

Tissue Engineering

Definition

Tissue Engineering = Gewebetechnik, Gewebezüchtung

- Interdisziplinäres Arbeitsgebiet der Ingenieurs- und Lebensmittelwissenschaften
- Ziel: Entwicklung biologischer Ersatzgewebe zur Unterstützung oder zum Ersatz von geschädigtem oder ausgefallenem Gewebe
- Regenerative Medizin: endogenes Regenerationspotential (Selbstheilungskräfte des Körpers)
 - Verwendung der dabei wirkenden Mechanismen und steuernden Molekülen



Transplantationen

Autotransplantation

aus dem eigenen Körper

Allotransplantation

von einem anderen Menschen

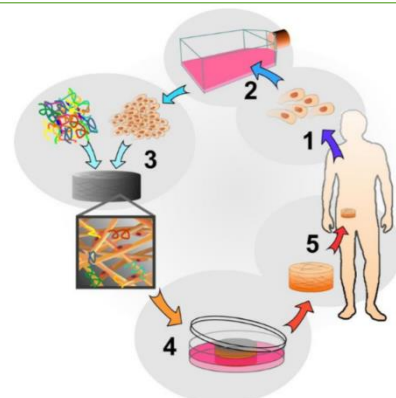
Xenotransplantation

Tiere als Organspender

Prinzip des TE

1. Gewebebiopsie
2. Zellisolation und -vermehrung
3. Zellaussaat auf Matrix (synthetisch oder biologisch)
4. Kultivierung des bioartifiziellen Gewebes (in Bioreaktoren)
5. Transplantation oder Einsatz als Testsystem auf Basis humaner Zellen

Bausteine des TEs: Zellen/Zellinteraktionen
Trägerstrukturen/Biomaterialien
Bioreaktoren



Unterschiedliche Gewebe = unterschiedliche Zelltypen!

Grundbedürfnisse einer Zelle: Bewegung, Nahrung, Dach über dem Kopf, Freunde, Schutz

Nachahmung der physiologischen Bedingungen notwendig

Bisher: Aufbau meist einfacher Gewebe ohne Versorgungssystem

Vitale Implantate

Zellquellen

- **Zelllinien**
- **Primäre Zellen**
- Adulte Stammzellen
- Embryonale Stammzellen
- reprogrammierte (iPS) Stammzellen

Zelllinien

= immortalisierte Zellen, die sich unbegrenzt teilen können

Herstellung: - Zufällige Mutation einer Zelle – Tumorzelllinie
- Gezielte Veränderung einer Zelle mit Viren oder Plasmiden

- Viele verschiedene Zelllinien für verschiedene Zelltypen kommerziell erhältlich
- Einfache Kultivierungsbedingungen (günstig, schnell, reproduzierbar, ...)
- Viele zelltypische Merkmale, Funktionen und Eigenschaften
- Unbegrenzt proliferationsfähig
- Gleichbleibende Qualität

Aber:

- Veränderte Eigenschaften durch Immortalisierung
- Verändertes Wachstumsverhalten
- Ergebnisse wenig auf Zellen in Gewebe übertragbar
- Nicht in vivo implantierbar (kanzerogen!)
- Kontaminierte Zelllinien

Beispiel HeLa (Henrietta Lachs; Karyogramm: 82 statt 46 Chromosomen):

- Erste permanente Zelllinie
- 1951 isoliert aus humanen Epithelzellen eines Cervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs)
- Etablierung des ersten Impfstoffs gegen Kinderlähmung

Je älter eine Zelle, desto kürzer ihre Telomere: Einschränkung der Fähigkeit der Zellteilung

Primäre Zellen

= aus Gewebebiopsien isolierte Zellen

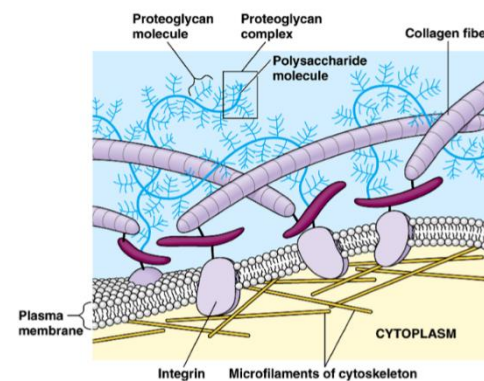
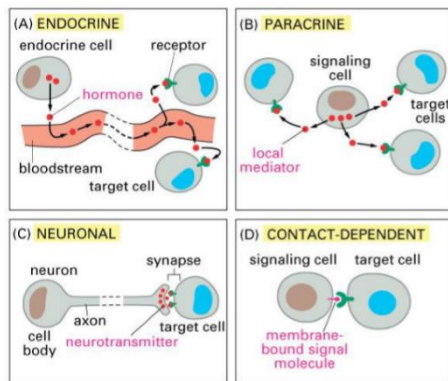
- Physiologische Eigenschaften der Zellen wie in vivo
- Autolog verwendbar
- Funktionell und ausdifferenziert

Aber:

- Nur begrenzt proliferationsfähig/ begrenzte Lebensdauer in Kultur
- Biopsiematerial nur begrenzt verfügbar
- Qualität ist vom Spender und von Kultivierungsbedingungen abhängig
- Kultivierung mit Antibiotika
- Oft keine Reinkultur nach Isolation
- Dedifferenzieren in andere Zelltypen
- Veränderung der Zelleigenschaften durch in vitro Kultivierung

Implantatherstellung: primäre Zellen oder Stammzellen

Zell-Zell-Interaktionen / Zell-Matrix-Interaktionen



Trägerstrukturen / Biomaterialien

- Künstliche Matrix
- Biologische Matrix
- Nachbildung der in vivo Verhältnisse (beschichtete Zellkultur, 3D-Gele, 3D-Elektrospinning: willkürliche Faseranordnung in einem Hochspannungsfeld einer natürlichen Protein-/Polymerlösung)

Bioreaktoren

- Simulationen zur Parametrisierung von Bioreaktoren und zur Analyse von biologischen Prozessen
- Inkubatorsysteme
- Physiologische Bedingungen für verschiedene Gewebe -> Aufprägen von verschiedenen physikalischen Reizen

Stand der Technik: Implantate

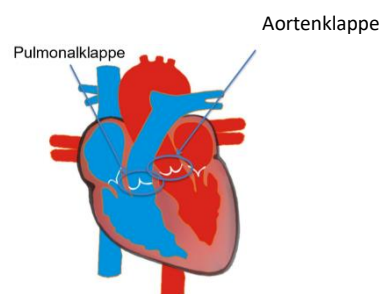
- Knorpelimplantat
Ersatz aus Chondrozyten und Kollagen: klinischer Einsatz
- Hautimplantat
Ersatz aus Fibroblasten/Keratinocyten und Kollagen: klinischer Einsatz
- Zelltransplantationen
adulte Stammzellen für die Heilung von Leukämie, Muskelzellen bei Inkontinenz etc.: klinischer Einsatz

Aktuelle Forschung: kardiovaskuläres (Herz, Blutgefäßsystem) TE

- Herzklappen-TE
- Kardiovaskuläre Stammzellnische
- Kardiomyozyten Regeneration/Ersatz

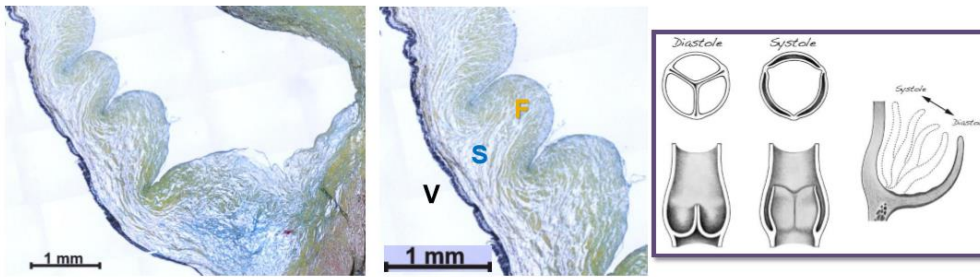
Anatomie der Herzklappen:

- Segelklappen: Trikuspidal- (rechts) und Mitralklappe
- Taschenklappen: Pulmonal- und Aortenklappe
- Ernährung hauptsächlich über Diffusion



Herzklappenentwicklung EMT: Epithelial (Endocardial) to Mesenchymal Transformation

Morphologie:



Fibrosa	hauptsächlich Kollagen
Spongiosa	hauptsächlich Glykosaminoglykane
Ventrikularis	hauptsächlich Elastin

Hauptkomponenten der Herzklappen:

- **Zellen:** - Endothelzellen -> bieten Thromboseresistenz, Entzündungsmediatoren
 - Interstitialzellen -> Synthese und Umbau der ECM
- **ECM:** - Elastin -> Elastizität wichtig für Öffnungs- und Schließmechanismus
 - Glykosaminoglykane (GAGs)
 - > dämpfen wahrscheinlich die Scherung zwischen Ventrikularis & Fibrosa ab
 - Kollagene -> bieten Festigkeit und Steifheit; wichtig für gute Abdichtung

Herzklappenfehler:

- 15% angeboren
- 85% erworben: hauptsächlich linke Herzhälfte betroffen
 - > stärkere mechanische Belastung aufgrund der höheren Drücke (Mitralklappe 60%, Aortenklappe 15%)

Herzklappenerkrankungen:

Klappenverengung (Stenose)

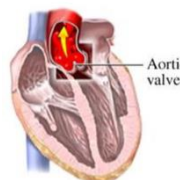
Klappeninsuffizienz



normale
Aortenklappen



Aortenklappen-
stenose



normale
Aortenklappen-



Aortenklappen-
insuffizienz

Herzklappenersatz	Limitationen
mechanisch	Thrombogen, (lebenslange Einnahme von Antikoagulationsmitteln), sehr infektionsanfällig
bioprothetisch	Geringe Lebensdauer Verkalkung -> Stenose & mechanische Ermüdung, immunogen
Allogene Transplantate (kryopreserviert)	Geringe Verfügbarkeit, immunogen

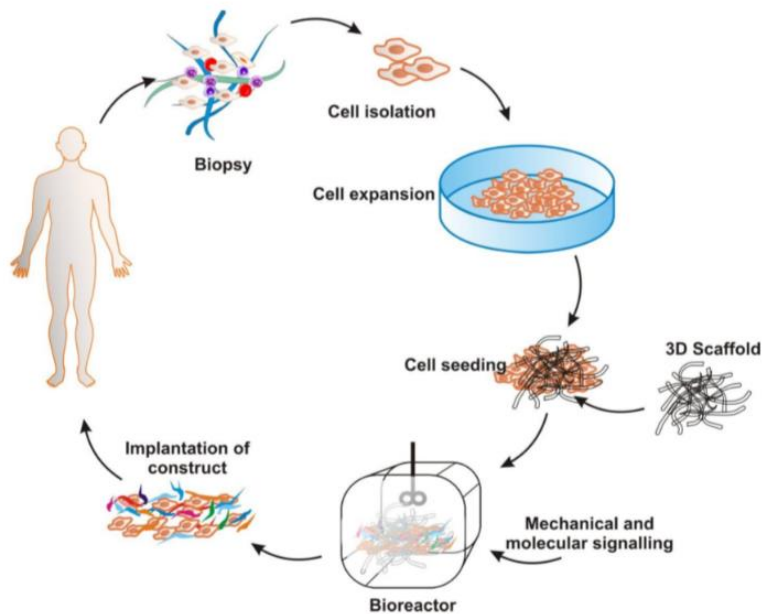


Problem vor allem in Pädiatrie Ersatzklappen:

- Wachsen nicht mit
- Reparieren sich nicht
- Keine Möglichkeit zum Remodelling
- > noch kein idealer Ersatz gefunden

- > Tissue Engineering

Konzept



Zellquellen:

- Mikrovaskuläre Endothelzellen (mECs)
 - Isolation aus Haut- oder Gefäßbiopsaten (z.B. Vena saphena)
- Glatte Muskelzellen
 - Isolation aus Gefäßbiopsaten
- Mesenchymale Stammzellen (MSCs)
 - Isolation aus Knochenmark, Blutplasma und Fettgewebe
- Endotheliale Progenitorzellen (EPCs)
 - Isolation aus Blut, Nabelschnurblut

Trägerstrukturen:

- Dezellularisierte, xenogene Trägerstrukturen (porzine Herzklappen, Rinderperikard)
 - Einfach zu produzieren
 - Aber: Übertragung von Krankheiten; ethische Bedenken
- Biokompatible, synthetische Trägerstrukturen (Polymere: PCL, PCA, PU, ...)
 - Einfach zu produzieren und sterilisieren
 - Kein Krankheitsrisiko
 - Aber: kein dynamisch & chemisch stimuliertes Umfeld

Optimal sind Hybridmatrices:

- Kombination natürlicher (biologischer) Materialien mit stabilen Polymere/ECM-Proteine

Implantationstechniken:

Minimal-invasiv vs Operation am offenen Herzen

Perfekt gezüchtete Herzklappe

- **Autologe Progenitorzellen**, die sowohl in Endothelzellen als auch in Matrix-produzierende Interstitialzellen differenzieren können
- Richtige Zusammensetzung der Trägerstruktur: **ECM-Proteine** (Kollagene, PGs, Elastin)
- Zugesezte **Wachstumsfaktoren** im Medium: wichtig für Valvulogenese, helfen Zelle in den richtigen Phänotyp zu differenzieren
- **Mechanische Stimuli**, die zur gewünschten Differenzierung und ECM-Bildung anregen

Anwendungen des Tissue Engineering

Testsysteme

- Ersatz zu Tierversuchen
- Simulation physiologischer Barrieren & Aufklärung zellulärer Mechanismen
- Verbesserte Übertragbarkeit durch humane Zellen

Implantate

- Verringerte Wartezeit
- Verminderte Abstoßungsreaktion durch patienteneigene Zellen

Aspekte der 3R

Reduction Reduzierung von Tierversuchen auf ein Minimum)

Refinement (Verbesserung der Bedingungen für Tiere)

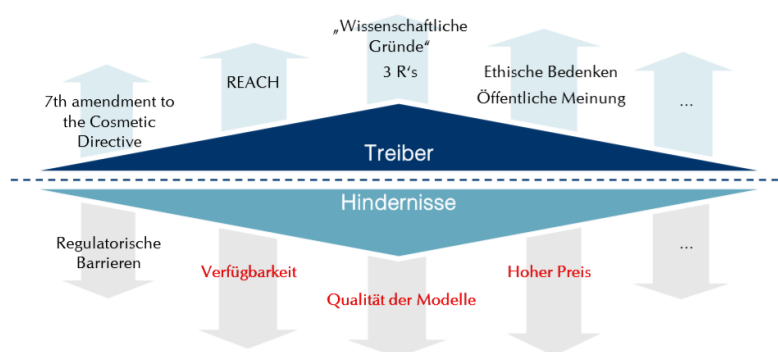
Replacement (Ersetzen von Tierversuchen)

2007: REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances)

2009: EU-Verbot für Einsatz von Tierversuchen für Kosmetika-Tests

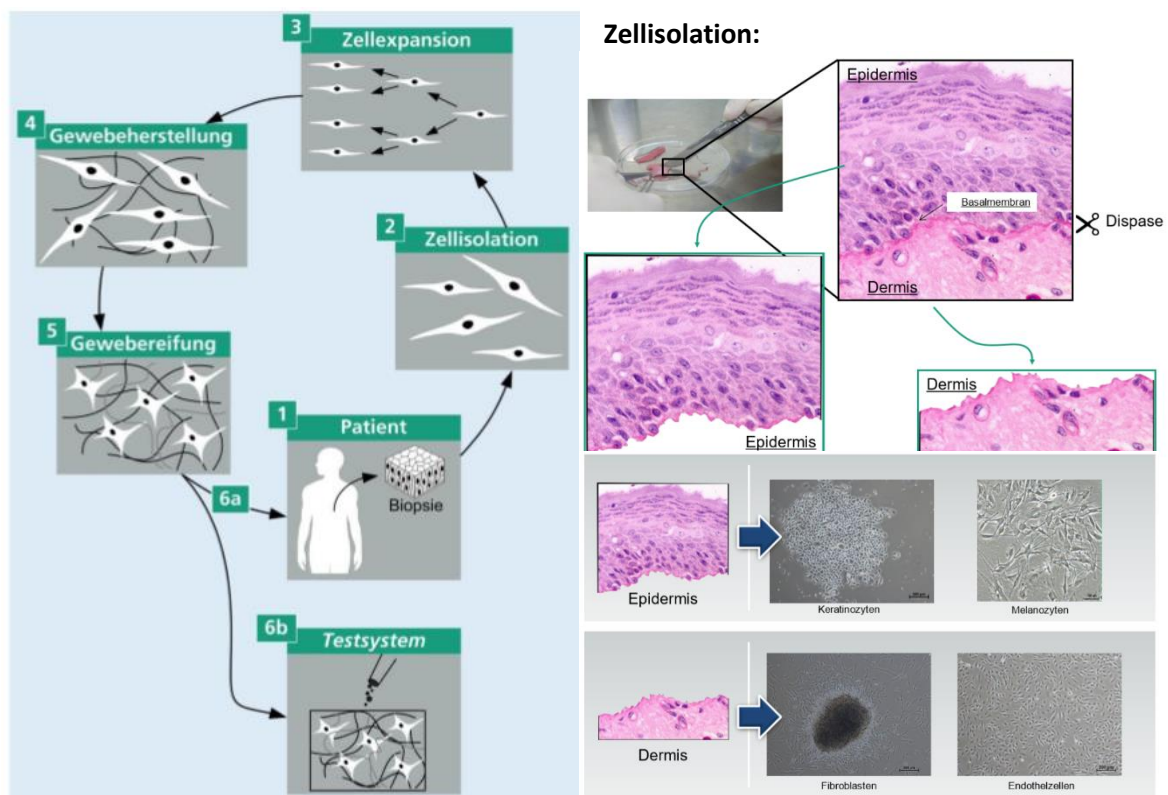
ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)

Gründe für und gegen alternative Methoden zu Tierversuchen

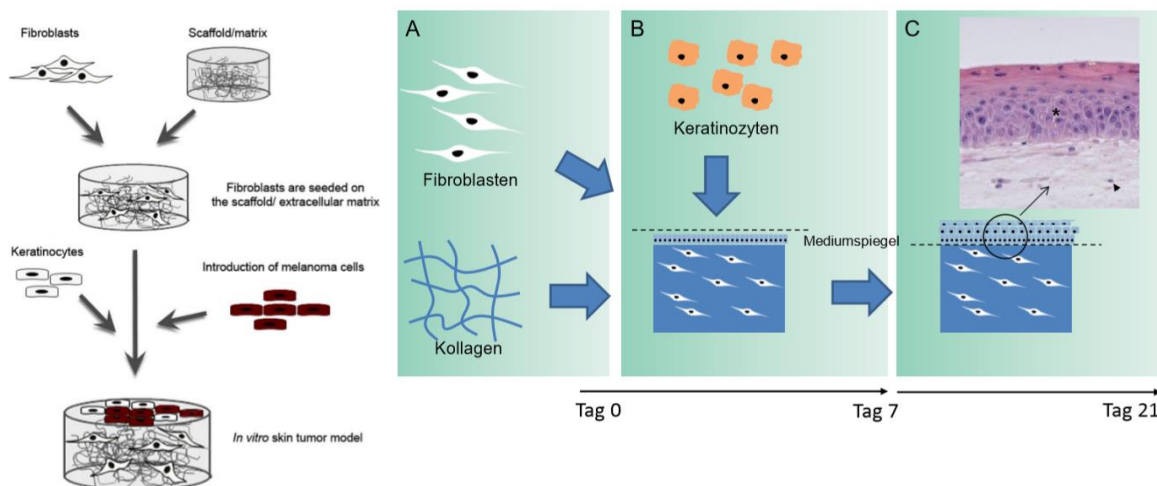


- Eine automatisierte Herstellung von in vitro Modellen könnte diese hauptsächlichen Hindernisse aus dem Weg räumen

Tissue-Engineerte Haut als Testsystem



Herstellung:



Krankheitsmodelle

Darmtestsysteme

- Auf Basis von Caco-2-Zellen (Zelllinie aus einem Dickdarmkarzinom; 2D) und humanen Endothelzellen (3D)
- 2D vs. 3D Testsysteme: Permeabilitätsstudien und dynamische 3D in vitro Systeme
 - Peristaltik über Bioreaktoren simuliert

Zusammenfassung Testsysteme

- **Dringende Notwendigkeit von humanbasierten Testsystemen (3R-Prinzip, REACH, ...)**
- Kein Modell ist optimal für alle Fragestellungen!

Implantate

Hautimplantat: Apligraf: körperfremder Ersatz aus Fibroblasten/Keratinozyten und Kollagen

- Klinischer Ersatz

Knorpelimplantat: körpereigener Ersatz aus Chondrozyten und Kollagen

- Klinischer Einsatz

Blutgefäßersatz: körpereigene Endothelzellen und Kunststoffe

- Klinische Studien
- Goldstandards für bypass-OP's: autologe Arterien oder Venen
- Künstliche Gefäßprothesen: PET (polyethylene), ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene)
 - Aber: nur gut bei größeren Gefäßen (> 6mm), bei kleineren Verstopfungen durch Thrombusformation
- Grund: Fehlen von Endothelzellen
- Herausforderung: Coronar-, Bein- oder Mikrogefäßoperationen

Zusammenfassung Implantate

- Nur sehr einfach aufgebaute TE-Konstrukte im klinischen Einsatz (Haut, Knorpel, Knochen)

GMP (Good Manufacturing Practice)

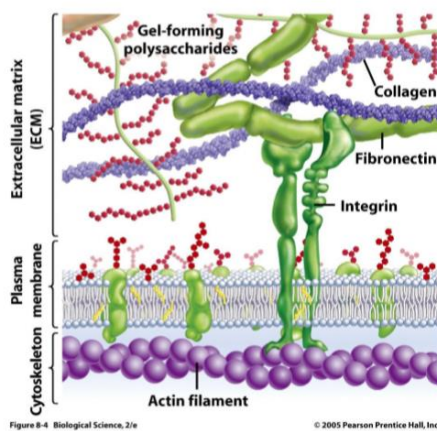
- **Qualitätssicherungssystem**
- **Ziel:** Produkt mit höchstmöglicher Qualität; Wirksamkeit; Unbedenklichkeit
- Gilt für Herstellung von Medizinprodukten, Arzneimitteln sowie Transplantaten
 - Qualität wird produziert

Extrazelluläre Matrix

Definition

= Gesamtheit aller Makromoleküle im tierischen Gewebe, welche sich im Interzellularraum befinden und sowohl stützende als auch funktionelle Bedeutungen haben.

Komplexe Struktur aus Faserproteinen (z.B. Kollagen, elastische Fasern) und Grundsubstanz (z.B. Proteoglykane)

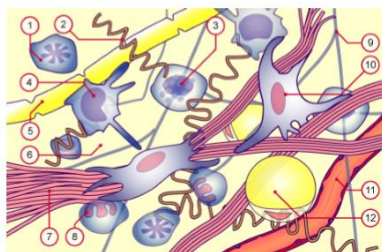


- **Fasern:**
 - Retikuläre Fasern
 - Kollagen
 - Elastische Fasern
- **Nicht-faserbildende Bestandteile:**
 - Proteoglykane (PGs)
 - Glykosaminoglykane (GAGs)
 - Fibronectin, Laminin
 - Matrizelluläre Proteine
- **ECM essentiell für:** Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung

Bindegewebe vs. Epithel

Bindegewebe

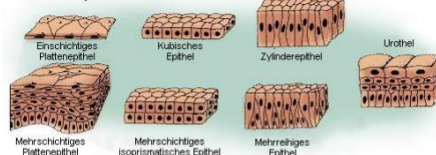
- hauptsächlich ECM
- Faserförmige Polymere (verleihen mechanische Stärke)
- Kaum Zell-Zell Kontakte



Epithel

- Hauptbestandteil: Zellen (Zellschichten)
- wenig ECM (Basallamina)
- viele Zell-Zell Kontakte

Arten von Epithel



Sekretion der ECM (wird von Zellen sekretiert):

- im Bindegewebe: Fibroblasten
- im Knorpel: Chondrozyten
- im Knochen: Osteoblasten

Aufbau von ECM-Proteinen:

- in der Zelle: Proteinsynthese
- außerhalb der Zelle: Bildung größerer Konstrukte (z.B. Kollagenfasern)

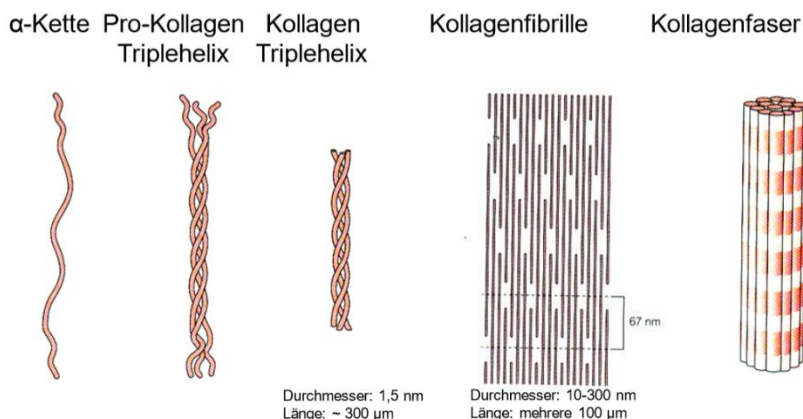
Funktionen

- Formgebung von Geweben und Organen
- Bietet Möglichkeit zur Adhäsion von Zellen
- Kontrolle des Zellwachstums
- Zelldifferenzierung
- Beeinflussung der Gewebserneuerung/ Wundheilung
- Speicherung und Präsentation von regulatorischen Molekülen
- ➔ Die ECM ist je nach Aufgabe des Gewebes unterschiedlich aufgebaut (z.B. Knochen vs. Blutgefäß)

Kollagene Fasern

- heterogene Proteingruppe
- ~ 25% der menschlichen Körpermasse bestehen aus Kollagen
- Hauptbestandteil der: Haut (Dermis), Cornea, Sehnen, Knorpel, Knochen
- Von Zelltypen des Bindegewebes synthetisiert: Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten

Aufbau: Zusammenlagerung zu Kollagenfasern



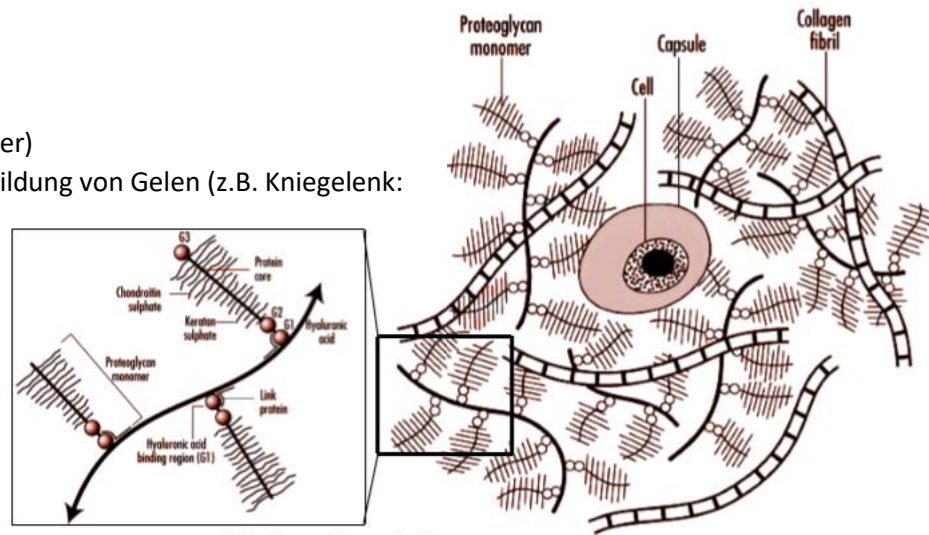
Elastische Fasern

- quervernetzte Tropoelastin-Moleküle
- Elastische Mikrofibrillen aus Fibrillinen
- Sehr dehnbar (elastisch): 100-150%
- Elastische Fasern bilden sich während der frühen Entwicklung
- Schäden in adulten Geweben werden nur unzureichend repariert
- Wichtig: elastische Fasern sind häufig im Verbund mit Kollagenfasern, um nicht überdehnt zu werden und umgekehrt, um die Kollagenfasern wieder in die ursprüngliche Lage zurückzubringen
- Hoher Anteil an hydrophoben AS
- Wasserunlöslich, hitzestabil, chemisch bzw. Proteinase-resistent
- Im Gewebe: konzentrische Ringe in elastischen Arterien

- Von Fibroblasten und glatten Muskelzellen synthetisiert

Glykosaminoglykane (GAGs)

- lange unverzweigte Polysaccharidketten
- Bestehend aus Disaccharideinheiten:
 - Aminosucker
 - Zuckersäure
- Sehr hydrophil
- Starke Anionen (sehr sauer)
- Wasserneinlagerung -> Bildung von Gelen (z.B. Kniegelenk: Druckfestigkeit)



Proteoglykane (PG)

- Kernprotein + Seitenketten aus sulfatierten GAGs
- Kategorisierung anhand der GAG-Ketten
- Unterteilung in 4 Klassen: Chondroitinsulfat/Dermatansulfat, Heparansulfat/Chondroitinsulfat, Chondroitinsulfat, Keratansulfat
- Bildung: GAGs sind kovalent an Proteine gebunden (Ausnahme: HA)
- Bilden große Polymerkomplexe mit:
 - Anderen PGs
 - HA
 - Faserproteinen (z.B. Kollagen)
- **Aufgaben:**
 - Bildung von Gelen unterschiedlicher Porengröße und Ladungsdichte
 - Filtereigenschaften (Perlecan in der Niere)
 - Signalübertragung
 - Bindung von sezernierten Signalmolekülen
 - Stimulation/Inhibition der Aktivität
 - Entzündung
 - Festhalten von Chemokinen an der Entzündungsstelle: weiße Blutkörperchen dringen ins entzündete Gewebe ein
- Transmembrane PGs: Zelloberflächenrezeptoren
- Small leucin-rich PGs: Decorin, Biglycan, Fibromodulin, Lumican, Pg-Lb, Keratocan

Decorin: Kernprotein + Chondroitin-/Dermatansulfat

- Kollagenbildung
- Regulierung von Wachstumsfaktoren
- Regulation des Zellwachstums
- Anti-fibrotisch

Hyaluronsäure (HA): einfachstes GAG: sulfatfreies, repetitives Disaccharid

- Nicht wie andere GAGs kovalent an Protein gebunden
- Druckfestigkeit von Geweben und Gelenken
- Wasserspeicherung
- Wesentlicher Bestandteil der Gelenkflüssigkeit
- Wundheilung
- Wichtig während der Embryonalentwicklung

