit 200 μl Hydrolyseungslösung bedeckt und über Nacht bei 70 $^{\circ}\text{C}$ hydrolysiert. Anschließend wurde ein Aliquot von 50 μl entnommen und der TBA-Test wie im Anhang 6.4.6 beschrieben durchgeführt.

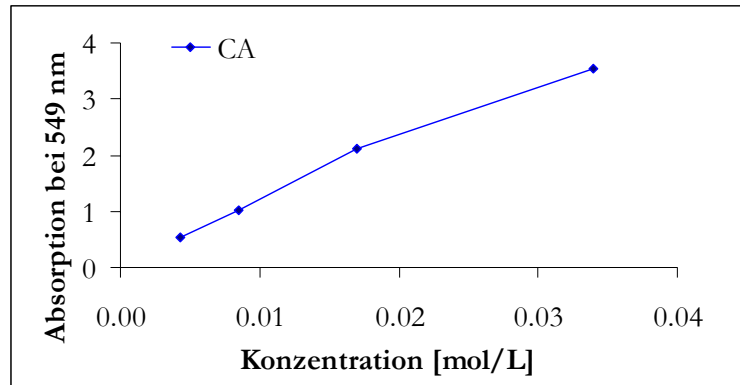


Abbildung 49: Beispiel für eine Kalibration des TBA-Tests.
Mittels des TBA-Tests wurde die CA Konzentration auf den Glasfritten der Porosität 4 bestimmt.

In Tabelle 11 ist das Ergebnis der Dreifachbestimmung des TBA-Tests dargestellt. Sowohl nach der kovalenten Kopplung von CA als auch nach der Adsorption von CA an den Glasfritten der Porosität 4 konnte Colominsäure nachgewiesen werden. Es werden vergleichbare Absorptionswerte erhalten. Die Konzentration wurde über eine Kalibration berechnet, der Colominsäuregehalt betrug 0,0074 mol/L (kovalent über GOPTMS gekoppelt) und 0,0056 mol/L(adsorbiert) auf den Fritten.

Tabelle 11: Bestimmung der CA Konzentration auf Glasfritten der Porosität 4.

	GOPTMS+CA	CA ads.
Absorption	0,9386	0,7540
Konzentration [mol/L]	0,0074	0,0056

Des Weiteren wurde die Viabilität/Proliferation der ISC auf den Materialien nach 14 Tagen und die Verteilung der Zellen auf dem Material mittels DAPI-Färbung bestimmt. Vor der Besiedlung wurden die Materialien mit Isopropanol desinfiziert und über Nacht in Medium äquilibriert. In Abbildung 50 ist das Ergebnis der Bestimmung der Zellviabilität/Proliferation auf den Glasfritten der Porosität 3-5 dargestellt.

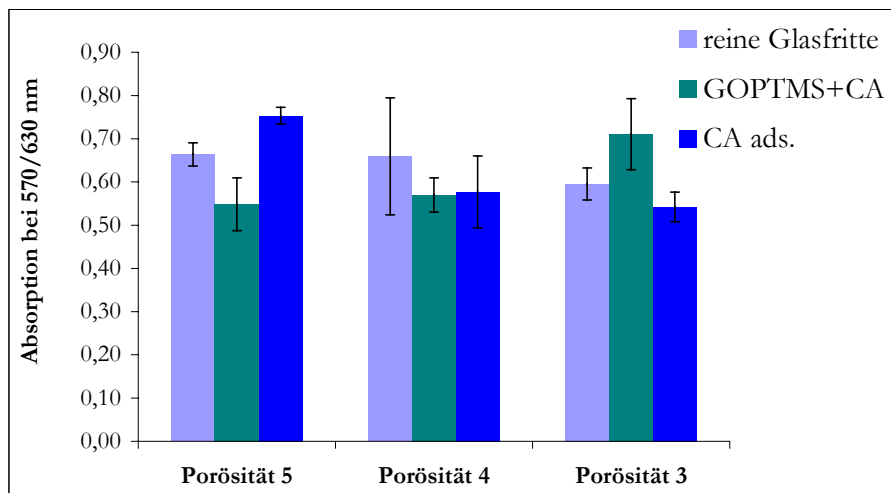


Abbildung 50: Viabilität/Proliferation von ISC auf Glasfritten unterschiedlicher Porosität. Die Bestimmung der Viabilität/Proliferation erfolgte nach 14 Tagen mittels MTT-Tests. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM (n=4).

Die immortalisierten Schwanzzellen adhäreren auf den Glasfritten und wiesen nach 14 Tagen ein hohe Viabilität/Proliferation auf. Die Bestimmung der Zellviabilität/Proliferation ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Porositäten und den unterschiedlich modifizierten Materialien. Die DAPI-Färbung, im Folgenden für das Material mit der Porosität 4 (Abbildung 51) dargestellt, bestätigt die gute Adhäsion der Zellen auf den Materialien.

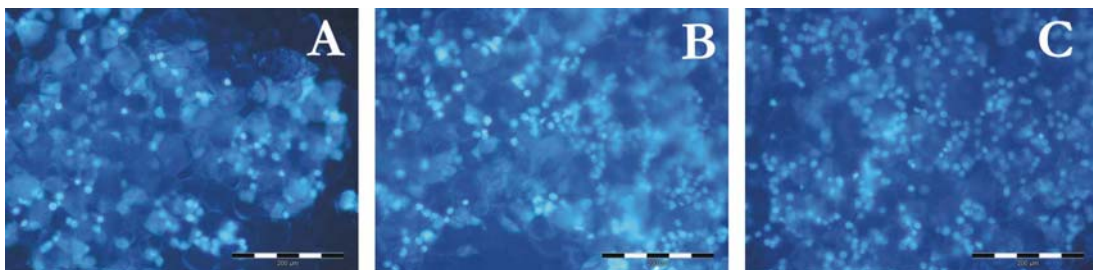


Abbildung 51: Färbung der Zellkerne von ISC mittels DAPI auf Glasfritten mit der Porosität 4 nach 14 Tagen. Abbildung A: ohne Behandlung, B: GOPTMS+CA und C: adsorbierte CA.

4.6.4 Untersuchung von elektrogesponnenen Colominsäure Fasern

Im Folgenden werden CA Modifikationen vorgestellt, bei denen die Colominsäure mit unterschiedlichen Substanzen wie Polyacrylnitril (PAN) und Cellulose-Acetat versponnen wurde. Durch das Electrospinning wurden wasserunlösliche Faserstrukturen hergestellt die als Trägersubstanz für die Zellkultur getestet wurden. Die Materialien wurden von Ulrike Assmann aus dem DIK (Deutsches Institut für

Kautschuktechnologie) zur Verfügung gestellt und mittels Rasterkraftmikroskopie, FT-IR (die Fourier-Transformation Infrarot) und Rasterelektronenmikroskopie auf ihre Zusammensetzung untersucht. Immortalisierten Schwanzzellen wurden auf den Materialien ausplattiert, die Viabilität/Proliferation wurde nach 6 Tagen mittels MTT-Tests bestimmt. Die Colominsäure wurde zusätzlich in Polyacrylnitril-Poly-L-Lysin-Colominsäure (PAN-PLL-CA) Fasern mit Hilfe des ABTS-ELISAs nachgewiesen.

Polyacrylnitril-Poly-L-Lysin/ Polyacrylnitril-Poly-L-Lysin-CA Fasern

Mit Hilfe des ABTS-ELISAs erfolgte der Nachweis von Colominsäure in den Fasern (Durchführung siehe Anhang 6.4.5). Die Auswertung der Signale unter der Berücksichtigung der Standardfehler war jedoch nicht sicher möglich (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden ist das Ergebnis der Viabilität/Proliferation der immortalisierten Schwanzzellen auf den Fasern dargestellt (Abbildung 52).

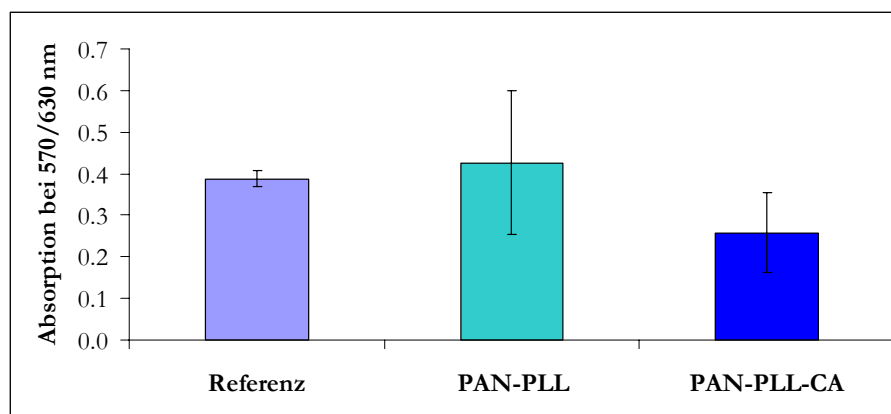


Abbildung 52: Viabilität/Proliferation von ISC auf elektrogesponnenen (PAN-PLL und PAN-PLL-CA) Fasern.

Die Fasern bestehen aus Polyacrylnitril und Poly-L-Lysin (PAN-PLL) bzw. Polyacrylnitril, Poly-L-Lysin und Colominsäure (PAN-PLL-CA). Als Referenz wurde ein unbesponnenes Deckgläschen verwendet. Nach 6 Tagen wurde die Viabilität/Proliferation mittels MTT-Tests bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM ($n=3$).

Die immortalisierten Schwanzzellen wuchsen auf den Fasern. Mit dem ELISA konnte Colominsäure in den Fasern nachgewiesen, jedoch nicht quantifiziert werden. Die Viabilität/Proliferation der Zellen war nach 6 Tagen etwas geringer als auf der Referenz. Die Materialien waren noch nicht optimal für das Wachstum der immortalisierten Schwanzzellen, eine weitere Modifizierung der Materialien könnte zu einer höheren Viabilität/Proliferation beitragen.

Cellulose-Acetat/Cellulose-Acetat-CA Fasern

Im Folgenden wurde das Wachstum der immortalisierten Schwanzzellen mittels Elektrosponning hergestellter Fasermaterialien aus Cellulose-Acetat bzw. Cellulose-Acetat und dem C1-Amid der Colominsäure untersucht. Nach 6 tägiger Kultivierung wurde die Viabilität/Proliferation der Zellen auf den Materialien bestimmt. Phasenkontrastaufnahmen dienten zur Beurteilung der Zellmorphologie und des Wachstumsverhalten auf den Fasern.

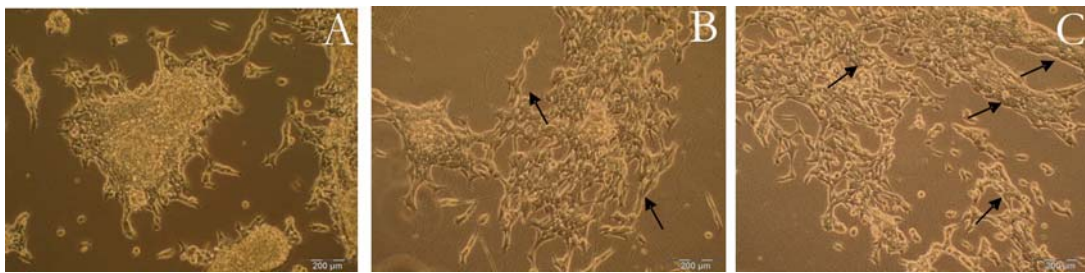


Abbildung 53: Phasenkontrastaufnahme von ISC nach 4 Tagen auf elektrogesponnenen Fasern.

ISC wurden kultiviert auf A: einem Deckglas, B: Deckglas mit Cellulose-Acetat besponnen und C: Deckglas besponnen mit Cellulose-Acetat und Colominsäure. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Zellen, die gerichtet wachsen.

Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen, dass sich die Zellen entlang der Fasermaterialien spreiten. Die Zellen adhärten gut auf der faserigen Oberfläche. Die immortalisierten Schwanzzellen spreiteten gut und wuchsen entlang der Fasern (52 B und 52 C). Im Gegensatz zu der Referenz, auf welcher die Zellen Agglomerate bildeten und nur gering spreiteten (52 A), war auf den Fasermaterialien ein gerichtetes Wachstum entlang der Fasern deutlich zu beobachten. Das gerichtete Wachstum war auch bei der Bildung der Formazankristalle der Zellen auf dem Material zu sehen (Abbildung 55). Untersuchungen der Viabilität/Proliferation der Zellen auf den Materialien zeigten hohe Absorptionswerte (Abbildung 54). Nach 6 Tagen Kultivierung der Zellen auf den Fasermaterialien wurde eine höhere Viabilität/Proliferation bei den Fasermaterialien gegenüber der Referenz gemessen. Signifikante Unterschiede zwischen den Cellulose-Acetat Fasern und dem Cellulose-Acetat-C1-Amid-CA Fasern waren nicht zu beobachten. Die höhere Viabilität/Proliferation der Zellen ist in erster Linie auf das elektrogesponnene Fasergerüst zurückzuführen. Die Zellen zeigten auf den elektrogesponnenen Fasern mit CA ein gerichteteres Wachstum als auf den Fasern ohne CA. In weiter führenden Versuchen müsste das Zellwachstum noch weiter untersucht

werden. Zum Beispiel könnte in folgenden Versuchen der CA Gehalt in den Fasern erhöht und dann das Wachstum und die Migration entlang der Fasern beurteilt werden.

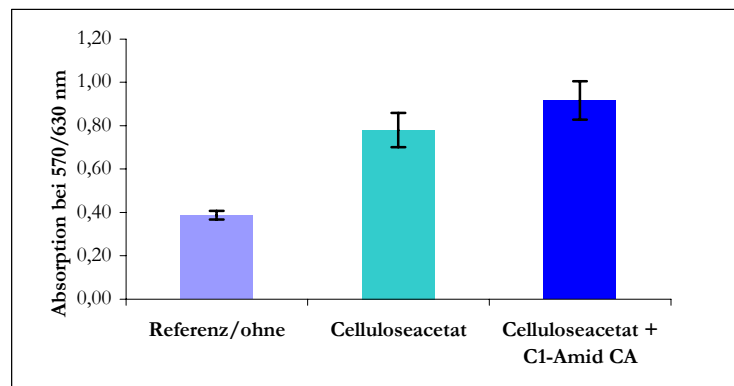


Abbildung 54: Viabilität/Proliferation von ISC auf Cellulose-Acetat Fasern.

Die Elektrogenesponnenen Fasern bestehend aus Cellulose-Acetat bzw. Cellulose-Acetat und dem C1-Amid der Colominsäure. Nach 6 Tagen wurde die Viabilität/Proliferation mittels MTT-Tests bestimmt. Als Referenz wurde ein unbesponnenes Deckgläschen verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM (n=3).

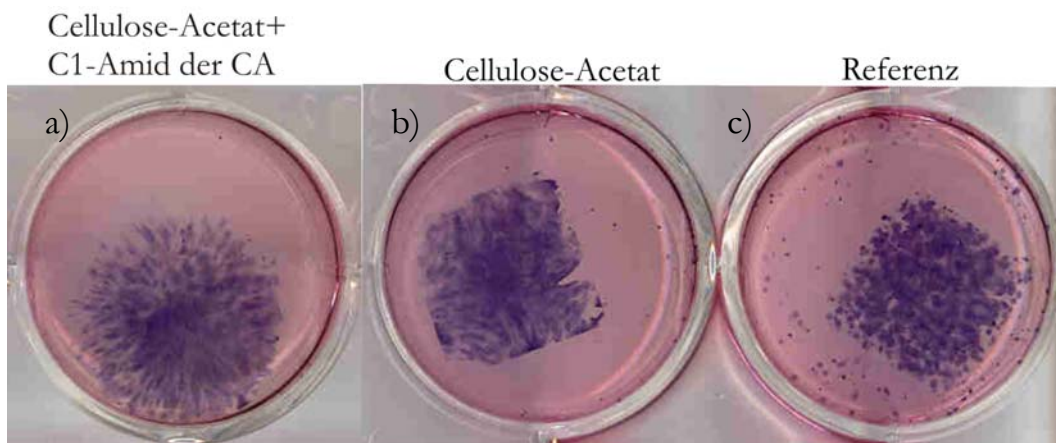


Abbildung 55: Darstellung der Formazankristalle auf Cellulose-Acetat Fasern.

Darstellung der Bildung von Formazankristallen nach der Zugabe von MTT zu ISC auf elektrogenesponnenen Fasern nach 6 Tagen. a) Formazanbildung auf Cellulose-Acetat-C1-Amid-CA-Fasern. b) Formazanbildung auf Cellulose-Acetat Fasern. c) Formazanbildung auf der Referenz (unbesponnenes Deckgläschen).

Fazit: Ziel war es, das Wachstum der immortalisierten Schwanzzellen auf unterschiedlich modifizierten Materialien zu untersuchen und sie in eine dreidimensionale Struktur zu überführen. Die immortalisierten Schwanzzellen wuchsen auf allen vorgestellten Modifikationen der Colominsäure. An das Sponceram[®] und die

Glasfritten ließ sich Colominsäure oder deren Modifikationen adsorbieren und koppeln. Besonders das Sponceram[®] ermöglichte den Zellen ein Wachstum im dreidimensionalen Raum, die den Zellen durch die Porenstruktur gegeben war. Die Beschichtung mit PSA-K 1 schien in den ersten Tagen die Viabilität/Proliferation der Zellen positiv zu beeinflussen, die Unterschiede waren signifikant. Ab Tag 7 nahmen die Absorptionen nur noch gering zu. Die Zellen hatten vermutlich die Plateauphase im Wachstum erreicht. Der Platz für das Zellwachstum reichte nicht mehr aus und die Nährstoffversorgung der Zellen in dem Inneren des Konstruktes war nicht mehr ausreichend. Der Anteil an absterbenden Zellen entspricht in dieser Phase dem Anteil an proliferierenden Zellen.

Die Glasfritten mit der Porosität 3 (16-40 μm) und der Porosität 4 (10-16 μm) ermöglichten ein Wachstum in das Material (siehe auch Abbildung 51). Die Glasfritte mit der Porosität 5 (1.0-1.6 μm) hatte eine zu geringe Porosität für ein Wachstum der Zellen im Inneren der Fritte. Die Oberfläche des Materials schien jedoch so strukturiert zu sein, dass sie ein Wachstum der Zellen ermöglichte, Unterschiede in der Viabilität/Proliferation zu den anderen Fritten waren nicht zu beobachten.