Heparansulfat: meistens an der Zelloberfläche an Syndecan- oder Glypicanproteine angehängt

- Proteinbindung und Rezeptorwirkung an der Zelloberfläche

Fibronectin (Glykoprotein): Proteinanteil überwiegt, kurze Kohlenhydrateinheiten

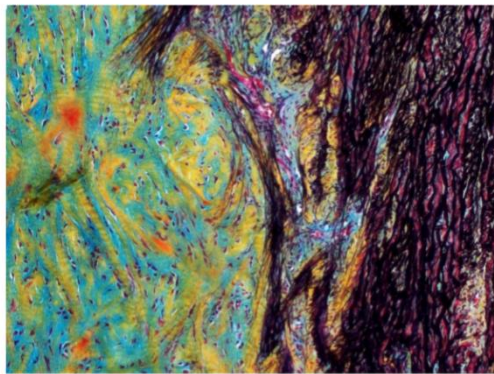
- Aufgabe: Strukturierung der Matrix, Zelladhäsion, Zellmigration

Laminine (Glykoproteine): Bestandteil der Basallamina

- Bilden Netzwerke
- Viele Bindungsstellen
- Aufgaben: Entwicklung, Zelldifferenzierung, Zellmigration
- Interagieren mit Zelloberflächenrezeptoren (Bsp. Integrine)

Matrizelluläre Proteine

- ECM-Proteine, die nicht primär eine strukturelle Rolle spielen, sondern Zell-Matrix-Interaktionen steuern
- Regulieren Zellfunktionen durch Interaktionen mit:
 - Zelloberflächenrezeptoren
 - Proteasen
 - Wachstumsfaktoren
 - Strukturelle Matrixproteine (Kollagen, elastische Fasern)
- Eigenschaften:
 - Während Entwicklung und nach Verletzungen stark exprimiert
 - Vermindern Zelladhäsion im Gegensatz zu den meisten Matrixproteinen



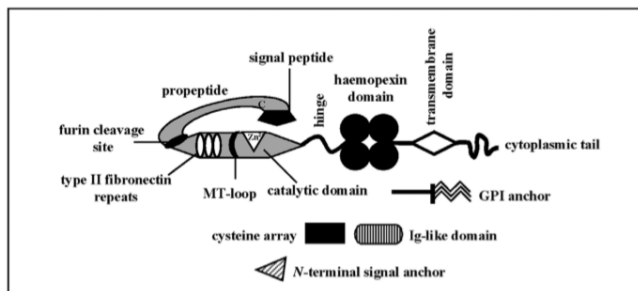
- Elastische Fasern und Zellkerne: **schwarz**
- Kollagen: **gelb**
- Muzine: **blau-grün**
- Muskel: **rot**
- Fibrinoide : **intensiv rot**

Basische Farbstoffe (blau/grün/schwarz) färben saure Strukturen

Saure Farbstoffe (rot/gelb) färben basische Strukturen

MMPs und TIMPs

- **Matrix-Metalloproteasen (MMPs)**
 - Zinkhaltige Endopeptidasen
 - Eine oder mehrere Hämopepin- oder Vitronectin-Domänen, die ein Enzym bei der Verankerung in ECM oder Zellmembran helfen
 - Calcium-bindende Domäne
 - > notwendig für Aktivierung
- Ab- und Umbau von Gewebe: Morphogenese, Wundheilung, Angiogenese, Tumorwachstum (Abbau von Basalmembran, Aufbau von tumoreigenen Blutgefäßen)
- Prozessieren von Signalmolekülen
- Oft ganzen Netzwerk von MMPs und gleichzeitig von körpereigenen Proteaseinhibitoren (TIMPs)
- Beim Menschen sind 24 MMPs bekannt

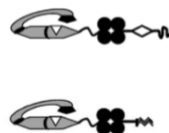


http://www.icpress.co.uk/etextbook/p390/p390_chap01.pdf

sekretorische MMPs



membranständige MMPs



Laborbuchführung

Allgemein

- Grundlage für Publikationen
- Arbeitsmanagement im Labor
- Streitfall IP

Erscheinungsbild

- Fester Einband, gutes Papier
- Seiten sind durchnummeriert (Seiten können nicht herausgerissen werden)
- Inhaltsverzeichnis
- Laborbuch gehört der Institution; wird bis zu 10 Jahre archiviert

Inhalt

- Inhalte chronologisch
- Experimente: Tag der Durchführung
- Verständliche Schreibweise
- Abkürzungen & Sonderbegriffe beschreiben
- Neues Experiment beinhaltet: Ziel, Problem, Lösungsansatz, Versuchsplan
- Details: Jeder Arbeitsschritt und die Bedingungen, Ergebnisse der einzelnen Schritte, Schlussfolgerungen
- Anlagen sind: permanent einzuheften, datieren, unterschreiben (halb Laborbuch, halb Anlage)
- Relevante Diskussionen in Besprechungen (Namen der Personen, Ideen)

Korrekturen

- Eintragungen nicht überdecken oder ausradieren
- Fehler lesbar durchstreichen, datieren, unterzeichnen und im nächsten freien Raum verbessern
- Größere freie Lücken durchstreichen, datieren und unterzeichnen
- Nachträge unter neuem Datum mit Verweis eintragen

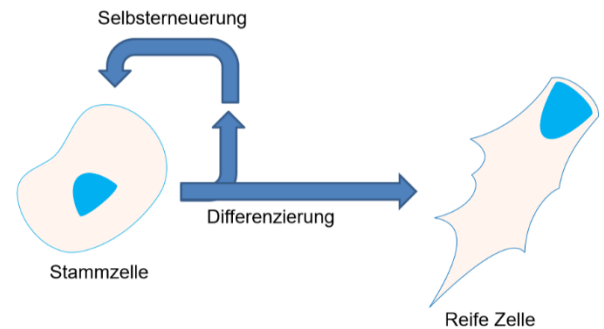
Korrekturen

- Erste Seite beinhaltet Nutzer und kennzeichnet ersten Tag des Laborbuchs
- Unterzeichnen von unabhängigen Zeugen (Zeuge muss Methodik verstehen; darf nicht am Projekt mitarbeiten)

Stammzellen

Definition

- (Vorläufer-) Zellen, die in verschiedene Zelltypen differenzieren können und das Potential zur Selbsterneuerung/-erhalt besitzen
- Zellen die ein regeneratives Potential haben
- Unterscheidbar nach:
 - Herkunft (Gewebeart)
 - Differenzierungspotential
 - Art der Stammzelle
- Erhalt durch:
 - Signale von Außen (Cytokine, Hormone, ...)
 - Extrazelluläre Matrixproteine
 - Struktur der Matrix



Stammzellarten

- Embryonale Stammzellen
- Adulte Stammzellen
- Induziert-pluripotente Stammzellen

Differenzierungspotential von Stammzellen

Totipotent (z.B. befruchtete Eizelle)

Fähigkeit zu allen Zellen eines Embryos/Fetus und des entwickelten Organismus zu differenzieren (Alle drei Keimblätter + den embryonalen Teil der Placenta und den Trophoblast)

Pluripotent (z.B. embryonale Stammzelle)

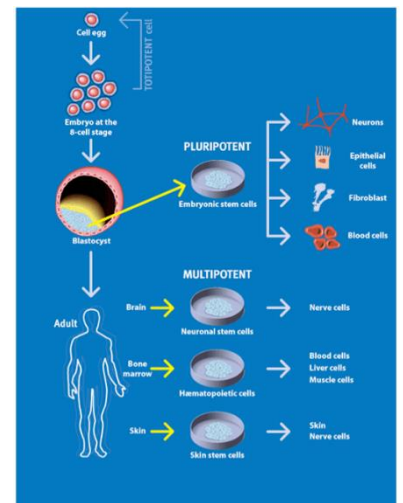
Fähigkeit zu allen Zellen eines Organismus zu differenzieren (alle drei Keimblätter)

Multipotent (z.B. hämatopoetische Stammzellen)

Fähigkeit zu mehreren Zelltypen eines Keimblattes zu differenzieren

Unipotent (z.B. Keratinozyten, Stammzellen)

Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Generierung eines spezifischen Zelltyps



Adulte Stammzellen

- Aus verschiedenen Geweben isolierbar (z.B. Knochenmark, Blut, Nabelschnur, fetales & adultes Gehirn, Leber, Skelettmuskel, Pankreas)
- Autolog verwendbar
- Hohes Proliferationspotential
- Multipotent, hohes Differenzierungspotential
- Verfügbarkeit von Biopsiematerial eingeschränkt
- Isolation und Kultivierung zeitintensiv

- Nicht immer gute Differenzierungsprotokolle verfügbar
- Gefahr der Entartung (Krebs)

Einsatz in der Therapie:

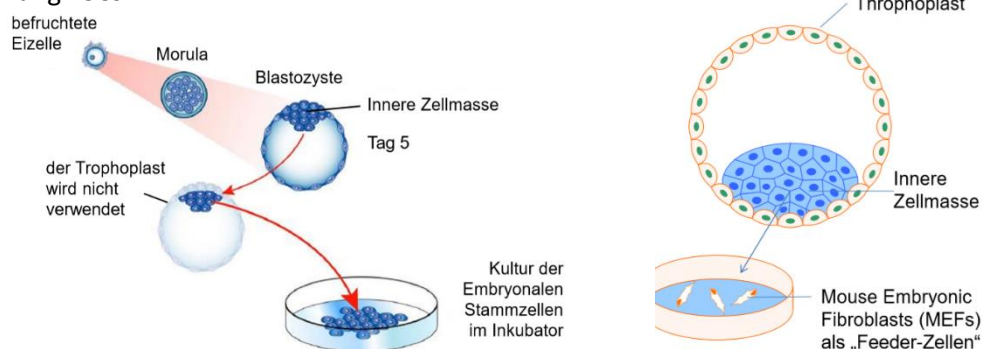
- Blutbildende Stammzellen des Knochenmarks zur Behandlung von Leukämie und Lymphomen
- Nach einer Chemotherapie: reimplantation zuvor entnommener Stammzellen aus dem Knochenmark
- Bislang nur Knochenmarks- und Blutstammzellen in so großer Zahl isolierbar, dass diese für eine Therapie nutzbar sind (Punktion des Knochenmarks, Biopsien der Stammzellapharese)

Stammzellapharese: Verfahren zur Separation der im Blut enthaltenen Stammzellen (z.T. sehr schwierig)

Embryonale Stammzellen

- **Pluripotent**
- In Deutschland dürfen keine embryonalen Stammzelllinien hergestellt werden (Import von Stammzellen, die vor dem 1.05.2007 gewonnen wurden)

Gewinnung ESCs:



Einsatzmöglichkeiten:

- Entwicklungsbiologisches Modell
- Regenerative Medizin
- Herstellung humaner in vitro Testsysteme

Entwicklungsbiologisches Modell:

- aus ESCs können Embryoid Bodies (rekapitulieren die frühe Embryogenese) gebildet werden
- gerichtete Differenzierung durch stufenweise Wachstumsfaktorzugabe, mechanische Stimulation und andere Faktoren



- Differenzierungseffizienzen sind oft niedrig

Regenerative Medizin:

- Theoretisch sehr hohes Potential
- Aber: Probleme von zell-basierten Ansätzen:
 - Identifikation des gewünschten Zelltyps
 - Ungenügende Zellzahlen durch Verlust vieler Zellen bei Injektion
 - Ungenügende Anzahl der verabreichten Zellen überleben und integrieren ins Gewebe
 - Gefahr von Tumorbildung nach Implantation
 - Keine Sicherstellung, dass ausschließlich der gewünschte Zelltyp verabreicht wird (niedrige Differenzierungseffizienzen)
- Forschungsergebnisse bestätigen die großen Hoffnungen der ESCs bisher nicht

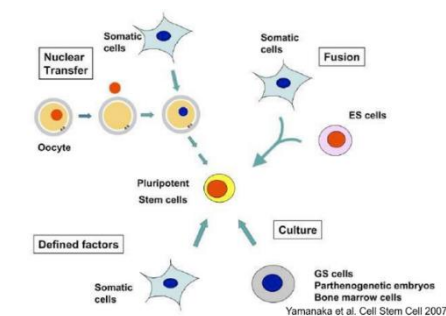
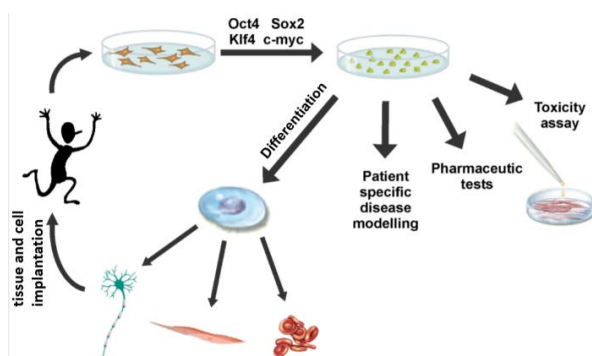
In vitro Testsysteme:

- Nutzung embryonaler Stammzellen für den Aufbau von in vitro Testsystemen
- Vorteile:
- Einsatz vieler Tiere für Tierversuche könnte vermieden werden
 - Menschliches System verhält sich eventuell anders als das tierische
 - ESCs können einfach manipuliert werden (physikalische und genetisch)

Allgemein:

- Theoretisch unbegrenzt proliferationsfähig (mitverantwortlich: hohe Telomerase-Aktivität)
- In der Regel wenig oder gar nicht mit Viren belastet (vgl. zu adulten Stammzellen)
- pluripotent, hohes Differenzierungspotential
- aufwendige, sehr teure Kultur
- nicht autolog einsetzbar, da Blastozyste zerstört wird
- Nicht immer gute Differenzierungsprotokolle verfügbar
- Gefahr der Entartung (Krebs)
- Ethische Vertretbarkeit

Induziert-pluripotente Stammzellen



iPSCs haben sehr ähnliche Eigenschaften wie ESCs

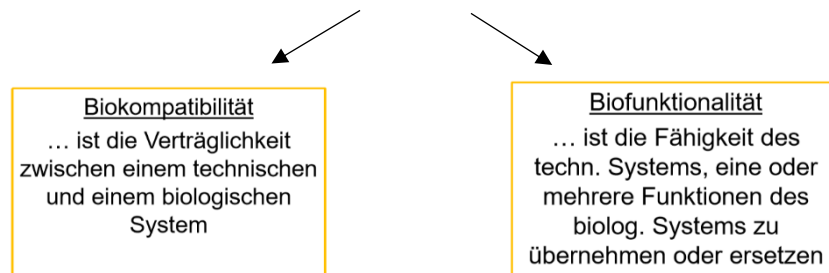
Unterschiede:

- Adulte Zellen können zur Generierung von iPSCs genutzt werden
- Theoretisch autolog verwendbar
- Keine Probleme mit der ethischen Vertretbarkeit
- Reprogrammierungs- / Differenzierungseffizienz ist gering
- Reprogrammierung und Differenzierung ist zeitintensiv
- Gefahr der Entartung (Krebs)

Biomaterialien

Definition

Feststoffe, die mit dem lebenden Organismus (Zellen, Organismusflüssigkeiten) in direkten Kontakt treten und an die diesbezüglich bestimmte **Anforderungen** gestellt werden



- Für Biomaterialien gilt das MPG (Medizin Produkte Gesetz)

Implantat-Gewebe-Interaktion

Jeder Fremdkörper ruft eine Reaktion hervor

- Toxisch: Gewebenekrose
- Inert: Gewebe bildet eine nicht-adhärente Bindegewebskapsel um das Implantat
- Bioaktiv: Gewebe bildet eine Bindung mit dem Implantat aus
- Degradabel: Gewebe ersetzt Implantat

Einteilung

Anwendung

Passive Medical Devices	z.B. Implantate
Bioactive Medical Devices	z.B. Drug Delivery Systeme
Diagnostische Anwendung	z.B. Biosensoren
Bioseparation	z.B. Dialysemembranen

Verwendungsdauer

Einsatz < 1 Tag	Schläuche Katheter	PE, PC, PTFE, PUR, PVC
Einsatz < 1 Monat	Nahtmaterial	PLA, PGA, Dacron, PP
Einsatz > 1 Monat	Herzklappen	PP, PUR, Fluorsilikon
	Gefäßprothesen	Dacron, PTFE, HEMA, PUR, PLA
	Trachea	Dacron, PP, PLA

Materialien

Synthetische Polymere	Teilkristalline Polymere (= undurchsichtig, PS)
	Amorphe-glasartige Polymere (= durchsichtig Petrischalen aus PS)
	Gummiartige Polymere (Kautschuk, Silikon)
Metalle	Reinmetalle (Titan)
	Legierungen (Nitinol)
Keramik	Als Beschichtungen z.B. für Herzklappen
Natürliche Polymere	Kollagen, BioVasc, Polysaccharide, Hyaluronsäure

Klassische Materialien

Material	Vorteile	Nachteile
Metalle	Hohe Dauer- und Zugfestigkeit	Korrosion, führt z.T. zu Entzündungen
Keramiken	Inert, häufig als Beschichtung	Geringe Dehnbarkeit, z.T. Abrieb, teuer
Polymere	Einstellbare Eigenschaften, billig	Geringe Festigkeit, Sterilisation schwierig

Zwischenschub: Polymere

= lange Ketten, die sich aus wiederholenden Einheiten (Monomeren) zusammensetzen

Herstellung: Polyaddition, Polymerisation, Polykondensation

Kettenstrukturen:

---AAAAAAAAA---	: homopolymer	---AAAAAAAAA---	: Pfropfpolymer
---ABABABAB---	: Alternierendes Polymer	B	
---AAABBBAAABBB---	: Blockpolymer	B	
---AABABBAAB---	: random Polymer	B	

Taktizität: isotaktisch, syndiotaktisch, ataktisch (-> amorph)

Kristallinität: **amorph** -> durchsichtig – schnelles abkühlen – ungeordnet

semi-kristallin -> trüb – langsames Abkühlen – geordnet

- Kristalline Polymere ermüden langsamer und haben bessere mechanische Eigenschaften

Die **Größe** eines Polymers wird über die Molekulargewichtsverteilung bestimmt

- Einfluss auf **thermische** und **mechanische** Eigenschaften

Thermische Eigenschaften

T_G : Glasübergangstemperatur -> Punkt an dem Material elastische Eigenschaften aufweist

Unterhalb T_G : spröde

Oberhalb T_G : weich

T_M : Schmelzpunkt

Liegt oberhalb T_G -> Polymer schmilzt

Mechanische Eigenschaften

E-Modul: Elastizitätsmodul -> Spannungs-Dehnungs-Verhalten bei Verformung

Oberflächenmodifikation

Mikroarchitektur	Biologische Modifikation	Chemische Modifikation	Physikalische Modifikation
• Strukturierung • Topographie	• Protein • Verkapselung von Wirkstoffen	• chemische Bindungen	• Adsorption

- Material soll gezielt zelluläre Antworten stimulieren
- Nachbildung der Reize und der Umgebung (ECM) in vivo

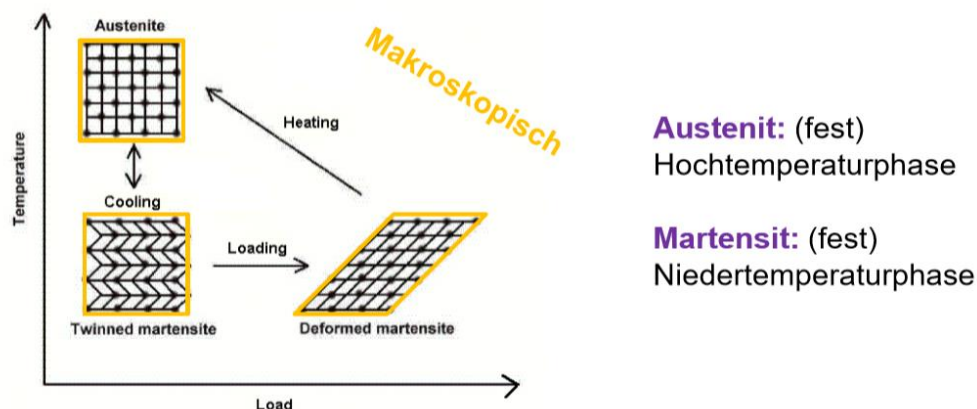
Auswahl eines Biomaterials für das TE

- Über 200 verschiedene Zelltypen
- Unterschiedliche ESMs
- Zellspezifische Biomaterialien
- **Mechanische Eigenschaften:**
 - Spannungs- Dehnungsverhalten (E-Modul, Festigkeit)
 - Mechanische Ermüdung
 - Verhalten bei Schlagbeanspruchung/ Härte
- **Oberfläche**
 - Struktur/ Modifikation
 - Verschleißverhalten/ Reibverhalten
- **Physikalische Eigenschaften**
 - Permeabilität, Löslichkeit, Feuchtigkeitsaufnahme
 - Oberflächenenergie, Oberflächenladung
 - Hydrophil/ Hydrophob
- **Beständigkeit**
 - Chemisch (Desinfektion, Arzneimittel, Korrosion)
 - Degradation: biologisch, thermisch, chemisch (Oxidation, Wasser), physikalisch
- **Thermische Eigenschaften**
 - Isolierwirkung
 - Ausdehnungskoeffizient
 - T_G
- **Verbindungstechnik**
 - Naht
 - Klebstoffe

Smart Biomaterials

- Formgedächtnismetalle oder shape memory alloy (SMA)
 - **Superelastizität:** Phasenumwandlung innerhalb; jedes Atom behält seine Nachbarn
- Metallische Legierungen (NiTiCu, CuZn, CuZnAl, FeMnSi, ...)
- In der Medizintechnik: Nitinol Stent (Nickel-Titan-Legierung)

Phasenumwandlung:



Analysemethoden

Definition

Analyse = erfasst den aktuellen Zustand eines Systems

Änderung dieses Zustands: durch Stimulus von außen (quantitativ oder qualitativ)

Licht-Mikroskopie

Zusammenspiel von Licht & Umgebung (Glasträger)

Vergrößerung: $M_{\text{Mikroskop}} = M_{\text{Objektiv}} * M_{\text{Okular}}$

Auflösung: $d_0 = \frac{\lambda}{2 * NA}$ mit NA: Numerische Apertur -> beschreibt Öffnungswinkel μ des Objektivs

Unterschiede im Brechungsindex -> Phasenverschiebung des Lichts -> Intensitätsunterschied

Histologische Färbungen

Histologie = Lehre von Gewebe

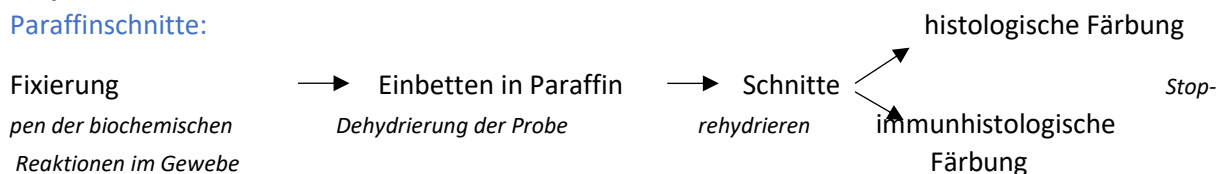
Färbung: Erhöhung des Kontrasts

Schnitte: ca 3-5 μm dick -> optische Dichte des Gewebes

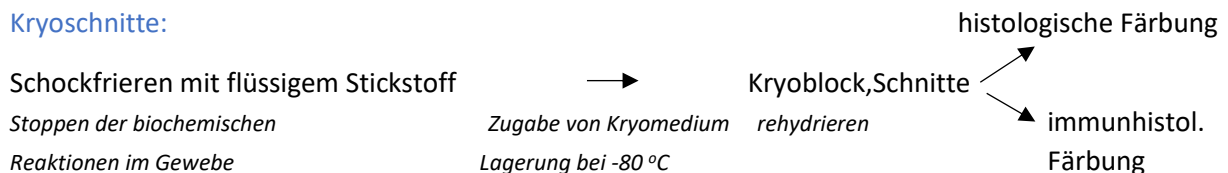
- Beurteilung der Gewebe Morphologie
- Unterschiede zwischen zellulären und extrazellulären Strukturen
- Anwendung in der Diagnostik und Pathologie (Standardfärbung: Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Präparationstechniken:

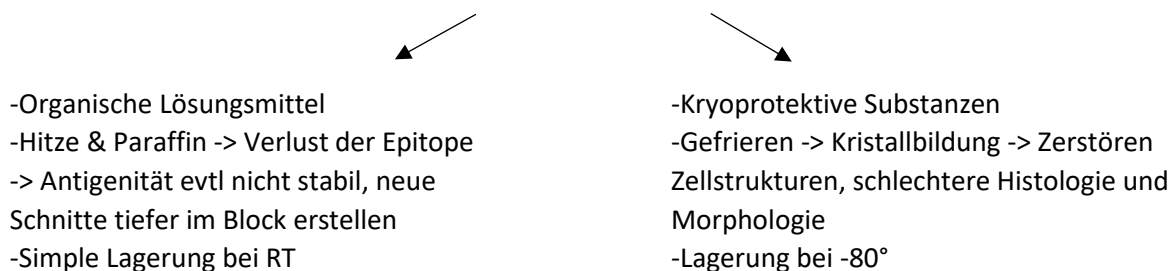
Paraffinschnitte:



Kryoschnitte:



Paraffinschnitt vs. Gefrierschnitt



-gut für Histologie
-schlechte Antigenität

-Auflösung bei höherer Vergrößerung
schlechter
-Mounting und Schneiden aufwändiger
-sehr gute Antigenität

Fixieren:

- Stoppt biochemische Reaktionen und schützt das Gewebe vor Zerfall (Proteasen, ...)
- Physikalische Fixierung: Trocknung/ Hitze
 - **Morphologische Schäden, nicht geeignet für Histologie**
- Chemische Fixierung: Zugabe von Fixiersubstanzen
 - Entzug von Wasser und Vernetzung von Proteinen
 - Formalinhaltige Substanzen werden in der Histologie am häufigsten eingesetzt

- **Fixierungsmethode beeinflusst Gewebemorphologie**

Farbstoff: Substanz, die nicht nur selbst färbig ist, sondern auch die Fähigkeit hat, sich an ein Substrat zu binden bzw. durch eine Bindungsreaktion am Gewebe oder durch histochemische Entwicklungsreaktionen färbig werden

Farbstoffe enthalten immer:

- **Chromophe Gruppen:** wirken farbig mit Benzolring
- **Auxochrome Gruppen:** verstärken Farbeffekt und stellen Verbindung zur Zielstruktur her

Zielstrukturen der Farbstoffe:

Proteine:	Zytoplasma, Bindegewebe (Kollagen, Elastin), Muskel
Kohlenhydrate:	Becherzellen, Basalmembran, Knorpel
Lipide:	Fettgewebe, Myelin
Nukleinsäuren:	Zellkerne
Mineralien:	Knochen

Einteilung:	basisch, azidophil	DNA, Elastin	Bsp.: Fuchsin, Alcianblau, Hämatoxylin
	sauer, basophil	Plasma, Kollagen	Bsp.: Eosin, Kongorot
	indifferent/lipophil	Fett	Bsp.: Scharlachrot, Sudan III

- Die Ladung des Farbstoffs und die der Zielstruktur ist immer abhängig vom pH-Wert des Puffers

Färbeprinzipien

- **Chemisch:** beruht auf chemischer Bindung; nicht mehr entfärbbar
- **Physikalisch:** beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit der Farbstoffe
- **Chemisch-physikalisch:** Effekte durch Dispersität der Farbstoffpartikel und Adsorptionseffekte (z.B. HE-Färbung)

HE-Färbung

Hämatoxylin (Hämalaun): positiv geladen -> bindet an die sauren Bestandteile der DNA

- Kernfärbung

Eosin: negativ geladen -> bindet an die positiven Gewebestandteile (z.B. Plasmaproteine, Kollagen)

- Plasmafärbung, ECM

Differenzierung: Überschüssige Farbanteile werden wieder entfernt

Movat-Pentachrom Färbung

STRUKTUR	FARBE
ELASTISCHE FASERN, ZELLKERNE	Blau-schwarz
KOLLAGEN	Gelb
PROTEOGLYKANE	Hellblau-grün
FIBRIN, MUSKEL	rot

Verwendete Farben: Alcianblau, Brillant Crocein-Säurefuchsin, Saffron, Hämatoxylin

➔ Nicht für zelluläre Strukturidentifizierung geeignet

Färbung	Untersuchungsziel
Alcianblau pH=2,5	Carboxylreiche Glykoproteine
Giemsa	Blutzellen
Sudan III	Lipide (nur an Gefrierschnitten möglich!)
Nilblausulfat	Pigmente
Hämalaun-Eosin (HE)	Übersicht, Schnellschnitt
Masson-Trichrom	Bindegewebe und Muskulatur
PAS-Reaktion	Kohlenhydrate, neutrale Glykoproteine
Alizarinrot S	Kalzium, Kalk
Movat-Pentachrom	Extrazelluläre Matrix (Kollagen, elastische Fasern, Proteoglykane)

Analysemethoden - Immunhistochemie und Immunzytochemie (Urologie)

➔ Grundlagen der Charakterisierung von Zellen und Geweben

Antikörper-vermittelte Methoden:

- ELISA
- Immuno- oder Western-blot
- Immunpräzipitation
- Enzymassay

- Immunhistochemie (Gewebe)
- Immunzytochemie (Zellen aussähen und färben, etc.)

Vorteile Antikörper-vermittelter Methoden:

- Hoch-spezifische Bindung der Antikörper (K_d50 = Dissoziationskonstante, 50% gebunden)
- Gute Ortsauflösung
- Darstellung von Zellen im Verbund oder intrazellulärer Strukturen
- Evtl. Darstellung von physiologischen/pathologischen Abläufen im Gewebe/in einer Zelle (z.B. Tumorantigen/Apoptose)
- 10^{-10} - 10^{-12} molare (übrig in Lösung) -> hochaffin/spezifisch
- Unterscheidbar ob eine einzige Aminosäure ausgetauscht wurde; unterscheidbar ob T-Helfer oder T-Killer Zelle, etc.

Generelles

Immunhistochemie bzw. -zytochemie kombiniert histologische, immunologische und biochemische Methoden zur Identifikation einer bestimmten Zielstruktur, diese muss nicht unbedingt biologisch sein (z.B. auch chemisch, mind. 6-8 AS, Nanopartikel sind zu klein). Die Zielstruktur kann aus verschiedenen chemischen Komponenten bestehen, muss aber immunogen sein (Herstellung eines AK).