Die elektrogewebten Fasern ermöglichten ebenfalls das Wachstum der Zellen auf den Materialien. Die Fasern sind nicht zytotoxisch. Durch das Spinnen der Fasern entstanden Strukturen, entlang derer die Zellen gerichtet wachsen konnten. Es konnten abhängig vom Material, deren Oberflächenstruktur, Porosität etc. unterschiedliche Zell-Matrix-Interaktionen beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen auf den 3D-strukturierten Oberflächen der Keramik und der Glasfritten gut adhärten. Dadurch erreichten Zellen eine höhere Gesamt-Viabilität/Proliferation als bei den glatten Hydrogelen. Die Ergebnisse zeigten, dass z.B. Strukturen wie die elektrogewebten Fasern, die Wachstumsrichtung der Zellen beeinflussen können.

4.7 Dynamische Kultivierung im Bioreaktor

Ein Material, das sich für die Kultivierung von Zellen als besonders geeignet herausgestellt hat, ist das Kollagen. Die Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care AG produziert Kollagenmatrizes, die in der Kosmetik und insbesondere für die Wundheilung von Verbrennungsoffern eingesetzt werden. Von der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care AG wurden freundlicherweise Kollagenmatrizes mit drei verschiedenen Konzentrationen an CA zur Verfügung gestellt. Aufgrund der helicalen

Struktur (Voet and Voet 1995) des Kollagens und seiner Zugfestigkeit wird es unter anderem für das *Tissue Engineering* von Knorpel eingesetzt (Stark et al. 2006). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Kollagenröhren und Stricke aus Kollagenfilamenten die Regeneration von Nerven fördern (Archibald et al. 1995; Archibald SJ et al.; Yoshii and Oka 2001). Getestet wurden die Kollagenmatrizes C-CA 5 % und C-CA 10 %. Die Prozentangabe bezieht sich auf die eingesetzte Menge an CA in Bezug zur Trockenmasse von eingesetztem Kollagen.

Die modifizierten Kollagenmaterialien wurden zunächst von Frau Bruns im Rahmen ihrer Doktorarbeit auf ihre Eignung für die Kultivierung von Zellen im *Tissue Engineering* untersucht. Dabei stellte sich das Kollagen-CA Material als geeignet heraus. In der vorliegenden Arbeit wurde die Colominsäure mittels des TBA-Tests in den Matrizes nachgewiesen und ihre Abgabe ins Medium untersucht. Des Weiteren wurde das Material auf seine Eignung zur dynamischen Kultivierung in einer Spinnerflasche untersucht. Nach 3 und 4 Wochen wurde die Viabilität/Proliferation der immortalisierten Schwanzzellen mittels MTT-Tests und deren Verteilung mittels DAPI-Färbung auf den Materialien untersucht. Während der Kultivierung wurde der Glukose- und Laktatgehalt gemessen. Verglichen wurden die Ergebnisse mit der Kultivierung der Zellen auf der Kollagen CA Matrix in einer Petrischale (statische Kultivierung). Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt.

4.7.1 Nachweis der Colominsäure und deren Abgabe ins Medium mittels TBA-Tests

Mit Hilfe des Thiobarbitursäure Nachweises wurde der Gehalt an CA in den Kollagen CA Matrizes untersucht. Zur Bestimmung des gesamten Colominsäuregehaltes in den Matrizes wurden diese zunächst bei 37 °C mit 1 ml Kollagenase I-Lösung (1 mg/ml Kollagenase I, 250 U/mg in PBS) verdaut. Nach 24 h wurde ein Aliquot von 50 µl für den TBA-Test entnommen (Durchführung siehe Anhang 6.4.6).

Um die Abgabe von CA aus der Kollagen CA Matrix in das Zellkulturmedium analog zu eine Kultivierung nachvollziehen zu können, wurden die CA Matrizes wie bei einer Kultivierung behandelt. Zunächst wurden die Matrizes mit Isopropanol für 2 h desinfiziert. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt und die Matrizes für 24 h mit PBS äquilibriert (Schritt 1). Darauf folgte ein weiterer Inkubationsschritt mit PBS für weitere 24 h (Schritt 2). Nach jedem Schritt wurde ein Aliquot von 50 µl für den TBA-

Test entnommen. In Tabelle 12 ist das Ergebnis der Colominsäurebestimmung dargestellt.

In dem Rohmaterial befanden sich nach dem Herstellungsprozess ca. 60 µg (C-CA 10 %) und ca. 30 µg (C-CA 5 %) Colominsäure pro Matrix. In dem 1. Schritt lösten sich ca. 60 % der eingearbeiteten Colominsäure heraus. Innerhalb von 48 h (nach dieser Zeit findet meist der erste Mediumwechsel statt), wurden weitere 6-8 % der Colominsäure aus dem Material herausgelöst. Über den Kultivierungsprozess standen den Zellen ca. 30 % der eingearbeiteten Colominsäure zur Verfügung. Bei der C-CA 10 % Matrix entsprach dies einem Wert von ca. 16 µg pro Matrix, welches vergleichbare Werte zu voran gehenden Studien zu Colominsäure sind (Haile et al. 2007).

Tabelle 12: Charakterisierung der C-CA 5 % Matrices.

Untersucht wurde der Gehalt an CA in den Matrices (0,28 cm² Fläche, 0,2 cm Höhe) und die Abgabe von CA ins Medium.

	C-CA 10 % m/m , +/- SEM (n=3)	C-CA 5 % m/m, +/- SEM (n=3)
Gesamter CA Gehalt	475,22 µg (+/-21.19 µg) in 8 Matrices	269,37 µg (+/-6.17 µg) in 8 Matrices
	59,4 µg pro Matrix	33,67 µg pro Matrix
Restgehalt an CA in den Matrices (Differenz vor und nach der PBS Behandlung)	127,60 µg in 8 Matrices	90,94 µg in 8 Matrices
	15,95 µg pro Matrix	11,37 µg pro Matrix
Freigesetzte CA Menge nach 24 Stunden Äquilibration in PBS (Schritt 1)	317,24 µg (+/-14.78 µg) in 8 Matrices	156,68 µg (+/-1.72 µg) in 8 Matrices
	39,66 µg per Matrix	19,58 µg per Matrix
Freigesetzte CA Menge nach 48 Stunden Äquilibration in PBS (Schritt 2)	30,37 µg (+/- 4.10 µg) in 8 Matrices	21,75 µg (+/-2.37 µg) in 8 Matrices
	3,8 µg per Matrix	2,72 µg per Matrix

Hier zeigten sich kaum nennenswerte Unterschiede in der Freisetzung bezogen auf die verfügbare Menge an CA in den Matrices. Frau Bruns hat jedoch festgestellt, dass die verschiedenen Zellsysteme (PC-12, Hep-G2 und ISC) eine hohe Viabilität/Proliferation auf der C-CA 5 % Matrix erreichten und die Zellen spezifische Zellmarker exprimierten

(Bruns). Daher wurde die C-CA 5 % Matrix für die Testung des Materials in der Spinnerflasche ausgewählt.

4.7.2 Reaktorsystem Spinnerflasche

Für die Testung der Materialien wurde eine Spinnerflasche der Firma Techne Corporation, die üblicherweise für die Kultivierung von Suspensionszellen eingesetzt wird, in der Weise modifiziert, dass bis zu zwölf Matrizes in das System eingebaut werden konnten (Abbildung 56). An den Rührkern wurden zwei Halterungen aus Edelstahl angebracht, an die über einen Stift mit O-Ring bis zu sechs Halter für die Matrizes angebracht werden konnten (siehe Abbildung 57). In der Spinnerflasche befanden sich somit versetzt 12 Halter, zwischen welche die Matrizes eingespannt wurden. Für die Probennahme während der Kultivierung wurde die Spinnerflasche zweigeteilt und durch ein Edelstahl-Ringsystem wiederverschließbar gemacht (siehe Abbildung 56 und 57). In der technischen Zeichnung ist der Aufbau der Spinnerflasche im Detail dargestellt. Der Prototyp der Spinnerflasche ist komplett autoklavierbar.

Zum einen wurde getestet, wie sich das Kollagen CA Material in der Spinnerflasche über 4 Wochen verhält, zum anderen wurde das Wachstum der Zellen auf der Kollagen CA Matrix untersucht und zu dem Wachstum der Zellen auf der Kollagen CA Matrix in einer Petrischale verglichen. In der Petrischale findet die statische Kultivierung der Zellen statt, wobei der Stofftransport der Zellen diffusionskontrolliert ist. In der Spinnerflasche wird durch die dynamische Kultivierung (Mediumfluss) der Stofftransport durch Diffusion verringert.



Abbildung 56: Darstellung der Spinnerflasche.

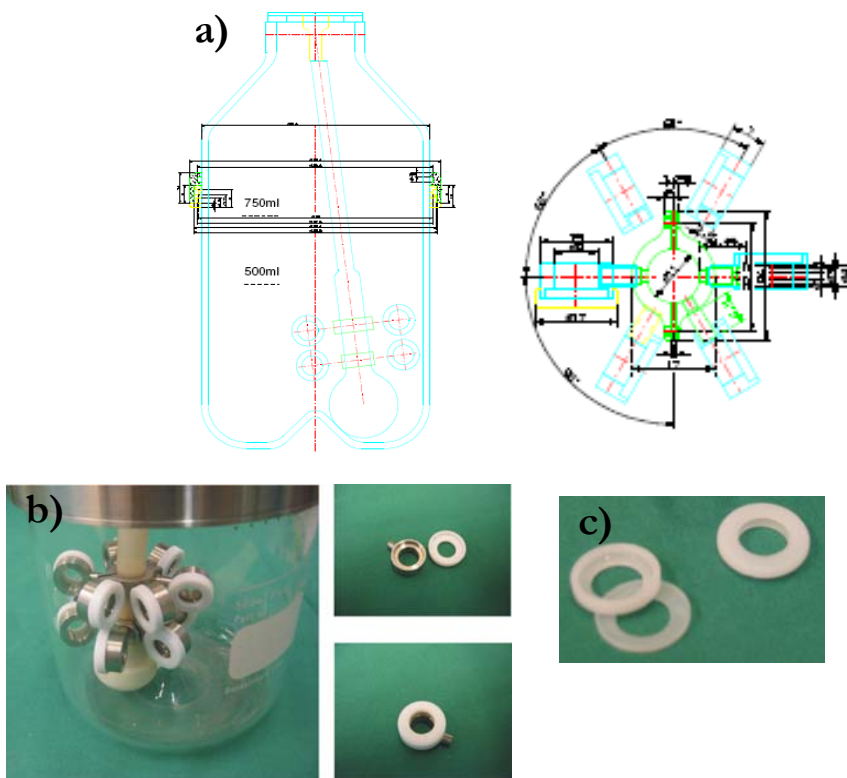


Abbildung 57: Spinnerflasche und technische Zeichnung der Spinnerflasche.

a) Technische Zeichnung der Spinnerflasche. b) Spinnerflasche mit Rührkern, bestückt mit zwölf Matrixhaltern sowie eine Matrixhalterung. c) Matrixhalterung für die statische Kultivierung. Angefertigt wurde die Spinnerflasche in der Werkstatt der Technischen Chemie.

Nach dem Einspannen der Materialien in die Halter stand den Zellen nach der Besiedlung eine Fläche von $0,636 \text{ cm}^2$ zur Verfügung. Die Materialien wurden vor der Besiedlung für 2 h in Isopropanol desinfiziert und über Nacht in Medium äquilibriert. Anschließend erfolgte die Besiedlung der in die Halterungen eingespannten Materialien in einer Petrischale. Nach 24 h wurden die Matrizes für die dynamische Kultivierung in die Spinnerflasche überführt. Das Medium wurde auf 500 ml in der Spinnerflasche aufgefüllt. Parallel erfolgte eine statische Kultivierung. Über den Kultivierungszeitraum von 27 Tagen wurden der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion sowohl in der Spinnerflasche als auch unter statischen Bedingungen verfolgt. Die Viabilität/Proliferation wurde nach 14, 21 und 27 Tagen jeweils von 3 Matrizes aus der dynamischen und statischen Kultivierung bestimmt. Zusätzlich wurden nach 27 Tagen eine Zellkernfärbung mit DAPI durchgeführt und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Kultivierungen gemacht.

In Abbildung 58 ist die Umsetzung des MTT-Reagenzes zum blauen Formazankomplex nach 27 Tagen auf den C-CA 5 % Matrices dargestellt. In Abbildung 59 ist das Ergebnis der Viabilität/Proliferationsmessung nach 14, 21 und 27 Tagen im Vergleich zur statischen Kultivierung dargestellt.

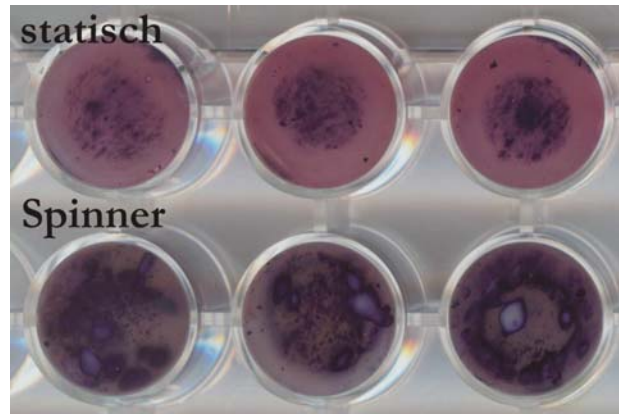


Abbildung 58: Darstellung der Formazankristalle nach 4 Wochen Kultivierung von immortalisierten Schwanzzellen auf C-CA 5 %.

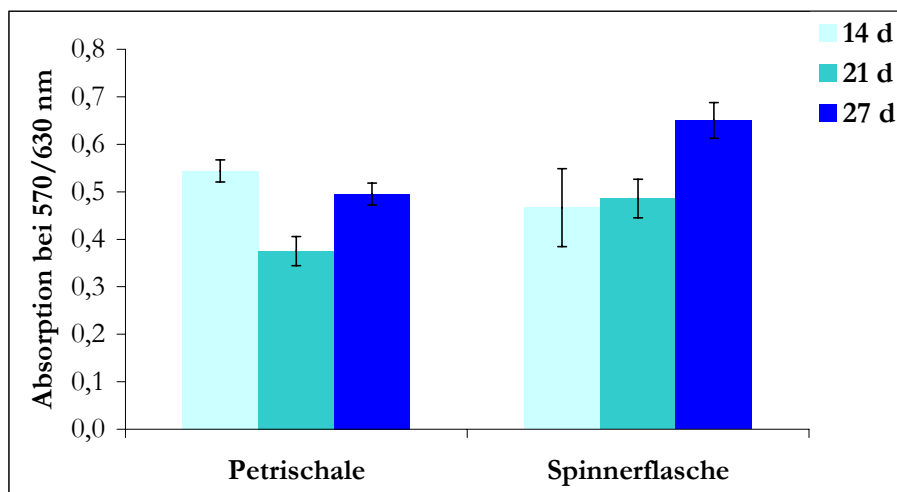


Abbildung 59: Viabilität/Proliferation von ISC auf C-CA-5 % mittels MTT-Tests, Vergleich von Spinnerflasche gegen Petrischale. Gemessen wurde die Viabilität/Proliferation nach 14, 21 und 27 Tagen. 3000 ISC wurden pro Matrix ausplattiert. Dargestellt sind die Mittelwerte +/- SEM (n=3).

Die Messungen der Viabilität/Proliferation ergaben in den ersten 21 Tagen keine deutlichen Unterschiede zwischen der statischen Kultivierung in der Petrischale und der Kultivierung in der Spinnerflasche. (Da eine Dreifachbestimmung erfolgte, wurde keine

Signifikanz bestimmt (Anhang 6.1.). Nach 27 Tagen war die Viabilität/Proliferation der Zellen in der Spinnerflasche höher als in der Petrischale. Die Bildung der Formazankristalle war bei den in der Spinnerflasche kultivierten Zellen gegenüber den unter statischen kultivierten Zellen deutlich stärker (Abbildung 58), so dass noch deutliche Unterschiede in der Viabilität/Proliferation erwartet wurden. In der Petrischale schien die Viabilität/ Proliferation über den Kultivierungszeitraum konstant zu sein, während im Reaktor die Viabilität/Proliferation über die 27 Tage stetig zunahm. Die Bilder der DAPI-Färbung zeigten nach 4 Wochen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf den Materialien (Abbildung 60). In der Spinnerflasche schienen die Zellen jedoch dichter zu wachsen. Durch alternative Methoden zur Messung der Viabilität/Proliferation und durch histologische Färbungen könnten die Zellbesiedlung in zukünftigen Experimenten detaillierter untersucht werden.

Durch die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte das Wachstum der Zellen auf den Materialien bestätigt werden (Abbildung 61). Die Zellen waren in das Material eingebettet und wuchsen entlang der Fasern. Zum Teil wuchsen die Zellen so dicht, dass die poröse Struktur des Materials kaum noch sichtbar war.

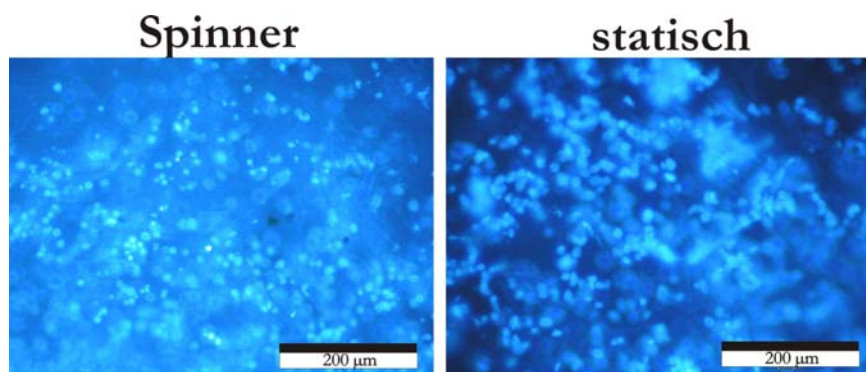


Abbildung 60: DAPI-Färbung von ISC auf C-CA 5 %.

Fluoreszenzaufnahmen zeigen das Ergebnis der DAPI-Färbung nach 4 Wochen auf den C-CA 5 % Matrices. Links, DAPI-Färbung der Zellen im Spinnerreaktor und rechts in der Petrischale kultiviert, 200fache Vergrößerung.

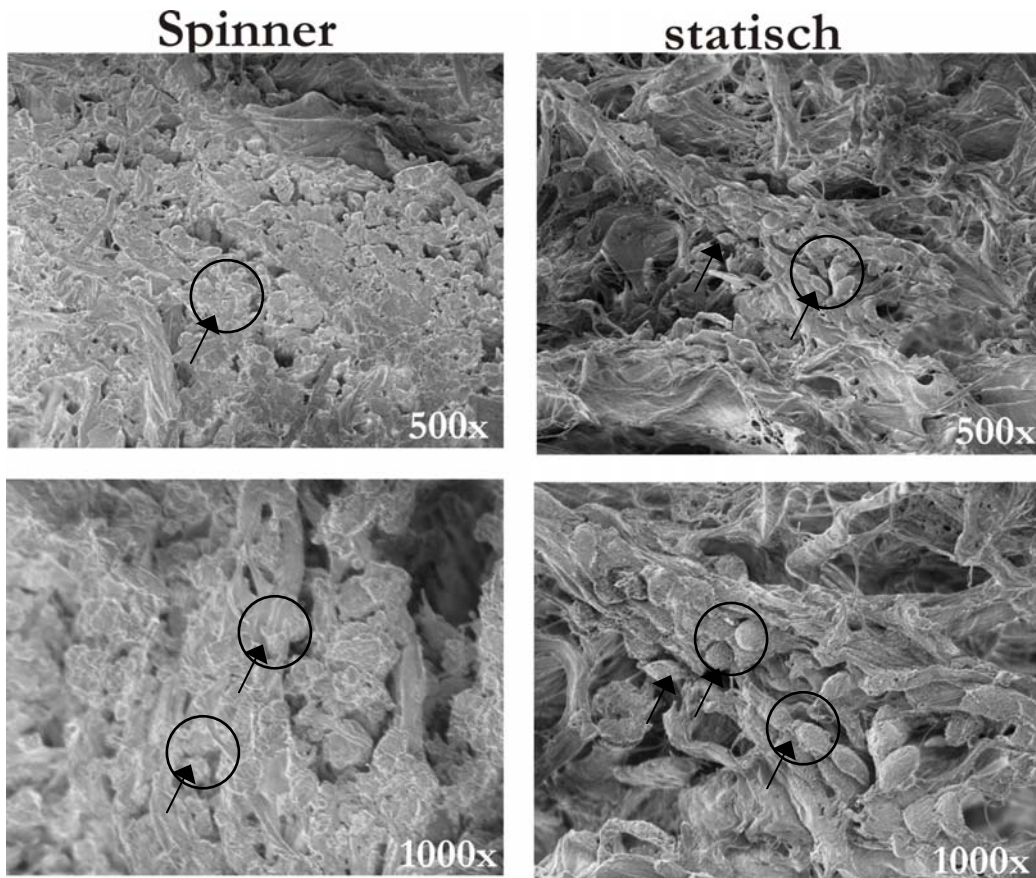


Abbildung 61: REM-Aufnahmen von ISC auf C-CA 5 %.

Die elektronenmikroskopischen Bilder zeigen ein gleichmäßiges Wachstum der ISC auf C-CA 5 % nach 4 Wochen. Links, REM-Aufnahmen von Zellen in Spinnerflasche und rechts in Petrischalen kultiviert. Die schwarzen Pfeile zeigen beispielhaft auf die ISC (eingekreist).

Auch beim Glukoseverbrauch war nach 20 Tagen kein Unterschied zu beobachten (Abbildung 62). Sowohl in der Spinnerflasche als auch in der Petrischale verbrauchen die Zellen ca. 100 mg Glukose pro Matrix. Danach stieg der Glukoseverbrauch der Zellen in der Spinnerflasche gegenüber dem Verbrauch unter statischen Bedingungen auf mehr als das Doppelte an. In der Petrischale verbrauchten die Zellen nach 27 Tagen ca. 30 mg Glukose als in der Spinnerflasche. Im Gegensatz dazu war die Laktatbildung während der statischen Kultivierung höher als bei der Kultivierung im Spinnerreaktor. In Tabelle 13 sind die Werte für den Glukoseverbrauch und die Laktatbildung ab dem 20. Tag der Kultivierung zusammengetragen, um den Unterschied zu verdeutlichen.

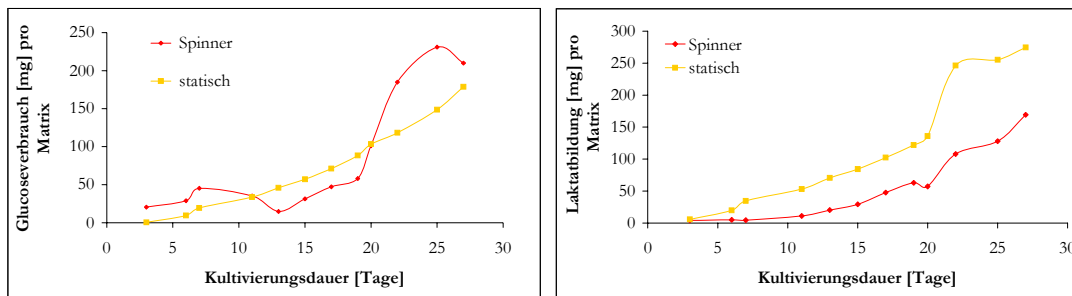


Abbildung 62: Glukoseverbrauch und Laktatbildung von ISC auf C-CA 5 %.
 ISC wurden kultiviert in einer Spinnerflasche und in einer Petrischale (statisch),
 angegeben ist der Gehalt pro C-CA 5 % Matrix.

Tabelle 13: Vergleich einiger Werte des Glukoseverbrauchs mit der Laktatbildung.

Tag	Spinner		Petrischale	
	Glukoseverbrauch [mg]/Matrix	Laktatbildung [mg]/Matrix	Glukoseverbrauch [mg]/Matrix	Laktatbildung [mg]/Matrix
20	101	57	103	136
22	185	108	118	246
25	231	128	149	255
27	210	169	179	275

Fazit: Die C-CA Materialien sind für die Kultivierung in einer Spinnerflasche geeignet. Nach vier Wochen Kultivierung war die äußere Form der Materialien unverändert. Ein Abbau der Materialien hat innerhalb der Kultivierung nicht stattgefunden. Auch im Körper soll der Abbau der Materialien nur langsam erfolgen, so dass die Zellen Zeit haben, die Matrix durch Bildung ihrer eigenen extrazellulären Matrix zu ersetzen. Über einen Kultivierungszeitraum von vier Wochen erreichten die Zellen in der Spinnerflasche eine höhere Viabilität/Proliferation als in der Petrischale. Der Glukoseverbrauch nahm ab der dritten Kultivierungswoche in der Spinnerflasche stärker zu als unter statischen Bedingungen. Die Laktatbildung war geringer als bei der statischen Kultivierung, was ein Indiz für eine bessere Sauerstoffversorgung der Zellen in der Spinnerflasche sein kann. Die Zellen zeigten auf den C-CA Material eine gleichmäßige Verteilung. Ein Unterschied in den Kultivierungen war erst ab der dritten Kultivierungswoche zu beobachten. Bis dahin waren der Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion der Zellen in den beiden Kultivierungssystemen vergleichbar.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der DFG-Forschergruppe 548 „Polysialinsäure Evaluation eines neuen Werkstoffs als Gerüstsubstanz für die Herstellung artifizierlicher Gewebe“ erstellt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener innovativer Biopolymere in der Zellkultur grundlegend untersucht. Colominsäure, ein spezifisches Derivat der Polysialinsäure, und die Biopolymere β -Glucan und Fucoidan wurden auf ihre Biokompatibilität hin untersucht. Verwendet wurden Hep-G2 Zellen, die oft für Biokompatibilitätstests eingesetzt werden, PC-12 Zellen, welche sich durch die Zugabe eines Wachstumsfaktors neuronal differenzieren lassen, und immortalisierte Schwanzzellen, die den *in vivo* vorkommenden Gliazellen ähneln. Da die Colominsäure *in vivo* in Prozesse der Nervenregeneration involviert ist, soll sie die Migration und Proliferation von neuronalen Zellen fördern (Landmesser et al. 1990). Daher wurden in dieser Arbeit die PC-12 Zellen und die immortalisierten Schwanzzellen eingesetzt, um insbesondere den *in vivo* Effekt der Colominsäure *in vitro* zu untersuchen.

Die verschiedenen Polysaccharide wurden zunächst in gelöster Form oder als Pulver zu Hep-G2 Zellen und PC-12 Zellen gegeben. Die Bewertung der Zytotoxizität erfolgte mittels MTT-Tests. Bei den Fucoidan Rohextrakten aus den Braunalgen *Fucus vesiculosus* und *Laminaria digitata* wurde eine Inhibierung der Viabilität/Proliferation beobachtet, insbesondere bei hohen Konzentrationen der Extrakte. Das Fucoidan ist ein Bestandteil von Algenextrakten und bekannt für seine antitumoralen und antibakteriellen Eigenschaften, was die Algenrohextrakte interessant für therapeutische Anwendungen macht (Sakai et al. 2003). Die antitumorale Eigenschaft deutet auch darauf hin, dass bei einer Krebszelllinie, wie bei den verwendeten Hep-G2 Zellen, eine Inhibierung des Wachstums zu erwarten ist. Nach weiterer Aufreinigung und Isolierung des Fucoidans aus den hier verwendeten Rohextrakten wären weitere Anwendungen in der Zellkultur oder im *Tissue Engineering* möglich. Die Polysaccharide β -Glucan und Colominsäure zeigten hingegen keine zytotoxischen Eigenschaften auf die Zellen.

Das β -Glucan ist für seine immunstimulierende Wirkung bekannt und wird auch für die Krebstherapie begleitend eingesetzt (Heinze 2006). Durch die Quervernetzung mit Diepoxyoctan sollte der Übergang zu einem dreidimensionalen Gerüst realisiert werden. Die durch das Quervernetzen entstandenen Hydrogele wiesen ebenfalls keine

zytotoxische Wirkung auf. Die Strukturierung der Hydrogeloberfläche führte zu einer Erhöhung der Besiedlungseffizienz. In weiter gehenden Versuchen sollte die Oberfläche und Stabilität des Gels optimiert werden. So könnten andere Quervernetzer oder andere Vernetzungsmethoden wie die Photopolymerisation verwendet werden. Durch den Einsatz von Porogenen (NaCl, NH_4HCO_3 , Zucker) könnte die Porosität des Materials verbessert werden (Lin et al. 2002; Zeltinger et al. 2001). Ein möglicher Einsatz des β -Glucans *in vivo* bedingt eine weitere Charakterisierung des Materials. Der Einfluss der Gels auf die Translation und/oder Untersuchung der mechanischen Belastbarkeit durch Zug- und Druckkräfte sollten je nach Einsatzgebiet des Materials getestet werden.

Die Colominsäure zeigte keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Weiterhin wurde die CA in Form einer Zellkulturbeschichtung eingesetzt und das Wachstum der Zellen auf der Beschichtung detailliert charakterisiert. Die Beschichtungseffizienz wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers nachgewiesen. Im Anschluss wurde der Einfluss der Colominsäure auf Zellen mit etablierten Beschichtungen wie Poly-L-Lysin und Kollagen verglichen. Anhand des in der Arbeit von Frau Bruns vorgestellten *Screening* Systems wurden die Zelladhäsion (DAPI-Färbung), Viabilität/Proliferation (MTT-Test), spezifische Zellmarker (wie die Neuritenausbildung, RT-PCR) und die Zellmigration untersucht. Die Zellen adhärten und wuchsen auf allen Beschichtungen, wobei unterschiedliche Zell-Matrix Interaktionen beobachtet wurden. Für die PC-12 Zellen stellten sich die Beschichtungen mit PLL und Kollagen als besonders geeignet heraus. Hier bildeten sich nach der Differenzierung die meisten Neuriten aus, für die Hep-G2 Zellen stellte sich eine Kollagenbeschichtung als geeignet heraus. Die ISC zeigten insbesondere auf Laminin eine hohe Proliferation (BrdU).

Darüber hinaus wurde die ECIS-Methode eingesetzt, um das Verhalten der Zellen auf ausgewählten Beschichtungen zu untersuchen. Mit der ECIS Methode wurde beobachtet, dass die ISC und Hep-G2 Zellen auf CA relativ schnell anhafteten, aber langsamer als auf Kollagen und PLL spreiteten. Zusätzlich wurde mit der ECIS Methode die Migration der Zellen untersucht, indem sie elektrisch permittiert wurden. Bei den Hep-G2 Zellen konnte unter dem Einfluss von CA keine verstärkte Migration beobachtet werden. Diese Beobachtungen wurden mit dem klassischen Wundheilungsassay bestätigt. Die ISC konnten nicht elektrisch verwundet werden. Mit Hilfe des klassischen Wundheilungsassays konnte dennoch die Migration der ISC untersucht werden. Unter dem Einfluss hoher CA Konzentrationen wurde eine verstärkte

Migration der Zellen in die Verwundung beobachtet. Untersuchungen mit primären neuronalen Zellen könnten hier zu einer Validierung des Ergebnisses führen und die *in vivo* Förderung der Migration durch CA *in vitro* bestätigen.

Weiterhin wurden molekulargenetische Untersuchungen von Hep-G2 und PC-12 Zellen sowie ISC auf Colominsäure und ausgewählten Beschichtungen durchgeführt. RT-PCR Untersuchungen zeigten die Expression des neurospezifischen Gens Thyrosinhydroxylase der PC-12 Zellen und die Expression leberspezifischer Gene (Albumin, GST) der Hep-G2 Zellen. Der Einfluss der CA auf die Transkription der Zellen wurde mittels organspezifischer DNA *Microarrays* untersucht. Bei den Hep-G2 Zellen wurde auf der Kollagenbeschichtung eine verstärkte Expression der akute Phase Proteine beobachtet, wie sie auch in der Literatur für Makrophagen auf Kollagen beschrieben wurde. Die RNA Expressionsprofile bestätigen die Biokompatibilität der CA. Molekulargenetische Untersuchungen differenzierter PC-12 Zellen und ISC mittels ZNS-Chips konnten eine verstärkte Regulation verschiedenster Rezeptorgene und neurospezifischer Gene zeigen. Die Expression der Gene für Map-Kinasen und verschiedener Apoptose Gene der ISC auf CA geben Hinweis auf eine unterstützende Wirkung der CA bei der Regeneration von Nerven. Mit der *Microarrayanalyse* konnten geringe Veränderungen auf transkriptionaler Ebene gezeigt werden. Die Technik kann somit genutzt werden, um Zell-Matrix Interaktionen detailliert zu analysieren.

Zusammengefasst zeigen die ISC die deutlichsten Veränderungen im Zellverhalten unter dem Einfluss von CA, sowohl auf die Migration als auch auf molekulargenetischer Ebene. In weiter führenden Untersuchungen sollten der translatorische Effekt der CA auf neuronale primäre Zellen oder Stammzellen näher untersucht werden, da sie einer *in vivo* Situation eher entsprechen. Eine weitere Möglichkeit wäre auch die CA in kontrolliert abbaubare Mikrosphären einzukapseln, so dass die CA langsam an die Zellen abgegeben werden kann, um dort gezielt und über einen längeren Zeitraum auf das Zellwachstum Einfluss zu nehmen.

Im *Tissue Engineering* werden Zellen auf 3D-strukturierten Trägermaterialien kultiviert, nach erfolgter Vermehrung wird das daraus resultierende Konstrukt in den Patienten implantiert. Die Kultivierung des Konstruktes erfolgt dabei *in vitro* in der Petrischale oder in einem dafür entwickelten Bioreaktorsystem. Innerhalb der DFG-Forschergruppe 548, in deren Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt wurde, wurden dreidimensionale CA Konstrukte entwickelt und mit ISC besiedelt. Die ISC adhärten

und wuchsen auf den mit CA beschichteten dreidimensionalen Konstrukten wie Sponceram und Glasfritten verschiedener Porosität. Durch die Methode des Elektrosinnens wurden Fasermaterialien entwickelt, die ein gerichtetes Zellwachstum ermöglichten. Dies bestätigt die Theorie, dass Zellen eine Struktur benötigen, entlang derer sie wachsen können. Ein geeignetes Material wurde in einen Bioreaktor (Spinnerflasche) gebracht und durch Rühren im Medium unter der Wirkung von Scherkräften kultiviert. Ein Kollagen CA Material wurde mit ISC besiedelt und in einer Spinnerflasche kultiviert. Das Material hat der mechanischen Scherbeanspruchung in dem Bioreaktorsystem standgehalten, die Zellen konnten erfolgreich auf dem Material kultiviert werden. REM-Aufnahmen zeigten eine sehr dichte Besiedlung der Materialien. Gegenüber der Kultivierung in einer Petrischale wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum eine verminderte Laktatproduktion gemessen, was für eine bessere Nährstoffversorgung der Zellen in der Spinnerflasche spricht. In weiterführenden Versuchen sollte die mechanische Belastbarkeit sowie biomechanische Eigenschaften der Materialien vor und nach der Kultivierung untersucht werden. So kann überprüft werden, ob die Stabilität des Konstruktes durch die Zellbesiedlung zunimmt und somit einer *in vivo* Situation standhalten kann.

6 Anhang

6.1 Statistik

Für alle Ergebnisse der Kultivierung auf den Beschichtungen oder den 3D Materialien wurden ab drei Messwerten (parallele Kultivierung in einem Experiment) der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Ab fünf 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 $p < 0,05$.

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 Modified Eagle's Medium)

DMEM-Pulver wurde mit NaHCO₃ versetzt und mit 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Anschließend wurde das Medium steril filtriert, dabei erhöhte sich der pH-Wert um 0,1-0,2 Einheiten.

PBS (Phosphate Buffered Saline)

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	7,2 mM
KH ₂ PO ₄	14,7 mM
pH-Wert	7,4

6.3 Säugerzellen

Hep-G2 Zellen

Hep-G2 Zellen (DSMZ-Nr. ACC 180) sind humane Leberkarzinomzellen. Sie dienen als Zelllinien für Biokompatibilitätstests.