Färbbare subzelluläre Strukturen:

- Zytoplasma
- Kern/Chromatin
- Membranen/Lipide
- Proteine (z.B. Albumin)

Nachweis der Zellproliferation -> Färbung von Zyklinen (Zellzyklus-abhängig produzierte Proteine)

Nachweis der Apoptose -> Aktivierte Caspase oder Inaktive bzw. defekte Mitochondrien (JC1-Färbung), Nachweis bevor Apoptose begonnen hat möglich

Antikörper gegen Kollagen waren beispielsweise lange kaum herstellbar, da Kollagen bei allen Tieren sehr ähnlich ist, genauso bei Membranlipiden

Technische Variablen für ICH/ICC

- Auswahl des AK -> monoklonal (bevorzugt) vs. Serum
- Methode der Gewebe- bzw. Zellfixation (Epitop kann kaputt gehen, da Eiweiß präzipitiert)
- Gewebeschnitte: Paraffinschnitt vs. Kryoschnitt
- Antigen Retrieval -> Regeneration der Epitope/Antigenität retten
- Verdünnung des AK (richtige Konzentration!)
- Verdünnungsmedium

Technische Variablen für AK-Detektion

- Kontrolle/Isotypkontrolle
- Direkte vs. indirekte Färbung
- Inkubation mit prä-Immunserum
- Enzymatische Detektion vs. Detektion durch Farbstoff (Fluoreszenz, entsprechendes Mikroskop benötigt) -> heute
- Detektion durch Radioisotopen -> früher

Einfluss der AK auf das Resultat

Herstellung:

- Spezies der Immunisierung (Kaninchen, Nager, ...)
- Immunisierung mit gesamtem Antigen
- Immunisierung mit Epitop (-> Oberflächenspezifität), N-terminus (Aminoende), C-terminus (Carboxyende), spezifischen Peptiden (Problem wenn Faltung des Proteins eine Rolle spielt für die Funktion, z.B. aktiviert/nicht-aktiviert nicht unterscheidbar)
- Immunisierung mit modifiziertem Antigen

Monoklonaler AK (mAK):

- Isotyp κ/λ (Kombination leichte und schwere Kette, leichte Kette ist entweder κ oder λ , einzeln/unabhängig nachweisbar, hochspezifisch)
- B-Zellüberstand oder aufgereinigt

Polyklonaler AK:

- i.d.R. Serum oder Aszites (in EU verboten, B-Zellen werden im Bauch von einer Maus gezüchtet -> eine Art Tumorerkrankung wird sezerniert, die eine große Menge AK enthält, eigentlich mAK, aber oft verunreinigt mit anderen AK, deswegen polyklonal)
- Affinitätsgereinigt am Antigen oder AK

➔ Jeder AK muss für die gewünschte Anwendung geeignet sein

Anwendung:

- Immunhistochemie auf Paraffinschnitten/Kryoschnitten
 - Durchflusszytometrie – Immunzytochemie
 - Immunpräzipitation – Immunoblot
- ➔ Recherchieren, testen, validieren

Probenvorbereitung muss ebenfalls optimiert werden. Problem z.B. bei Knochen: lange Entkalkung vor Histologie, Azidzugabe verhindert Keimbildung

Antigenretrieval auf Paraffinschnitten

benötigt, wenn Epitope bei Lagerung etc. an den oberen Schichten kaputt gehen und man das Antigen nicht mehr nachweisen kann obwohl es vorhanden sein müsste

Chemisch-Physikalisch:

- Bedecke Probe mit: Citrate 6.0, Tris-EDTA 9.0, EDTA 8.0
- Inkubation über WB im Dampf für 15-30 Minuten
- N.B. Tropfenbildung

Proteolytisch in Puffer:

- Proteinase K
- Trypsin
- Pepsin
- Pronase, etc.
- Kann Epitope zerstören!
- Schlechte Morphologie

Permeabilisierung der Probe

- Nachweis **intrazellulärer** Antigene
- Detergenzien: Triton-X, Tween, o.Ä. -> lösen Lipide aus Membranen -> AK kann durch diffundieren
- Saponin: öffnet Poren in Membranen, muss auf Probe bleiben
- Fixation mit Aceton/Methanol o.Ä., Präzipitiert Membranproteine und löste Lipide aus Membranen -> ABER: Antigen kann dabei ausfallen

Reduktion unerwünschter AK-Bildung durch AK-Blocking

- unspezifische Hintergrundfärbung (z.B. Fc = Konstanter AK-Abschnitt, Fc-Rezeptoren auf Zellen)
 - Spezifische Hintergrundfärbung
 - Kreuzreaktive polyklonale AK
 - Schlechte Fixierung der Probe
 - Nicht-spezifische Hintergrundfärbung
 - Bindung des AK durch Lektin-artige Glc/Zucker-Seitenketten (Kaninchen!) -> Papain „verdaut“ Fc-Teil des AK, wodurch die gebundenen Zuckerreste wegfallen
 - Endogene Enzyme oder Biotin
- ➔ Vorinkubationen mit Prä-Immunserum (100-200 mL vor Immunisierung entnehmen) oder Blockierung der Enzyme

Komplemente: Eiweiße im Blut, machen Löcher in Zellen/Strukturen, in immunologischen Notfällen freigesetzt, AK kann auch an Komplemente statt an die Zielzellen binden -> verfälschtes Signal

Kontrollversuche

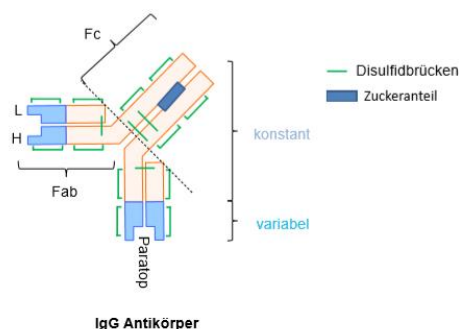
Positive Kontrolle: Bekannte Probe mit Antigen, evtl. Titration um notwendige Verdünnung zu finden

Negative Kontrolle: Isotypkontrolle/Färbungen mit 2 AK, Test mit Prä-Immunserum der selben Spezies, Gewebe/Probe OHNE Antigen

Immunhistologische Färbung

- Färbung mithilfe eines Antikörpers
- Gezieltes Anfärben von Proteinen im Gewebe oder zellspezifische Markerproteine

Verwendete AK:



Fc-Teil: speziesabhängig (konstant)

Fab-Teil: Antigenabhängig

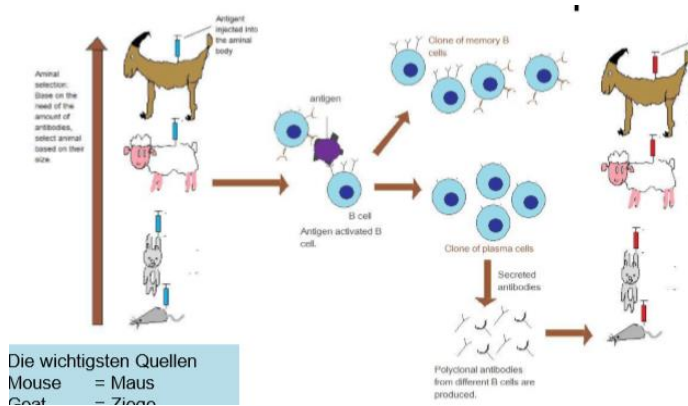
Antigen: lösliche/unlösliche Peptid-, Glykosid- oder Nukleinsäurestruktur

- Sind immunogen, wenn sie eine Immunantwort auslösen
- Epitope des Antigens werden von Rezeptoren an Immunzellen erkannt
- Antigene besitzen verschiedene Epitope

Wichtigste **Quellen** zur Produktion von Antikörpern: Maus, Ziege, Kaninchen, Schaf

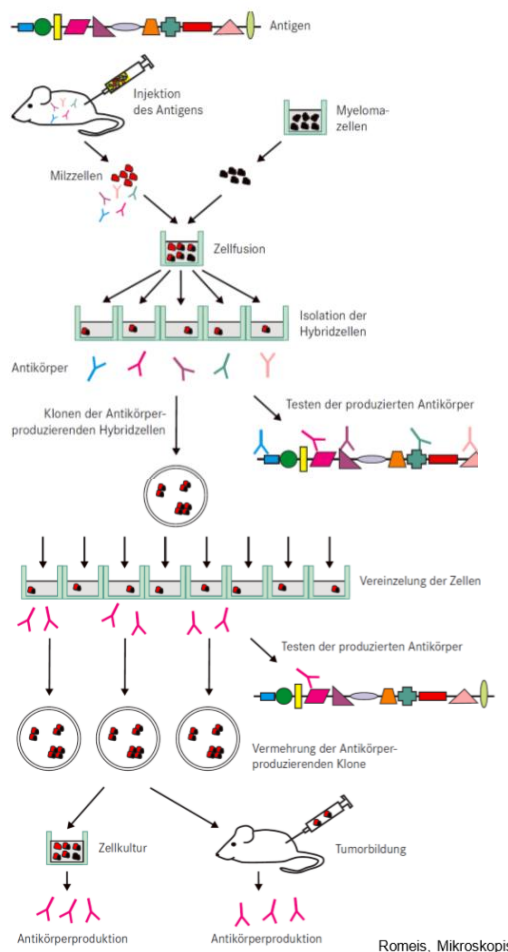
Probleme: Nager sind klein und es kann nur wenig Blut entnommen werden, Kaninchen AK sind glykosyliert -> unspezifische Bindung über Seitenketten

Produktion von Antikörpern:



Produktion von *polyklonalen* AK auch ohne Tierversuche möglich durch Aufreinigung von IgY aus dem Eigelb/Eiklar(?) (von immunisierten Hühnern)! (aber: sehr aufwendig)

Produktion von *monoklonalen* (binden an ein spezifisches Epitop des Antigens) AK:



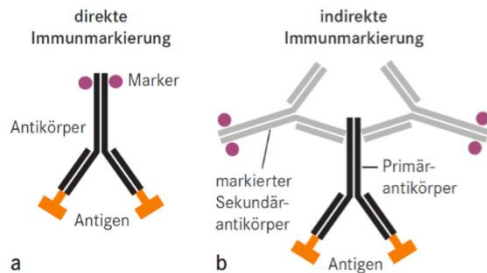
Tiere werden bei beiden Verfahren mehrmals gespritzt/immunisiert (2 Wochen Abstand, stärkere Antwort) -> *Booster-Immunisierung*

Monoklonale vs. Polyklonale Antikörper

molekular identische Antikörper
 unlimitierte Verfügbarkeit
 gleichbleibende Qualität
 1 Epitopspezifität
 Kreuzreaktionen möglich
 Maus, Ratte, Kaninchen
 leicht herzustellen
 evtl. schwache Antigenität wenn Epitop versteckt
 Fusions-B-Zelle, aufwändige Klonierung

Verschiedene Antikörper
 begrenzte Menge
 Chargenunterschiede, Variabilität
 unterschiedliche Epitopspezifitäten
 Kreuzreaktionen wahrscheinlich
 viele Spezies (z.B. Huhn)
 simple Herstellung
 Besser bei denaturierten Antigenen

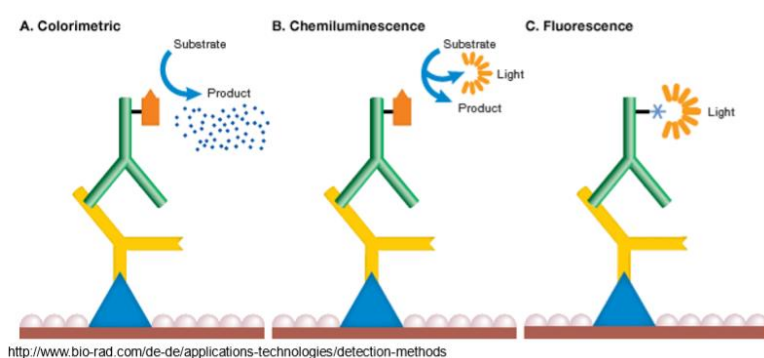
Detektion von Antikörpern



nicht markierter primärer AK: „Anti-Antigen“ (z.B. Anti-Albumin IgG aus Maus)

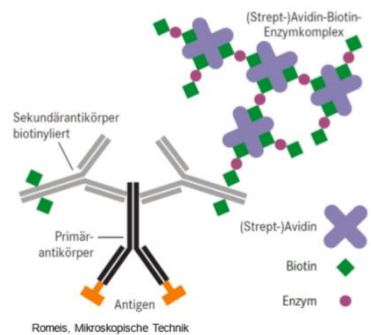
markierter sekundärer AK: „Anti-Spezies“ (z.B. Anti-Maus IgG)

Detektionsprinzipien:

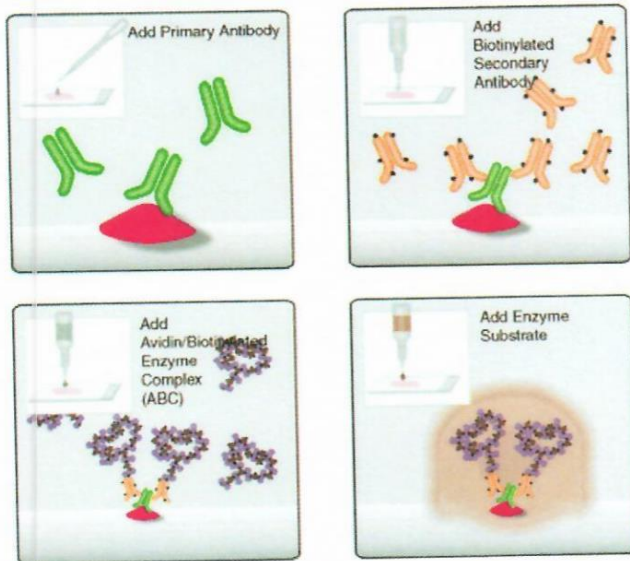


Signalverstärkung mit ABC-Technik:

- Alvidin und Streptavidin mit hoher Affinität zu Biotin
- Biotin ist Vitamin und Coenzym
- Endogenes Biotin muss geblockt werden, verfälscht sonst Signal
- Nachweis sehr geringer Antigenmengen möglich
- Vervielfachung des Signals pro Streptavidinbindung



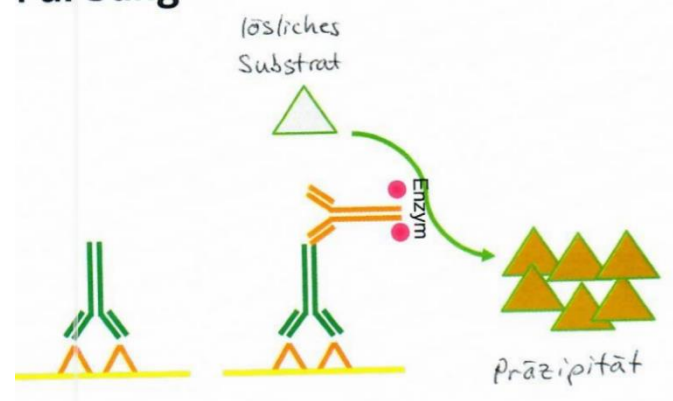
ABC Methode (oft in klinischen Kits)



Enzymgekoppelte Färbungen:

- Geeignet für Durchlichtmikroskop
- Nur 2 Farbvarianten üblich: braun/blau
- Wird durch histochemische Färbungen gestört

Peroxidase-oder Phosphatase-Färbung



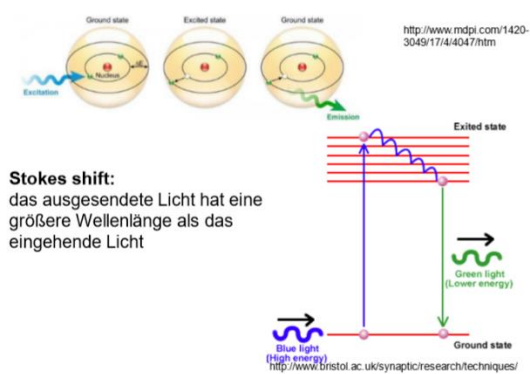
Direkte Methode:

- Weniger Hintergrundfärbung
- Schnellere Durchführung der Färbung
- Mehrere Primärantikörper derselben Spezies bei Mehrfachfärbungen verwendbar

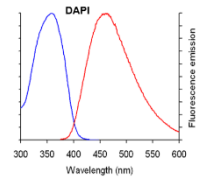
Indirekte Methode:

- Signalverstärkung, da mehrere Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden können
- Markierte Primärantikörper häufig nicht kommerziell erhältlich
- Palette an Sekundärantikörpern gegen verschiedene Spezies ist relativ günstig
- Kontrollpräparat, welches nur mit dem Primärantikörper inkubiert wird, muss mitgeführt werden

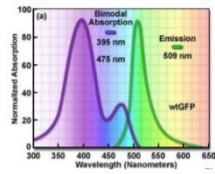
Wiederholung Fluoreszenz:



DAPI -> wird zur Zellkernfärbung eingesetzt



GFP -> in vivo Studien (nicht toxisch)



Fluoreszenzbasierte Detektion:

- Bessere Auflösung
- Genaue Lokalisation und Struktur des Antigens sichtbar
- Mehrere Antigene parallel färbbar
- Fluoreszenz bleicht aus
- Teuer (Mikroskop)
- Probleme mit Autofluoreszenz

Enzymbasierte Detektion:

- Verstärkungseffekt
- günstig
- Färbungen sind länger haltbar
- Weniger Informationen über Struktur & Lokalisation des AG
- Nur wenige AG parallel färbbar
- Keine Kolkalisationsstudien

Durchflusszytometrie

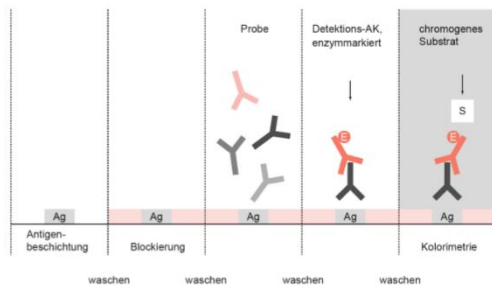
= Fluorescence activated cell sorting (FACS)

- Analyse von Partikeln in Flüssigkeitsstrom
- Detektion von Zellpopulation auf Einzelzellebene mit Hilfe von Fluoreszenzmarkierungen
- FACS Sorter können Zellpopulationen trennen
- 20 000 – 50 000 Zellen werden innerhalb weniger Minuten analysiert
- Keine Information über die Lokalisation
- Vorteile: Quantifizierung vieler Zellen
- Aber: keine räumliche Auflösung
 - ➔ Genauer s. Wendel-Labor

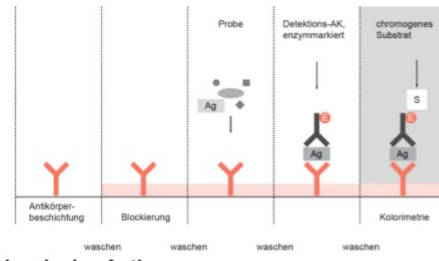
ImageStreamX: Imaging plus Cytometry

ELISA (Enzym-linked immunosorbent assay)

Sandwich ELISA



➡ Nachweis des Antikörpers

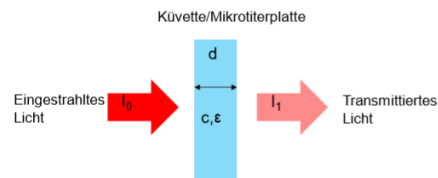


➡ Nachweis des Antigens

Kolorimetrie

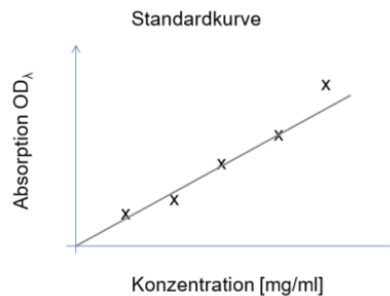
= Absorptions-Spektrometrie

- Konzentrationsbestimmung von farbigen Substanzen

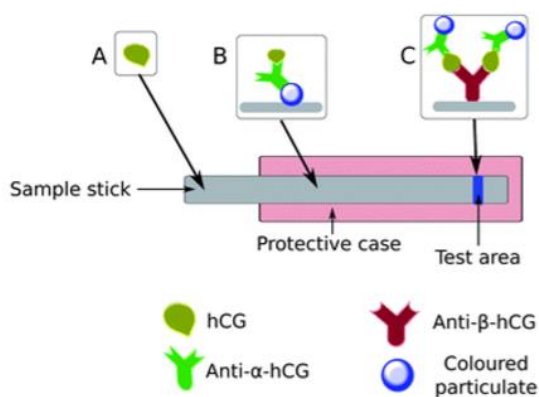


$$\text{Lambert-Beersches Gesetz } A_\lambda = \lg(I_0/I_1) = \epsilon cd$$

- Bestimmung der Konzentration des gesuchten Stoffes anhand einer Standardkurve



Schwangerschaftstest

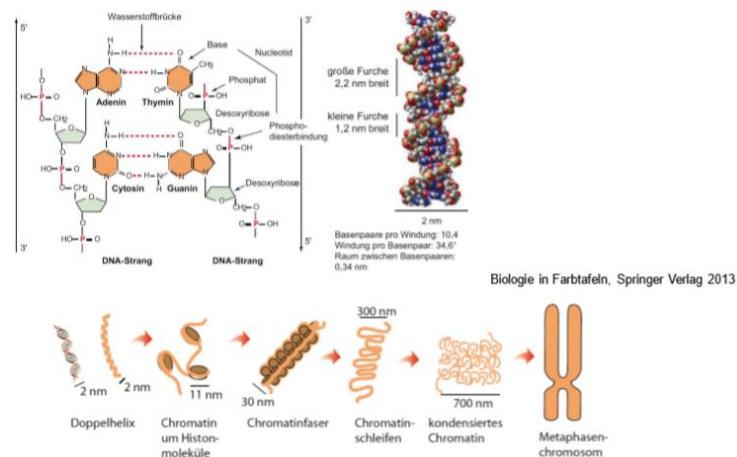


A: hCG aus dem Urin wird absorbiert

B: α -Epitop des hCG bindet spezifisch an den anti-hCG AK, der über Farbpartikel auf der Oberfläche adsorbiert ist

C: Kapillarkräfte transportieren den Antigen-Antikörper-Komplex mit den Farbpartikeln zum Testbereich, wo ein an die Oberfläche gebundener Anti-hCG-Antikörper an das β -Epitop des hCG Proteins bindet. Eine sichtbare Linie erscheint, wenn genug hCG/anti-hCG/Farbpartikel gebunden werden

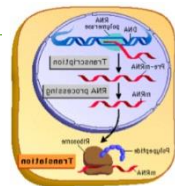
DNA - Struktur und Organisation



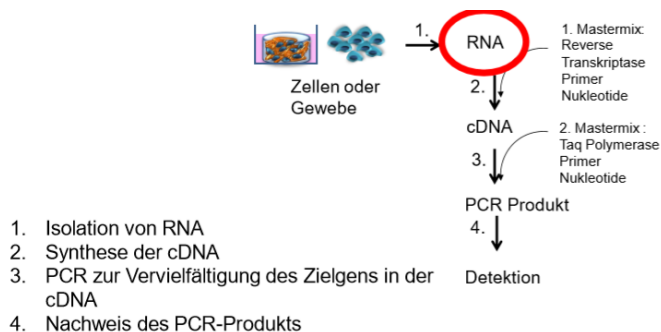
- Besteht aus verschiedenen Nukleotiden, vier
- Nukleotide sind miteinander kovalent über Phosphodiesterbindungen verbunden,
- DNA-Stränge werden über Wasserstoffbrücken zusammengehalten
- Das 3'-Ende trägt eine freie OH-Gruppe
- Das 5'-Ende trägt eine freie Phosphatgruppe
- Beide Stränge sind antiparallel und zueinander komplementär in ihrer Nukleotidsequenz

RNA Expression

- RNA = dynamische Information
- Zelle kann auf veränderte Bedingung reagieren
- mRNA korreliert mit exprimierten Proteinen



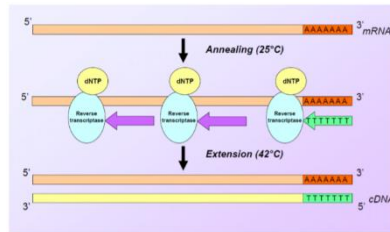
Analyse: Ablauf der Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)



RNA Isolation:



cDNA Synthese:



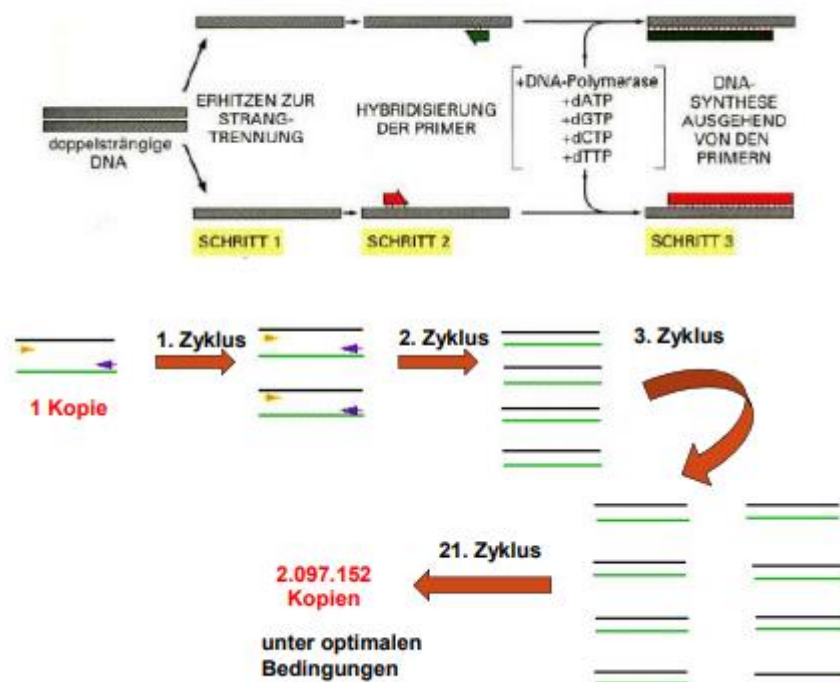
➔ semikonservativ, Ein DNA Einzelstrang dient als Matrize zur Neusynthese des komplementären Gegenstranges

Zellcharakterisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

- Methode zur gezielten in vitro Vervielfältigung von DNA Fragmenten,
- basiert auf Grundprinzipien der DNA Vervielfältigung in biologischen Systemen,
- Kary B. Mullis: 1985 Entwicklung der PCR, 1993 Nobelpreis für Chemie

Grundprinzip der PCR: exakt wie im biologischen System, aber künstlich herbeigeführt

1. **Schritt:** Denaturierung (93-95° C), Auftrennung der dsDNA in ssDNA
2. **Schritt:** Primer-Annealing (Hybridisierung) (50-60° C), Zwei kurze zur DANN-Matrize komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) binden an die ssDNA -> Kurze Doppelstrangbereiche
3. **Schritt:** Elongation (72° C), DNA Synthese durch eine DNA-Polymerase

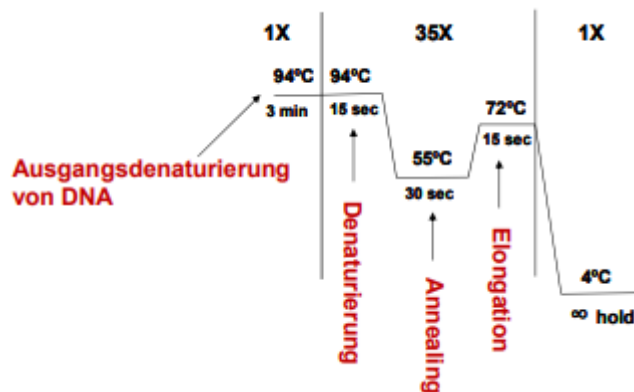


Enzymatische Vervielfältigungsmethode, bei der in mehreren Amplifikationsrunden Primer entlang einer Matrizen-DNA verlängert werden. Dabei wechselt die Temperatur periodisch, so dass die DNA immer wieder denaturiert wird und sich die Primer erneut anlagern und verlängert werden können.

Amplifizierung: Prozess, in dem die Anzahl der Kopien eines bestimmten DANN-Moleküls in einer PCR vervielfältigt werden

Amplikon: DNA-Abschnitt, der in der PCR vervielfältigt wurde

- Theoretische Anzahl amplifizierter DNA Moleküle: $N = N_0 \cdot 2^n$,
- Früher: 35 Zyklen in ca. 8 Stunden vs. Heute: 35 Zyklen in ca. 30 Minuten (Thermocycler)
- PCR Reaktion erfolgt automatisiert mit PCR Maschinen (**Thermocycler**), Diese sorgen für einen zyklischen Temperaturverlauf bei der PCR, Tendenz zu immer schnelleren Geräten (SpeedCycler benötigt weniger als 8 Minuten)
- Zyklischer Temperaturverlauf (Beispiel):



PCR Komponenten:

- **Template DANN (DANN-Matrize) (0,5 – 50 ng):** DANN-Molekül, das die zu amplifizierende Sequenz enthält.
- **Sense und Antisense Primer (jeweils 0,1 – 2 µM):** Zwei kurze, zur DANN-Matrize komplementäre Oligonukleotide, die an die DANN binden und zur Vermehrung des zwischen den Primern liegenden DANN Abschnitts führen. Sie liefern die Startstelle für die DANN-Polymerase.
- **dNTPs (20 – 250 µM):** Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP als Substrate für die DANN-Polymerase.
- **Thermostabile DANN Polymerase (0,5 -2,5 U/rxn):** Katalysiert die Reaktion
- **10x Polymerase Puffer (optimaler pH-Wert, Salzkonzentration)**
- **MgCl₂ (1 – 5 mM):** Beeinflusst die Primer Annealing und Polymerase Aktivität

Thermostabile DNA-Polymerasen: In der PCR eingesetzte Polymerasen werden aus thermophilen (wärmeliebenden) Eu- bzw. Archaeobakterien isoliert

- **Taq-DANN-Polymerase** (Thermostabile DANN-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, das 1969 aus einer heißen Quelle im YellowstoneNationalpark isoliert wurde)

Größtes Problem einer PCR ist die Kontamination!