PC-12 Zellen

PC-12 Zellen (DSMZ-Nr. ACC 159) sind Ratten Nebennierenrindentumorzellen. Sie können durch die Zugabe von NGF (nerve growth factor) zu einem neuronalen Phänotyp differenziert werden.

ISC

Die immortalisierten Schwanzzellen (ISC) stammen aus dem Ischias Nerv neonataler Ratte und wurden freundlicherweise von Frau Prof. Grothe, Leiterin der Abteilung Neuroanatomie, der MH-Hannover zur Verfügung gestellt.

6.4 Methoden

6.4.1 Zellkultur

Zellkulturmedien

Hep-G2

Die Zellen wurden in DMEM versetzt mit 10 % Fötalem Kälber Serum (FKS), Penicillin (100 U/ml), und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37 °C/5 % CO₂ kultiviert.

PC-12

Die Zellen wurden in DMEM versetzt mit 10 % Pferdeserum (HOS), 5 % FKS, L-Glutamin (2 mM), Na-Pyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/ml), und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert. Für die neuronale Differenzierung wurden die PC-12 Zellen in DMEM versetzt mit 1 % HOS, 1 % FKS, L-Glutamin (2 mM), Na-Pyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und NGF (100ng/ml) kultiviert. (Jacovina et al. 2001; Schimmelpfeng et al. 2004).

ISC

Die Zellen wurden in DMEM versetzt mit 10 % FKS, L-Glutamin (2 mM), Na-Pyruvat (1 mM), Penicillin (100 U/ml), und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37 °C/5 % CO₂ kultiviert. Die verwendeten Zellen wachsen adhärent in Zellkulturflaschen. Die PC-12 Zellen adhäreren schwach, da sie ursprünglich Suspensionszellen waren, daher erfolgte die Kultivierung auf mit 0,5 mg/ml Poly-L-Lysin beschichteten Zellkulturoberflächen zur Förderung der Zelladhäsion. Die Kultivierung erfolgte in 75 cm²-Flaschen im Inkubator bei 37 °C/5 % CO₂. Das Zellkulturmedium wurde alle drei Tage gewechselt und die verwendeten Zelllinien wurden 1-2 mal pro Woche passagiert.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium vollständig abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,2 % (w/v) Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS) bei 37 °C/5 % CO₂ inkubiert, bis sich die Zellen vollständig vom Boden abgelöst hatten (2-10 min). Anschließend wurden die Zellen in 8 ml Medium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Zahl verdünnt und in neuen Zellkulturflaschen ausplattiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension in die Kammer gefüllt und vier Großquadrate ausgezählt. Um die Anzahl der Zellen pro ml zu erhalten, wurde die Anzahl der Zellen pro Quadrat mit dem Faktor 10⁴ multipliziert.

6.4.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Lagerung wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Medium mit 10 % DMSO, um die Bildung von Kristallen zu vermeiden, die die Zellmembran schädigen können. Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin abgelöst, dann mit Medium resuspendiert und bei 4000 g für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit dem DMSO haltigen Kulturmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Aliquots zu 1,25 ml in Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Einlagerung in Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese aus dem Kryotank entnommen und zügig bei RT aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in eine Kulturflasche überführt und mit Medium versetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

6.4.3 MTT

Als Maß für die Bestimmung der Viabilität/Proliferation von Zellen wurde der MTT-Test eingesetzt. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein gelbes, wasserlösliches Salz aus der Klasse der Tetrazolium-Salze. Diese werden in den Mitochondrien lebender Eukaryotenzellen vom Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System (EC.1.3.99.1) unter Spaltung des Tetrazolium-Ringes umgesetzt. Das gelbe MTT wird dabei zum blau-violetten MTT-Formazan umgesetzt. In wässriger Lösung ist das MTT-Formazan nicht löslich, was dazu führt, dass sich in der Zelle Formazan-Kristalle bilden.

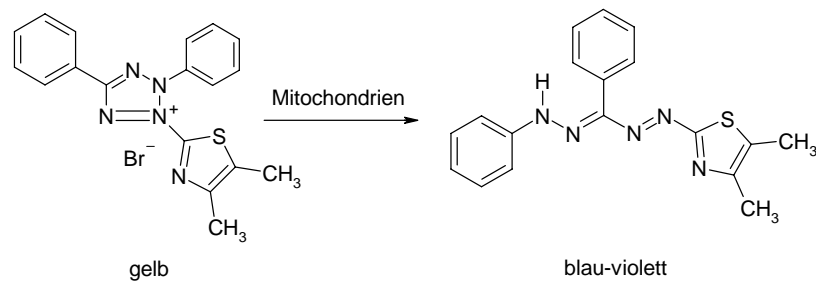


Abbildung 63: Reaktion von MTT zum Formazan.

Die mit Zellen besiedelten Vertiefungen der 96-Lochplatten oder Matrizes wurden mit 100 μl des Kulturmediums versetzt. Hierzu wurden 10 μl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS, sterilfiltriert) gegeben und für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurden 100 μl Solubilisierungslösung (1 g SDS in 10 ml 0,01 M HCl, sterilfiltriert) zugesetzt und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Unter diesen Bedingungen gehen die Formazan-Kristalle in Lösung. Am nächsten Tag wurde die Absorption des Formazans beim lokalen Absorptionsmaximum von 570 nm gegen 630 nm als Referenzsignal im Plattenlesegerät gemessen. Als Blindwert diente Medium ohne Zellen. Das erhaltene Signal wurde als relatives Maß für die Viabilität/Proliferation von Zellen und damit auch bedingt als Maß für die Proliferation der Zellen eingesetzt.

6.4.4 Beschichtungslösungen

Tabelle 14: Ansätze für die Beschichtungslösungen.

	Konzentration	Quelle
Poly-L-Lysin	0,5 mg/ml in ddH ₂ O	Sigma-Aldrich Mol.>70000
Kollagen I	1 mg/ml in 0,1 N Essigsäure, 3 h bei RT rühren, dann 1:4 verdünnt mit ddH ₂ O	Sigma-Aldrich Rattenschwanz
β-Glucan	5 mg/ml in 1 N NaOH	Emslandstärke GmbH
Hyaluronsäure	3,5 mg/ml ddH ₂ O	Sigma-Aldrich
Colominsäure	5 mg/ml	Nacalai Tesque, INC.
PSA-K1	5 mg/ml	TCI, <i>E.coli</i> K1
Laminin	0,225 mg/ml, mit 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ beschichten	Sigma-Aldrich

Alle Lösungen wurden mit einem 0,22 μm Filter steril filtriert und bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt. Die Vertiefungen einer 96-Lochplatte wurden jeweils mit 40 μl bzw. 230 μl für 24-Lochplatten, der Lösungen beschichtet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT und anschließend für 30 min bei 4 °C. Abschließend wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS gewaschen.

Für die Chipexperimente wurden Zellkulturflaschen jeweils mit 2 ml der entsprechenden Lösung beschichtet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT und anschließend für 30 min bei 6 °C. Abschließend wurden die Flaschen zweimal mit PBS gewaschen.

6.4.5 Nachweis der Colominsäure/Polysialinsäure mittels ELISA

Der Nachweis der Colomin- oder Polysialinsäure auf Oberflächen erfolgte mittels eines für die Polysialinsäure spezifischen Antikörpers mAK 735, welcher freundlicherweise von der Abteilung Zelluläre Biochemie der MH-Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Gerardy-Schahn zur Verfügung gestellt wurde. Als sekundärer Antikörper wurde entweder ein Cyanine-3 (Cy3) gekoppelter Antikörper oder ein HRP gekoppelter Antikörper verwendet.

Die mit Colominsäure/PSA-K1 beschichteten 96-Lochplatten wurden zunächst mit 200 µl 1 %iger BSA-Lösung (in PBS) geblockt, um unspezifische Reaktionen des Antikörpers zu verhindern. Die Inkubation erfolgte entweder bei Raumtemperatur für 30 min oder über Nacht bei 4 °C. Die Vertiefungen wurden dreimal mit 200 µl PBS gewaschen und die Platte trocken geklopft. Im Anschluss folgte die Inkubation mit 40 µl des primären Antikörpers mAK 735 (1:400; 5 µg/ml mAK 735 in 1 % BSA) für 1 h bei Raumtemperatur (Acheson et al. 1984). Darauf folgte erneut dreimaliges Waschen der Vertiefungen mit 200 µl PBS mit anschließender Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur mit 40 µl des sekundären Antikörpers (Ziege-anti-Maus-HRP (Southern Biotechnology Associates, Alabama, USA Nr. 10-10-05 oder Ziege-anti-Maus-Cy3 (dianova, Hamburg) 1:3000). Die Vertiefungen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Der Cy3 gekoppelte Antikörper wird bei 550 nm maximal angeregt, das Emissions-Maximum liegt bei 570 nm. Die Detektion erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Olympus IX50. Bei der Verwendung des sekundären Ziege-anti-Maus-HRP gekoppelten Antikörpers folgte die Substratreaktion mit ABTS. Dazu wurden 50 µl der ABTS-Lösung in die Vertiefungen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm im Plattenlesegerät (Microplate Reader, BIO-RAD).

6.4.6 Nachweis der Colominsäure mittels TBA-Tests

Die Colominsäure und der Gehalt in den verwendeten Materialien kann mit Hilfe des Thiobarbitursäure Nachweises erfolgen. Der Nachweis beruht auf der Reaktion der

hydrolysierten monomeren Zuckermoleküle mit Thiobarbitursäure, diese Reaktion kann kalorimetrisch vermessen werden. Die ursprünglich für Sialinsäuren von Aminoff et al. and Warren (Aminoff et al. 1980; Warren 1959) entwickelte Methode ist für die quantitative Bestimmung der Polysialinsäuren weiterentwickelt worden.

Die Bestimmung der Colominsäure erfolgte aus einem Aliquot von 50 µl Lösung. Zunächst wurden die Lösungen über Nacht mit 150 µl einer 0,1 M H₃PO₄ (pH 2-3) für 18 h bei 70 °C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurden die Proben mit 100 µl einer 0,1 M NaOH-Lösung neutralisiert. Zum Schluss wurde der vollständig hydrolysierte Zucker mit Periodat zu β-Formylbrenztraubensäure oxidiert. Dafür wurde das Hydrolysat mit 100 µl Oxidationslösung (0,2 M Periodat Lösung) versehen und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran folgte die Reduktion mit 500 µl *m*-Arsenit Reagenz (5 % NaAsO₂ in 0,2 N H₂SO₄ mit 0,5 M Na₂SO₄). Dabei wurden die Proben solange geschüttelt bis die gelb-braune Farbe wieder verschwand. Danach folgte die Reaktion mit der Thiobarbitursäure. Dafür wurden 500 µl einer 3 %igen Thiobarbitursäure Lösung hinzugegeben (pH 9) und für 15 min bei 95 °C geschüttelt. Das Zwischenprodukt β-Formylbrenztraubensäure reagiert dabei quantitativ mit zwei Molekülen der Thiobarbitursäure und bildet einen pink farbigen Farbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 549 nm liegt. Zur Stabilisierung des Farbstoffes erfolgte eine Extraktion von 400 µl der Probenlösung mit 700 µl Cyclohexanon. Die Proben wurden jeweils zweimal für 10 s gevortext und abschließend zur Phasenseparation 3 min bei 12000 g zentrifugiert. Je 200 µl der organischen Phase wurde in die Vertiefungen einer 96-Loch UV Platte überführt und die Absorption bei 559 nm im Multiskan Mikropplattenlesegerät ausgelesen. Die Berechnung des Colomin-/Polysialinsäuregehalts erfolgte über eine Kalibrationskurve.

6.4.7 Fixierung von Zellen

Zur Fixierung der Zellen in den Zellkulturschalen oder auf Matrizes wurde das Medium vollständig entfernt und zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 100 % Ethanol für 20 min bei -20 °C. Danach wurde dreimal mit PBS gewaschen.

6.4.8 DAPI-Färbung

Zu den fixierten und gewaschenen Zellen in 96-Lochplatten erfolgte die Zugabe von 200 µl DAPI-Lösung (1 ml Färbepuffer + 2 µl Stammlösung). Die Zellen wurden für

15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Visualisierung der eingefärbten Zellkerne erfolgte mit Hilfe des UV-Filters am Olympus Fluoreszenzmikroskop.

DAPI-Stammlösung

500 µg/ml DAPI in ddH₂O

DAPI-Färbepuffer

Tris pH 7 (Sigma 7-9)	100 mM
NaCl	150 mM
CaCl ₂	1 mM
MgCl ₂	0.5 mM
Nonidet- P 400	1 %

6.4.9 Zelladhäsions-Bestimmung

Die Anhaftung der Zellen auf verschiedenen Oberflächen wurde indirekt über die DAPI-Färbung nach 2 h und 24 h bestimmt. Die Zellen wurden zunächst in die beschichteten 24-Lochplatten mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung ausplattiert. Nach der Inkubation (2 h, 24 h) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 230 µl DAPI-Lösung nach Standardprotokoll gefärbt.

Für jedes Experiment wurden drei Vertiefungen präpariert und 6 Bilder (200fache Vergrößerung) aufgenommen. Abschließend wurden die eingefärbten Zellkerne auf den Bildern gezählt.

6.4.10 Glukose/Laktatbestimmung

Die Untersuchung des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion ermöglicht eine Aussage über die Stoffwechselaktivität von Zellen. Dabei erfolgt die Messung direkt aus zellfreiem Zellkulturmedium. Die Glukose- und Laktatkonzentrationen im Kulturmedium wurden mit dem YSI 2700 von Yellow Springs Instruments analysiert. In regelmäßigen Abständen wurde aus dem Kulturmedium ein Aliquot entnommen und vermessen. Der kumulative Glukoseverbrauch und die kumulative Laktatbildung wurden berechnet. Das Kulturmedium diente dabei als Referenzwert.

6.4.11 Messung der Neuritenlänge

Durch die Zugabe von NGF in das Zellkulturmedium der PC-12 Zellen bilden diese Neuriten aus und es entsteht ein neuronaler Phänotyp. Die Länge der Neuriten wurde

mittels Olympus DP Software Version 809 vermessen. Dazu wurden 10 Bilder bei 200facher Vergrößerung am Olympus Mikroskop IX 50 mit der Olympus Camera Z4040 Zoom aufgenommen. Es wurden nur die Neuriten der Zellen vermessen, welche nicht am Rand der Zellkultur Vertiefung wuchsen und sich komplett im Fokus der Kamera befanden.

6.4.12 BrdU Labeling

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des BrdU-Colorimetric-Kit von Roche bestimmt. Die Quantifizierung der Zellproliferation erfolgt durch die Messung des Basenanalogs BrdU (5-Bromo-2'-desoxyuriden), dieses wird während der S-Phase der sich teilenden Zellen anstelle des Thymidins eingebaut. Die Zellen wurden in 96-Lochplatten ausplattiert. An drei Zeitpunkten wurde die Proliferation bestimmt. Die Zellen wurden nach den Angaben des Herstellers behandelt.

Zum Schluss wurde die Reaktion mit der Zugabe von 25 μ l 1 M H_2SO_4 -Lösung beendet. Abschließend wurde die Absorption der Lösung bei 450 nm innerhalb von 5 bis 15 min gemessen, nachdem zuvor eine Minute geschüttelt wurde. Die gemessenen Absorptionswerte korrelieren direkt mit der Menge an synthetisierter DNA und somit mit der Anzahl an proliferierenden Zellen.

6.4.13 ECIS (Electric Cell-Substrate Impedance Sensing)

Mit Hilfe der ECIS-Methode kann quantitativ das Anhaftungsverhalten, Spreitungs- und Wundheilungsverhalten von Säugetierzellen untersucht werden. Bei der biophysikalischen Methode wird das Impedanzsignal verfolgt, hervorgerufen durch Zellen auf einer mit einem Goldfilm bedeckten Elektrode.

Messprinzip:

Die Impedanzmessungen wurden freundlicherweise von PD. Dr. Wegener am Institut für Biophysikalische Chemie der Universität Münster durchgeführt. Verwendet wurde entweder das ECIS Model 100 oder das Model 1600R von Applied BioPhysics. Das Messsystem besteht aus einer Zellkulturplatte, die aus 8 Messkammern besteht, an deren Boden sich jeweils die Elektroden befinden. Jede Kammer enthält eine kleine Arbeitselektrode mit einer Fläche von $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2$ und eine große Gegenelektrode mit einer Fläche von $0,15 \text{ cm}^2$. Aufgrund der 300fach größeren Fläche der Arbeitselektrode wird die Impedanz des Gesamtsystems durch die Impedanz der kleinen Elektrode bestimmt.

Das Kammer-System mit den Goldelektroden ist mit einer Polymerschicht überzogen, wobei die Arbeits-, Gegenelektrode und die Kontaktpunkte mittels Photolithographie von der Polymerschicht befreit wurden. Um während der Messung zwischen den 8 Arbeitselektroden wechseln zu können, wurde ein Relais-Modul verwendet. Die Steuerung des Relais-Moduls und des Impedanz-Analysators, sowie die Datenerfassung erfolgten über einen herkömmlichen PC. Für die Durchführung des Experimentes wurde die Kammer in einen Brutschrank bei 37 °C/5 % CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert.

Zellanhaftung/ Zellspreitung:

Vor der ECIS Messung wurden die beschichteten Vertiefungen der Kammer mit Zellkulturmedium gefüllt und in einem Inkubator für mindestens 30 min äquilibriert. Dann erfolgte die Zugabe der Zellsuspension von Hep-G2 (150.000) bzw. ISC (400.000) Zellen in die Kammern. Das Anhaften und Spreiten der Zellen wurde für 20 h durch die Messung der Impedanz verfolgt. An die Elektroden wurde eine Wechselspannung von 40 kHz und einer Amplitude von 1 V_{p-p} mit einem vorgeschalteten 1 MΩ Widerstand angelegt.

Verwundung

Zur Beobachtung des Verwundungsverhalten bzw. der Zellmigration wurden 150.000 Hep-G2 Zellen in die Vertiefungen der Kammer ausplattiert. Die Verwundung erfolgte zu dem Zeitpunkt, als die Zellen konfluent waren, durch ein Signal von 40 kHz, 5 V für 30 s.