- Unmengen einer bestimmten Sequenz im Labor
- Kreuzkontamination von Probe zu Probe
➔ Falsch positive Ergebnisse

Vermeidung von Kontaminationen:

- Immer eine NTC durchführen
- Kontrolliert arbeiten
- Heftige Luftbewegungen vermeiden
- Gestopfte Pipettenspitzen verwenden
- Reaktionsgefäße vorsichtig öffnen, abzentrifugieren
- Räumliche Trennung in verschiedene Arbeitsbereiche: Ansetzen des Amplifikationsmixes, Probenvorbereitung, Amplifikation und Detektion
- UV-Bestrahlung der Oberflächen

Problem Konventionelle PCR:

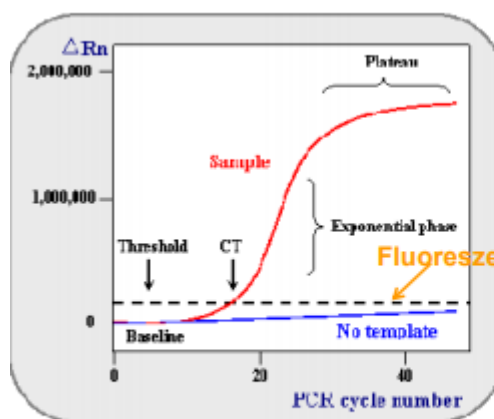
- sehr sensitive einfache Methode
- Detektion geringer Mengen an Ausgangsmaterial
- ABER: Unterschiede in der Genexpression sind mit der konventioneller PCR schwer zu quantifizieren

➔ Lösung: Real-time PCR = Methode zur Quantifizierung von DNA, mRNA (cDNA)

Real-time PCR

Zunahme der DNA-Konzentration korreliert mit einer Zunahme eines Fluoreszenzsignals das in Echtzeit (online) gemessen wird

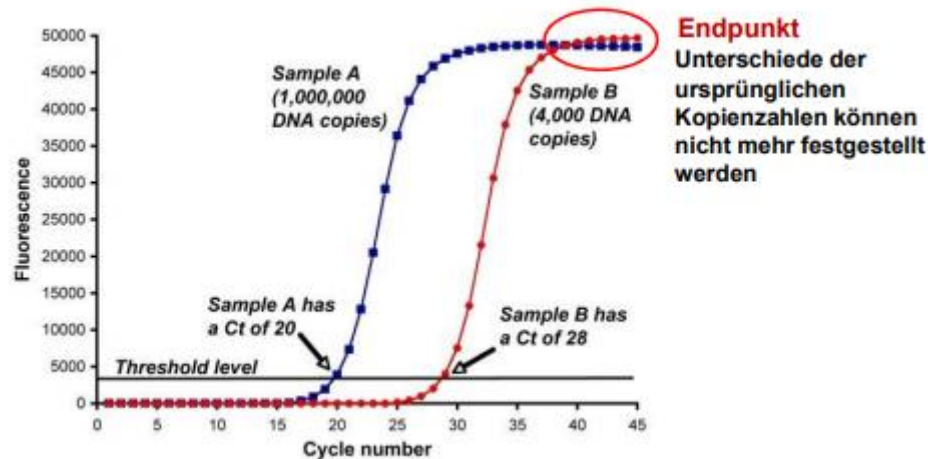
“Threshold Cycle” (C_t) Quantifizierung in der Real-Time PCR:



Der Threshold Cycle (C_t) ist der Zyklus der PCR, in dem die Fluoreszenz einer Probe erstmals signifikant über ihre Hintergrundfluoreszenz hinaus ansteigt.

Fluoreszenzschwellenwert

Der C_t -Wert entspricht der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen



- ➔ Je höher die Anfangskopienzahl einer DNA in der Probe, umso schneller steigt die Fluoreszenzintensität d.h. desto niedriger liegt der Ct -Wert

Möglichkeiten zur Detektion von PCR-Amplifikaten in der Real-Time-PCR:

Detektion mittels interkalierender Fluorophore z.B. SYBR Green™: SYBR Green™ ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs ansteigt. Zunahme der DNA-Anzahl -> Zunahme der Fluoreszenz Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt

Detektion mittels Fluorophor-markierte genetische Sonden z.B. Taqman™- Sonden, Molecular Beacons: Das Quencher-molekül absorbiert die Reporter-Fluoreszenz der DNA-Hybridisierungs-sonde, Taq-Polymerase besitzt 5' -> 3' Exonukleaseaktivität -> Abspaltung des Fluorophors beim Erreichen der Sonde, Getrennt vom Quencher wird die Reporterfluoreszenz messbar und zeigt die Neustrangsynthese an

Quantifizierungen in der Real-time PCR

Absolute Quantifizierung -> Quantifizierung von Kandidatgenen mit Hilfe vordefinierter Standards

Relative Quantifizierung -> Quantifizierung von Kandidatgenen durch Normalisierung mit Referenzgenen (wurde auch bei unserem Versuch im Labor durchgeführt)



Zur Transkriptions- (Expressions-) analyse von Genen wird die gebildete mRNA Menge quantifiziert, Real-time RT-PCR (RT qPCR)

-> In einer ersten Reaktion wird die mRNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (RT) in DNA übersetzt (cDNA)

-> Die gebildete cDNA wird mittels PCR amplifiziert und quantifiziert

Haushaltsgen (engl. housekeeping gene): nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen, welches unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird, z.B. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatDehydrogenase), ribosomale Untereinheiten 18S und 28S, β -Actin, α 2-Mikroglobulin

(Praktikum s. Protokoll)

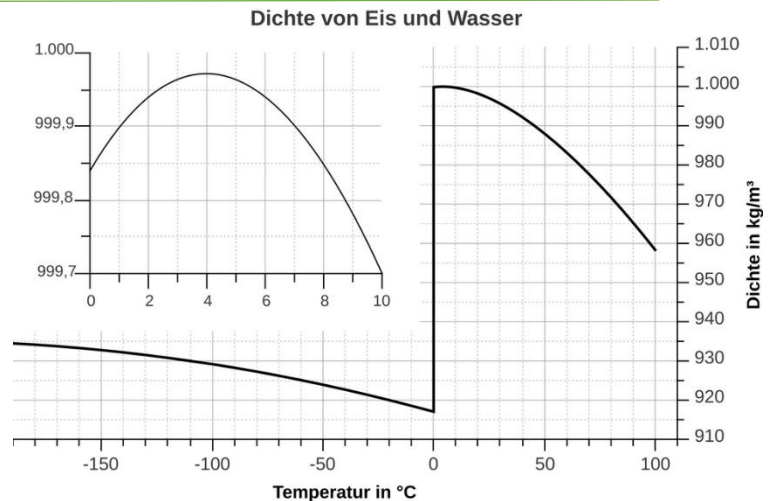
Kryokonservierung

Definition

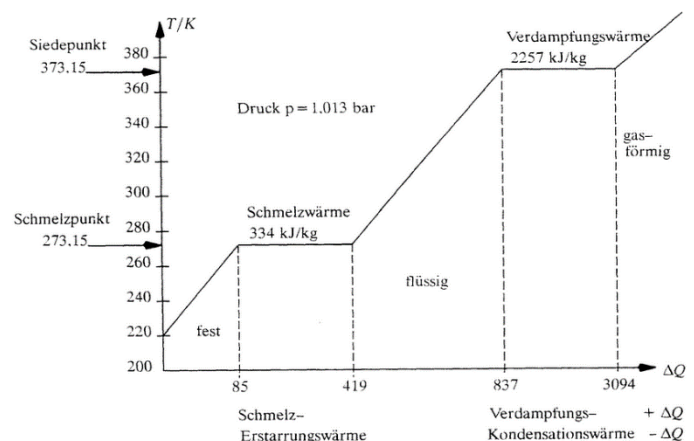
- Kryokonservierung ist im einfachsten Sinne eine „Pause-Taste“ für das Leben
- Definition: Anwendung von tiefen Temperaturen, um Zellen und Gewebe strukturell intakt und vital zu erhalten
- Vorteile einer kryokonservierten Zellbank
 - Ermöglicht zeitliche Trennung von Arbeitsschritten
 - Vereinfacht Lagerung, da weder Alterungs- noch Zelluntergangsprozesse ablaufen
 - Keine Veränderung des Genotyps
 - Keine Transformation und tumorähnliche Veränderung
 - Keine bakterielle Kontamination, keine Kreuzkontamination
 - Einfacher Transport und Verfügbarkeit (bei Experimenten)
 - Sicheres System

Wiederholung

- Dichteanomalie des Wassers
 - Die höchste Dichte von Wasser liegt bei 4°C
 - Eis hat eine deutlich geringere Dichte als Wasser
- ➔ Gefriert das Gewebe solange noch zu viel Wasser enthalten ist, geht es aufgrund von Eiskristallbildung zu grunde

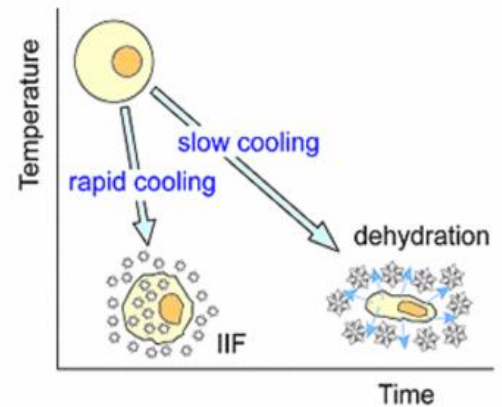


Temperatur-/Energiediagramm von Wasser



Slow Freeze

- Weit verbreitete und etablierte Methode zur Kryokonservierung von Gewebe
- Langsames Einfrieren (gewöhnlich: 1°C pro Minute)
 - ➔ Durch langsames Gefrieren diffundiert das Wasser schnell genug aus der Zelle, sodass sich keine Zellinterne Eiskristalle bilden können
 - ➔ Je schneller das Wasser herausdiffundiert, desto schneller kann der Gefrierprozess ablaufen
- Jedoch müssen Zellen vorher mit kryoprotektiven Substanzen behandelt werden, verhindert, dass sich im Extrazellulärraum Eiskristalle bilden



Kryoprotektive Substanzen

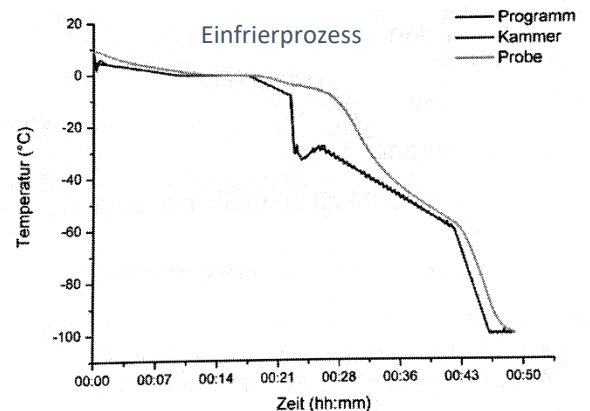
- Ziel: Konzentrationserhöhung der in der Zelle gelöster Substanzen
 - Verhindern Kristallinisierung von Wasser bei tiefen Temperaturen
 - Eigenschaften:
 - Gute Wasserlöslichkeit, auch bei tiefen Temperaturen
 - Gefrierpunktniedrigend
 - Geringe Toxizität (wenn gefroren)
 - Diffundiert in Zelle, aber nur ca. 3mm
- Glycerin, Ethandiol, Propandiol, Dimethylsulfoxid (DMSO)

Kryokonservierungsprozess (am Beispiel der porcinen Leber)

1. Konditionieren
 2. Einfrieren
 3. Lagern
 4. Auftauen
 5. Konditionieren
- Entscheidend für Vitalität!

1.) Konditionieren:

- Lebergewebe in die Kryoröhrchen geben wurde, und diese beschriften
- 5%-10%ige DMSO (bei uns 10%) auf zu konservierendes Gewebe geben, kurze Zeit in Eiswasser inkubieren (ca. 10 min bei unserem Versuch)
- DMSO genügend Zeit in Leberstücke zu diffundieren



2.) Einfrieren

- Einfrieren geschieht mittels eines Kryostats, welches die Geschwindigkeit des Einfrierprozesses reguliert

3.) Lagern

- Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung ist Lagerung von biologischem Material nicht unbegrenzt möglich
- Diese hängt von Energie/Temperatur ab
- Kurzzeitkonservierung bei -20°C
- Mittelzeitkonservierung bei -80°C (Sublimation CO₂: -78,5°C)
- Langzeitkonservierung bei -196°C (Siedepunkt fl. N₂)

4.) Auftauen

- Sollte schnell gehen: Zellen in Wasserbad mit 37°C
- Kontaminationsvorsorge, Behälter in das die Zellen nach auftauen gegeben werden, sollten steril sein

5.) Konditionieren

- Nach auftauen Zellen nicht in destilliertes Wasser geben, sondern DMSO-Lösung, da sonst osmotischer Schock droht -> Zellen platzen
- Sollte aber nicht zu lange dauern, da sonst zytotoxischer Effekt des DMSO eintritt
- Zentrifugieren und aufgetaute Zellen abpipettieren

Heutige Anwendung

- Laboranwendung
 - ➔ Zelllinien, Hepatozyten in Suspension/Vlisen, Nebenschilddrüse
- Klinische Anwendung
 - ➔ Eizellen, Spermien, Stammzellen (Nabelschnur), Ovarial-/Hodengewebe

Vitrifikation

- Verfahren, um amorphes (nicht-kristallines) Eis in Zelle zu erhalten
- Durch extrem schnelles Runterkühlen von Wasser unter die Glasübergangstemperatur (130 K bei 1 bar) bildet sich ein Festkörper ohne kristalline Struktur
- Bei klinischer Anwendung auch Kryoprotektiva nötig
 - ➔ Junges verfahren, Publikationen nehmen seit ca. 2000 sehr schnell zu

Azellularisierung

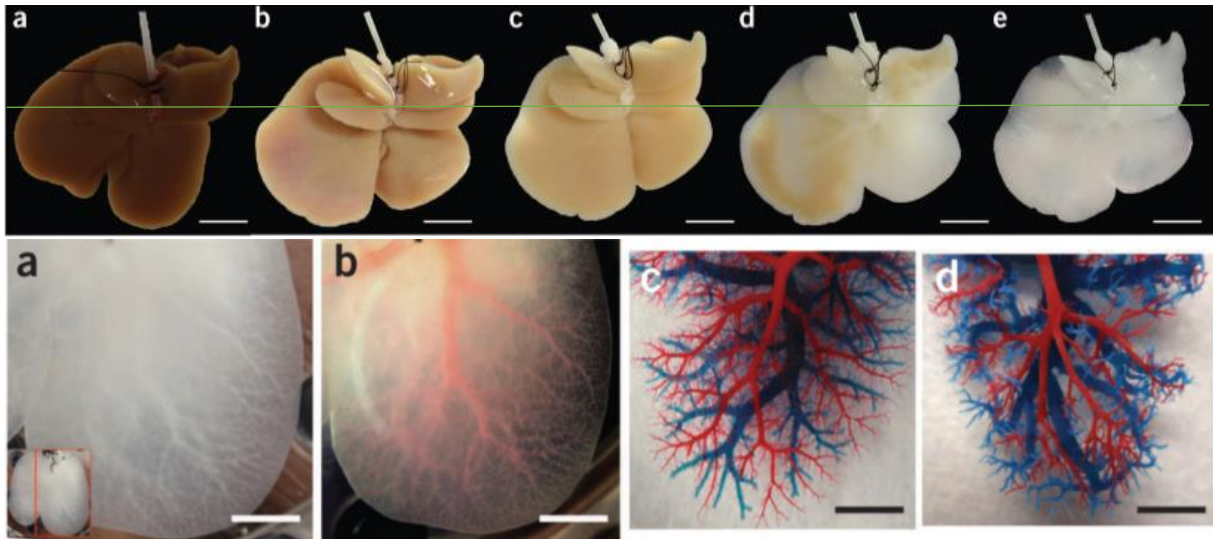
Transplantationen

- 7400 Transplantationen von toten Spendern im Jahr 2018, 14000 Patienten aktiv auf der Warteliste (Statistik von Eurotransplant, 129 Transplantationen am UKT)
- Probleme:
 - ➔ Organknappheit
 - ➔ Verteilungsgerechtigkeit (Dringlichkeit und Erfolgsaussicht)
 - ➔ Problem: je höher die Dringlichkeit, desto geringere Erfolgschancen
 - ➔ Organhandel, Kliniken stufen Dringlichkeit höher ein als sie ist
 - ➔ Lösung: Scoresystem nach Laborwerten, trotzdem manipulierbar
 - ➔ Abstoßungsreaktionen
 - ➔ Dauerhafte Einnahme von Immunsuppressiva führt zu Problemen
 - ➔ Niere hält maximal 10-15 Jahre im Optimalfall
- Lösungsansätze sind TE und xenogene Transplantate
 - ➔ TE noch nicht weit genug, um funktionsfähige Organe herzustellen
 - ➔ Xenogene Transplantate haben verstärkte Abstoßung (da andere Immunfaktoren und Rezeptoren)
 - ➔ Übertragung Xenogener Krankheiten

Azellularisierung

- Komplettes Entfernen angesiedelter Zellen eines Organs (Leber), aber Erhaltung der nativen Ultrastruktur und Zusammensetzung der EZM

- Einteilung der Azellularisierungsmittel in 3 Gruppen:
 - Chemische Agentien
 - Biologische Agentien
 - Physikalische Agentien



Chemische Agentien

- Säuren und Basen
 - Peroxyessigsäure:
 - Entfernt Nukleinsäuren, geringer Effekt auf EZM-Zusammensetzung und Struktur
 - Essigsäure
 - Zerstört und entfernt Kollagen, entsprechende Reduktion der EZM-Stärke
 - Calciumhydroxid, Natriumsulfid, Natriumhydroxid
 - Entfernen Haare von Hautproben in früher Azellularisierungsphase
 - Eliminieren Wachstumsfaktoren
 - Zerstören Quervernetzung
 - Spalten Kollagenfasern
- } Verminderung Mechanischer Eigenschaften der EZM („aus Haut wird Leder“)
- Hypo- und hypertone Lösungen
 - Hypertone Kochsalzlösung
 - Trennt DNA von Proteinen
 - Hypotone Kochsalzlösung
 - Zelllysis durch osmotischen Effekt
 - Generell gebräuchlich Gewebe abwechseln mit hypo- und hypertonen Lösungen zu spülen, gut geeignet, um Zellreste aus Gewebe zu entfernen

- Detergenzien (Tenside)

- Triton X-100

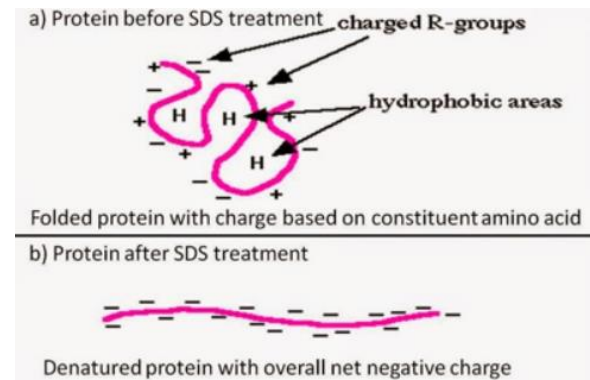
- Nicht-ionisches Tensid (hydrophiler Kopf, hydrophober Rest)
 - Entfernt Zellreste aus dickeren Geweben (z.B. Herzklappen, hier enzymatische oder osmotische Methoden ineffizient)
 - Schwächt EZM durch Proteinverlust

- CHAPS

- Zwitterionisches Tensid
 - Besonders effektiv für dünnere Gewebe (z.B. Lunge), ineffektiv bei dickem Gewebe

- SDS (Natrium-Dodecylsulfat)

- Ionisches Tensid
 - Effektiver als Triton X-100, um Zellkerne aus dichterem Gewebe und Organen zu entfernen
 - Erhält mechanische Funktionalität der EZM
 - Störung der Ultrastruktur, Elimination von Wachstumsfaktoren



SDS kann Hauptunterschied bei Azellularisierungsprotokoll machen, jedoch wird Ultrastruktur zerstört, sowie Wachstumsfaktoren auf EZM eliminiert

- Druchspülen des azellularisierten Gewebes sehr wichtig, da SDS-Rückstände zytotoxisch wirken Neuan siedlung gefährdet

- Chelatbildner

- EDTA/EGTA

- Unterstützen Zelldissoziation von EZM-Proteinen durch Binden von Metallionen
 - Reichen nicht aus um Gewebe/Organe zellfrei zu bekommen

- Alkohole

- Glycerol

- Fördert Azellularisierung durch Dehydrierung und Lysis der Zellen

- Isopropanol, Ethanol, Methanol

- Entfernt Lipide sehr effektiv
 - Ethanol und Methanol haben fixierenden Charakter, erhalten Proteine

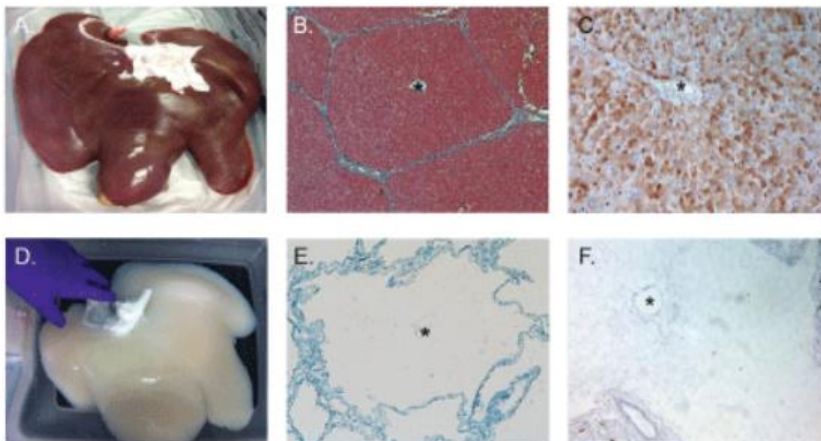
- Andere Lösungen

- Aceton

- Entfernt Lipide
 - Fixiert und konserviert EZM durch Querverbindungen → steife Gerüste

Biologische Agentien

- Enzyme
 - Nukleasen (DNase, RNase)
 - Spalten Nukleinsäuresequenzen
 - Entfernen nach Zelllysis Nukleotide im Gewebe
 - Endonukleasen sind effektiver als Exonukleasen, aber teuer
 - Trypsin (Serinprotease)
 - Häufig als Azellularisierungsagens genutzt
 - Greift EZM-Proteine (z.B. Kollagen) an, zeitabhängiger Effekt
 - Geeignet in Anfangsphase eines Protokolls
 - Kollagenase
 - Kann nur für Azellularisierung verwendet werden, wenn Ultrastruktur der EZM und Erhaltung des Kollagens nicht wichtig für weitere klinische Verwendung sind
 - Enzyme entfernen Zellreste sehr spezifisch, aber Überreste bei Neubesiedelung können diese beeinträchtigen, und negative Immunreaktionen hervorrufen



Masson's Trichrom Färbung vor (B) und nach (E) der Dezellularisierung zeigt, dass kaum Zellen im Gewebe sind, und die EZM intakt ist. Die natürliche Struktur der Leber ist ebenfalls intakt, sowie die Zentralvene (*).

Physikalische Agentien

- Temperatur
 - Einfrier- und Auftauprozesse lysieren Zellen in Gewebe und Organen
 - Löst Zellen nur, Reste müssen ausgespült werden
 - Effektiv, um Azellularisierungsprozess einzuleiten
- Kraft und Druck
 - Zellen auf Oberflächen lassen sich durch Scherkräfte leicht entfernen
 - Darunterliegende Ultrastruktur und Basalmembran kann Schaden davontragen
- Hydrostatischer Druck
 - Kurzer Zeitaufwand, effektiv für Blutgefäße und Hornhaut
 - Eventuelle Bildung von Kristallen, die EZM zerstören

→ Gegensteuern durch Temperaturerhöhung

- Non-thermal irreversible Electroporation
 - Neuartige Methode
 - Anlegen eines elektrischen Feldes, welches dauerhaft umgepolt wird
 - Schwingen des Lipiddoppellayers
 - Bildung von Mikroporen
 - Verlust der Zell-Homöostase
 - Bisher nur für sehr kleine Proben geeignet

Techniken und Methoden

Dünne Gewebe

- Einfrieren/Auftauen
- Mechanische Bearbeitung
- Kurze Behandlung mit leicht zu entfernenden Detergentien oder Säuren (CHAPS)
- Spülen

Dicke Gewebe

- Intensivere biochemische Behandlung nötig (SDS, anschließend DNasen/RNasen)
- Längere Spülzeiten, mehrere Spülzyklen
- Bei fettigem, amorphem Gewebe zusätzlich Lipidlöser verwenden

Ganze Organe

- Ausnutzen des vaskulären Systems
- Beispielprotokoll Schenk AG:
 - Organ nach Entnahme mit 2L NaCL spülen
 - Einfrieren bei -80°C
 - Auftauen bei 4°C
 - 1h mit PBS spülen, 20mmHg
 - 37°C warme, 1%ige SDS-Lösung für 20h
 - DNase für 2h
 - Nachspülen mit PBS und Konservierung bei -80°C

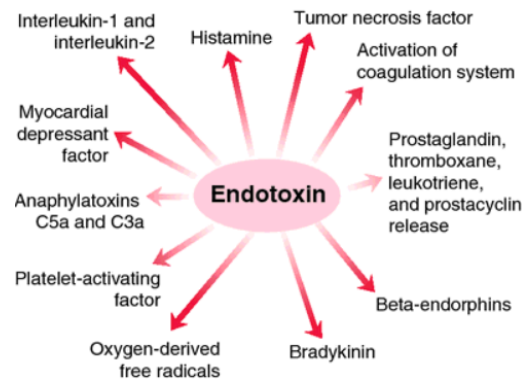
Sterilisation

- Begasung mit Ethylenoxid (ETO)
 - stark toxisch und stark karzinogen
- Elektronenbestrahlung
- Bestrahlung mit γ -Strahlen

Evaluierung

- Azellularisiertes Gewebe muss
 - Unter 50ng DNA-Doppelstrang pro mg EZM-Trockengewicht
 - Unter 200 Basenpaare Länge der DNA-Fragmente
- ... für die Weiterverwendung im Schenk-Labor haben

Bei der Azellularisierung werden nicht physiologische, chemische oder biologische Agentien verwendet. Dabei kann es zu **Schädigungen der EZM** kommen. Jedoch ist für eine erfolgreiche Wiederbesiedelung eine **vollständige Azellularisierung** der Schlüssel.



Nach Bradford:

- Triphenylmethan-Farbstoff **Coomassie-Brilliant-Blau** bindet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen
- Ungebunden ist der Farbstoff braunrot, Maximum im Absorptionsspektrum bei 470nm
- Durch Komplexbildung mit Proteinen verschiebt sich Maximum auf 595nm
 - Farbstoff wird in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfatform stabilisiert
- Extinktionskoeffizient erhöht sich stark bei Farbstoff-Proteinkomplex
 - Proteinkonzentration kann somit photometrisch bestimmt werden
- Bradfordstammlösung:
 - 100mg Coomassie Brilliant Blau Tabletten
 - 50ml 99% Ethanol
 - 100ml Phosphorsäure 85%
 - 100ml aqua dest

Nach Biuret:

- Im alkalischen bilden Proteine über ihre Peptidbindungen Cu (II)-Ionen
- Entstehung eines violetten Cu(I) Komplex
 - Messung photometrisch bei 540 nm
 - Farbe direkt proportional zu Proteinkonzentration
- Biuretstammlösung:
 - 0,5% CuSO₄
 - 1,5% K-Na-Tartrat
 - 0,5% KI
 - In 0,2 mol/l NaOH

Nach Lowry:

- Proteinbestimmung beruht auf zwei Reaktionen
 - Biuret-Reaktion
 - Zweiter Reaktionsschritt:
 - Reduktion von Cu(II) zu Cu(I)
 - Cu(I) reduziert gelbes Folin-Ciocalteu-Reagenz zu Molybdänblau
 - Resultierende intensive Blaufärbung dient quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie
- Hierbei werden 4 Lösungen verwendet
 - 4g NaOH + 20g Na₂CO₃ + 0,2g K-Na-Tartrat in 1 L aqua dest (A)
 - 0,5g CuSO₄ in 100 ml aqua dest (B)
 - 50 A + 1 B mischen
 - Folin-Reagenz mit aqua dest 1:1

Hämokompatibilität

Arteriosklerotische Plaques:

- Fetteinlagerungen *in* die innere Wandschicht arterieller Blutgefäße -> Verengung, Verhärtung, höherer Blutdruck (ab 90% Erhöhung sehr kritisch)
- Bevorzugt an Herzkranzgefäßen
- Stenose = Totalverschluss

Kardiovaskuläre Erkrankungen

- Im Westen Todesursache Nummer 1

Therapieansatz: Revaskularisierung über Stents oder Bypässe (OP-Eingriff deutlich aufwändiger und riskanter, aber größerer Langzeiterfolg, daher den Stents dauerhaft überlegen)

Bypass:

- bei Verstopfung der Koronargefäße,
- Gefäßtransplantation am Herzen,
- bevorzugt mit Beinvenen/-arterien o.Ä., Arterien theoretisch besser als Venen aber schwieriger für OP,
- Überbrücken der Engstellen mit direkter Verbindung zum Aortenbogen

Medizinische Geräte mit Blutkontakt:

- Stent Graft,
- Oxygenator,
- Stents,
- Vascular Graft,
- VAD (Herzunterstützungssystem),
- Herzklappe

Probleme Hämokompatibilität: Thrombosen, Koagulation, Fibrinolyse, Entzündungen, Sepsis

Biokompatibilität

- Zytokompatibilität und Hämokompatibilität!

Thrombin: Zentrales Protein (Enzym) der Gerinnungskaskade -> Umwandlung/Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin

Plasmin: lysiert/spaltet Fibrin (Fibrinolyse = Auflösung eines Blutgerinnsels) -> Gegenstück zu Thrombin

Hämostatische Balance: Koagulation (=Gerinnung) und Fibrinolyse -> dynamisches Gleichgewicht,

- Erhöhte Koagulation: führt zu Thrombosen (Myokardinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie, ...)
 - Aktivierung: Thromboplastin (Gewebefaktor)

- Inhibitoren: Heparin, Hirudin, Warfarin (Vitamin K-Antagonist, Coumarin), ASS (Acetylsalicylsäure, Aspirin)
- Erhöhte Fibrinolyse: führt zu Blutungen, Fibrinauflösung (innere Blutungen, Hirnblutungen, Hämatome, ...)
- Aktivierung: Kallikrein, t-PA (tissue plasmin activator), Streptokinase
- (Inhibitoren: Aprotinin, Antiplasmin, PAI)

Gerinnungsaktivierung:

- Intrinsische Gerinnung, extrinsische Gerinnung -> Thrombinaktivierung
- Thrombozytäre Gerinnung -> Thrombozytenadhäsion
 - Aggregation der Thrombozyten + Fibrin -> ... -> Thrombus
- PDGF: Wachstumsfaktor für Endothelzellen, damit Endothel den Thrombus überwächst und Gefäßwand wiederhergestellt wird

3 Faktoren der Thrombose: Gerinnungsfähigkeit, Gefäßwand, Blutströmung

Beurteilung der Hämkompatibilität

1. Thrombose, 2. Koagulation, 3. Platelets, 4. Hämatologie, 5. Komplementsystem

Faktoren für die Blutqualität bei Bluttests:

- Blut muss frisch sein!
- Testperson soll möglichst nicht rauchen, Drogen/Medikamente nehmen oder schwanger sein,
- Sterilität soll gegeben sein,
- keine Stase (Arm abbinden) beim Blutabnehmen,
- Blut nach Entnahme nicht zitrieren (wird in Transfusionszentren gemacht)! Stattdessen mit *unfraktioniertem* Heparin behandeln,
- Hintergrundaktivierung gering halten

Testmodelle:

- statisch vs. Dynamisch,
- Prädikate = Produkte, die schon auf dem Markt sind, werden als Vergleichsstandard genutzt

Ummantelung bei Stents:

- spielt entscheidende Rolle bei Hämkompatibilität
- Biopassiv ummantelt (Albumin), Bioaktiv ummantelt (Heparin), uncoated

Western Blotting: Proteinauftrennung nach Größe (wie Elektrophorese etc)

In vitro Herz-Lungen-Maschine: deutlich sensibler als Tiermodell -> deutlich aussagekräftiger

Zusammenfassend

gute Messungen mit Testmodellen möglich, vor allem in vitro!