6.4.14 Untersuchung der Zellmigration

Klassischer Wundheilungsassay

Die Migration der Hep-G2 und ISC unter dem Einfluss verschiedener CA Konzentrationen wurde mit Hilfe der klassischen *Scratch*-Methode untersucht.

Dazu wurden die Zellen in die Vertiefungen einer 6-Lochplatte ausplattiert und bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Mit Hilfe einer gelben (bei den Hep-G2 Zellen) bzw. weißen (bei den ISC) Pipettenspitze wurden die Zellen aus der Vertiefung entfernt, indem mit der Pipettenspitze einmal durch das Well gescratcht wurde. Anschließend wurde das Medium entfernt. Das Zellkulturmedium wurde mit CA Konzentrationen von 0,1-20 mg/ml angesetzt. Das Serum wurde durch einen Serumersatzstoff (SR I, von Sigma-Aldrich) ersetzt. Je 3 ml des Mediums wurden anschließend in die Vertiefungen

zu den Zellen gegeben, diese wurden nach 0 h und 46 h (Hep-G2) bzw. 24 h (ISC) analysiert. Mit Hilfe des Olympus Phasenkontrast Mikroskops IX 50 wurden Aufnahmen gemacht. Um die gleichen Stellen zu fotografieren wurde die Rückseite der Vertiefungen an sechs Positionen eingeritzt. Im Anschluss wurde nach 0 h und 24 h mit der Olympus DP Software Version 809 die zellfreie Strecke vermessen, die durch das *Scratchen* der Zellen entstanden war. Insgesamt wurde die Strecke an sechs Stellen pro Bild vermessen.

Untersuchung der Zellmigration mit Hilfe von Cellprofiler™

Alternativ wurde die Fläche, die von den ISC bedeckt war, mit der Cellprofiler™ Software ausgewertet. Dies ist ein neues Programm, was aus dem Internet frei heruntergeladen werden kann (www.cellprofiler.org). Mit der von A. Carpenter und T. Jones (Carpenter et al. 2006) entwickelten Software zur Analyse von Zellaufnahmen, wurden die Bilder des Wundheilungsassays beispielhaft für die ISC ausgewertet.

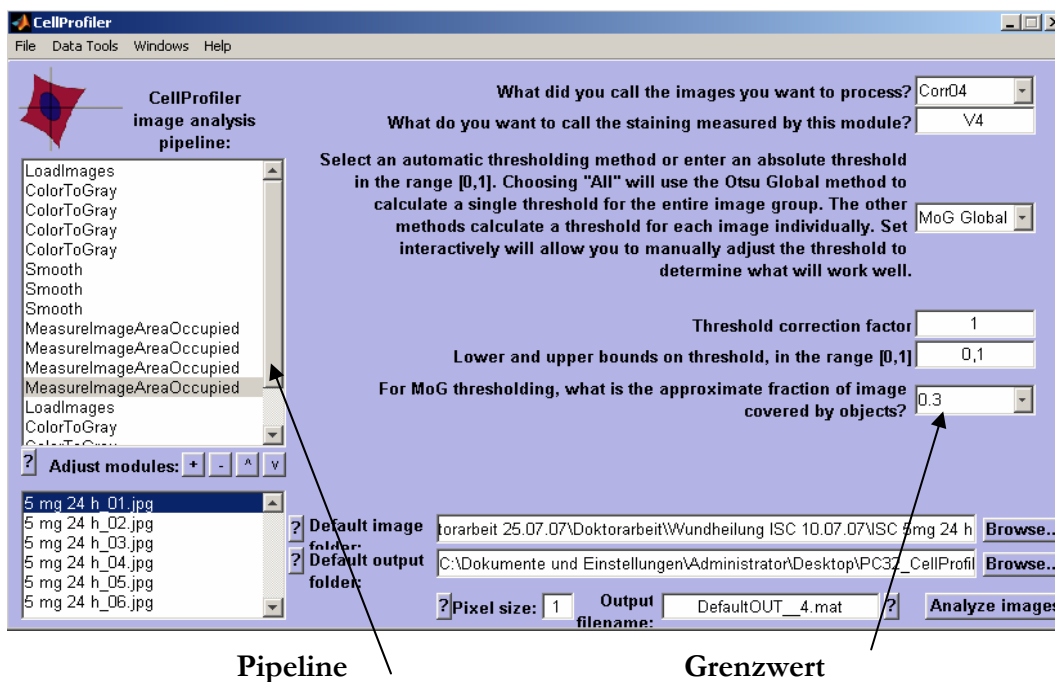


Abbildung 64: Darstellung des Cellprofiler™ Programms.

In die Pipeline werden einzelnen Schritte geladen, die vom Programm ausgeführt werden sollen. Der MoG threshold muss so variiert werden, dass angemessene Oberflächenbedeckungen gemessen werden konnten. Für die Bilder nach 0 h lag der Wert zwischen 0,01 und 0,3 nach 24 h lag der Wert zwischen 0,5 und 0,8.

In der Abbildung 64 ist die Software dargestellt. In der *Pipeline* ist das Programm beschrieben, über die die Auswertung der Bilder erfolgte. Im vorliegenden Fall wurden

sechs Bilder in das Programm geladen. Jedes Original muss von Farbe in Grau (*ColorToGray*) umgewandelt werden, anschließend können die einzelnen Bilder geglättet (*Smooth*) werden. Abschließend wird die Oberfläche berechnet (*MeasureImageArea Occupied*), die von den Zellen eingenommen wurde (Abbildung 65).

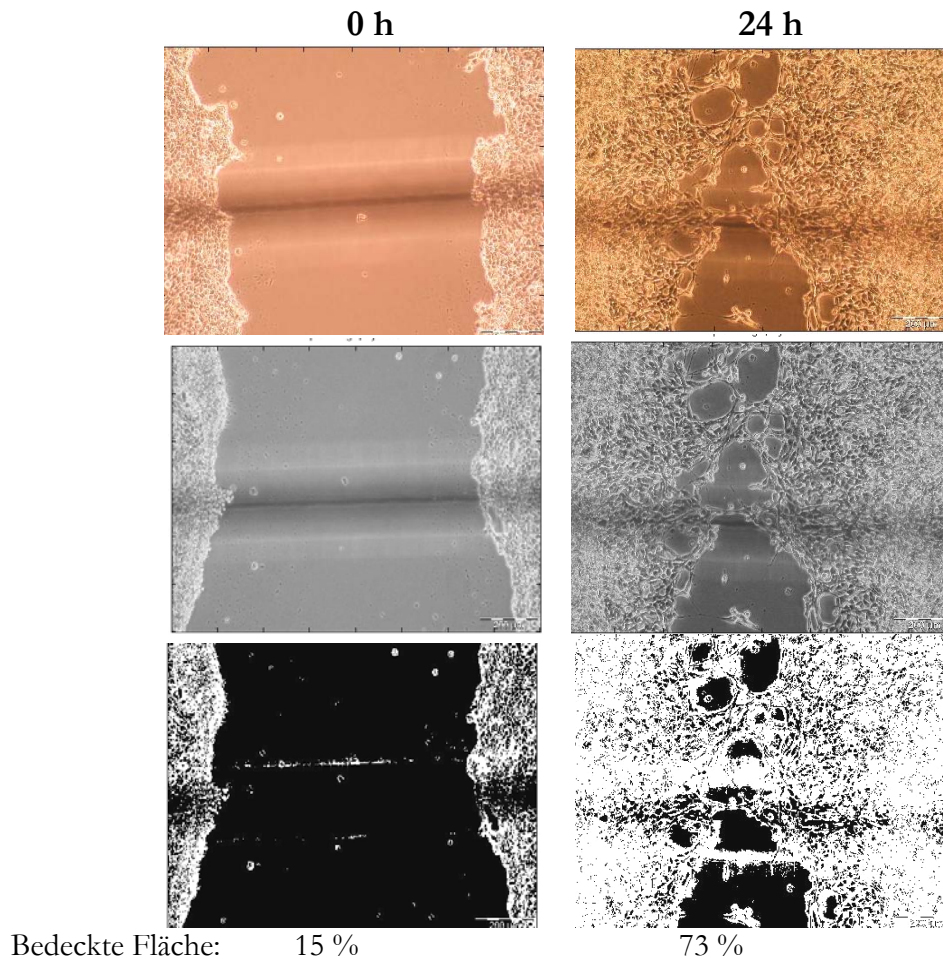


Abbildung 65: Auswertung mit dem Cellprofiler™ Programm.
Beispielhaft dargestellt für ISC 0 h und 24 h nach Zugabe von CA.

Durch die Markierung der Unterseite der Lochplatte ergeben sich Fehler, da diese Fläche als zellfrei erkannt wurde oder auch umgekehrt. Da jedoch bei allen Bildern das Problem bestand, und die Bilder zum Zeitpunkt $t=0$ h und $t=24$ h die gleiche Markierung besaßen, wurde angenommen, dass sich der Fehler aufhob.

6.4.15 Raster-Elektronen-Mikroskopie

Zur Untersuchung der Materialien mittels REM wurde das Medium von den Zell-Matrix Konstrukten entfernt und die Matrix anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Fixierung über Nacht in Karnovsky Puffer. Im Anschluss wurden die Konstrukte mit Cacodylat Puffer gewaschen und bei 4 °C bis zur Entwässerung aufbewahrt. Zur Entwässerung wurden die Konstrukte zunächst dreimal mit PBS gewaschen und dann für jeweils 15 min bei 4 °C mit einer aufsteigenden Acetonreihe (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 100 %) behandelt. Der letzte Schritt mit 100 % Aceton wurde drei weitere Male bei RT durchgeführt. Das Aceton wurde vollständig entfernt und die Konstrukte für 24 h bei RT getrocknet. Die Zellen auf den Matrizes wurden anschließend im JEOL JSM-6700F Raster-Elektronen-Mikroskop (Physikalische Chemie, Leibniz Universität Hannover) untersucht.

Cacodylat Puffer

0,2 M Na Cacodylat in ddH₂O; pH 7,4

Karnovsky Puffer

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

6.4.16 RNA Isolierung

Die Isolierung der RNA erfolgte mittels dem Invitrogen TRIzol Reagent[®]. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Fläche von 75 cm² kultiviert, anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit Medium resuspendiert und für 4 min bei 4000 g pelletiert. Das Medium wurde vollständig entfernt und das Pellet mit 1 ml TRIzol Reagent[®] aufgenommen. Durch das Phenol und das Guanidinisothiocyanat im TRIzol Reagent[®] findet eine Lyse der Zellmembran sowie der Abbau von Zellkompartimenten und die Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen statt. Durch die Homogenisierung im Ultra-Turrax für 30 Sekunden wurde die Zellyse unterstützt. Anschließend wurde das Homogenat zum Entfernen der Zelltrümmer für 10 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Nach 5 min Inkubation bei RT wurden je eingesetztem Milliliter TRIzol Reagent[®] 200 µl Chloroform zugegeben, gut gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Durch erneute Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 15 min wurde eine Phasentrennung erreicht.

Die obere wässrige, RNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt um die RNA zu fällen. Nach 10 min bei RT wird die RNA durch 10 min Zentrifugation bei 12000 g, und 4 °C pelletiert. Das Isopropanol wurde entfernt und die RNA mit 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen und abermals abzentrifugiert (7 min, 12000 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in 30 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte mittels *Nano-Drop-1000*[®] und die Qualitätskontrolle mittels des *Agilent 2100 Bioanalyzers*.

6.4.17 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der RNA wurde mit dem Spektralphotometer *Nano-Drop-1000*[®] über die optische Dichte der Probe bei 260 nm bestimmt.

6.4.18 Qualitätskontrolle der RNA

Die Qualität der RNA, das Verhältnis der RNA-Untereinheiten, wurde mit Hilfe des *Agilent 2100 Bioanalyzers* bestimmt. Dabei wurde die RNA auf einen RNA Nano LabChip[®] aufgetragen. Bis zu 12 Proben können dabei parallel analysiert werden.

Vor Gebrauch wurden die Reagenzien für das Gel für 30 min bei RT äquiliibriert. 65 µl *RNA 6000 Nano Gel matrix* wurden 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Das *dye concentrate* wurde zunächst 10 s gevortext und anschließend herunterzentrifugiert. 1 µl der Farbstofflösung wurde zu dem Gel gegeben und vermischt. Vor dem Gebrauch wurde es für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 9 µl des *Gel-Dye-Mixes* in eine der Vertiefungen des Chips gegeben und mit Hilfe der speziellen *Priming Station* in das fluidische System ampliziert. Je 9 µl des *Gel-Dye-Mixes* wurden in weitere Vertiefungen pipettiert. Die übrigen Vertiefungen wurden mit 5 µl *RNA 6000 Nano Mix*, 1 µl RNA (1:10 verdünnt) bzw. mit dem *RNA 6000 Ladder* befüllt. Die Proben und der Marker wurden für 2 min bei 70 °C denaturiert. Der befüllte Lab Chip wurde in einem speziellen Vortexer für 1 min bei 2400 min⁻¹ geschüttelt. Abschließend erfolgte die Messung der RNA in dem *Agilent 2100 Bioanalyzer*.

6.4.19 cDNA Synthese

Für die RT-PCR muss die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Im Anschluss an die total RNA Isolierung wurde die mRNA mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA mit 3 µl Oligo dT Primer (100 µM) und

ddH₂O versetzt, so dass ein Volumen von 21 µl erhalten wurde. Die Lösung wurde anschließend für 5 min bei 65 °C inkubiert.

Nach dem Abkühlen der Lösung auf Eis wurden die folgenden Reagenzien hinzupipettiert:

8 µl 5fach RT-Puffer
 4 µl dNTP-Mix (5 mM)
 1 µl MLV- Reverse Transkriptase (200 U/µl)
 ddH₂O ad 40 µl

Der Reaktionsmix wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und dann zum Stoppen der Reaktion für 10 min bei 65 °C inkubiert.

6.4.20 RT-PCR

Für die Durchführung der RT-PCR wurden nach folgendem Ansatz die aufgelisteten Reagenzien zusammen pipettiert:

Tabelle 15: Ansatz für die RT-PCR.

Reagenz	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen [µl]
5x RT-Puffer	5x	1x	10
Vorwärts primer	10 pmol·µl ⁻¹	0,2 pmol·µl ⁻¹	1
Rückwärts primer	10 pmol·µl ⁻¹	0,2 pmol·µl ⁻¹	1
dNTPs	5 mM	0,1 mM	2
Go Taq-Polymerase	1 U·µl ⁻¹	0,02 U·µl ⁻¹	1
cDNA		100 ng (RNA)	2
ddH ₂ O			33
Gesamtvolumen			50

Die RT-PCR wurde anschließend nach dem folgenden Programm im Thermozykler durchgeführt:

1 Zyklus 5 min Denaturierung bei 95 °C

35 Zyklen 30 s bei 94 °C; 30 s bei der entsprechenden Annealing Temperatur der Primer (siehe unten); 30 s bei 72 °C.

1 Zyklus 7 min bei 72 °C

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten PCR Primer für die PC-12 Zellen.

PC-12 Zellen			
Primer Sequenzen 5`-3`	Annealing [°C]	Produkt	Accession Nr..
GAPDH			
GAA ACC TAG TGG GTC T ATC TCT GCA ATC AGG A	59	451 bp	NM_017008
β-actin			
GTC CAC ACC CGC CAC CAG T AGC GCG TAA CCC TCA TAG AT	56	535 bp	NM_031144
TH			
TCG GGC TAT GTA AAC AGA AT CTG GAG TGC ATG CAG TAG TA	55	596 bp	NM_012740

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten PCR Primer für die Hep-G2 Zellen.

Hep-G2 Zellen			
Primer Sequenzen 5`-3`	Annealing [°C]	Produkt	Accession Nr..
GAPDH			
ACC AGA GTC CAT GCC ATC AC TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	53	452 bp	NM_002046
Albumin			
CTC GGC TTA TTC CAG GGG TGT G AAA GGA GTT CCG GGG CAT AAA AG	63	497 bp	AY728024
Transferrin			
AAG AGC GAT AAT TGT GAG GA CTT CCT TAT CTT TCC GTG TG	52	543 bp	NM_001063
CYP 3A4			
ATA CAC ACC CTT TGG AAG TG GAG CAA AGC AGA AGT CCT TA	54	247 bp	NM_017460

6.4.21 Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte in einem 2 %igen (v/w) Agarosegel. Die benötigte Menge an Agarose wurde durch Erwärmen in der Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 70 °C abgekühlt wurde, wurden 2 µl Ethidiumbromid (10 µg/ml) hinzugegeben und das Gel in die Gelkammer gegossen. Das polymerisierte Gel wurde mit dem TAE-Puffer überschichtet. 18 µl der PCR-Produkte wurden zusammen mit 3 µl 6fach Auftragspuffer in die Probenaschen gegeben ebenso wie ein DNA Marker (1kb). Die Gelelektrophorese wurde dann 45 min

bei 100 V durchgeführt. Zur Dokumentation wurden die Gele mit UV-Licht von 245 nm (Roth, Karlsruhe) bestrahlt und fotografiert.

50fach TAE (Tris-Acetat-Puffer)

Tris pH 7 (Sigma 7-9)	242 g
Essigsäure (konz.)	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
ddH ₂ O ad	1000 ml

6fach Auftragspuffer

Bromphenolblau	25 mg
Saccharose	4 g
ddH ₂ O ad	10 ml

6.5 DNA Chipexperimente

6.5.1 Herstellung des humanen Leberchips und des murinen ZNS-Chips

Es wurden ein selbstentwickelter humanspezifischer Leberchip und ein Ratten spezifischer Zentralnervensystem Chip (ZNS-Chip) verwendet. Das Bedrucken der Chips erfolgte mit dem Affimetrix Arrayer 417TM. Das Chipdesign und damit die Anordnung der Spots auf den Chips und die Anzahl der Replikate erfolgte mittels der Clonetracker-Software entsprechend der Geräteparameter des Affimetrix Arrayer 417TM. Der Affimetrix Arrayer 417TM funktioniert nach dem sogenannten Ping und Ring System (Sчена et al. 1996). Der Druckkopf taucht in die mit der Oligonukleotidlösung (50 µM) befüllten 96-Loch-Platten ein und wird beladen. Durch die Oberflächenspannung bleibt der Ring mit der Nukleotidlösung gefüllt. Beim Durchstechen des Pins durch den Ring wird ein Volumen von ca 100 Pikolitern direkt auf die aldehydbeschichtete Oberfläche der Glasslides (Chips) gebracht. Der Spotdurchmesser ist abhängig vom Durchmesser der Pins und beträgt hier 125 µm. Zur vollständigen kovalenten Immobilisierung der Oligonukleotide an den Aldehydgruppen wurden die Chips 3 min mit UV-Licht bestrahlt und 2 h bei 80 °C inkubiert.