Durchflusszytometrie

- Methode zur Zellmessung

Nachweis von Proteinen

1. Messung der Gesamtmenge (Bicinchoninsäure Assay = BCA),
2. Auftrennung verschiedener Proteine in einem Proteingemisch (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = SDS-PAGE),
3. Detektion eines spezifischen Proteins (Enzyme Linked Immunosorbent Assay = ELISA, **Durchflusszytometrie**)

Definition Durchflusszytometrie

Experimentelle Technik zur Analyse von Zellen in vitro mittels eines Lichtstrahls (Laser), „Zytometrie“ = „Zell-Vermessung“.

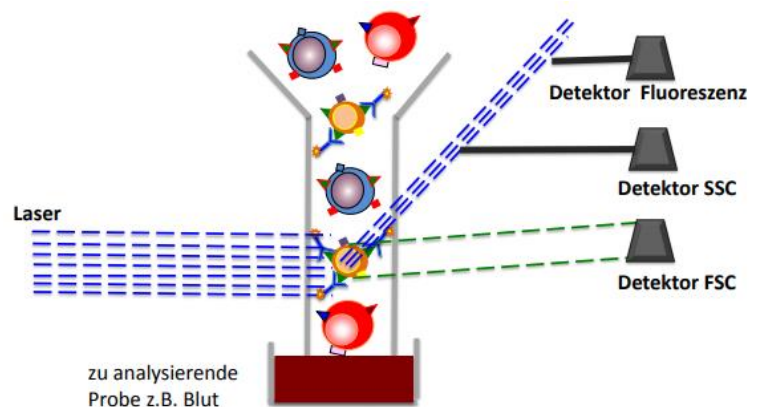
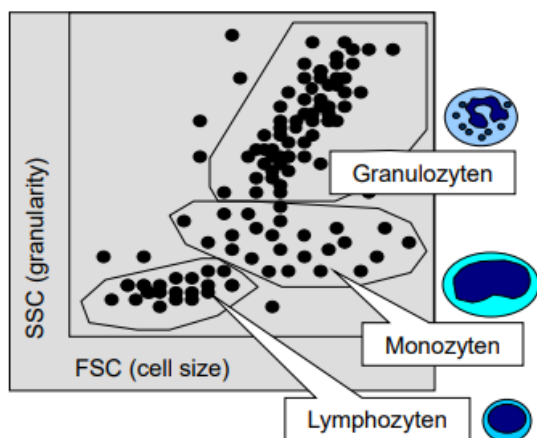
- Zellen müssen in *Lösung* vorliegen -> (Einzell-) Suspension,
- es kann eine Vielzahl verschiedener Zellen untersucht werden (unterschiedliche Größen -> Blutzellen, Tumorzellen, Bakterien, Hefen, etc.),
- bis zu 10.000 Zellen/Sekunde

Prinzip

Streuung des Lichtstrahls aufgrund verschiedener Zelleigenschaften

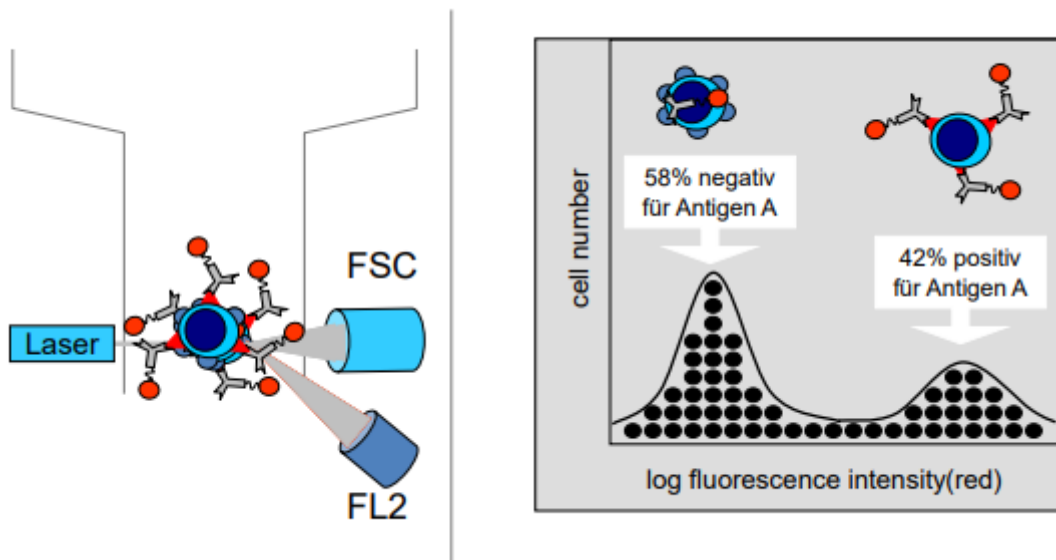
1. Vorwärtstreulicht (forward scatter: FSC) -> Zellgröße
 2. Seitwärtstreulicht (side scatter: SSC) -> Granularität
 3. Nachweis von Oberflächenrezeptoren und intrazellulären Proteinen -> Verwendung Fluoreszenzmarkierte Antikörper (AK)
- Meist 3 Detektoren: FSC, SSC, Fluoreszenz

Auftragen in Botplot: z.B. SSC gegen FSC -> Zelltypen nach Größe und Granularität geordnet



Expression von Rezeptoren oder Adhäsionsmolekülen charakterisiert einen Zelltyp oder einen funktionellen Status (z.B. aktiviert oder inaktiv). Es gibt 339 verschiedene Oberflächenmoleküle, die mit monoklonalen Antikörpern als „Cluster of Differentiation“ (CD) identifizierbar sind.

Fluoreszenzintensität: emittiertes Fluoreszenzlicht ist proportional zur Zahl gebundener Fluorochrommoleküle, ebenfalls darstellbar in einem Diagramm -> Histogramm wird erstellt mit Kurvenverlauf



Fluoreszenz

Fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome) absorbieren Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich, dabei werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben. Beim Zurückfallen zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon -> Fluoreszenzlicht mit anderer Wellenlänge (Teil der Energie geht in Form von Wärme verloren).

Gängige Fluorochrome in der Durchflusszytometrie sind **Phycoerythrin (PE)** und **Fluoresceinisothiocyanat (FITC)**.

Mehrfarbenfluoreszenzanalyse: Verwendung unterschiedlicher AK, die mit verschiedenen Fluorochromen gelabelt sind -> mehr Informationen können in einer Probe gesammelt werden

Fazit

Zellgröße, Granularität und Expression von Rezeptoren auf der Zelloberfläche lässt sich detektieren und quantifizieren. Änderung in der Expression von Rezeptoren können detektiert werden.

Thrombozyten

- 2 bis 4 µm Durchmesser,
- werden durch Abschnürung von Megakaryozyten gebildet (Knochenmark),
- besitzen *keinen* Zellkern,
- 7-10 Tage Lebensdauer (so lange wirken daher auch bestimmt Medikamente wie Aspirin, die auf Thrombozyten wirken),
- 150.000 bis 300.000 Thrombozyten pro µl Blut,
- im ruhenden Zustand diskoide/diskoidale Form -> nach Aktivierung „shape changing“

Hauptaufgabe der Thrombozyten: primäre Hämostase! Sie erkennen, wenn Endothel beschädigt ist und binden an freiliegende Struktur.

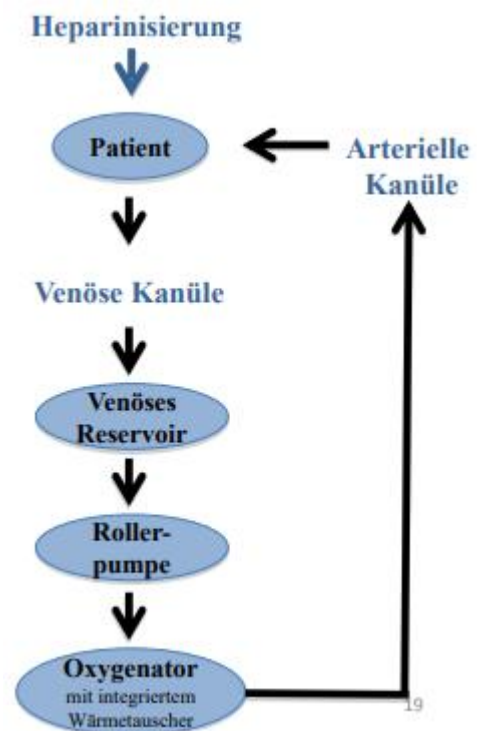
Primäre Adhäsion -> Aktivierung -> Aggregatbildung, Thrombozytenrekrutierung

Leukozyten

- Im Blut, Knochenmark, lymphatischen Organen und Geweben.
- „Wächter“ des Immunsystems,
- vernichten für den Organismus unverträgliche Stoffe bzw. Krankheitserreger,
- können aus dem Blut ins Gewebe einwandern
- Unterteilung in:
 - Granulozyten: neutrophile (60-70 %), eosinophile (2-4 %), basophile (0,01-0,5 %)
 - Lymphozyten (20-45 %)
 - Monozyten (2-8 %)

Extrakorporale Zirkulation (EKZ)

- essentiell während Einsatz der Herz-Lungen-Maschine,
- gewährleistet stabile Kreislaufverhältnisse und den Gasaustausch des Patienten,



EKZ-Fremdoberflächen und Scherkräfte induzieren jedoch eine Aktivierung von **Thrombozyten**:

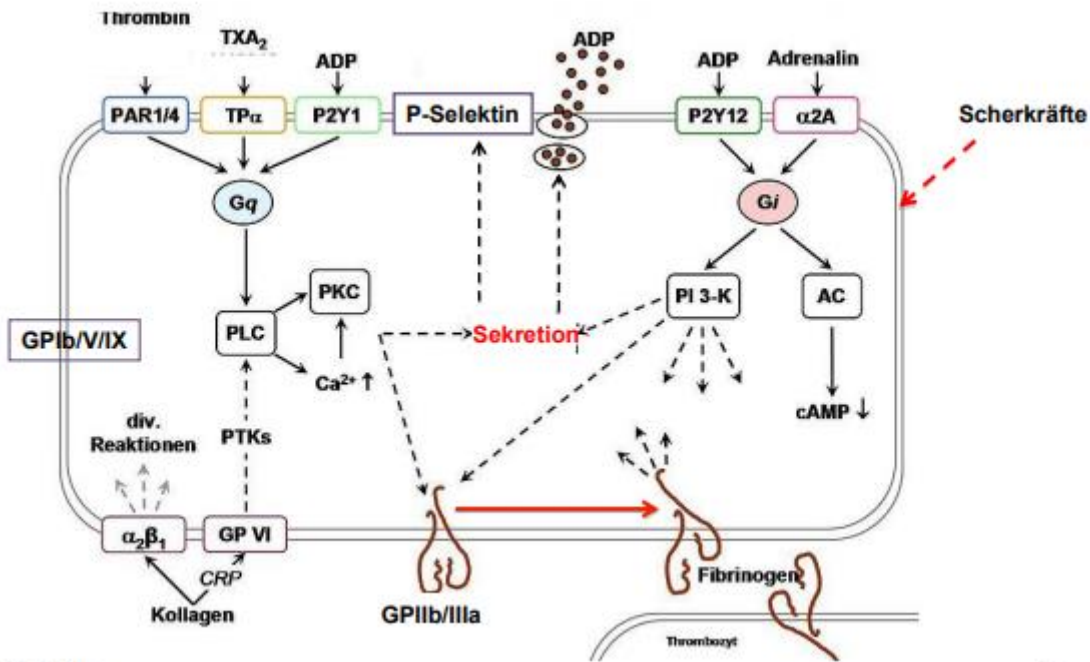
- Post-operative Koagulopathie -> Lebensbedrohliche Blutungen und thrombembolische Komplikationen
- Aktivierung von Leukozyten (Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 auf Leukozyten) -> Systemische Entzündungsreaktion/lebensbedrohliches Multiorganversagen (MOF)

Faktoren der Thrombozytenaktivierung

P-Selektin: nur bei aktivierten Thrombozyten in die Zelloberfläche integriert, sonst innerhalb der Zelle

GPIIb/IIIa: Fibrinogenrezeptor, Bindungsstelle der Thrombozyten, Aggregatbildung über Fibrinogenbindung

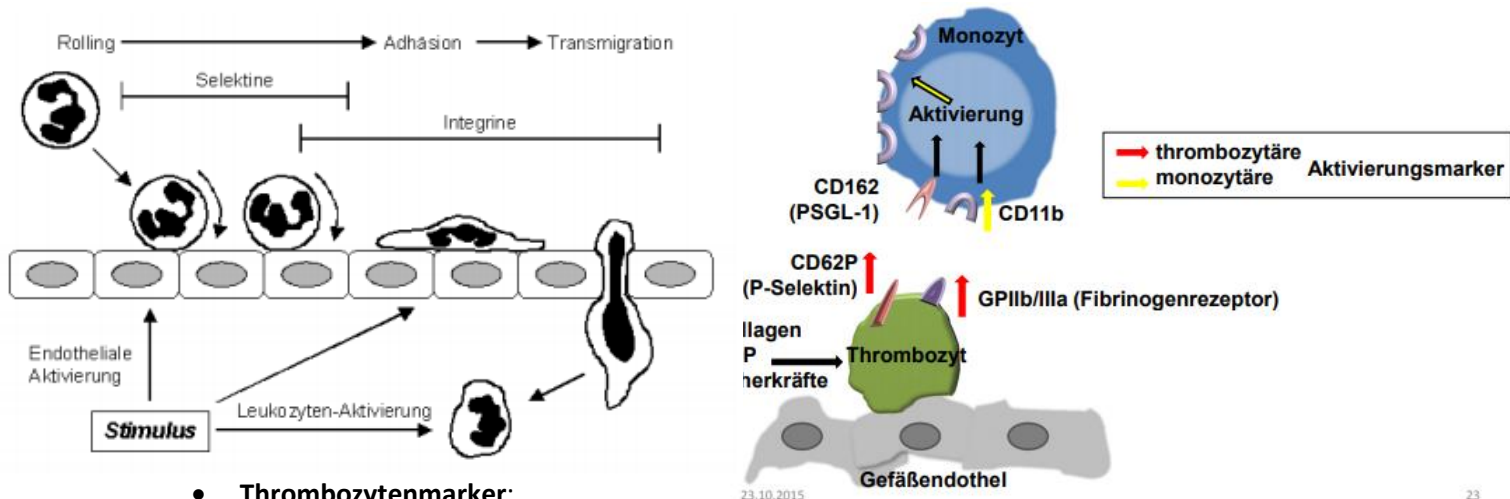
- Der Aktivierungsgrad der Thrombozyten ist über diese beiden Rezeptoren/Marker messbar



Leukozytenaktivierung

- Mac-1 (CD11b/CD18) schwach exprimiert
- nach Stimulation werden die in zytoplasmischen Granula gespeicherten Moleküle rasch auf der Zelloberfläche exponiert und können mit ICAM-1 auf Endothelzellen interagieren,
- Detektion der Aktivierung:

Spezifische Aktivierungsmarker von Thrombozyten/Leukozyten



- **Thrombozytenmarker:**
 - **Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa:** Aktivierung von Thrombozyten führt zu einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa Rezeptors -> detektierbar durch spezifischen Antikörper (PAC-1 Antikörper)
 - **P-Selektin (CD62P):** wird nach Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert -> Grad der Aktivierung messbar durch anti-P-Selektin Antikörper
- **Leukozytenmarker:**

- **CD11b:** in geringer Menge auf ruhenden Leukozyten exprimiert. Bei Aktivierung werden vermehrt CD11b Rezeptoren auf der Oberfläche exprimiert -> Interaktion mit Gefäßepithel
- **CD162:** auf Leukozyten vorhanden -> Interaktion mit P-Selektin und E-Selektin (Endothel)

Praktikumsversuch

- humanes Vollblut *unbehandelt* vs. mit *ReoPro (Thrombozyteninhibitor)*,
- Stimulation der Thrombozyten mittels ADP (Adenosindiphosphat),
- mit AK gelabelt für Fluoreszenz (PAC-1-FITC an Fibrinogenrezeptor, CD62P-PE an P-Selektin)
- die Thrombozyten des behandelten Blutes können nicht mehr aktiviert werden bzw. es findet keine Aggregation statt

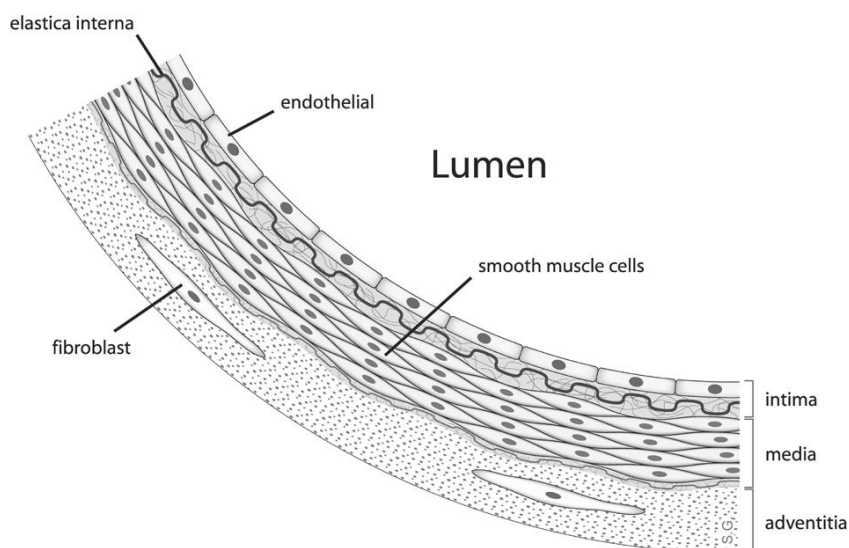
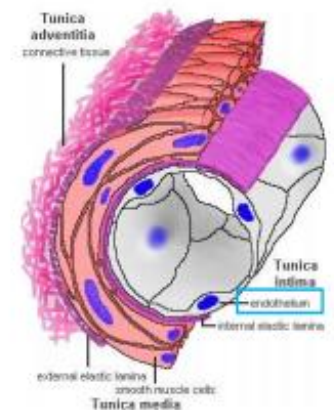
Isolierung von Endothelzellen (ECs) aus porcinen Venen/Arterien

Endothel

- besteht aus Endothelzellen,
- innerste Wandschicht von Lymph- und Blutgefäßen,
- gehört zur *Tunica Intima*, zum Gefäßlumen hingerichtet

Wandbau der Arterie:

Endothelzellen bilden ein einschichtiges Plattenepithel, gefolgt von einer Basalmembran



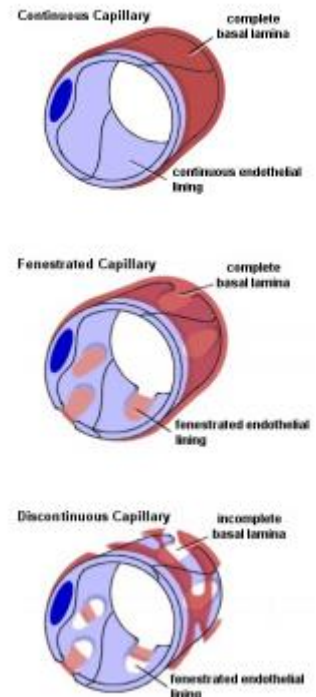
Aufgabe/Funktion von Endothel:

- Permeabilitätsgrenze: Regulation des Stoffaustausches, zwischen Gewebe/Organen und Blut (z.B. Blut-Hirn-Schranke)
- Regulation des Blutdrucks, Produktion von NO (wirkt auf glatte Muskelzellen -> Kontraktion/Entspannung steuert Blutdruck mit)
- Schafft antithrombogene Oberfläche (im unbeschädigten Zustand)

Endothelarten:

unterscheiden sich in ihrer Durchlässigkeit von unterschiedlichen Stoffen im Blut

- **Kontinuierliches Endothel:** *undurchlässig* für im Blut gelöste Stoffe -> tight junctions! Stoffaustausch nur über Transporter möglich, z.B. Blut-Hirn-Schranke
- **Fenestriertes Endothel:** etwas *durchlässiger*, auch für größere Moleküle durchlässig, z.B. Darm
- **Diskontinuierliches Endothel:** *sehr durchlässig bzw. löchrig*, Zellen können hindurch wandern, z.B. Leber



Endothelzellen:

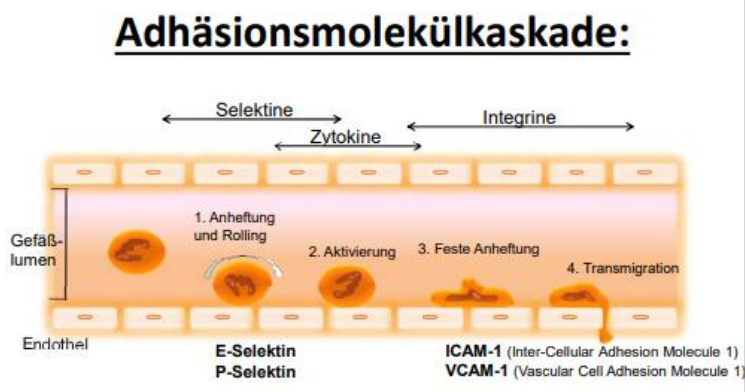
wachsen adhärent und teils spindelförmig, Beschichtung notwendig für Kultivierung z.B. Gelatine oder Kollagen, kopfsteinartiges Wachstum -> Morphologie: sehr flach

Wichtige Endothelzellmarker:

- CD31/PECAM-1 (prominentester Marker)
- CD144/ Vaskuläres Endotheliales Cadherin (Quervernetzung)
- VEGFR-2/KDR (VE Wachstumsfaktor Rezeptor)
- E-Selektin -> Unterschiedliche Expression bei inflammatorischem Zustand der Zelle auf der Oberfläche, Grundexpression in ruhendem Zustand

Adhäsionsmolekülkaskade

1. Anheftung und Rolling: E-Selektin, P-Selektin, Zytokine wirken als Signalmoleküle/locken Zellen an und binden an die Selektine
2. Aktivierung (Zytokine, ...)
3. Feste Anheftung: Integrine, ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule 1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1)
4. Transmigration



Liganden: E/P-Selektin = PSGL1, ICAM-1 = LFA1, VCAM-1 = VLA4

Quellen für die Gewinnung von ECs

- Venen (z.B. Vena saphena),
- Arterien (Vorteil: keine Venenklappen) von Mensch und Tier,
- Nabelschnur -> Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

Prinzip der Isolierung von Endothelzellen

- Material: Vene oder Arterie
- Antibiotische Behandlung des Gefäßes
- Spülen der Innenwand des Gefäßes
- Kollagenaseverdau (Außenwand nicht in Kontakt mit Kollagenase bringen, da die Außenwand sonst verdaut wird und Fibroblasten in die Kultur gelangen)
- Aussaat der abgelösten Zellen
- Zellen bis zur Konfluenz kultivieren
- Achtung bei Venen: Klappen verhindern Rückfluss von Flüssigkeit -> Gefäß auf richtiger Seite füllen

(Praktikum s. Protokoll)

Zellkultur

Begriffsdefinition

in-vitro-Zellbiologie“ – Grundlage für die Aufklärung grundlegender Wachstums- und Differenzierungsprozesse in Zellen

Einsatz:

- Biomedizinische Grundlagenforschung
- Virologie
- Immunologie
- Strahlenbiologie
- Krebsforschung
- Medizinische Diagnostik
- Herstellung von biologischen Wirkstoffen für Diagnostik, Prophylaxe und Therapie
- Produktion von Impfstoffen und Arzneimitteln
- Toxikologische Untersuchungen
- Regenerative Medizin

Zellkulturtechniken

- durch sterile Präparation von Zellen aus Gewebe, z. B. Embryonen, fetalen Gewebe, Gewebebiopsien oder Operationsmaterial
- Kultivierung unter standardisierten Bedingungen in spezifischen Medien
- Medienzusammensetzung und Kultivierungsbedingungen sind abhängig von Organismus und Zelltyp (menschliche Zellen 37 °C, 5 % CO₂)
- Versorgung von Zellen mit Nährstoffen und Entsorgung von Stoffwechselprodukten erfolgt durch das Medium – Fütterung von Zellen
- Sicherstellung der Vermehrung von Zellen durch die Passagierung

Wachstum von Zellen in Kultur

In genetischer Hinsicht Unterschied zwischen:

- Normalen Zelllinien (Primärkultur) -> Lebensfähigkeit begrenzt
- Transformierte Zelllinien (Permanente Zelllinie) -> unbegrenzt kultivierbar
- Arten der Transformation:
 - spontan (Umweltfaktoren)
 - gezielt (Viren) -> kann zur malignen Transformation führen
 - maligne (mutagene Substanzen)

Lebensdauer von Zelllinien abhängig von: Alter, Spezies, Zelltyp, Kulturbedingungen

Kryokonservierung

Langzeitlagerung von Zellen unter Erhalt ihrer spezifischen Merkmale und Eigenschaften. Kritische Faktoren bei der Tiefkühlkonservierung:

- Art und Qualität von kryoprotektiven Substanz
- Temperatursenkung während des Einfriervorgangs
- Verhinderung der Kristallbildung
- Lagerungstemperatur (Optimal: -196° C)
- Auftauvorgang

„in situ freezing“ – Einfrieren von adhärennten Zellen ohne vorheriges Ablösen

Kontaminationen

Bakterien, Viren, Mykoplasmen, Pilze, Protozoen, Zellen anderer Linie oder Spezies – „Kreuzkontamination“

Alarmsignale:

- Veränderungen der Zellmorphologie
- Proliferationsrate
- biochemischen oder genetischen Eigenschaften

Nachweis von Kontaminationen mit: Speziellen Nährböden, Elektronenmikroskopie, PCR Analyse, DNA-Färbung (DAPI)

➔ Hauptursache: unsterile Handhabung!!!

Kontaminierte Zellen wenn möglich verwerfen und durch neue ersetzen, Kontaminationsquelle bekämpfen

Zellkulturmodelle: Monolayer-Kulturen

Def. Monolayer-Kultur: zweidimensional einschichtige Kultur von Zellen -> beruht auf der Eigenschaft von Zellen an Substraten zu adhären

- **Primärkulturen**
 - Zellen nur wenige Tage kultivierbar (Kurzzeitkulturen)
 - begrenzte Vermehrbarkeit
 - für Untersuchungen geeigneter als Zelllinien
 - Lymphozytenkultur zur Aufklärung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen
 - Hepatozytenkultur für Untersuchungen der Mutagenität, Kanzerogenität und Stoffwechsel von Xenobiotika
 - Kardiomyozytenkultur für biochemische, molekularbiologisch und pharmakologisch-physiologische Untersuchungen
 - Neuronenkultur zur Analyse der Differenzierungsprozesse, Metabolismus von Transmittern, Funktion der neuronalen Rezeptoren und neurotoxische Wirkungen
- **Etablierten Zelllinien**
 - Untersuchung von biologischen Veränderungen während der Alterung der Zellen (zunehmende Passage)
 - Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen, die eine homogene Zellpopulation mit hohen Proliferationsraten erfordern

Zellkulturmodelle: Kokulturen und organotypische Kulturen

Feederlayer-Kultur:

- Zellen auf Feederlayer
- Feederzellen werden in ihrer Proliferation blockiert (Bestrahlung oder Mutagenbehandlung)
- behalten aber die Adhäsionseigenschaften und die Stoffwechselaktivität -> Medium wird mit bestimmten Proteinen angereichert
- Feederlayer-Effekt durch: Direkte Zell-Zell-Kontakte und Wachstumsstimulation

Kokulturen mit Hepatozyten:

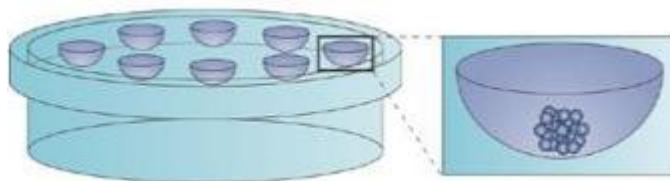
- Nachweis von Zytotoxizität, Genotoxizität bzw. Kanzerogenität von Pharmaka und Toxinen
- Entwicklung von in-vitro-Modellen für den septischen Schock
- Entwicklung von alternativen Zellmodellen zum Ersatz/Ergänzung von Tierversuchen

Perfusionskulturen:

- Permanente Durchströmung von Kulturen in Perfusionskammern (kontinuierliche Nährstoffversorgung)
- Kultivierung der Zellen auf Biopolymermembranen
- Kultur von Knorpelzellen (Tissue Engineering)

Zellkulturmodelle: Dreidimensionale Kulturen

- Sphäroide aus Primärkulturen, immortalisierten, transformierten oder nichttransformierten Zellen
- Verwendung in der Tumorforschung zur Untersuchung von Wachstums-, Zell- und Stoffwechselkinetik sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen
- Zellsysteme zur Untersuchung der Wirkung von Strahlen und zytotoxischen Agenzien auf Tumore
- Sphäroide dienen zur Untersuchung der Invasivität von Zellpopulationen



Zellkulturmodelle: Suspensionskulturen

- Verringerte bis keine Adhäsion an die Kulturunterlage
- Wachsen in Einzelzellen oder Zellaggregaten
- Kultivierung in Bioreaktoren
- Verwendung:
 - Produktion von Enzymen und Antikörpern
 - Virusproduktion bei Impfstoffherstellung
 - Bioproduktion von pharmakologischen Wirkstoffen

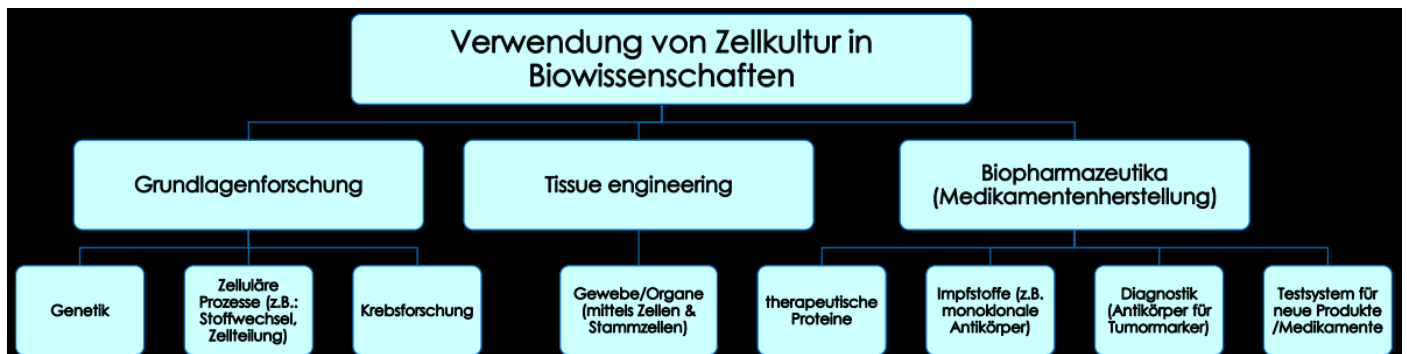
Zellkulturmodelle: Differenzierungsmodelle

Differenzierungsmodelle erlauben die *in vitro* Analyse:

- einzelner Zellen und ihrer Entwicklungslinien
- Interaktionen
- Differenzierungsprozesse (hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen)

Induzierte pluripotente Stammzellen finden Anwendung:

- Analyse früher embryonaler Entwicklungsprozesse *in vitro*
- Als Zellmodell für Wirkstoffscreening (Pharmaforschung)
- Analyse der embryotoxischen, zytotoxischen und mutagenen Wirkung von Umweltfaktoren
- Nutzung für Zell- und Gewebetherapie



Beispiele TE:

- Einfache Gewebe finden klinische Anwendung, z.B.: Implantation von Knorpel in Ohrmuscheln
- Kultivierung von Blutstammzellen in großen Mengen. Dabei ahmen kleine, poröse Kugeln aus Kollagen im Bioreaktor das Knochenmark nach, indem sie den Blutzellen in ihren Hohlräumen Unterschlupf gewähren

Anwendung von Zellkultur in der pharmazeutischen Industrie

Ziel: Einsatz von Zellkulturen oder deren Bestandteile für Produktion hochkomplexer Strukturen

Anwendung: Entwicklung und Zulassung von neuen Medikamenten, Proteine/Nukleinsäuren werden in gentechnisch veränderten lebenden Zellen hergestellt

Wichtigste Zelllinie: CHO

- 70 Prozent der rekombinanten biopharmazeutischen Wirkstoffe für menschliche Medikamente in Zellen hergestellt, stammt von der immortalisierten Primärkultur von Ovarienzellen eines Hamsterweibchens (!)