Der ZNS-Chip enthielt 352 Gene, die wahlweise mit einem Replikat (PC-12) bzw. zwei (ISC)-Replikaten bedruckt wurden. Auf dem humanen Leberchip wurden 249 Gene mit zwei Replikaten gespottet.

6.5.2 cDNA Synthese für die DNA-Chips

Die cDNA-Synthese wurde nach dem *NEN[®] Micromax[™] TSA[®] Labeling and Detection Kit* Protokoll von PerkinElmer durchgeführt. Die cDNA wird zunächst durch den Einbau von Biotin-11-dCTP bzw. Fluorescein-12-dCTP markiert.

Für die cDNA-Synthese werden zunächst folgende Reagenzien zusammen pipettiert:

- X µl RNA (6 µg)
- 1 µl Reaction Mix Concentrate (Vial Y) oder 2 µl dNTPs 2 mM
- 1 µl Biotin-11-dCTP bzw. Fluorescein-12-dCTP
- 1 µl Primer (random)
- 1 µl oligo-dT Primer (100 µM)
- (14-X) µl H₂O.

Der Reaktionsmix wurde für 10 min bei 65 °C, dann für 5 min bei 25 °C und abschließend für 3 min bei 45 °C inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden für die reverse Transkription folgende Reagenzien von Invitrogen hinzugegeben:

- 5 µl 5x RT reaction buffer
- 3 µl DTT
- 1 µl RNase out
- 2 µl Superskript III

Dann folgte eine Inkubation für 2 h bei 42 °C, und die Abkühlung der Reaktionslösung für 1 min auf Eis. Anschließend wurden 2,5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 2,5 µl 1 N NaOH zur heißen alkalischen Hydrolyse des RNA-Templates zu der Lösung gegeben und erneut für 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach erneutem Abkühlen auf Eis wurde die Lösung mit 6,5 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) neutralisiert.

6.5.3 Aufreinigung der cDNA

Die Aufreinigung der cDNA erfolgte über das *QLAquick PCR Purification Kit* nach den Angaben des Herstellers. Darauf folgte ein Reinigungsschritt mit 700 µl 35 % Guanidin-Hydrochloridlösung. Die Elution der cDNA wurde abschließend zweimal mit 25 µl 1:10 verdünntem *EB-Puffer* (pH 8,5) durchgeführt und für je 1 min bei max. Umdrehungszahl zentrifugiert.

6.5.4 Hybridisierung

Die aufgereinigten cDNA Proben wurden in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockenheit eingengt und die Pellets abhängig von der Chipgröße in je 36 bzw. 11 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Darauf folgte eine Denaturierung bei 95 °C für 3 min. Nachdem die Proben vollständig auf Eis abgekühlt waren wurden sie vereinigt und 8

bzw. 3 μ l *Top Block* wurden hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde auf den gespotteten Chip aufgetragen, eingedeckelt und luftdicht mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C in einer feuchten Kammer.

6.5.5 Signalverstärkung

Nach der Hybridisierung wurde das Deckgläschen abgenommen und der Chip nacheinander für jeweils 5 min mit Waschpuffer 1 (2x SSC, 0.1 % SDS), Waschpuffer 2 (1x SSC) und Waschpuffer 3 (0,5x SSC) gewaschen, um ungebundene cDNA Fragmente zu entfernen.

20x SSC

NaCl (3 M)	175,3 g
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (0,3 M)	88,3 g
ddH ₂ O ad	1000 ml
pH 7; autoklavieren	

2x SSC; 0,01 % SDS

20x SSC	100 ml
10 % SDS	10 ml
ddH ₂ O ad	1000 ml
mit einem 0,22 μ m Filter filtrieren (analog 1x SSC und 0,5x SSC)	

Für die nachfolgenden Inkubationsschritte wurde der reaktive Bereich mit einem *ImmEdgeTM Pen* begrenzt und der Chip über den gesamten Prozessierungszeitraum vor dem Eintrocknen geschützt.

Zunächst erfolgte die Inkubation des Chips für 10 min mit 300 μ l TNB-G Puffer, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dann wurde der Chip 1 min mit TNT-Puffer gewaschen. Darauf erfolgte eine 10 min Inkubation mit anti-F1-HRP-Konjugat (2 μ l anti-F1-HRP in 200 μ l TNB-G) zur Signalverstärkung der Fluorescein markierten cDNA. Anschließend wurde 3 x 1 min mit TNT-Puffer gewaschen. Die nächste Inkubation erfolgte für 10 min mit 250 μ l Cy-3-Tyramid-Lösung (0,5 μ l Cyanine-3 Tyramide in 250 μ l *Ampiflication Diluent*), danach wurde der Chip 3 x 5 min mit TNT-Puffer gewaschen. Dann erfolgte die Inaktivierung der nicht abreagierten HRP mit 300 μ l HRP *Inactivation Solution* (10 μ l 3 M Natriumacetat-Lösung in 300 μ l HRP *Inactivation Solution* bzw. 10 % H₂O₂). Nach 3 x 1 min Waschen mit TNT-Puffer erfolgte schließlich die Signalverstärkung der biotinmarkierten cDNA. Dazu wurde der Chip für 10 min mit 200 μ l Streptavidin-HRP-Konjugat (2 μ l Streptavidin-HRP-Konjugat in

200 µl TNB-G) inkubiert und 3 x 1 min mit TNT-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde der Chip 10 min mit 250 µl Cy-5-Tyramid-Lösung (0,5 µl Cyanine-5 Tyramid in 250 µl *Amplification Diluent*) inkubiert. Der Chip wurde 3 x 5 min mit TNT Puffer gewaschen und mit 0,06x SSC gespült. Abschließend wurde der Chip 2 min bei 12000 g trocken zentrifugiert.

TNB-G

TNB-Puffer	4,5 ml
10 % Ziegen Serum	0,5 ml

TN-Puffer

TrisHCl (0,1 M)	1,576 g
NaCl (0,15 M)	0,876 g
ddH ₂ O ad	100 ml
mit einem 0,22 µm Filter steril filtrieren	

TNB-Puffer

TN-Puffer	100 ml
Blocking Reagenz (I)	0,5 g
bei 60 °C lösen und steril filtrieren	

TNT-Puffer

TrisHCl (0,1 M)	15,76 g
NaCl (0,15 M)	8,76 g
100 % Tween 20	500 µl
ddH ₂ O ad	1000 ml
pH 7,4 mit 1 M NaOH einstellen, mit einem 0,22 µm Filter steril filtrieren	

6.5.6 Scannen

Der hybridisierte Chip wurde im Array Scanner Axon 4000B gleichzeitig bei 532 nm (Cy3) und 635 nm (Cy5) Kanal ausgelesen. Der Chip wurde 6 x bei verschiedenen Einstellungen (Veränderung des PMT und der Laserstärke) eingescannt.

6.5.7 Datenanalyse

Primäre Datenanalyse

Die primäre Analyse der Daten erfolgte mit der Software *Gene Pix Pro 6.0*, indem eine Zuordnung der Gene zu den Spots erfolgte und die Falschfarbendarstellung in einen Zahlenwert umgerechnet wurde. Die während dieses Prozesses generierten Daten wurden einer weiteren Auswertung unterzogen.

Qualitätskontrolle

Zusätzlich wurden die eingescannten Chips einer Qualitätskontrolle unterzogen. Dabei wurde unter anderem die Zirkularität der einzelnen Spots, die Standardabweichung der Spots und die Anzahl an geflaggtten Daten bestimmt. Je geringer der Anteil an geflaggtten Daten, desto besser der Chip. In Tabelle 18 und 19 sind die Ergebnisse der Qualitätskontrolle für die PC-12 und ISC dargestellt.

Tabelle 18: Qualitätskontrolle des ZNS-Chips für die PC-12 Zellen.

	Scans	Zirkularität	Spots mit hoher Standardabweichung	geflaggte Daten [%]
Chip 1	1. Scan	396	892 (325)	10
	2. Scan	394	908 (291)	5
	3. Scan	339	902 (400)	21
	4. Scan	346	903 (400)	21
	5. Scan	422	893 (288)	5
	6. Scan	416	876 (300)	6
			Mittelwert	11
Chip 2	1. Scan	428	848 (301)	6
	2. Scan	427	858 (279)	3
	3. Scan	402	878 (332)	12
	4. Scan	426	861 (304)	8
	5. Scan	432	839 (273)	2
	6. Scan	432	830 (293)	12
			Mittelwert	7
Chip 3	1. Scan	404	842 (292)	5
	2. Scan	346	862 (282)	5
	3. Scan	423	864 (309)	8
	4. Scan	387	857 (295)	6
	5. Scan	360	846 (264)	2
	6. Scan	341	833 (281)	3
			Mittelwert	5

Tabelle 19: Qualitätskontrolle des ZNS-Chips für die ISC.

	Scans	Zirkularität	Spots mit hoher Standardabweichung	geflaggte Daten [%]
Chip 1	1. Scan	387	1111 (274)	24
	2. Scan	281	1131 (564)	49
	3. Scan	281	1131 (564)	49
	4. Scan	362	1118 (364)	32
	5. Scan	382	1117 (364)	32
	6. Scan	403	1111 (280)	24
			Mittelwert	35
Chip 2	1. Scan	570	1011 (165)	14
	2. Scan	462	1063 (279)	24
	3. Scan	537	1070 (212)	18
	4. Scan	537	1070 (212)	18
	5. Scan	540	1036 (228)	20
	6. Scan	574	1043 (172)	15
			Mittelwert	18
Chip 3	1. Scan	566	954 (137)	12
	2. Scan	497	912 (173)	15
	3. Scan	501	903 (170)	15
	4. Scan	519	954 (142)	12
	5. Scan	539	980 (132)	11
	6. Scan	539	980 (132)	11
			Mittelwert	13

Sekundäre Datenanalyse

Die sekundäre Datenanalyse wurde von Cornelia Repenning (TCI, Universität Hannover) im Rahmen ihrer Doktorarbeit durchgeführt. Dabei wurden die Daten der verschiedenen Scans zunächst unter der Verwendung des Medians anhand aller Spot-Intensitäten normalisiert und auf Ausreißer untersucht. Ebenso wurden die Replikate für jedes Gen berücksichtigt. Die Ausreißer der Genreplikate wurden nach der Methode von Nalimov entfernt. Die erhaltenen Daten wurden gemittelt. Im Anschluss wurde der Quotient der unterschiedlichen Zustände gebildet, die miteinander verglichen wurden. Abschließend wurde der *t-Test* (5 % Fehlerwahrscheinlichkeit) angewendet, um die Unterschiede zwischen den exprimierten Genen der beiden Zustände zu ermitteln. Die *Microarray* Daten wurden als Unterschiede in der Genexpression angegeben.

Auswertung mit KEGG

Zur Vereinfachung der Datenanalyse wurde ein Programm erstellt, das eine Verknüpfung der Daten mit der Datenbank von KEGG ermöglichte. Über die KEGG Orthologie wurden die Gene ihren biologischen Pfaden zugeordnet (Kanehisa et al. 2004).

Tabelle 20: Auswahl an regulierten Genen der HepG2 Zellen.

Regulierte Gene HepG2					
Genname	KEGG Levels			KEGG	Accession.
	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	
GSTT1	Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 [PATH:hsa00980]	2952	NM_000853
		Metabolism of Other Amino Acids	Glutathione metabolism [PATH:hsa00480]	2952	NM_000853
11-betahydroxysteroid-dehydrogenase	Metabolism	Lipid Metabolism	C21-Steroid hormone metabolism [PATH:hsa00140]	3290	M76665_1
AC0X			Androgen and estrogen metabolism [PATH:hsa00150]	3290	M76665_1
			Fatty acid metabolism [PATH:hsa00071]	51	NM_004035
			Poly unsaturated fatty acid biosynthesis	51	NM_004035
CytochromoxidaseIII	Metabolism	Energy Metabolism	Oxidative phosphorylation [PATH:hsa00190]	1514	J01415_7
EGF	Human Diseases	Cancers	Pancreatic cancer [PATH:hsa05212]	1950	NM_001963
			Glioma [PATH:hsa05214]	1950	NM_001963
			Melanoma [PATH:hsa05218]	1950	NM_001963
			Bladder cancer [PATH:hsa05219]	1950	NM_001963
			Prostate cancer [PATH:hsa05215]	1950	NM_001963
			Endometrial cancer [PATH:hsa05213]	1950	NM_001963
			Non-small cell lung cancer [PATH:hsa05223]	1950	NM_001963
CREB binding protein (CREBBP), (CBP), mRNA	Human Diseases	Cancers	Huntington's disease [PATH:hsa05040]	1387	NM_004380
			Prostate cancer [PATH:hsa05215]	1387	NM_004380

Genname	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	Accession.
Fibronectin	Human Diseases	Cancers	Small cell lung cancer [PATH:hsa05222]	2335	XM_055254
NAT2(N-acetyl-transferase2)	Enzymes	Acytransferases	-	10	XM_0446911
KollagenV	Environmental Information Processing	Signaling Molecules and Interaction	ECM-receptor interaction [PATH:hsa04512]	1293	NM_004369
EGF			Cytokine-cytokine receptor interaction [PATH:hsa04060]	1950	NM_001963
Fibronectin			ECM-receptor interaction [PATH:hsa04512]	2335	XM_055254
EGF	Environmental Information Processing	Signal Transduction	MAPK signaling pathway [PATH:hsa04010]	1950	NM_001963
			ErbB signaling pathway [PATH:hsa04012]	1950	NM_001963
GSTT1	Environmental Information Processing	Signal Transduction	MAPK signaling pathway [PATH:hsa04010]	2952	NM_000853
CREB binding protein (CREBBP), (CBP), mRNA	Environmental Information Processing	Signal Transduction	Wnt signaling pathway [PATH:hsa04310]	1387	NM_004380
			Notch signaling pathway [PATH:hsa04330]	1387	NM_004380
			TGF-beta signaling pathway [PATH:hsa04350]	1387	NM_004380
			Jak-STAT signaling pathway [PATH:hsa04630]	1387	NM_004380
CREB binding protein (CREBBP), (CBP), mRNA	Cellular Processes	Nervous System	Long-term potentiation [PATH:hsa04720]	1387	NM_004380
Alpha1antitrypsin	Cellular Processes	Immune System	Complement and coagulation cascades [PATH:hsa04610]	5265	K01396_1
Fibrinogen				2266	NM_000509
ApolipoproteinC-III	Cellular Processes	Endocrine System	PPAR signaling pathway [PATH:hsa03320]	345	X00567_1
ACOX				51	NM_004035
CREB binding protein (CREBBP)	Cellular Processes	Endocrine System	Melanogenesis [PATH:hsa04916]	1387	NM_004380
EGF	Cellular Processes	Cell Motility	Regulation of actin cytoskeleton [PATH:hsa04810]	1950	NM_001963
Fibronectin				2335	XM_055254

Genname	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	Accession.
CREB binding protein (CREBBP), (CBP), mRNA	Cellular Processes	Cell Growth and Death	Cell cycle [PATH:hsa04110]	1387	NM_004380
KollagenV	Cellular Processes	Cell Communication	Focal adhesion [PATH:hsa04510]	1293	NM_004369
EGF	Cellular Processes	Cell Communication	Focal adhesion [PATH:hsa04510]	1950	NM_001963
EGF	Cellular Processes	Cell Communication	Gap junction [PATH:hsa04540]	1950	NM_001963
CREB binding protein (CREBBP), (CBP), mRNA	Cellular Processes	Cell Communication	Adherens junction [PATH:hsa04520]	1387	NM_004380
Fibronectin	Cellular Processes	Cell Communication	Focal adhesion [PATH:hsa04510]	2335	XM_055254
Elastin	-	-	-	2006	NM_000501
AntithrombinIII	-	-	-	462	X68793_1

Tabelle 21: Auswahl an regulierten Genen der differenzierten PC-12 Zellen.

Regulierte Gene PC-12 Zellen (4 d differenziert)					
Genname	KEGG Levels			KEGG	Accession.
	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	
HDC	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Histidine metabolism [PATH:rno00340]	24443	M29591
Calcineurin a alpha	Human Diseases	Neurodegenerative Disorders	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [PATH:rno05030]	24674	D90031
NF-H			Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [PATH:rno05030]	24587	AF031879
D1 dopamin receptor	Environmental Information Processing	Signaling Molecules and Interaction	Neuroactive ligand-receptor interaction [PATH:rno04080]	24316	M35077
glutamate receptor,,GLUR7				298521	M83552
neuromedin k receptor				24808	NM017053
Rat alpha-1A-adrenergic receptor mRNA				29412	M60654
Rattus Adra2a				25083	-
Rattus Chrn b					
Rattus Pomc mRNA				24664	-
YY-Y2 receptor				66024	AY004257
CNTF				25707	X17457
Tumor necrosis factor receptor				25625	NM013091
neuroligin 2		Cell adhesion molecules (CAMs) [PATH:rno04514]	116647	U22952	
Calcineurin a alpha	Environmental Information Processing	Signal Transduction	Wnt signaling pathway [PATH:rno04310]	24674	D90033
Rat mRNA for protein kinase C gamma				24681	X07289
Calcineurin a alpha				24674	D90034
Rat mRNA for protein kinase C gamma				24681	X07290
				24681	X07292
Calcineurin a alpha	Environmental Information Processing	Signal Transduction	MAPK signaling pathway [PATH:rno04010]	24674	D90032

Genname	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	Accession.
Rat mRNA for protein kinase C gamma	Environmental Information Processing	Signal Transduction	MAPK signaling pathway [PATH:rno04010]	24681	X07287
Tumor necrosis factor receptor			MAPK signaling pathway [PATH:rno04010]	25625	NM013091
CNTF			Jak-STAT signaling pathway [PATH:rno04630]	25707	X17457
Rat mRNA for protein kinase C gamma			ErbB signaling pathway [PATH:rno04012]	24681	X07288
Calcineurin a alpha			Calcium signaling pathway [PATH:rno04020]	24674	D90035
D1 dopamin receptor				24316	M35077
neuromedin k receptor				24808	NM017053
Rat alpha-1A-adrenergic receptor mRNA				29412	M60655
Rat mRNA for protein kinase C gamma				24681	X07291
Rattus Chrnb2				81645	-
Calcineurin a alpha	Cellular Processes	Nervous System	Long-term potentiation [PATH:rno04720]	24674	D90035
Apoptotic death agonist BID		Immune System	Natural killer cell mediated cytotoxicity [PATH:rno04650]	64625	NM022684
Calcineurin a alpha			T cell receptor signaling pathway [PATH:rno04660]	24674	D90035
Calcineurin a alpha			B cell receptor signaling pathway [PATH:rno04662]	24674	D90035
Calcineurin a alpha			Adipocytokine signaling pathway [PATH:rno04920]	25625	NM013091
Tumor necrosis factor receptor		Endocrine System			
Calcineurin a alpha		Development	Axon guidance [PATH:rno04360]	24674	D90035
Apoptotic death agonist BID		Cell Growth and Death	Apoptosis [PATH:rno04210]	64625	NM022684
Calcineurin a alpha				24674	D90035
Tumor necrosis factor receptor				25625	NM013091
D1 dopamin receptor	Cell Communication	Gap junction [PATH:rno04540]	24316	M35077	

Tabelle 22: Auswahl an regulierten Genen der ISC.

Regulierte Gene ISC					
Genname	KEGG Levels			KEGG	Accession.
	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	
glutamic acid decarboxylase (GAD)	Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	beta-Alanine metabolism [PATH:rno00410]	24379	M34445
			Taurine and hypotaurine metabolism [PATH:rno00430]	24379	M34445
glyceralaldehyd 3 phosphat dehydrogenase	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Glycolysis / Gluconeogenesis [PATH:rno00010]	24383	AB017801
glutamic acid decarboxylase (GAD)	Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Butanoate metabolism [PATH:rno00650]	24379	M34445
HDC	Metabolism	Amino Acid Metabolism	Histidine metabolism [PATH:rno00340]	24443	M29591
glutamic acid decarboxylase (GAD)			Glutamate metabolism [PATH:rno00251]	24379	M34445
			Alanine and aspartate metabolism [PATH:rno00252]	24379	M34445
Presenilin 2	Human Diseases	Neurodegenerative Disorders	Alzheimer's disease [PATH:rno05010]	81751	NM031087
glyceralaldehyd 3 phosphat dehydrogenase			Alzheimer's disease [PATH:rno05010]	24383	AB017801
			Dentatorubropallidoluisianatrophy (DRPLA) [PATH:rno05050]	24383	AB017801
glyceralaldehyd 3 phosphat dehydrogenase	Human Diseases	Neurodegenerative Disorders	Huntington's disease [PATH:rno05040]	24383	AB017801
synaptotagmin	Human Diseases	Neurodegenerative Disorders	Parkinson's disease [PATH:rno05020]	116470	D12519
glutamic acid decarboxylase (GAD)	Human Diseases	Metabolic Disorders	Type I diabetes mellitus [PATH:rno04940]	24379	M34445
Rattus TNF-alpha gene	Human Diseases	Metabolic Disorders	Type I diabetes mellitus [PATH:rno04940]	24835	-

Genname	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	Accession.
Rattus TNF-alpha gene	Human Diseases	Metabolic Disorders	Type II diabetes mellitus [PATH:rno04930]	24835	-
heparin-binding growth factor receptor 2	Human Diseases	Cancers	Prostate cancer [PATH:rno05215]	25022	L19111
synaptotagmin	Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	SNARE interactions in vesicular transport [PATH:rno04130]	116470	D12519
Rattus Pomc mRNA	Environmental Information Processing	Signaling Molecules and Interaction	Neuroactive ligand-receptor interaction [PATH:rno04080]	24664	-
Rattus brain-specific somatostatin receptor gene				25033	-
gaba-a alpha 3				2562	-
cortistatin 14				25305	NM012835
Neurokinin b				29191	M16410
cortistatin 14				25305	NM012835
DRD5				25195	NM012768
neuromedin-b receptor				25264	U37058
cckbr				25706	NM013165
VIPR2				29555	NM017238
gaba-a receptor alpha 2				29706	-
gaba-a receptor alpha 5				29707	-
gaba-a receptor epsilon				65191	AF255612
neuroligin 3				Environmental Information Processing	Signaling Molecules and Interaction
neuroligin 2	116647	U22952			
Rattus TNF-alpha gene	Cytokine-cytokine receptor interaction [PATH:rno04060]	24835	-		
Rattus MAP kinase kinase kinase 1 (MEKK1) mRNA		Signal Transduction	MAPK signaling pathway [PATH:rno04010]	116667	-
DRD5	Environmental Information Processing	Signal Transduction	Calcium signaling pathway [PATH:rno04020]	25195	NM012768
cckbr			25706	NM013165	
heparin-binding growth factor receptor 2			MAPK signaling pathway [PATH:rno04010]	25022	L19111
Presenilin 2			Notch signaling pathway [PATH:rno04330]	81751	NM031087
Rattus TNF-alpha gene					

Genname	Level 1	Level 2	Level 3	Gene ID	Accession.
Rattus TNF-alpha gene	Environmental Information Processing	Signal Transduction	TGF-beta signaling pathway [PATH:rno04350]	24835	-
Apoptotic death agonist BID	Cellular Processes	Immune System	Natural killer cell mediated cytotoxicity [PATH:rno04650]	64625	NM022684
Rattus TNF-alpha gene			Hematopoietic cell lineage [PATH:rno04640]	24835	-
			Toll-like receptor signaling pathway [PATH:rno04620]	24835	-
			Natural killer cell mediated cytotoxicity [PATH:rno04650]	24835	-
			T cell receptor signaling pathway [PATH:rno04660]	24835	-
			Fc epsilon RI signaling pathway [PATH:rno04664]	24835	-
heparin-binding growth factor receptor 2	Cellular Processes	Cell Motility	Regulation of actin cytoskeleton [PATH:rno04810]	25022	L19111
Rattus TNF-alpha gene	Cellular Processes	Cell Growth and Death	Apoptosis [PATH:rno04210]	24835	-
Caspase 7				64026	-
Caspase 8				64044	-
Apoptotic death agonist BID				64625	NM022684
Rattus TNF-alpha gene				24835	-
alpha tubulin	Cellular Processes	Cell Communication	Gap junction [PATH:rno04540]	64158	NM022298
Rattus TNF-alpha gene	Cellular Processes	Endocrine System	Adipocytokine signaling pathway [PATH:rno04920]	24835	-
cyclic nucleotide phosphodiesterase 1, CNPI	-	-	-	25275	L16532
Programmed cell death 2	-	-	-	58934	M80601
Programmed cell death 4	-	-	-	64031	NM022265
Rattus caspase 11 (Casp11)	-	-	-	114555	-
choline acetyltransferase gene	-	-	-	432359	-
Nestin	-	-	-	25491	M34384
GDNFR beta	-	-	-	25136	AF005226
acetylcholin transporter	-	-	-	60422	U09211

6.5.8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
c	Konzentration
C	Cytosin
CA	Colominsäure
CO ₂	Kohlendioxid
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazelluläre Matrix
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HOS	Pferdeserum
HRP	Horse-Reddish Peroxidase
konz.	Konzentration

l	Liter
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaOH	Natronlauge
NCS	Newborn Calf Serum
NGF	Nerve Growth Factor
nm	Nanometer
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PLL	Poly-L-Lysin
PSA	Polysialinsäure
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TN	Tris-Natrumchlorid-Puffer
TNB	Tris-Natrumchlorid-Puffer mit Blockingreagenz
TNB-G	TNB-Puffer mit Ziegenserum
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UV	Ultraviolett
VIS	Visuell
z.B.	zum Beispiel

6.5.9 Geräte und Reagenzien

Gerät	Hersteller
Array Scanner Axon 4000B	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
Autoklav FV5/3	Integra Biosciences, Fernwald
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Digitalkamera Camedia C-4040 Zoom	Olympus, Puchheim
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage, Analytica AC210S	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX 41, Japan
Gelelektrophorese Classic ISSU1224	Thermo Electron, Dreieich
Hybridisierungssofen	Thermo Electron, Dreieich
Kühl/ Gefrierkombination	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer-Heizplatte Typ RCT b	IKA Werke GmbH, Staufen
Mikrowelle Typ M1727N	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach
Px2 PCR-Thermocycler	Thermo Electron, Dreieich
Phasenkontrastmikroskop	Olympus IX 50, Japan
pH-Elektrode	Checker® , Hanna Instruments, USA
Plattenlesegerät, Microplate Reader	BIO-RAD, München
Sterilbank 2F150-II GS	Technoflow, Integra Biosciences, Schweiz
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
UV/Vis Spektrometer Uvikon 922	Kontron Instruments, Eching
UV-Tisch	Roth, Karlsruhe
Vortex-Mixer	VM-300, neo-Lab, Heidelberg
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge Multifuge 3 s	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415R (gekühlt)	Eppendorf AG, Hamburg

Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
6-Loch-Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht

Kanülen	B.Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Stäbchen	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	Terumo, Belgien
Sterilfilter 0,22 µm	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturgefäße	Sarstedt, Nümbrecht

Reagenzien

Alle hier aufgeführten Reagenzien und Chemikalien hatten, falls nicht anders explizit aufgeführt, den kommerziell höchsterhältlichen Reinheitsgrad.

Für Längen, Massen, Stoffmengen- und Zeitangaben werden SI-Einheiten verwendet sowie Vorsilben für Dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

Reagenzien

Hersteller

ABTS, ready to use, hGH Bottle 4	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Agarose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Antibiotika	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
BrdU-Colorimetric- Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Glucan, Pilotfermenter i. Januar 2002	Emslandstärke GmbH
Cacodylat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kollagen I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kollagenase I, 250U/mg	Worthington, New Jersey, USA
Colominsäure	Nacalai Tesque, INC., Kyoto, Japan
DEPC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dialyseschlauch 1784.1, Typ 27/32	Roth, Visking, Karlsruhe
1, 2, 7, 8- Diepoxyoctan	Lancaster Synthesis, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA-Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

DMEM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DTT	Invitrogen
EDTA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA, 0,5 M, pH 8	AppliChem AG, Darmstadt
Essigsäure	Fluka, Seelze
Ethanol, abs. reinst	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hyaluronsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hybridisierungspuffer	MWG, Biotech AG, Ebersberg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Glutamin	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MTT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumbicarbonat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumcarbonat	Fluka, Seelze
Natriumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Na-Pyruvat	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
NGF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nonidet-P 400	Fluka, Seelze
Nucleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Oligo-dT-Primer	Qiagen, Hilden
PCR-Primer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Biomers
Periodat	Fluka, Seelze
PLL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Pferdeserum	Gibco
RNaseZAP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Saccharose	Fluka, Seelze
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

sekundärer Cy-3 Antikörper	dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus HRP-Antikörper	Southern Biotechnology Associates, Alabama, USA Nr. 10-10-05
Serum Replacement 2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Spinnerflasche	Techne, Cambridge, England
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
Top-Block	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tri-Natrium-Dihydrat (SCC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-Puffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizol	Invitrogen, Carlsbad
Trypsin (10fach)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ziegenserum	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich

7 Literatur

- Acheson AL, Naujoks K, Thoenen H. 1984. Nerve growth factor-mediated enzyme induction in primary cultures of bovine adrenal chromaffin cells: specificity and level of regulation. *J Neurosci* 4(7):1771-80.
- Adams JC, Watt FM. 1993. Regulation of development and differentiation by the extracellular Matrix. *Development* 117(4):1183-1198.
- Agrawal CM, Athanasiou KA. 1997. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. *J Biomed Mater Res* 38(2):105-14.
- Alberts B, Bary D, Lewis J, Raff M, Robert K, Watson JD. 1994. *Molekularbiologie der Zelle*. 2. Überarbeitete Auflage.
- Altman NS, Hua J. 2006. Extending the loop design for two-channel microarray experiments. *Genet Res* 88(3):153-63.
- Amino S, Itakura M, Ohnishi H, Tsujimura J, Koizumi S, Takei N, Takahashi M. 2002. Nerve growth factor enhances neurotransmitter release from PC12 cells by increasing Ca(2+)-responsible secretory vesicles through the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biochem (Tokyo)* 131(6):887-94.
- Aminoff D, Anderson J, Dabich L, Gathmann WD. 1980. Sialic acid content of erythrocytes in normal individuals and patients with certain hematologic disorders. *Am J Hematol* 9(4):381-9.
- Archibald S, Shefner J, Krarup C, RD. M. 1995. Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube. *J Neurosci* 15(5 Pt 2):4109-4123.
- Archibald SJ, Shefner J, Krarup C, RD. M. 1995. Monkey median nerve repaired by nerve graft or collagen nerve guide tube. *J Neurosci* 15(5 Pt 2):4109-4123.
- 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.
- Bacakova L, Filova E, Rypacek F, Svorcik V, Stary V. 2004. Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiol Res* 53 Suppl 1:S35-45.
- Bacakova L, Stary V, Kofronova O, Lisa V. 2001. Polishing and coating carbon fiber-reinforced carbon composites with a carbon-titanium layer enhances adhesion and growth of osteoblast-like MG63 cells and vascular smooth muscle cells in vitro. *J Biomed Mater Res* 54(4):567-78.
- Badami AS, Kreke MR, Thompson MS, Riffle JS, Goldstein AS. 2006. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly(lactic acid) substrates. *Biomaterials* 27(4):596-606.
- Baier Leach J, Bivens KA, Patrick CW, Jr., Schmidt CE. 2003. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 82(5):578-89.
- Balakrishnan B, Jayakrishnan A. 2005. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials* 26(18):3941-51.
- Becker JL, Prewett TL, Spaulding GF, Goodwin TJ. 1993. Three-dimensional growth and differentiation of ovarian tumor cell line in high aspect rotating-wall vessel: morphologic and embryologic considerations. *J Cell Biochem* 51(3):283-9.
- Bork K, Reutter W, Gerardy-Schahn R, Horstkorte R. 2005. The intracellular concentration of sialic acid regulates the polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *FEBS Lett* 579(22):5079-83.

- Bosman FT, Stamenkovic I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200(4):423-8.
- Bruns S. laufende Dissertation, Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- Cao L, Su Z, Zhou Q, Lv B, Liu X, Jiao L, Li Z, Zhu Y, Huang Z, Huang A and others. 2006. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes olfactory ensheathing cells migration. *Glia* 54(6):536-44.
- Carpenter AE, Jones TR, Lamprecht MR, Clarke C, Kang IH, Friman O, Guertin DA, Chang JH, Lindquist RA, Moffat J and others. 2006. CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7(10):R100.
- 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.
- Chen LE, Seaber AV, Wong GH, Urbaniak JR. 1996. Tumor necrosis factor promotes motor functional recovery in crushed peripheral nerve. *Neurochem Int* 29(2):197-203.
- Chevolot L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, Collic-Jouault S. 2001. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr Res* 330(4):529-35.
- 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.
- Choong CS, Hutmacher DW, Triffitt JT. 2006. Co-culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolactone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering. *Tissue Eng* 12(9):2521-31.
- Ciardelli G, Chiono V. 2006. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci* 6(1):13-26.
- Coward SM, Selden C, Mantalaris A, Hodgson HJ. 2005. Proliferation rates of HepG2 cells encapsulated in alginate are increased in a microgravity environment compared with static cultures. *Artif Organs* 29(2):152-8.
- Deux JF, Meddahi-Pelle A, Le Blanche AF, Feldman LJ, Collic-Jouault S, Bree F, Boudghene F, Michel JB, Letourneur D. 2002. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia in rabbit iliac artery in-stent restenosis model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(10):1604-9.
- Doweiko JP, Nompleggi DJ. 1991. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 15(2):207-11.
- Drury JL, Mooney DJ. 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24(24):4337-51.
- Dvir T, Benishti N, Shachar M, Cohen S. 2006. A novel perfusion bioreactor providing a homogenous milieu for tissue regeneration. *Tissue Eng* 12(10):2843-52.
- Esposito A, Mezzogiorno A, Sannino A, De Rosa A, Menditti D, Esposito V, Ambrosio L. 2006. Hyaluronic acid based materials for intestine tissue engineering: a morphological and biochemical study of cell-material interaction. *J Mater Sci Mater Med* 17(12):1365-72.
- 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.

- Fu W, Begley JG, Killen MW, Mattson MP. 1999. Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 274(11):7264-71.
- Fujimura T, Shibuya Y, Moriwaki S, Tsukahara K, Kitahara T, Sano T, Nishizawa Y, Takema Y. 2000. Fucoidan is the active component of fucus vesiculosus that promotes contraction of fibroblast-populated collagen gels. *Biol Pharm Bull* 23(10):1180-4.
- Fullerton SA, Samadi AA, Tortorelis DG, Choudhury MS, Mallouh C, Tazaki H, Konno S. 2000. Induction of apoptosis in human prostatic cancer cells with beta-glucan (Maitake mushroom polysaccharide). *Mol Urol* 4(1):7-13.
- Giaever I, Keese CR. 1991. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(17):7896-900.
- 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.
- 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.
- 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.
- Heinze T. 2006. Polysaccharide-Basis für Polymermaterialien der Zukunft. *Nachrichten aus der Chemie* (54):1195-1198.
- Hou S, Xu Q, Tian W, Cui F, Cai Q, Ma J, Lee IS. 2005. The repair of brain lesion by implantation of hyaluronic acid hydrogels modified with laminin. *J Neurosci Methods* 148(1):60-70.
- Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. 1996. The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16(4):735-43.
- Hunter DD, Llinas R, Ard M, Merlie JP, Sanes JR. 1992. Expression of s-laminin and laminin in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol* 323(2):238-51.
- Hutmacher DW. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21(24):2529-43.
- Hwang JJ, Jelacic S, Samuel NT, Maier RV, Campbell CT, Castner DG, Hoffman AS, Stayton PS. 2005. Monocyte activation on polyelectrolyte multilayers. *J Biomater Sci Polym Ed* 16(2):237-51.
- Ibanez CF, Ernfors P, Persson H. 1991. Developmental and regional expression of choline acetyltransferase mRNA in the rat central nervous system. *J Neurosci Res* 29(2):163-71.
- Iida H, Schmeichel AM, Wang Y, Schmelzer JD, Low PA. 2004. Schwann cell is a target in ischemia-reperfusion injury to peripheral nerve. *Muscle Nerve* 30(6):761-6.
- Jacovina AT, Zhong F, Khazanova E, Lev E, Deora AB, Hajar KA. 2001. Neuritogenesis and the nerve growth factor-induced differentiation of PC-12 cells requires annexin II-mediated plasmin generation. *J Biol Chem* 276(52):49350-8.
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* 32(Database issue):D277-80.
- Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. 2004. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6):1554-9.