Chemisch-synthetische und biopharmazeutische Wirkstoffe im Vergleich		
	chemisch-synthetische Wirkstoffe	biopharmazeutische Wirkstoffe
Herstellungsprozess	▪ durch chemische Synthese hergestellt ▪ Prozess gut reproduzierbar	▪ in lebenden Zellen hergestellt ▪ durch einzigartige, gentechnisch veränderte Zelllinie ▪ Produkt stark abhängig von Temperatur, Nährstoffen und anderen Produktionsbedingungen
Eigenschaften	▪ rund zwei Dutzend bis wenige hundert Atome	▪ viele hunderte bis tausende Atome ▪ analytisch schwer zu charakterisieren
Anwendung	▪ werden meist als Tabletten geschluckt	▪ werden meist gespritzt oder infundiert
Wirkort	▪ innerhalb oder außerhalb von Zellen	▪ meist außen an den Zellen oder in der Blutbahn

Biopharmazeutika/Medikamentenherstellung

Arzneimittelherstellung in großen Fermentern / Bioreaktoren: eukaryotische (Hefen, tierische Zellen) & prokaryotische (Bakterien) Zellen

Warum werden tierische Zellen zur Arzneimittelherstellung verwendet? -> posttranslationale Prozesse (Glykosylierungsmuster) bzw. korrekte Proteinfaltung (humane Konformation) nur im tierischen System (Zellkultur) möglich um volle Funktionsfähigkeit und Aktivität des therapeutischen Proteins zu erhalten (Bsp: EPO, Blutgerinnungsfaktor VIII)

Vorteil:

- Standardisiertes, gut kontrollierbares Verfahren
- Kaum Tierversuche notwendig. Allerdings Tiereinsatz für Organ-/Zellentnahme, Seren, ...

Wie erfolgt die Herstellung von Biopharmazeutika? -> in Bioreaktoren / Fermentern (oft Edelstahlgefäße): darin enthalten sind Microcarrier (z.B. Glas-/Polystyrolkugeln) an denen sich die Zellen anheften können (adhärentes Wachstum), Ausbeute gering: aus 10.000 l oft nur wenige kg Wirkstoff Gewinnung

Beispiele für die Zellkultur in der medizinischen Anwendung

- EPO als rekombinantes Protein für Dialysepatienten
- Hepatitis B als rekombinanter Impfstoff 1986 zugelassen
- Impfung gegen Humane Papillomaviren (Gebärmutterhalskrebs) mittels Antigen-/ Antikörperherstellung in Bioreaktoren
- Diagnostik in der Krebsmedizin: monoklonale Antikörper, z.B. Cetuximab und Panitumumab binden an EGF-Rezeptoren, die viele Krebszellen im Übermaß auf ihrer Oberfläche tragen
- Kultivierung von Blutkrebszellen -> Erforschung solcher entarteten Zellen bietet Alternative zu Tierversuchen. Potentielle Medikamente können zunächst in der Zellkultur getestet werden
- Krankheitsprozesse werden mit komplexen Gewebekulturen nachgestellt und untersucht (Bsp: Lungenschleimhaut in der Kulturschale Æ Aufnahme von inhalierten Stoffen kann simuliert werden)

Praxisteil

Grundmedium (z.B. DMEM, RPMI): standardisierte Nährmedien aus gepufferter Salzlösung mit unterschiedlichem Anteil an Vitaminen, Aminosäuren, Glukose, Farbstoffen...

Medienzusätze:

- *Fötales bovines Serum* (FBS = Rinderserumalbumin): enthält wachstumsfördernde Substanzen (Serumproteine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Lipide, Spurenelemente), Variationen in Zusammensetzung je nach Spezies, Herkunft, Ernährung und Entnahme, Chargenschwankungen
- *Antibiotika* (Penicillin, Streptomycin): Auflösen der Zellwand, Gestörte Permeabilität der Zellwand, Hemmung Proteinsynthese, Hemmung Nukleinsäuresynthese
- *L-Glutamin*: Notwendig für den Zellstoffwechsel (essentielle Aminosäure)
- *Phenolrot - pH-Indikator*: Gelbes Medium -> Kultur ist überwachsen, Bakterielle Kontamination, Zuviel CO₂ im Inkubator, Violettes Medium -> Kultur wächst nicht, Kontamination mit Pilzen oder Hefe, Zu wenig CO₂ im Inkubator

Steriles Arbeiten:

- Fenster und Türen geschlossen halten, Labor muss aufgeräumt sein/bleiben, vor und nach dem Arbeiten Arbeitsflächen desinfizieren
- Labormantel ist Pflicht: lange Ärmel, geschlossen, Haare zusammenbinden, Händedesinfektion beim Eintritt/Verlassen des Labors, Husten, Niesen, Sprechen vermeiden, Keine Speisen, Getränke, Kaugummis und Handys im Labor
- Geräte, Kulturen: Zügig und genau arbeiten, Aerosolbildung vermeiden (durch Sprühen!), Gefäße nur so lange als unbedingt notwendig öffnen, Nicht über offene Gefäße greifen/hantieren, Bei Hautkontakt sofort desinfizieren, Gewebe- und Blut-Abfall getrennt sammeln und entsorgen, Bei Kontakt steriler Materialien (z.B. Pipettenspitze) mit unsterilen Stellen (z.B. Außenseite eines Gefäßes) neue Kunststoffmaterialien verwenden, Verschüttete Lösungen sofort aufnehmen und desinfizieren

Sterilwerkbank:

- Hochleistungsschwebstofffilter (HOSCH/HEPA-Filter)
- 99,97 % aller Teilchen $>0,3 \mu\text{m}$ werden abgeschieden
- Von 10.000 Partikeln passieren max. 3 das Filtersystem
- Unterschiedliche Werkbanksysteme je nach Anforderung: Reiner Personenschutz (Klasse 1), *Reiner Materialschutz (Klasse 2)*, Personen und Materialschutz (Klasse 3)
- Werkbank mind. 15 min vor Arbeitsbeginn einschalten
- Arbeitsbereich reinigen/desinfizieren (70 % EtOH)
- Luftansaug-/Ausblasschlitz freihalten
- So wenig wie möglich Arbeitsmaterial unter der Werkbank
- Alles wird mit 70 % EtOH eingesprüht bevor es unter die Werkbank gebracht wird
- Nach Arbeitsende die Werkbank aufräumen und desinfizieren

Arbeiten in der Zellkultur: Füttern, Passagieren, Einfrieren/Auftauen

Davor Zellen immer prüfen auf: Morphologie, Zelldichte, Kontamination

Zellen füttern:

Warum? -> Verbrauch der Nährstoffe, Entfernen der Stoffwechselendprodukte, Halbwertszeit der Antibiotika

Wann? -> 1 – 2x pro Woche bzw. 24 – 48 Std. nach Auftauen/Präparation

Wie? -> Medium erwärmen, Altes Medium absaugen, Neues Medium einfüllen

Passagieren:

Warum? -> 24 h Verdopplungsrate, Gefäß voll bewachsen, Wachstumsstopp, Ablösen bzw. Sterben von Zellen

Wann? -> 1x in der Woche, wenn Gefäß voll

Wie? -> Zellen aus Brutschrank nehmen -> unter Sterilwerkbank • Medium absaugen (Pasteurpipette) • „Waschen“ mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) • Trypsin/EDTA zugeben, einige Minuten inkubieren (Beobachtung unter dem Mikroskop) • wenn Zellen abgelöst, Zugabe von TNS (Trypsin Neutralization Solution) oder Vollmedium • Zellen durch vorsichtiges Pipettieren vollständig lösen • Zellsuspension in Reaktionsgefäß überführen und pelletieren • Überstand verwerfen • Zellpellet in Medium resuspendieren (ggf. Zellzahl bestimmen) • Zellen auf „neue“ Flaschen verteilen/ einsäen • Zellen zurück in den Brutschrank

Einfrieren:

Warum? -> Aufbewahrung der Zellen über einen längeren Zeitraum (Monate – Jahre), nur bei sehr tiefen Temperaturen (-80°C bis -196°C), meist Stammkulturen („Stock“), unterhalb von -120°C kommen biochemische Reaktionen zum Stillstand, oberhalb von -70°C verlieren Zellen an Vitalität

Wann? -> Passage der Zellen so niedrig wie möglich

Wie? -> Kryokonservierung in flüssigen Stickstoff, nur in Kryotubes!, nur gesunde Zellen, 1×10^6 – 20×10^6 Zellen in 1ml / Röhrchen, In Kryo Einfrierboxen (ü.N. bei -80°C, dann fl. N₂ bei -196°C), langsames Einfrieren (-1 °C/min), Zugabe von DMSO vor dem Einfrieren, um Zerstörung der Zellmembran durch Eiskristallbildung zu verhindern

Auftauen:

Warum? -> Bedarf an „neuen“ Zellen, Hohe Passage – Wachstumsstop

Wann? -> Bei Bedarf

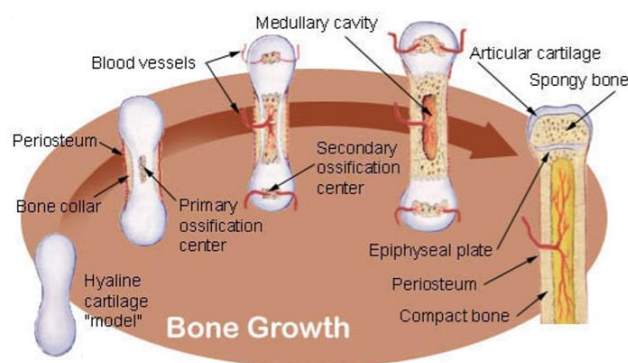
Wie? -> Zügig, DMSO für Zellen schädlich, Überführen der Suspension in 9 ml Medium, Zentrifugation, Aussaat in Zellkulturflaschen

Einführung in das Knochen Tissue Engineering

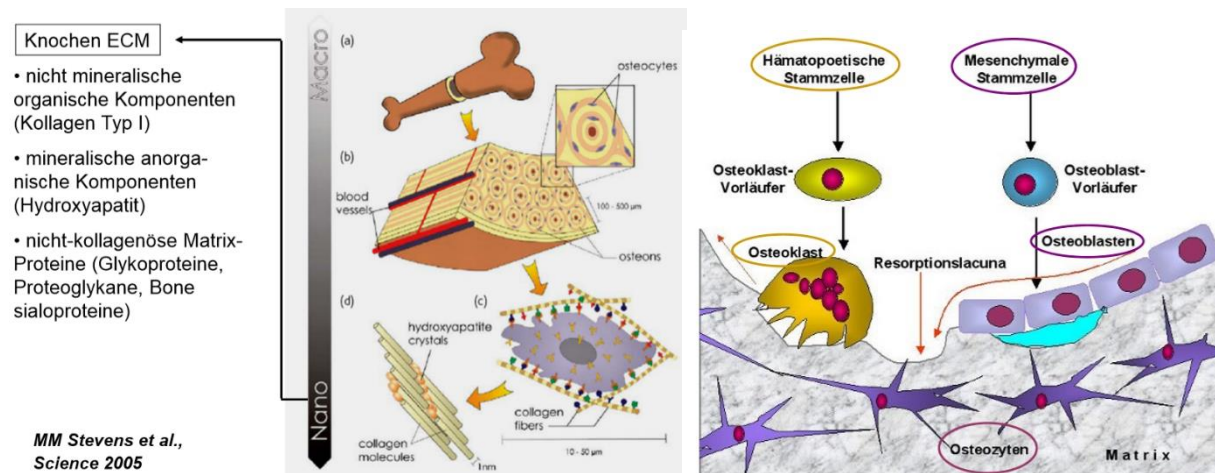
Pathologie

1. Zahnlosigkeit: Kieferknochenschwund (Rückbildung des darunterliegenden Knochengewebes, aufgrund fehlender mechanischer Belastung)
 - ➔ Implantatinstallation nicht möglich
 - ➔ Aufbau von Knochengewebe notwendig
2. Tumore im Mundbereich: Kieferknochenresektionen
 - ➔ Titanimplantat als Ersatzkiefer
3. Lippen-, Kiefer-, Gaumenspalten: fehlender Saugeffekt
 - ➔ Platte am Gaumen

Knochenwachstum



Hierarchische Organisation des Knochens & wichtige Zellen des Knochens



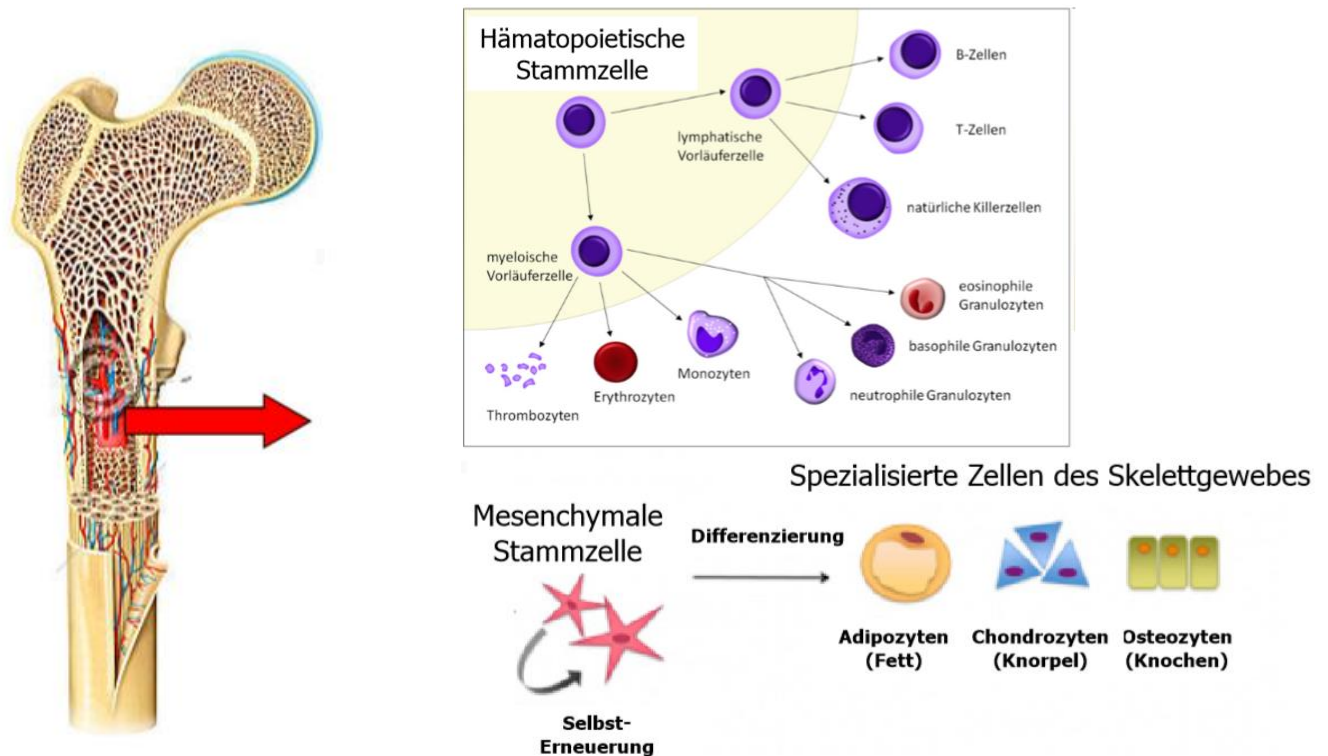
Osteozyten: Versorgungsfunktion, mechanosensitiv

Gold Standard für Knochenregeneration: autologe Knochenmarktransplantation

- ➔ Entnahme aus Beckenknochen: keine Belastungsstelle
- ➔ Nachteile: begrenztes Knochenmaterial; Morbidität der Entnahmestelle
- ➔ Adulte Stammzellen

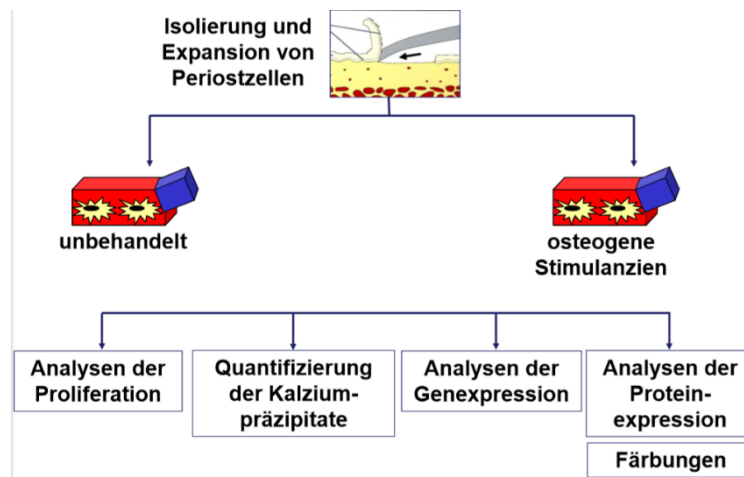
Osteogene Vorläuferzellen

Knochenmark (99% hämatopoietische Stammzellen):



Periost (2-schichtig): stratum osteogenicum: Ort der Stammzellvorkommen
stratum fibrosum: Versorgung

In vitro Kultivierung von Stammzellen



→ Je differenzierter eine Zelle, desto geringer die Proliferationsrate

Unterschiedliches **osteogenes Potential** von Periostzellen:

- Test: Anregen der Osteozyten (Einfärben von Calcium mit Alizarinrot)
- Unterschiedliche Reaktionen auf gleiche Stimulanzen
- Individualmedizin

Knochendifferenzierung: Korrelation mit der **alkalischen Phosphatase**

- Kein direkter Zusammenhang zu Mineralbildung
- Mehrere Signalstoffe beteiligt

Eigenschaften von Biomaterialien für das TE

Biomaterialien

- synthetische Polymere
- Keramiken
- Kompositmaterialien
- Metalle

Eigenschaften

- Biokompatibilität
- biologische Abbaubarkeit
- mechanische Eigenschaften
- Architektur von Poren
- Oberflächenbeschaffenheit

Häufigste Anwendung: Kompositmaterialien -> Kombination Festigkeit & Elastizität

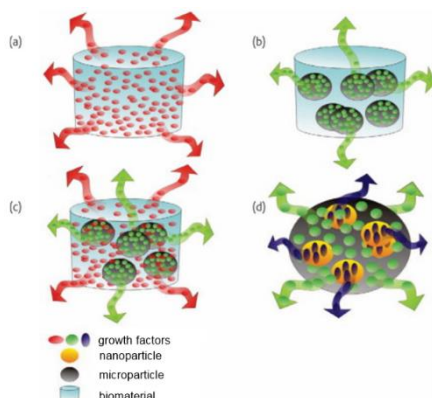
Zell-besiedelte Biomaterialien:

- Kollagen (weiche schwammartige Zylinder)
- Calciumphosphat (brüchig)
- Polylaktid (Kombination der beiden, aber: bildet saures Milieu)

Präzipitate („Knötchen“) in Zell-besiedelten Konstrukten:

- Elementanalyse über EDX-Spektroskopie
- Gewollt bei Osteogenstimulation: **Calciumphosphat**

Potenzielle „drug delivery“ Vehikel:



Biofunktionalisierung der Biomaterialien: Besiedelung mit mesenchymalen Stammzellen

- MSCs bauen Knochen auf und gleichzeitig Biomaterial ab

Einsatz der so gewonnenen „Knochenchips“ in Kiefer- bzw. Knochendefekt, um Knochenwachstum zu induzieren -> Zahnimplantatsinstallation

Immunogenität von mesenchymalen Stammzellen (MSC)

Teile des Immunsystems

Angeborenes Immunsystem	Erlertes Immunsystem
Immunantwort ist nicht-spezifisch	Erreger- bzw. Antigen - spezifische Antwort
Exposition führt zur sofortigen Maximalresponse	Verzögerungszeit zwischen Exposition und Maximalresponse
Zell-vermittelte und humorale Bestandteile	Zell-vermittelte und humorale Bestandteile
Kein immunologisches Gedächtnis	Exposition führt zum immunologischen Gedächtnis

Humoral = lösliche Bestandteile/Faktoren (Zytokine, etc.), Gegenspieler zu zellulärer Antwort

Makrophagen
Granulozyten
Natürliche Killer Zellen
Komplementsystem

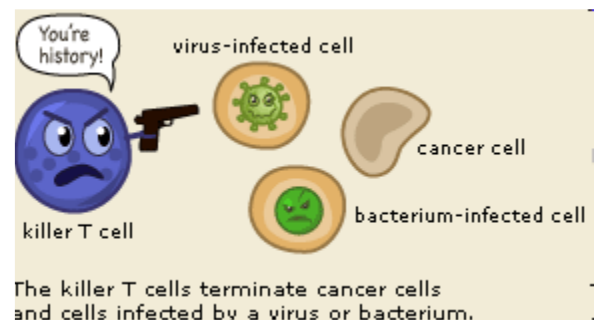
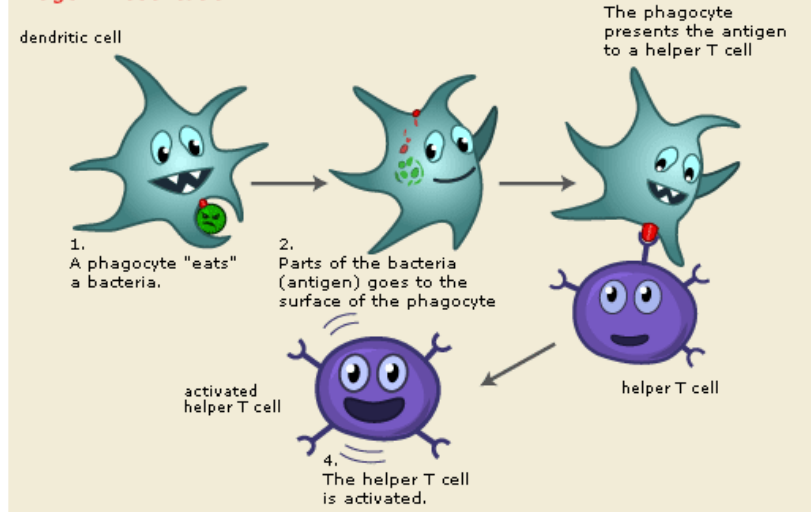
Antigen-präsentierende Zellen
T-Zellen
B-Zellen

Phagozyten – „Fresszellen“

Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen

T-Zellen

Antigen Presentation

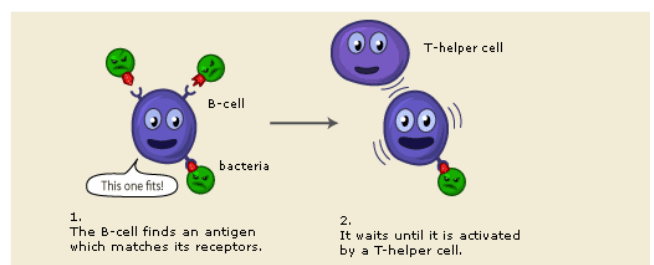


Antigenpräsentation: 1. Phagozytose, 2. Antigene des Bakteriums wird zur Oberfläche transportiert, 3. Phagozyte präsentiert Antigen auf Oberfläche (MHCII Molekül) und T-Helferzelle kann daran binden, 4. Helferzelle durch Bindung an Antigen aktiviert

T-Killerzellen: zerstören Krebszellen und infizierte Zellen

B-Zellen

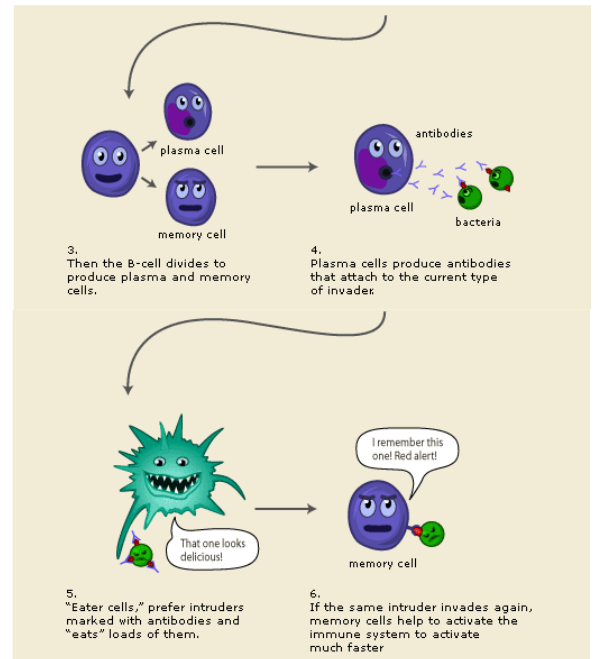
B-Zellen – suchen Antigene, die auf ihre Rezeptoren passen. Durch die Antigenbindung, werden sie leicht aktiviert und weiter zur Proliferation durch ausgeschüttete Zytokine von T-Helferzellen stimuliert.



Vitale Implantate

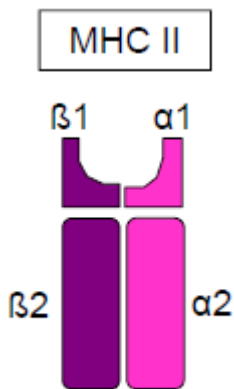
Plasma Zellen – entstehen nach der Teilung der B-Zellen.
Plasma Zellen produzieren sehr schnell Antikörper.

Gedächtnis B-Zellen – entstehen nach der Teilung der B-Zellen. Sie leben länger und erinnern sich an frühere Erreger.

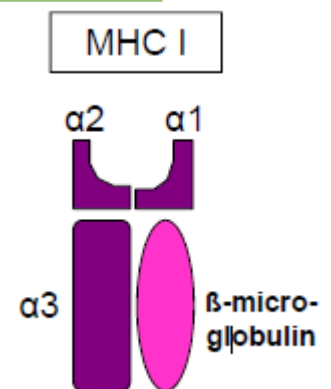


MHC (major histocompatibility complex) Moleküle

MHC I ist auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert und schützt gesunde Zellen vor dem Zerstörungsmechanismus durch natürliche Killerzellen. Bei Tumorzellen runterreguliert!



MHC II ist auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert (B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen) und wird von dem T-Zell Rezeptor der T-Helferzellen erkannt.



Akute lymphatische Leukämie

Häufigste Krebserkrankung im Kindesalter!

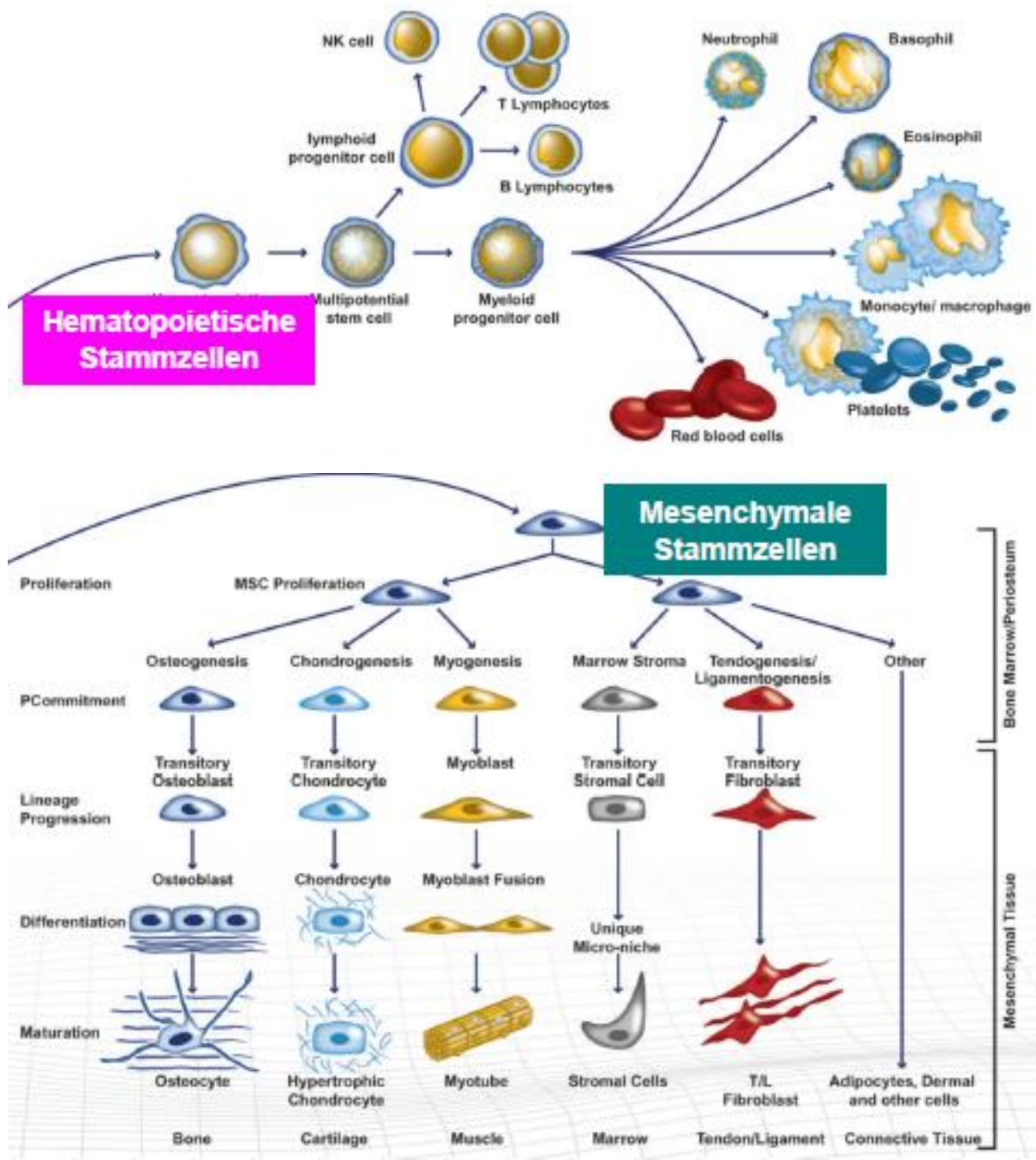
Folge: Knochenmarkinsuffizienz mit Mangel an Erythrozyten und Thrombozyten

Symptome: allgemeine Schwäche (->Erythrozyten) und Blutungsneigung (->Thrombozyten)

Therapieoptionen:

- Bestrahlung und intensive Chemotherapie
- Knochenmark- / Stammzell-Transplantation (Hematopoietische und Mesenchymale SZ)
- Allogene Stammzell-Transplantation (Fremdspender)
- Haplo- (halb-) identische Stammzell-Transplantation (Erbmerkmale, auch die Gewebsantigene, des Kindes stammen zu gleichen Teilen von Vater und Mutter)
- HLA identische Knochenmark- / Stammzell-Transplantation (Geschwister, identische MLCs!)

Adulte Stammzellen aus dem Knochenmark



Knochenmark-Transplantation

Aus dem Hüftknochen eines gesunden Spenders werden Blut-Stammzellen entnommen (CD34+ 1-4% = Oberflächenmarker), die kranken Immunzellen eines Blutkrebspatienten werden abgetötet (Radioaktive Bestrahlung/Chemotherapie -> Knochenmark und somit Großteil des eigenen Immunsystems wird zerstört) -> Die gesunden Blut-Stammzellen bilden ein neues gesundes Immunsystem

➔ Sehr belastend sowohl für Donor als auch Akzeptor

Stammzell-Transplantation (SCT)

- In ca. 80 % der Fälle Entnahme von peripheren Stammzellen
- **G-CSF** (= Faktor zur Aktivierung) wird 5 Tage lang subcutan gespritzt -> vermehrte Produktion von Stammzellen und Freisetzung ins zirkulierende Blut
- Nach Vorbehandlung Stammzellenentnahme über die Leukapherese
- Dauer: in der Regel mindestens vier Stunden
 - ➔ Deutlich angenehmer für Donor, braucht keine OP mehr

Graft-versus-host disease (GVHD)

Häufigste Komplikation nach einer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation von einer fremden Person (allogene Transplantation). Die transplantierten Zellen erkennen die Wirtszellen als "fremd" und greifen diese an.

➔ Lebensbedrohlich, betrifft 50% der Patienten

Behandlung: Transplantation mit mesenchymalen Stammzellen (MSC), 50% der Patienten sprechen auf diese Therapie an!

MSC schwächen die allogene Abstoßung ab

MSC sind **hypoimmunogen**:

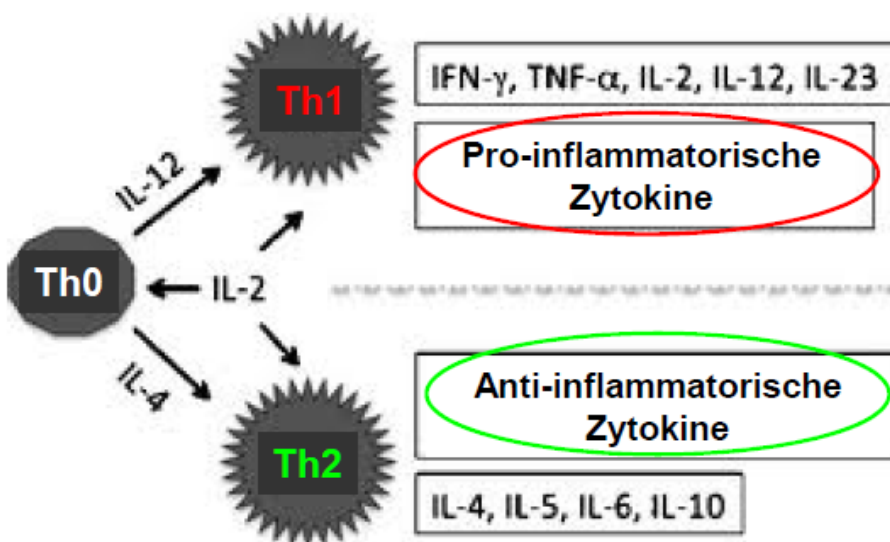
- MSC Antigenpräsentation: MHC class I positiv (schützt vor dem Zerstörungsmechanismus durch NKs, soll positiv sein), keine MHC class II Expression (soll negativ sein, sonst Abstoßung der Stammzellen), keine Expression von costimulatorischen Molekülen für die Aktivierung von Effektor T-Zellen (CD40, CD40L, CD80, CD86) -> MSCs insgesamt sehr „beruhigend“
- MSC exprimieren HLA-G: MSCi ähnlich, wirkt immunsuppressiv, in der Schwangerschaft sehr hoch im fötalen Gewebe damit Embryo nicht abgestoßen wird
- HLA-G ist involviert in der MSC-vermittelten Lymphozyten-Proliferation

MSC **inhibieren die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen (DC)**: Dendritische Zellen präsentieren Antigene, Monozyten allein differenzieren zu reifen dendritischen Zellen, Monozyten zusammen mit MSCs differenzieren zu unreifen Makrophagen.

Nach der initialen Differenzierung von Monozyten zu reifen DCs, bewirkt die Ko-Kultur mit MSCs das Beibehalten der CD14 Expression ohne Aktivierung der CD1a, CD80 oder CD83!

MSC **modulieren die T-Zell Proliferation und den T-Zell Phänotyp**:

- MSC inhibieren die T-Zell Proliferation (CD4+ = Helferzellen/CD8+ = Killerzellen/CD2+ = alle T-Zellen)
- T-Zell Subtypen:



TH1: aktiviert Killerzellen

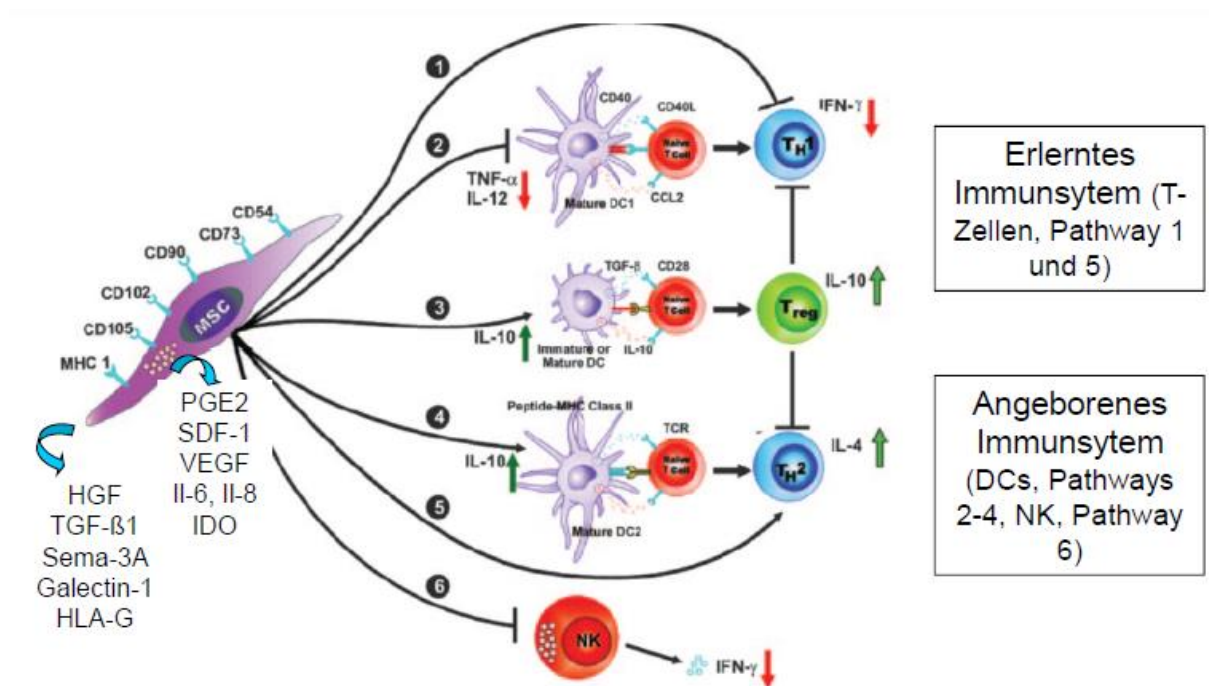
TH2: unterdrückt Immunantwort

Im gesunden Körper herrscht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen beiden

- MSC modulieren den T-Zell Phänotyp – Th1 -> Th2 Shift: nachweisbar über bestimmte Marker
-> IFN- γ für TH1 und IL-4 für TH2, TH1 geht runter, Treg und TH2 gehen hoch, NK (natürliche Killerzellen) geht runter
➔ Anti-inflammatorische Immunantwort

MSC bilden ein lokales immunsuppressives Milieu: MSCs produzieren immunsuppressive Faktoren, sodass die T-Zellen inhibiert werden

Zusammenfassung – immunsuppressive Wirkung von MSC

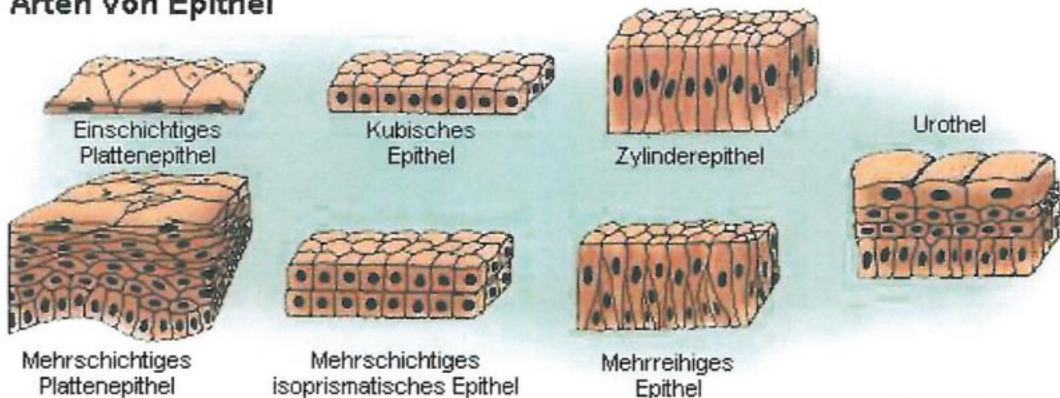


DC = dendritische Zelle, Pfeil bei 1/2/6 = Inhibition

Geweberekonstruktion mit künstlichem Urothel

Wiederholung

Arten von Epithel



Urothel
=
Übergangsepithel

- **Einschichtiges Plattenepithel:** Endothel, Mesothel (Bauchfell und Brustfell)
- **Mehrschichtiges Plattenepithel:** Mundhöhle, Speiseröhre
- **Kubisches Epithel:** Nierentubuli, Speicheldrüsen, Gallengänge
- **Mehrreihiges isoprismatisches Epithel:** Ausführungsgänge der Schweißdrüsen, Netzhaut
- **Zylinderepithel:** Magen- & Darmschleimhaut, Gallenblase
- **Mehrreihiges Zylinderepithel:** Flimmerepithel (Luftwege), Nebenhodengänge

➔ Neu: Übergangsepithel – Mischung aus Platten-, kubisches & Zylinderepithel

- Sehr elastisch, trotzdem dicht
- Kleiden Hohlorgane mit veränderlicher Ausdehnung aus (2-10 Zellschichten)
- Eigenschaften des **mehrschichtigen** und **mehrreihigen** Epithels

Intermediärzellen weder Kontakt mit Basallamina noch mit Epitheloberfläche

Deckzellen reichen mittels langer dünner Fortsätze bis auf Basallamina

Übergangsepithel, ungedehnt



Übergangsepithel, gedehnt

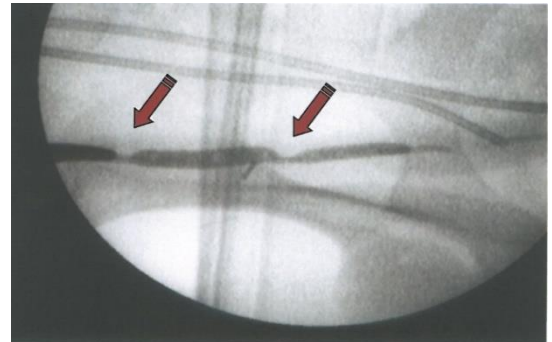


- Ungefüllter Zustand hochprismatisch
- Flachen mit zunehmender Füllung ab
- Reservefalten in Zellmembran ermöglichen Dehnung

Warum?

Verletzung der Harnröhre (HR) die unter Umständen einen chronischen Verlauf annehmen kann, aber auch iatrogene Ursachen (ca. 50% durch ärztliche Eingriffe)

- Männliche Radsportler, zu hohe punktuelle Belastung durch kleinen Sattel
→ Verschluss der HR
- Transurethrale Prostatektomie
- Beckentrauma
- Endoskopische Eingriffe
- Katheterzufuhr
→ Bsp. Querschnittsgelähmte Patienten



Röntgenaufnahme einer porcinen Harnröhre

Bisherige Therapien:

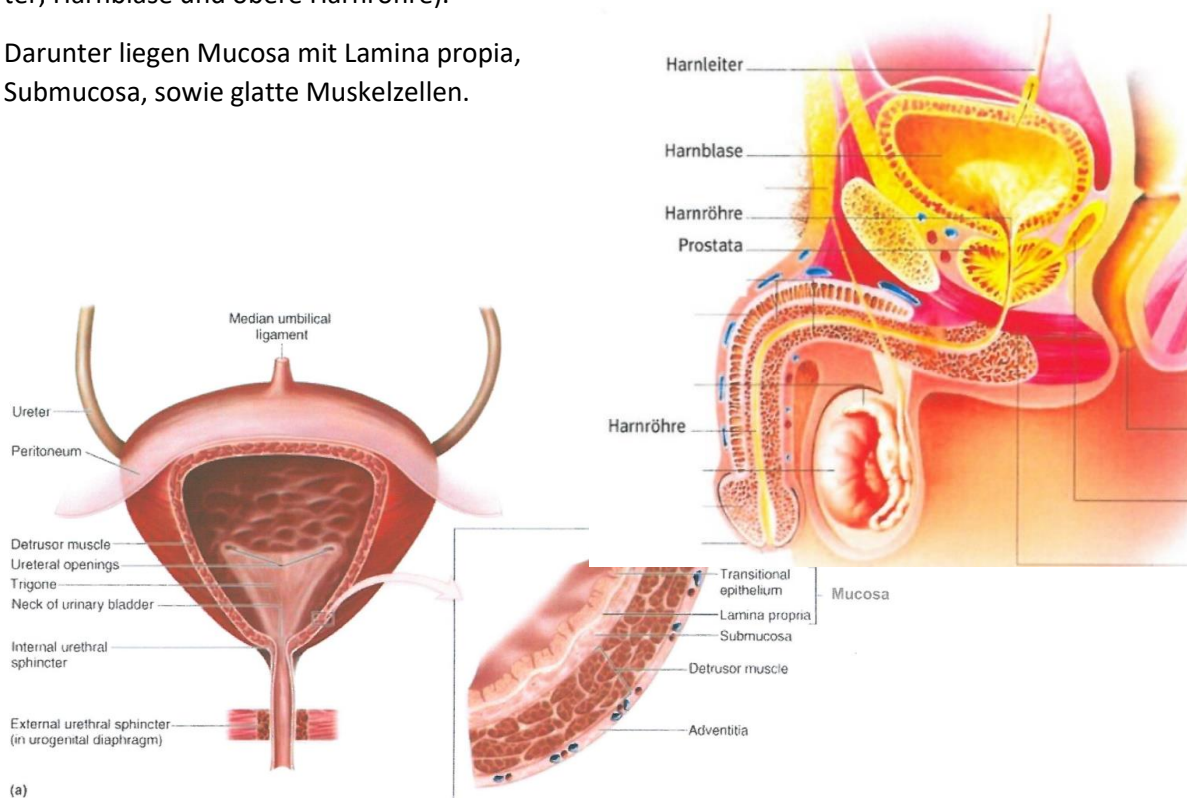
- Endoskopische Schlitzung durch Bauchwand
→ Keine Dauerlösung, hohes Infektionsrisiko
→ Nur bis HR angeheilt, sodass durchströmender Harn keine Gefahr darstellt
- Ende-zu-Ende Anastomose (nur bei < 1cm)
- Transplantate (Wangenschleimhaut)

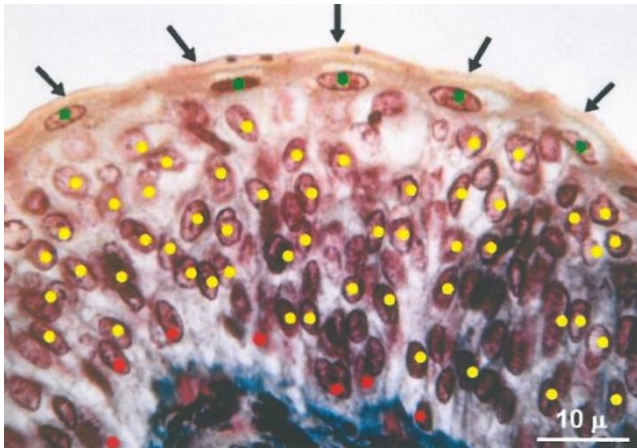
Primäres Ziel ist es, Harnröhrenstrikturen (Verengung durch Narbengewebe, siehe Pfeile) zu behandeln. Außerdem sollen Rekonstruktion von Harnleiter, -blase und -röhre verwirklicht werden.

Das Urothel

Als Urothel bezeichnet man das luminale Epithel der ableitenden Harnwege (Nierenbecken, Harnleiter, Harnblase und obere Harnröhre).

Darunter liegen Mucosa mit Lamina propria, Submucosa, sowie glatte Muskelzellen.





Deckzellen:

Oberste Zellschicht mit parallel ausgerichteten Kernen, liegt schirmartig auf. Cytoplasma apikal deutlich verdichtet (Crusta).

Intermediärzellen:

Nur teilweise auf Basallamina, mit Basalzellen verbunden

Basalzellen:

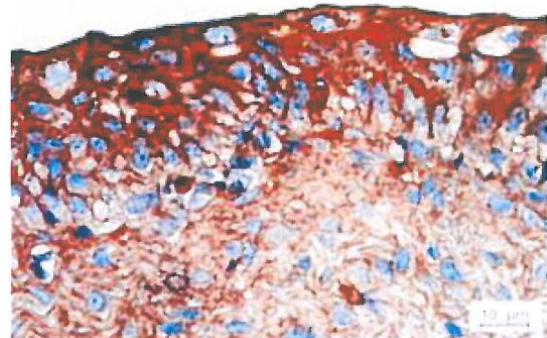
Sitzen alle auf Basalmembran, sind mit ihr verankert.

Crusta

Schleimschicht, die das Urothel auf verschiedene Weisen schützt:

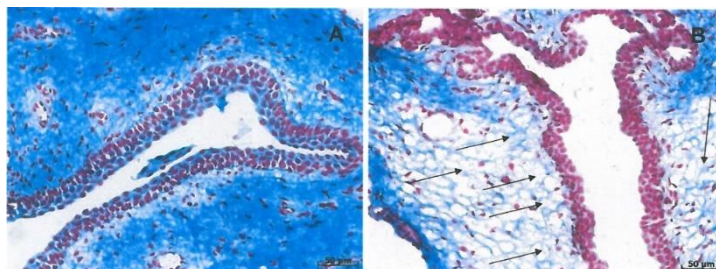
- Besteht aus eng aufeinanderliegenden Mikro- und Intermediärfilamenten
- Eingelagerte Membranvesikel mit Membranproteinen die für Urothel typisch sind (Uroplakine – Transmembranproteine in Deckzellen, mechanische Widerstandsfähigkeit)
- Oberfläche der schirmartigen Deckzellen mit GAG's (Glykosaminoglykane) bedeckt
 - Werden von Epithelzellen sezerniert
 - Verhindern Harnsteinbildung (Harn nicht sauer genug, z.B. durch Nierenfunktionsstörung, erhöhen Löslichkeit von Ca^{2+} -Ionen -> geringere Harnsteinbildung)
- Barrierefunktion gegen Infektionen

Immunhistologischer GAG Nachweis



Harnröhrenstriktur

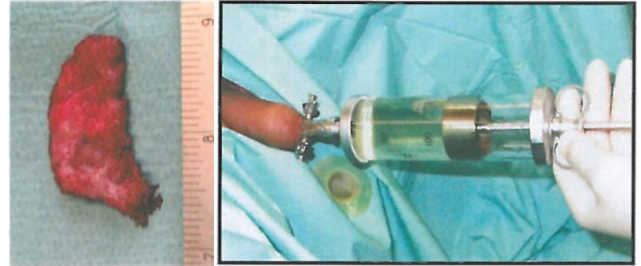
- Nach einer Striktur verändern sich die Strukturen des Urothels, sowie die darunterliegenden Strukturen
- Vergleicht man A und B, sieht man, dass nach einer Striktur (B) eine ausgeprägte Spongiofibrose den darunterliegenden corpus spongiosum in ein instabiles, möglicherweise undichtes Gewebe verwandelt hat



➔ Azan-Färbung nach Heidenhain (blau: kollagen & retikuläres Bindegewebe, rot: Urothel) – Querschnitt porciner Penis

- Gewinnung von UC's (Urothelzellen) auf verschiedene Wege
 - „Spülflüssigkeit“ – UC's durch Urin mittels mechanischer Kräfte aus Harnröhre mitgerissen
 - Gewebebiopsie (Praktikum) - Ablösen und kultivieren der Zellen aus Spendergewebe (meist autolog)

- Arbeitsschritte
 - Biopsat oder Blasenflüssigkeit gewinnen
 - Isolierung und Kultivierung der UC's
 - Induktion der Stratifizierung
 - Autologes, mehrlagiges Transplantat

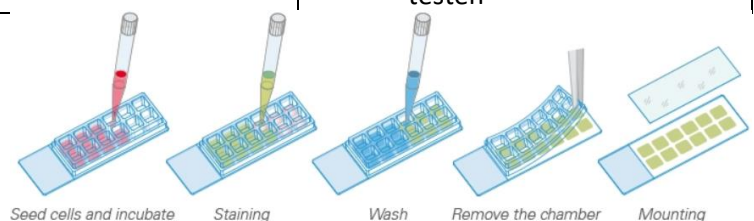


	Tag	Prozess	Kontrollen
Phase I – Isolierung	1	Zellisolierung, Aussaat in Zellkulturflasche (T25) Kultivierung in CnT-07-Medium mit Gentamicin	→ Zellzahlbestimmung → Photodokumentation (PD) der Zellen in Suspension
Phase II – Kultivierung 1	2-19	Mediumwechsel jeden 2./3. Tag, Medium nun ohne Gentamicin	→ Zellmorphologie kontrollieren und PD → Sterilität überprüfen (min. 6 Tage ohne Gentamicin)
Phase III – Passagierung	20	Herauslösen der Zellen, und Überführung in neue Behälter („Forschung“ wieder T25, klinisch in Petrischalen) Medium ohne Gentamicin	→ Zellmorphologie kontrollieren und PD → Prüfung auf Mykoplasmen und Endotoxinnachweis
Phase IV – Kultivierung 2	21-29	Mediumwechsel jeden 2./3. Tag, Medium nun ohne Gentamicin	→ Zellmorphologie kontrollieren und PD
Phase V – Stratifizierung	30-40	Mediumwechsel mit CnT-02-Medium + CaCl_2 (Stratifizierungsmedium) Jeden 2./3. Tag wechseln	→ Zellmorphologie kontrollieren und PD → Nach Induktion der Stratifizierung, Sterilitäts- und Mykoplastentest
Phase VI - Transplantat		Enzymatisches Ablösen des Urothelhäutchens (Dispase-Lösung) Vorbereitung für OP-Transport	→ Vor/Nach Ablösung Morphologie kontrollieren und PD → Zellkulturüberstand auf Sterilität und Mykoplasten testen

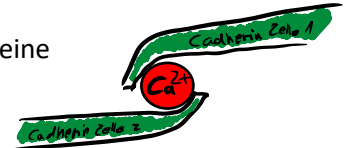


← T25 (25 cm²)

Chamber Slides →



- Zellen werden ohne Antibiotika kultiviert, um mögliche Kontaminationen zu bemerken und auch ausschließen zu können
- Mikroplasmien werden von Antibiotika nicht zerstört!
 - Parasitär intra- oder extrazellulär Lebende, sehr kleine Bakterien
 - Quasi unmöglich aus Zellen zu entfernen
 - Unsichtbar mit Lichtmikroskop
 - Besitzen keine Zellwand
 - Können Zelle beeinflussen, ohne dass man es merkt
 - Können Krankheiten übertragen (z.B. Tuberculose)
- CaCl_2 wird verwendet, da Ca^{2+} für die Zelladhäsion unerlässlich ist
 - Cadherine sind von Ca^{2+} abhängige, transmembrane Glykoproteine
 - Gleicht negative Carboxylgruppen aus
 - „S-Bahnverbund“

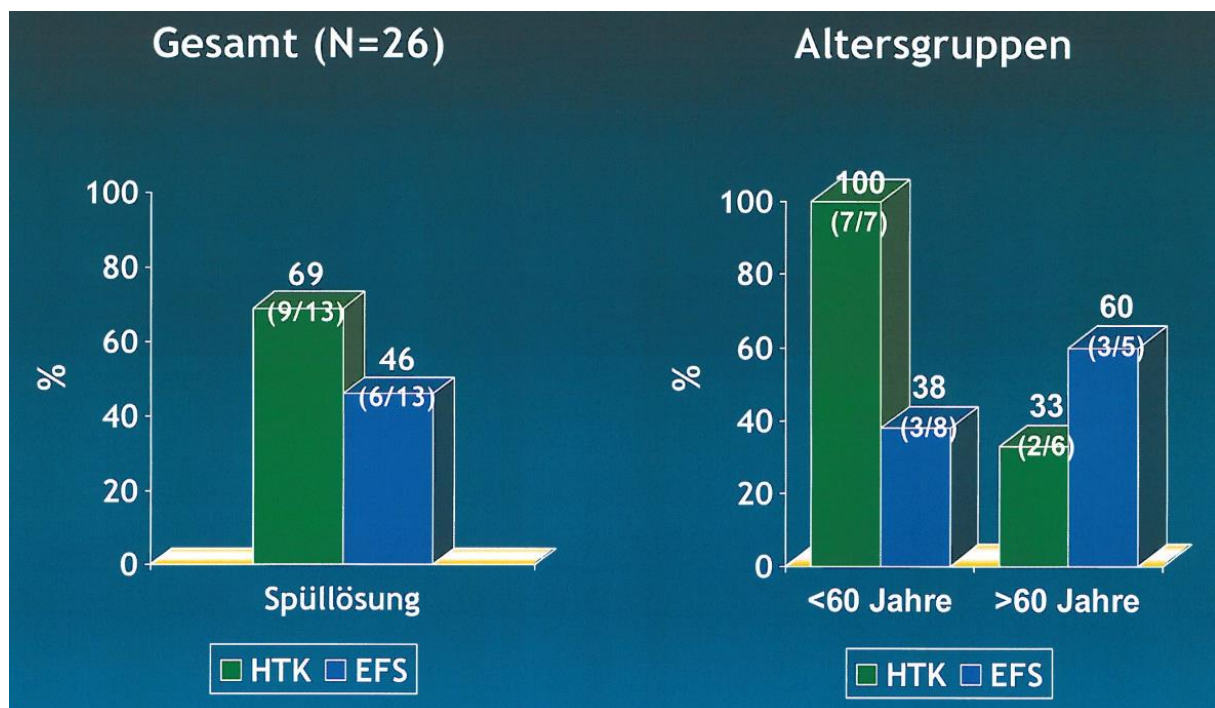


Histologie und Markerexpression

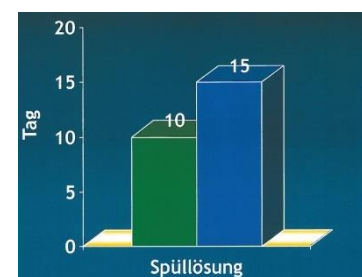
- Verschiedene Marker für Urothelzellen
 - **CK20** – Cytokeratin 20, bindet an Schirmzellen/Deckzellen
 - **P63** – Nukleäres Protein stratifizierter Urothelzellen, bindet an Basalzellen und Progenitorzellen
 - **Uroplakin** – Differenzierungsmarker von Urothelzellen, nur im Urothel exprimiert
 - **Uroplakin III** – Terminale Differenzierung von Urothelzellen zu Schirmzellen
 - **AE1/AE3** – Pancytokeratin (heißt es beinhaltet verschiedene Cytokeratine), beinhaltet mehrere Marker
 - **Schirmzellen** – CK20, Uroplakin I-III
 - **Intermediärzellen** – CK7, 7, 17, 18, 19
 - **Basalzellen** – CK5, 14, 17
- Üblicherweise wird eine Zellkultu auf Urothelzellen getestet (z.B. mittels AE1/AE3), aber es werden auch Gegenproben gemacht, um Infiltration durch andere, körpereigene Zellen, zu überprüfen (z.B. auf MSC's mittels α -SMA (Smooth Muscle Actin) oder TE-7)
- Wichtig ist, dass Histologie und die Markerexpression artifiziieller Urothelzellen dem in vivo Vorbild vergleichbar sind
- Weitere Marker:
 - E-Cadherine (epitheliales Adhäsionsprotein) -> Nachweis von Desmosomen
 - ZO-1 (Zona Occludens – epitheliales Adhäsionsprotein)
 - > Nachweis von Tight Junctions
 - Immunfluoreszenzfärbungen (Bsp.: **PKH26**, **DAPI Kernfärbung**, ...)