- Kim BS, Nikolovski J, Bonadio J, Smiley E, Mooney DJ. 1999. Engineered smooth muscle tissues: regulating cell phenotype with the scaffold. *Exp Cell Res* 251(2):318-28.
- Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, Mooney DJ. 1998. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng* 57(1):46-54.
- Klapper W, Shin T, Mattson MP. 2001. Differential regulation of telomerase activity and TERT expression during brain development in mice. *J Neurosci Res* 64(3):252-60.
- Kleene R, Schachner M. 2004. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci* 5(3):195-208.
- Lamprecht MR, Sabatini DM, Carpenter AE. 2007. CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques* 42(1):71-5.
- 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.
- Lavik E, Teng YD, Snyder E, Langer R. 2002. Seeding neural stem cells on scaffolds of PGA, PLA, and their copolymers. *Methods Mol Biol* 198:89-97.
- Leckband D. 2004. Nanomechanics of adhesion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 14(5):524-30.
- Lee KY, Mooney DJ. 2001. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101(7):1869-79.
- Lee SB, Jeon HW, Lee YW, Lee YM, Song KW, Park MH, Nam YS, Ahn HC. 2003. Bio-artificial skin composed of gelatin and (1-->3), (1-->6)-beta-glucan. *Biomaterials* 24(14):2503-11.
- Li Y, Ma T, Kniss DA, Lasky LC, Yang ST. 2001. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices. *Biotechnol Prog* 17(5):935-44.
- Lin HR, Kuo CJ, Yang CY, Shaw SY, Wu YJ. 2002. Preparation of macroporous biodegradable PLGA scaffolds for cell attachment with the use of mixed salts as porogen additives. *J Biomed Mater Res* 63(3):271-9.
- Luong JH, Habibi-Rezaei M, Meghrouh J, Xiao C, Male KB, Kamen A. 2001. Monitoring motility, spreading, and mortality of adherent insect cells using an impedance sensor. *Anal Chem* 73(8):1844-8.
- Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP and others. 2007. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface*.
- Martin I, Wendt D, Heberer M. 2004. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 22(2):80-6.
- McCullough LA, Egan TM, Westfall TC. 1998. Neuropeptide Y receptors involved in calcium channel regulation in PC12 cells. *Regul Pept* 75-76:101-7.
- McGuire EJ, Binkley SB. 1964. The Structure And Chemistry Of Colominic Acid. *Biochemistry* 3:247-51.
- Mercurio AM. 1995. Laminin receptors: achieving specificity through cooperation. *Trends Cell Biol* 5(11):419-23.
- Mercurio AM, Shaw LM. 1991. Laminin binding proteins. *Bioessays* 13(9):469-73.
- Mian M, Beghe F, Mian E. 1992. Collagen as a pharmacological approach in wound healing. *Int J Tissue React* 14 Suppl:1-9.

- Mitchell JD, Lee R, Hodakowski GT, Neya K, Harringer W, Valeri CR, Vlahakes GJ. 1994. Prevention of postoperative pericardial adhesions with a hyaluronic acid coating solution. Experimental safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107(6):1481-8.
- Miura T, Ohno N, Miura NN, Adachi Y, Shimada S, Yadomae T. 1999. Antigen-specific response of murine immune system toward a yeast beta-glucan preparation, zymosan. *FEMS Immunol Med Microbiol* 24(2):131-9.
- Mochizuki M, Kadoya Y, Wakabayashi Y, Kato K, Okazaki I, Yamada M, Sato T, Sakairi N, Nishi N, Nomizu M. 2003. Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering. *Faseb J* 17(8):875-7.
- Muhlenhoff M, Eckhardt M, Bethe A, Frosch M, Gerardy-Schahn R. 1996. Polysialylation of NCAM by a single enzyme. *Curr Biol* 6(9):1188-91.
- Myers RR, Sekiguchi Y, Kikuchi S, Scott B, Medicherla S, Protter A, Campana WM. 2003. Inhibition of p38 MAP kinase activity enhances axonal regeneration. *Exp Neurol* 184(2):606-14.
- Nagai M, Hayakawa T, Fukatsu A, Yamamoto M, Fukumoto M, Nagahama F, Mishima H, Yoshinari M, Nemoto K, Kato T. 2002. In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial cell attachment. *Dent Mater J* 21(3):250-60.
- Nagatsu T, Levitt M, Udenfriend S. 1964. Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step In Norepinephrine Biosynthesis. *J Biol Chem* 239:2910-7.
- Nasca MR, O'Toole EA, Palicharla P, West DP, Woodley DT. 1999. Thalidomide increases human keratinocyte migration and proliferation. *J Invest Dermatol* 113(5):720-4.
- Nieto N, Dominguez-Rosales JA, Fontana L, Salazar A, Armendariz-Borunda J, Greenwel P, Rojkind M. 2001. Rat hepatic stellate cells contribute to the acute-phase response with increased expression of alpha1(I) and alpha1(IV) collagens, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and matrix-metalloproteinase-2 messenger RNAs. *Hepatology* 33(3):597-607.
- Ogata T, Yamamoto S, Nakamura K, Tanaka S. 2006. Signaling axis in schwann cell proliferation and differentiation. *Mol Neurobiol* 33(1):51-62.
- Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. 1994. N-CAM mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neuron* 13(3):595-609.
- Oyane A, Uchida M, Ito A. 2005. Laminin-apatite composite coating to enhance cell adhesion to ethylene-vinyl alcohol copolymer. *J Biomed Mater Res A* 72(2):168-74.
- 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.
- Patankar MS, Oehninger S, Barnett T, Williams RL, Clark GF. 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem* 268(29):21770-6.
- Pei M, Solchaga LA, Seidel J, Zeng L, Vunjak-Novakovic G, Caplan AI, Freed LE. 2002. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *Faseb J* 16(12):1691-4.
- Pereira MS, Mulloy B, Mourao PA. 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from echinoderms with

- the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem* 274(12):7656-67.
- Priest CA, Puche AC. 2004. GABAB receptor expression and function in olfactory receptor neuron axon growth. *J Neurobiol* 60(2):154-65.
- Rabinovsky ED, Smith GM, Browder DP, Shine HD, McManaman JL. 1992. Peripheral nerve injury down-regulates CNTF expression in adult rat sciatic nerves. *J Neurosci Res* 31(1):188-92.
- Rauvala H. 1984. Neurite outgrowth of neuroblastoma cells: dependence on adhesion surface-cell surface interactions. *J Cell Biol* 98(3):1010-6.
- Rhee HW, Zhau HE, Pathak S, Multani AS, Pennanen S, Visakorpi T, Chung LW. 2001. Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 37(3):127-40.
- Risbud MV, Sittinger M. 2002. Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation. *Trends Biotechnol* 20(8):351-6.
- Rode B. laufende Dissertation, Insitut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover.
- Roeder BA, Kokini K, Sturgis JE, Robinson JP, Voytik-Harbin SL. 2002. Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *J Biomech Eng* 124(2):214-22.
- Rowley JA, Madlambayan G, Mooney DJ. 1999. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20(1):45-53.
- 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.
- Sakai T, Kimura H, Kojima K, Shimanaka K, Ikai K, Kato I. 2003. Marine bacterial sulfated fucoglucuronomannan (SFGM) lyase digests brown algal SFGM into trisaccharides. *Mar Biotechnol (NY)* 5(1):70-8.
- Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD. 1990. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol* 111(4):1685-99.
- Sapper A, Wegener J, Janshoff A. 2006. Cell motility probed by noise analysis of thickness shear mode resonators. *Anal Chem* 78(14):5184-91.
- Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. 1996. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20):10614-9.
- Schiffer R, Klein B, Klosterhalfen B, Zwadlo-Klarwasser G. 1999. The contact of human macrophages with extracellular matrix proteins selectively induces expression of proinflammatory cytokines. *Pathobiology* 67(5-6):233-5.
- Schimmelpfeng J, Weibezahn KF, Dertinger H. 2004. Quantification of NGF-dependent neuronal differentiation of PC-12 cells by means of neurofilament-L mRNA expression and neuronal outgrowth. *J Neurosci Methods* 139(2):299-306.
- Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. 2005. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials* 26(4):359-71.
- Seyer JM, Hutcheson ET, Kang AH. 1977. Collagen polymorphism in normal and cirrhotic human liver. *J Clin Invest* 59(2):241-8.

- Shafer TJ, Atchison WD. 1991. Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies. *Neurotoxicology* 12(3):473-92.
- Shettigar UR, Jagannathan R, Natarajan R. 1982. Collagen film for burn wound dressings reconstituted from animal intestines. *Artif Organs* 6(3):256-60.
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. 2002. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res* 62(1):136-48.
- Stark Y, Suck K, Kasper C, Wieland M, van Griensven M, Scheper T. 2006. Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Exp Toxicol Pathol* 57(4):305-11.
- Still J, Glat P, Silverstein P, Griswold J, Mazingo D. 2003. The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients. *Burns* 29(8):837-41.
- Stokols S, Tuszynski MH. 2004. The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* 25(27):5839-46.
- Stryer L. 1994. *Biochemie*. Kapitel 11:273 ff.
- Suck K, Behr L, Fischer M, Hoffmeister H, van Griensven M, Stahl F, Scheper T, Kasper C. 2007. Cultivation of MC3T3-E1 cells on a newly developed material (Sponceram) using a rotating bed system bioreactor. *J Biomed Mater Res A* 80(2):268-75.
- Taipale J, Keski-Oja J. 1997. Growth Factors in the extracellular Matrix. *FASEB J* 11:51-59.
- Tang J, Landmesser L, Rutishauser U. 1992. Polysialic acid influences specific pathfinding by avian motoneurons. *Neuron* 8(6):1031-44.
- Temenoff JS, Mikos AG. 2000. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21(5):431-40.
- Thorlacius H, Vollmar B, Seyfert UT, Vestweber D, Menger MD. 2000. The polysaccharide fucoidan inhibits microvascular thrombus formation independently from P- and L-selectin function in vivo. *Eur J Clin Invest* 30(9):804-10.
- Tillinghast GW, Partee J, Albert P, Kelley JM, Burtow KH, Kelly K. 2003. Analysis of genetic stability at the EP300 and CREBBP loci in a panel of cancer cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 37(2):121-31.
- Traving C, Schauer R. 1998. Structure, function and metabolism of sialic acids. *Cell Mol Life Sci* 54(12):1330-49.
- Tsuzuki A, Tateishi T, Ohno N, Adachi Y, Yadomae T. 1999. Increase of hematopoietic responses by triple or single helical conformer of an antitumor (1-->3)-beta-D-glucan preparation, Sonifilan, in cyclophosphamide-induced leukopenic mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 63(1):104-10.
- Turner DC, Flier LA, Carbonetto S. 1987. Magnesium-dependent attachment and neurite outgrowth by PC12 cells on collagen and laminin substrata. *Dev Biol* 121(2):510-25.
- 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.
- Verheye S, Markou CP, Salame MY, Wan B, King SB, 3rd, Robinson KA, Chronos NA, Hanson SR. 2000. Reduced thrombus formation by hyaluronic acid coating of endovascular devices. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(4):1168-72.
- Voet D, Voet JG. 1995. *Biochemistry*: John Wiley and Sons Inc.

- Wang KK, Costas PD, Jones DS, Miller RA, Seckel BR. 1993. Sleeve insertion and collagen coating improve nerve regeneration through vein conduits. *J Reconstr Microsurg* 9(1):39-48.
- Wang L, Shelton RM, Cooper PR, Lawson M, Triffitt JT, Barralet JE. 2003. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 24(20):3475-81.
- Wang Y, Ameer GA, Sheppard BJ, Langer R. 2002. A tough biodegradable elastomer. *Nat Biotechnol* 20(6):602-6.
- Warren L. 1959. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J Biol Chem* 234(8):1971-5.
- Wegener J, Keese CR, Giaever I. 2000. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res* 259(1):158-66.
- Wendt D, Marsano A, Jakob M, Heberer M, Martin I. 2003. Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity. *Biotechnol Bioeng* 84(2):205-14.
- Widner B, Behr R, Von Dollen S, Tang M, Heu T, Sloma A, Sternberg D, Deangelis PL, Weigel PH, Brown S. 2005. Hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 71(7):3747-52.
- Wolk M, Danon D. 1985. Promotion of wound healing by yeast glucan evaluated on single animals. *Med Biol* 63(2):73-80.
- Yang YH, Speed T. 2002. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* 3(8):579-88.
- Yashiki S, Umegaki R, Kino-Oka M, Taya M. 2001. Evaluation of attachment and growth of anchorage-dependent cells on culture surfaces with type I collagen coating. *J Biosci Bioeng* 92(4):385-8.
- Yim JH, Kim SJ, Ahn SH, Lee CK, Rhie KT, Lee HK. 2004. Antiviral effects of sulfated exopolysaccharide from the marine microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03. *Mar Biotechnol (NY)* 6(1):17-25.
- Yim JH, Son E, Pyo S, Lee HK. 2005. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity in vivo. *Mar Biotechnol (NY)* 7(4):331-8.
- Yoo Y, Hong J, Hur K, Oh E, Chung J. 2004. Iron enhances NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *MOLECULES AND CELLS* 17(2):340-346.
- Yoshii S, Oka M. 2001. Collagen filaments as a scaffold for nerve regeneration. *J Biomed Mater Res* 56(3):400-5.
- Zeltinger J, Sherwood JK, Graham DA, Mueller R, Griffith LG. 2001. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition. *Tissue Eng* 7(5):557-72.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name, Vorname	Stark, Yvonne
Geburtsdatum	26.12.1979
Geburtsort	Helmstedt

Schulbildung

1986-1990	Grundschule Alemannstr., Hannover
1990-1992	Orientierungsssschule Isernhagenerstr., Hannoer
1992- 1999	Gymnasium Berenbostel/Garbsen
1999	Abschluss Allgemeine Hochschulreife

Studium

1999-2004	Studium Chemie-Diplom an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität in Hannover
2004	Diplomarbeit mit dem Titel: „Einsatz von Kollagenmatrices im Tissue Engineering“, Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität in Hannover
2004-2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Technische Chemie der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität in Hannover

Publikationsliste

Journals

Yvonne Stark, Stephanie Bruns, Frank Stahl, Cornelia Kasper, Claudia Grothe, Maïke Wesemann, Thomas Scheper

A study on polysialic acid as a biomaterial for cell culture applications

J Biomed Materials Res A, 2007; doi: 10.1002/jbm.a.31406.

Stephanie Bruns, **Yvonne Stark**, Martin Wieland, Frank Stahl, Cornelia Kasper, Thomas Scheper.

Fast and efficient screening system for new biomaterials in tissue engineering: a model for peripheral nerve regeneration.

J Biomed Materials Res A, 2007; 81(3): 736-747.

Stephanie Bruns, **Yvonne Stark**, Stefanie Röker, Martin Wieland, Gerald Dräger, Andreas Kirschning, Frank Stahl, Cornelia Kasper, Thomas Scheper.

Collagen biomaterial doped with colominic acid for cell culture applications with regard to peripheral nerve repair.

J Biotechnol., 2007; 131(3): 335-45.

Yvonne Stark, Kirstin Suck, Martin Wieland, Martijn van Griensven, Cornelia Kasper, Thomas Scheper,

Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering.

Exp. Toxic. Pathol., 57 (4), 2006, 305

Cornelia Kasper, Kirstin Suck, **Yvonne Stark**, Martijn van Griensven,

Tissue Engineering,

BIOforum Europe 6/2004, 38

Poster

20th Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT) 2007, Dresden, Germany 17.-20.Juni 2007

Yvonne Stark, Stephanie Bruns, Bastian Rode, Silke Beski, Frank Stahl, Cornelia Kasper, Thomas Scheper

A study on bioscaffolds of polysialic acid and β -glucan for cell culture and tissue engineering applications

Annual TERMIS-EU Meeting 2006, Rotterdam, Netherlands, 08. - 11. Oktober 2006

Yvonne Stark, Stephanie Bruns, Bastian Rode, Frank Stahl, Cornelia Kasper, Thomas Scheper

Polysialic acid from E.coli K1 as bio-identical material for cell cultivation and tissue engineering applications

GVC/DECHEMA-Jahrestagungen 2006 mit 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, Germany, 26. -28. September 2006

Yvonne Stark, Stephanie Bruns, Frank Stahl, Cornelia Kasper, Thomas Scheper

Comparative testing of surface coatings for cell culture application

Biomaterials – synthesis, processing and biological evaluation, Workshop 2006 der DFG Forschergruppe 548 Polysialinsäure, Hannover, Germany, 29. März 2006

Yvonne Stark, Stephanie Bruns, Cornelia Kasper, Frank Stahl, Claudia Grothe, Thomas Scheper

Comparative testing of various surface coatings for cell cultivation

4th annual meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES) 2005, München, Germany, 31. August -03. September 2005

Yvonne Stark, Kirstin Suck, Martin Wieland, Martijn van Griensven, Cornelia Kasper, Thomas Scheper

Investigation of Different Biomaterials for Bone and Cartilage Repair Tissue Engineering

GVC/DECHEMA-Jahrestagungen 2005 mit 24. DECHEMA-Jahrestagung der Biotechnologen, Wiesbaden, Germany, 6.-8. September 2005

Yvonne Stark, Kirstin Suck, Martin Wieland, Martijn van Griensven, Cornelia Kasper, Thomas Scheper

New Biomaterials for Cartilage Tissue Engineering