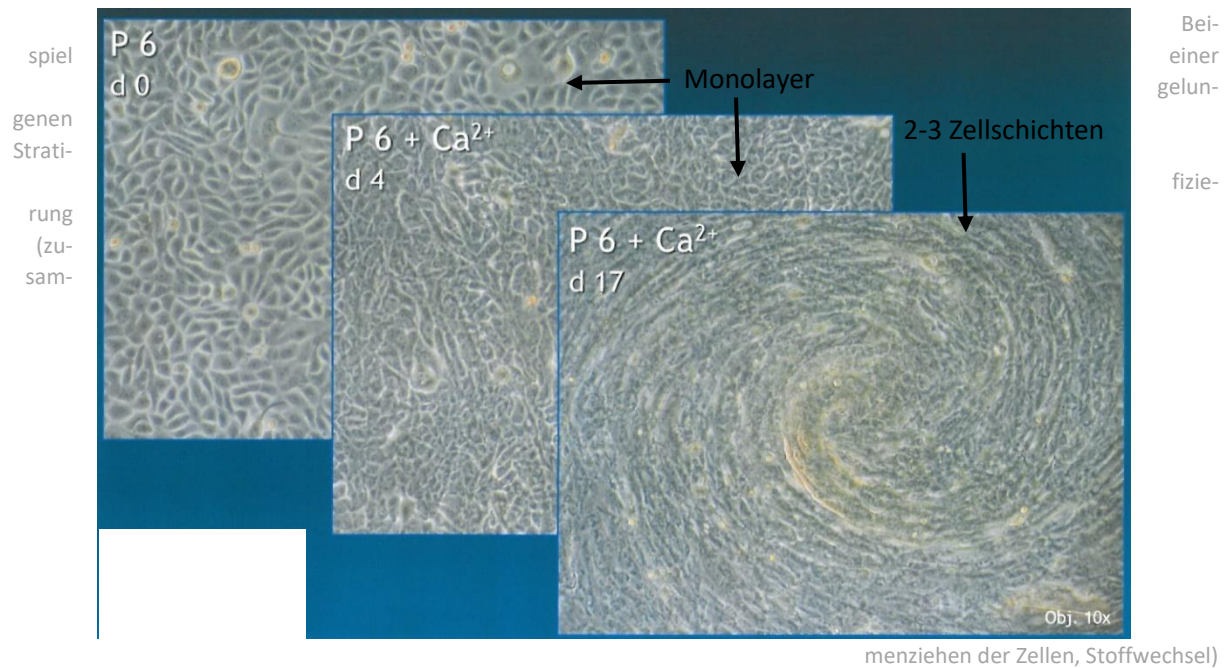
Daten zum Forschungsprojekt Urotheltransplantat

- Vor einigen Jahren forschte das Urologielabor an einem transplantablen Urothelersatz, den man mithilfe des TE herstellen sollte
- Züchten des Urothels, Probleme und Erfolge:
 - Entnahme und Prozessierung der Blasespülflüssigkeit
 - Es wurde keine Gewebeprobe genommen, da die Entnahme des Urins keinen Eingriff erfordert, sodass die Zulassungen deutlich einfacher sind
 - Eine klassische Zellgewinnung beinhaltetete 150 ml Blasespülflüssigkeit
 - Dabei wurde auf T25 Behälter verzichtet, um die Ablösung der Stratifizierung zu vereinfachen
 - Primäre Zellkultur
 - Für eine Zulassung musste man 3 Produktionszyklen unmittelbar hintereinander erfolgreich abschließen



- Wie man oben sieht, waren die Erfolgsraten sehr variabel
 - Bei jungen Spendern wurden öfter Erfolge erzielt
 - Jedoch ist Erfolgsrate zu gering (Faustregel: Deutlich über 90%)
- Auch die Wahl der Spülflüssigkeit ist hier nicht eindeutig justified
- Bei der Generierung handelt es sich um einen langen Prozess
 - Zellalterungsprozesse sind von Bedeutung (Telomere)
 - Je länger die Dauer, desto teurer wird das Projekt
 - Ca. 18 Tage nach Zellaussaat waren die Zellkulturen groß genug (Standardmedium) -> polygonale Zellkulturen
 - Auch bei Definierten Medium dauerte es immer noch ca. 9 Tage





Inprozesskontrollen

Prüfparameter	Prüfmethode	Spezifikation/Ergebnis	Prüfhäufigkeit	Prüfzeitpunkt
Indikation und Eignung für Blasenspülung	Urinstatus	unauffällig	100%	vor jeder Blasenspülung
Patientenidentität	Prüfung der Identität des auf dem Transportprotokoll genannten Patienten	ist ident	100%	vor Beginn der Urothelzellkultur
Sterilität ¹⁾ nach aktueller Ph. Eur.	Keimzahlbestimmung (qualitativ)	keine Keime nachweisbar	100%	Kulturmedium: - Tag 6 nach Weglassen des Antibiotikums - Beginn der Stratifizierung - unmittelbar vor Ablösen des Urotheltransplantates
Nachweis von Mykoplasmen²⁾ nach aktueller Ph. Eur.	Mykoplasmentest mit PCR	keine Mykoplasmen nachweisbar	100%	Kulturmedium: vor der Zellpassage
Parallelkultur anlegen für Zelldiagnostik im Rahmen der Validierung	Immunzytochemie auf epitheliale Zellmarker AE1/AE3	≥ 95 % AE1/AE3 positive Zellen	100%	während der Herstellung
Nachweis des Antibiotikums ¹⁾	Hemmstofftest	kein Hemmhof nachweisbar	100%	Beginn der Stratifizierung

Spezifikationen des Endprodukts

Prüfparameter	Prüfmethode	Spezifikation/Ergebnis	Prüfhäufigkeit	Prüfzeitpunkt
Identität (Patient, Urotheltransplantat, Chargendokumentation)	Deklaration stimmt mit Inhalt und Chargendokumentation überein	ist ident	100%	nach Herstellung und bei Abgabe
Gewebemorphologie mikroskopisch	Mikroskopische Kontrolle	Gewebe ist mehrschichtig	100%	nach Herstellung
Bakterielle Kontamination mikroskopisch	Mikroskopische Kontrolle	keine Bakterien zu beobachten	100%	nach Herstellung
Gewebemorphologie/-integrität makroskopisch	Makroskopische Sichtkontrolle	intaktes Transplantat (keine bis geringe Lochbildung)	100%	bei Abgabe
Sterilität ^{2), 3)} nach aktueller Ph. Eur.	Keimzahlbestimmung	keine Keime nachweisbar	100%	Kulturmedium: Endproduktkontrolle bei jeder Herstellung unmittelbar vor Ablösen des Urotheltransplantates
Nachweis von bakteriellen Endotoxinen^{1), 3)} nach aktueller Ph. Eur.	Endotoxintest (LAL-Nachweis)	< 0,5 EU/ml	100%	Kulturmedium: Endproduktkontrolle bei jeder Herstellung unmittelbar vor Ablösen des Urotheltransplantates

Fazit

Diese Technologie hatte sehr gute Erfolge in Laborversuchen und Kleinterversuchen sowie Großtierversuchen. Auch die Erlaubnis für klinische Studien wurde erteilt, jedoch zeigte sich, dass diese artifizierten Urothelien beim Menschen ungeeignet sind. Sowohl beim Implantieren als auch bei der darauffolgenden Heilung wurden unüberbrückbare Probleme festgestellt, sodass es nie zu klinischen Studien gekommen ist. Das Urothel hält den mechanischen Belastungen im menschlichen Körper in dieser Form nicht stand. Zusätzlich war es zu fragil für den Transplantationsprozess. Es gilt jedoch als erfolgreiches Proof-of-Principle.

Jedoch ist die Notwendigkeit eines solchen oder ähnlichen Produkts (aktuelle Forschung Aicher) rentabel. Allein in Deutschland gibt es Schätzungsweise ca. 30.000 OP-Bedürftige pro Jahr im Falle einer Harnstriktur. Weltweit ist der Markt, vor allem im Westen, riesig.

GMP-Herstellung



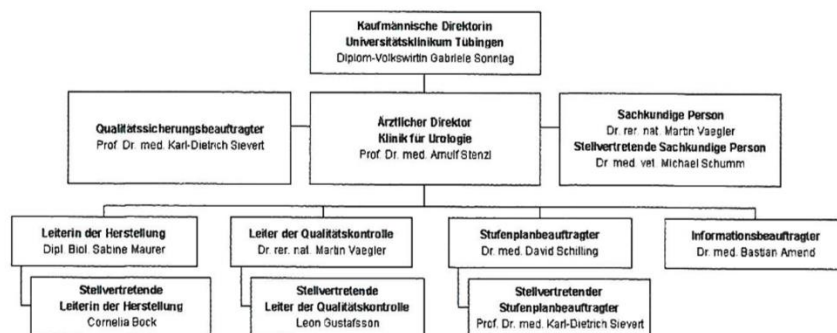
- Urotheltransplantate werden in Deutschland nach dem Arzneimittelgesetz §13 hergestellt
 - Umfasst klinische Anwendung und Rekonstruktion der Harnröhre
- GMP steht für Good Manufacturing Practice, ist EU-Richtlinie
 - EU-Richtlinien müssen durch jedes Land in Landesrecht umgewandelt werden
 - In Deutschland wird GMP durch folgende Richtlinien vertreten:
 - Das Arzneimittelgesetz (AMG)
 - Die Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung (AMWHV)
 - Transplantationsgesetz (TPG)
 - Gewebegesetz

1. Qualitätssicherung

- Entwicklung eines Systems, das gleichbleibende Qualität gewährleistet
- Produktion eindeutig beschrieben, keine Abweichung zum Herstellungsprotokoll
- Spezifikation und Kontrolle der Ausgangsmaterialien, Zwischen- und Endprodukte
- Gerechte Lagerung
 - Bsp. Urothel vorher: prüfen auf Tumorverdacht, Urinstatus und Serologie
 - Inprozesskontrollen: Sterilität, Hemmstoff, Mykoplasmen, Endotoxine

2. Personal

- Sachkundige Person (QP)
 - Hauptverantwortlicher im Herstellungsprozess
 - Genehmigung und Kontrolle von Prüfanweisungen
 - Gewährleistung, dass jede Charge den Vorschriften entspricht
 - Apotheker, Mediziner oder Biologe, mind. 2 Jahre Erfahrung
- Leiter der Herstellung (LH)
 - Produktion und Lagerung von Arzneimitteln
 - Erstellung Herstellungsanweisungen/Validierung kritischer Schritte
 - Verantwortlich für Geräte im Herstellungsprozess
- Leiter der Qualitätskontrolle (LQK)
 - Prüfung Ausgangsstoffe und hergestellter Arzneimittel
 - Kontrolle jeglicher Verpackungen, Wareneingang, Zwischenprodukte...
 - Nie Karton in Reinraum, da Sporeneinlagerung durch Lagerung im freien -> Kontamination
 - Plastik immer Absprühen
 - Erstellung von Prüfungsanweisung und Kontrolle der Einhaltung



3. Räumlichkeit und Ausstattung

- Arzneimittelproduktion findet im Reinraum statt
 - Für jeden Zweck gibt es geeignete Reinheitsklasse
 - Ausreichende Größe
 - Leicht zu reinigen
 - Minimale Kontamination
 - Getrennte Aufenthaltsräume
 - Definierte Parameter: Luftdruck, -feuchtigkeit, Belüftung, Temperatur etc.

- Sorgfältige Instandhaltung und regelmäßige Wartung
- Logische Anordnung der Herstellungsschritte, um Bewegung zu vermeiden
- Reinraumklasse

- Reinnräume arbeiten mit sterilem Überdruck, sodass immer nur sterile Luft ausströmt, und nie kontaminierte Hinein

- **Schwarzbereich** – Zugangskontrollierter Bereich

- **Reinraum Klasse D** – Lager

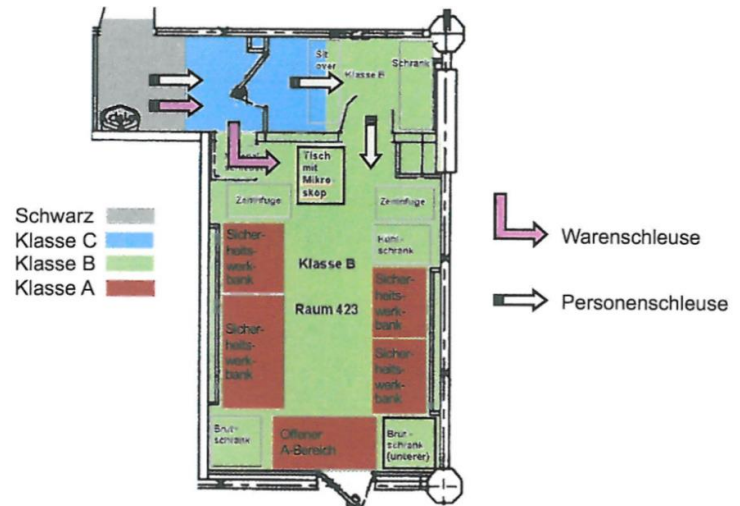
- **Reinraum Klasse C** – Unsteriles Arbeiten

- **Reinraum Klasse B** – Umgebung von A

- **Reinraum Klasse A** – Steriles Arbeiten am offenen Produkt



Sitover in Schleuse nach C

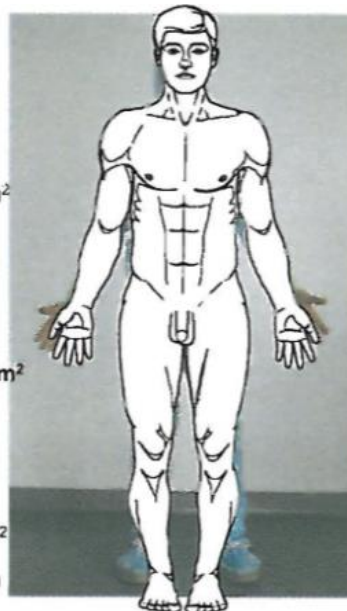


- Kontaminationsquelle Mensch

- 80% der Kontaminationen durch Menschen, nur 15% durch Materialien und 5% über die Luft
- Menschen verlieren 10^9 Hautzellen am Tag, 10% davon bakteriell kontaminiert

➔ Je schneller/weiter man läuft, desto mehr Zellen verliert man (deswegen alles Arbeitsschritte in unmittelbarer Nähe)

Unbedeckte Haut (Stirn)	$10^5 - 10^6/\text{cm}^2$
Kopfhaut	$1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$
Nasen/Rachenraum	$10^6 - 10^7/\text{ml}$
Mund (Speichel)	$10^5 - 10^6/\text{ml}$
Bedeckte Haut (Rücken)	$500 - 1000/\text{cm}^2$
Schweißzentren (Achselhöhle)	$1,5 \times 10^6/\text{cm}^2$
Magen	$10^3 - 10^5/\text{g}$
Duodenum	$10^3 - 10^6/\text{g}$
Hand	$1000 - 6000/\text{cm}^2$
Blind- und Dickdarm	$10^8 - 10^{10}/\text{g}$
Fingerkuppe	$20 - 100/\text{cm}^2$
Genitalbereich	$0 - < 1000/\text{ml}$
Analbereich	bis zu $10^{11}/\text{cm}^2$
Füße	$100 - 1000/\text{cm}^2$



Kopfhaube/Haarnetz
 Maske/Mundschutz
 Kragengestaltung
 Overall
 (Hält bis zu 99% der Kontamination des Trägers zurück)
 Ärmelbund
 Handschuhe
 Mikrofaserunterwäsche
 (Doppelbarriere, hält bis zu 70% der Kontamination des Trägers zurück)
 Socken und Überstiefel

Pumpeffekt

(ges. Hautoberfläche erneuert sich aller 4 d)

4. Dokumentation

- Dokumentarten umfassen:
 - Spezifikationen Anfangs- und Endprodukt
 - Herstellungsvorschriften/-anweisungen (HS-SOP)
 - Prüfvorschriften/-anweisungen (QK-SOP)
 - Protokolle (Herstellungs-, Prüfungs-, und Schulungsprotokoll)
 - Pläne und Berichte (Validierung, Wartung und Schulung)
 - Masterdokumente die als Vorlage dienen
 - Beinhaltet Herstellungsstätte, Validierung, Hygieneplan, Wartungsplan, Schulungsplan

5. Schulungen

- Kenntnis der wichtigsten Inhalte der GMP für Arzneimittel
- Kenntnis und Einhaltung der Vorgaben zur Herstellung spezifikationskonformer Arzneimittel
 - Bsp.: Unaufmerksamkeiten vermeiden, schlechte Gewohnheiten vermeiden, keine Zeit für „scheinbar“ unwichtiges, eigene Regelauslegung (5min weniger Zentrifugieren)
- Würde ich mein eigenes Produkt benutzen?

6. Produktion

7. Qualitätskontrolle

8. Herstellung im Lohnauftrag

9. Beanstandung und Produktrückruf

10. Selbstinspektion

Grundlagen der Gewebeaufbereitung

Gewebeprobe: Stück eines/r humanen Harnleiters/Harnblase

Primärkultur

- Die Arbeiten werden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Gewebeprobe (Harnleiter/Harnblase) wird in einer Petrischale mit 5 ml Keratinozytenmedium aufgenommen, um ein Dehydrieren zu verhindern. *Sauerstoff ist toxisch*
- Mit Hilfe steriler Pinzetten und einer Schere werden noch vorhandene Fett- und Gefäßreste abpräpariert und der Harnleiter anschließend der Länge nach aufgeschnitten. Die Reste werden entfernt, um beim Ablösen nur Urothelzellen zu erhalten.
- Anschließend wird das freipräparierte Gewebestück in 15 ml Strippinglösung überführt und in ein 50 ml Bluecap-Falcon aufgenommen. Das EDTA (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) der Strippinglösung bindet das Calcium und Magnesium, wodurch die Zell-Zell-Kontakte gelöst werden. *Oberste Schicht abgelöst ohne restliche Zellen*
- Nun erfolgt die Inkubation bei 37 °C über einen Zeitraum von 3 Stunden. *Zellverband wird aufgelöst*
- Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschaber mechanisch vom Gewebestück abgestrippt. Dies geschieht in einer mit 3 ml KC-Medium benetzten Petrischale. Im Medium ist Serum, enthalten Proteaseninhibitoren -> Damit Zellen nicht mehr weiter verdaut werden
- Das Gewebe wird nochmals mit 3 ml Medium abgespült und das gestrippte Material in einem 50 ml Bluecap-Falcon gesammelt.
- Bei 200 g wird das Material 5 Minuten lang zentrifugiert. Die Bremse ist mit 1-2 niedrig eingestellt, da das sich bildende Pellet eine weniger hohe Stabilität aufweist und somit eine erneute Aufwirbelung vermieden werden kann. *Zentrifugation bei RT;*
- Der Überstand im Falcon wird abgesaugt, ohne das Pellet zu beeinträchtigen und anschließend in 2,5 ml Medium aufgenommen und resuspendiert.
- Nach mehrfacher Aspiration mit der Pipette, werden die Zellen in eine T25 Kulturfalsche ausgesät.
- Anschließend wird die Primärkultur bei 37 °C und 5 % CO_2 im Inkubator kultiviert. *Luftfeuchtigkeit -> Feuchtigkeitsgesättigte Atmosphäre, Schutz der Zellen*
- → 5 % CO_2 um den pH-Wert des Mediums auf 7,4 zu regulieren

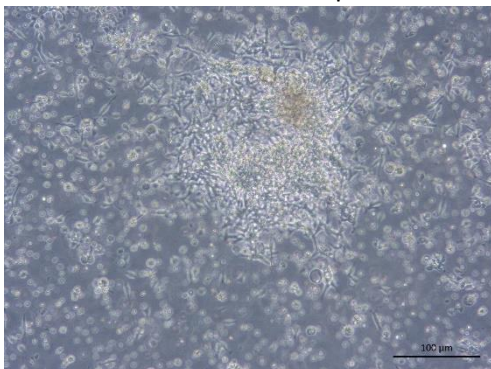


Abbildung 1 Primärkultur Tag 1

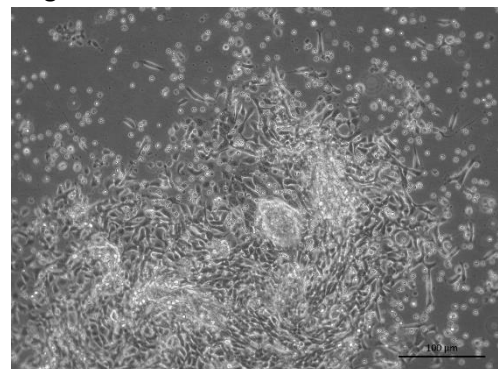


Abbildung 2 Primärkultur Tag 2

Urothelzellkultur

Passagieren von Urothelzellen

Zellmaterial: bereits vorkultivierte Urothelzellen, davon muss mindestens 80 % konfluent sein, um eine Passagierung durchzuführen

- Das vorhandene Medium in der T25 Kulturflasche wird abgesaugt und anschließend 2,5 ml des 0,1 % EDTA in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ über die Zellkultur zugegeben.
- Das EDTA bindet Calcium und löst somit die Zell-Zell-Kontakte.
- Die Urothelkultur wird bei 37 °C 8 Minuten inkubiert. In der Mikroskopischen Kontrolle ist sichtbar, dass sich die Zellen abgerundet und voneinander gelöst haben.
- Die Zellen haften jedoch weiterhin am Boden der Kulturflasche, wodurch die EDTA/PBS-Lösung abgenommen werden kann, ohne dass es zu einem Zellverlust kommt.
- Nun kann TrypLE Express, eine trypsinhaltige Lösung, auf die Zellen gegeben werden.
- Nach einminütiger Inkubation bei 37°C wird ringsherum auf die Kulturflasche geklopft, wobei darauf geachtet werden muss, dass keine Flüssigkeit in die Deckelmembran gelangt. Dieser Prozess in Verbindung mit der aggressiven Protease bewirkt die Ablösung der Zellen vom Untergrund.
- → Die Passagierung erfolgt in zwei Schritten, damit die Zellen sanfter abgelöst werden. Trypsin allein wäre zu aggressiv und würde einen großen Zellschaden hervorrufen. Es wird deshalb nur in Verbindung mit EDTA verwendet.
- Anschließend werden die Zellen mit 5 ml Medium abgespült. Durch das Medium wird das Trypsin inaktiv [Serinproteasen], so dass die Zellen keinen folgenden Schaden nehmen. Durch erneutes Spülen mit 5 ml Medium wird sichergestellt, dass eine möglichst hohe Zellzahl weiterverwendet werden kann.
- Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Bluecap-Falcon überführt und bei 200 g, 5 Minuten bei einer Bremse von 1-2 zentrifugiert.
- Der Überstand wird so abgesaugt, dass das Pellet nicht aufgewirbelt und beeinträchtigt wird. Die Zellen des Pelletes/Das Zellsediment/Zentrifugat werden dann in 5 ml Medium aufgenommen. Jeweils 200 µl werden in zwei Kammern eines Chamber Slides pipettiert für eine spätere immunzytochemische Färbung durchzuführen, die übrige Zellsuspension in zwei neuen Kulturflasche ausgesät.

Mediumwechsel Primärkultur

Zellmaterial: humane Urothelzellen eines Harnleiters

- Die Zellkultur/Zellkulturflasche wird aus dem Inkubator entnommen und mit Hilfe eines Mikroskops auf ihre Morphologie und mögliche Kontaminationen untersuchen.
- In der Sterilarbeitsbank saugt man das Medium ab, um so Abbauprodukte zu entfernen. Der Boden der Kulturflasche soll hierbei nicht berührt werden, um ein Ablösen der Zellen zu vermeiden.
- Anschließend 5 ml Keratinozytenmedium auf die Zellen geben, um deren Nährstoffversorgung weiterhin zu gewährleisten.
- Nun wird die Zellkultur erneut bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.

Stratifizierung urothelialer Zellen in vitro

Zellmaterial: zuvor passagierte Urothelzellen

- Die Herstellung des Stratifizierungsmediums erfolgt mit 26,5 µl CaCl_2 5,5 % in 10 ml Kera-tinozytenmedium. Das Calcium bewirkt die Anlagerung von Cadherinen und verstärkt so die Zell-Zell-Kontakte. So kann sich ein mehrschichtiges Zelllayer ausbilden und dieses ist stabiler gegen die Dispase bei der Ablösung aus der Kulturfalsche.
- Die zu stratifizierenden Zellkulturen werden aus dem Inkubator entnommen, unter dem Mikroskop bezüglich ihrer Morphologie untersucht und fotografisch festgehalten. Nur bei 100 % Konfluenz und optimaler Zellmorphologie besteht die Möglichkeit erfolgreich ein mehrschichtiges bioartifizielles Urothel zu erhalten.
- Das vorhandene Medium wird abgesaugt und die Kulturflasche nun mit dem Stratifizierungsmedium gefüllt. Es muss sichergestellt sein, dass der gesamte Boden benetzt und somit alle Zellen mit dem Medium bedeckt sind.
- Anschließend die Zellkultur erneut bei 37 °C inkubieren.

Immunzytochemischer Nachweis des epithelialen Phänotyps humaner Urothelzellen

Verwendung der am Vortag kultivierten Chamber Slides

- Fixierung
- Das Paraformaldehyd (PFA 4 %) wird aufgetaut.
- Das Medium in den Kammern wird verworfen und die Chamber Slide auf einem Papierhand-tuch ausgeklopft
- Anschließend werden die Zellwells/Chambers 3x mit 400 µl PBS jeweils 2 Minuten gewa-schen.
- Zur folgenden Fixierung wird 300 µl PFA für 10 Minuten auf die Zellen gegeben. Das PFA ver-ursacht die reversible Vernetzung der Proteine und fixiert so die Kultur.
- Nach Ablauf der Zeit werden die Kammern noch 2x mit 400 µl PBS für jeweils 2 Minuten ge-waschen, um das PFA wieder zu entfernen.

Permeabilisierung

- Nach dem Waschen wird das PBS erneut verworfen und die Chamber Slide ausgeklopft.
- 140 µl des verdünnten (1:50) Saponinpuffer wird über die Zellen gegeben, um die Permeabi-lität der Zellmembranen zu erhöhen, indem Microporen gebildet und so für die Antikörper durchlässig werden.
- Nach 10 Minuten Inkubationszeit werden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen (2x für 2 Minuten)

EnVision/HRP

- Nach Entfernung der letzten PBS-Lösung aus der Permeabilisierung wird in das eine Well der Chamber Slide der in Saponinpuffer verdünnte Antikörper AE1/AE3 [bindet an Cytokeratine; Cytokeratin 5, 6, 20 ist urothelzellenspezifisch, mit anderen Antikörpern können verschiedene Entwicklungsstufen gezeigt werden] pipettiert. Dieser Antikörper bindet spezifisch an Urothel. Der Saponinpuffer stellt sicher, dass die Mircoporen in den Zellmembranen geöffnet sind, sodass die Antikörper eindringen können. In das zweite Well wird ein Antikörperdiluent für die Negativ-Kontrolle gegeben (30 Minuten Inkubationszeit).
- Nun wird mit 500 µl PBS das ungebundene Material ausgewaschen.
- Nach Verwerfen der Waschlösung wird 100 µl des sekundären anti-mouse-Polymer Antikörper, welcher mit dem Enzym HRP markiert ist, hinzugegeben. Die Inkubationszeit beträgt erneut 30 Minuten.
- Es folgt eine weitere Spülung mit 500 µl PBS.
- Anschließend wird für 3 Minuten 100 µl des Farbstoffs Substratchromogen (1 Tropfen/1 ml) auf die Zellen gegeben. Dieser wird von dem Enzym HRP umgesetzt und führt zu einer braunrötlichen Färbung
- Dieses Mal wird 5 Minuten mit 500 µl Ampuwa gewaschen. -> alle Enzymreaktionen und Färbungen abgeschlossen;
- Die Färbung der Zellkerne erfolgt mittels 100 µl Hämatoxinilin. -> um zu zeigen, dass es sich überhaupt um Zellen handelt
- Die Objektträger mit den angefärbten Zellen werden 10 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gewässert, hinterher getrocknet und in Glyceringelatine eingedeckelt.
- Im Anschluss erfolgt eine mikroskopische Kontrolle der Zellen. Im Falle von Urothelzellen ist der Abschnitt mit AK AE1/AE3 rotbraun eingefärbt, die Negativ-Kontrolle sollte nur die blaue Färbung der Kerne aufweisen. Sowohl der Teil zur Bestimmung des Zellphänotyps als auch die Negativkontrolle zeigen die erwartete Färbung. Somit ist nachgewiesen, dass es sich hierbei um Urothelzellen handelt.

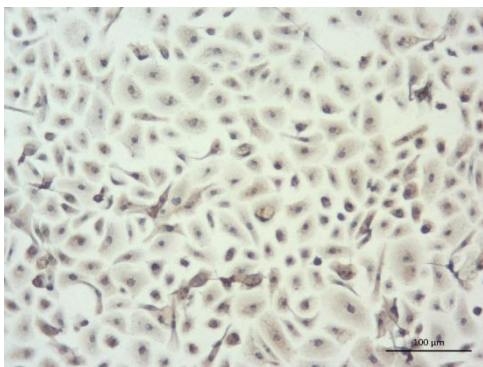


Abbildung 1 Negativ-Kontrolle

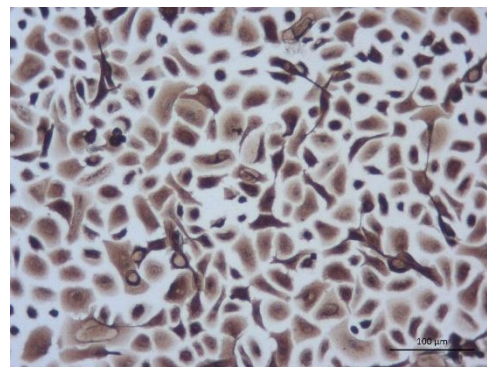


Abbildung 2 eingefärbte Urothelzellen