

VITALE IMPLANTATE

13.02.2023 KATJA SCHENKE-LAYLAND

Tissue Engineering

Prinzipiell: isolierte Spenderzellen in Matrix eingebettet → Implantation → Gewebe Remodeling → Autologes Gewebe

Gewebeersatz

- Für Industrie interessant als Testsysteme
- Für Medizin interessant als Organersatz

Mangel an Spenderorganen:

- Autotransplantation (aus eigenem Körper)
- Allotransplantation (von anderen Menschen)
- Xenotransplantation (Tiere als Organspender)
- Tissue Engineering (im Labor gezüchtetes Gewebe)
-

Begriff	Definition
Autolog	Vom selben Spender
Allogen	Von einem anderen Spender derselben Spezies
Xenogen	Von einer anderen Spezies

TE Arbeitsgebiet: Interdisziplinäre Zusammenarbeit

- Mediziner
- Zell-, Molekular-, Entwicklungsbiologen
- Immunologen
- Materialwissenschaftler, Chemiker
- Ingenieure, Bioverfahrenstechniker

Prinzip des TE:

1. Gewebebiopsie
2. Zellisolation und Zellvermehrung
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 de TE: Zellen/Zellinteraktionen, Trägerstrukturen/Biomaterialien, Bioreaktoren

Gewebsarten für TE:

- Blutgefäße
 - Leber
 - Darm
 - Haut
 - Knochen, Knorpel
 - Niere
 - Luftröhre
 - Herzmuskel/Herzklappen
- ➔ Schwierig, weil über 200 Zelltypen im Körper mit individuellen Ansprüchen

Grundbedürfnisse in vitro Zellen:

- Nahrung / Versorgung
- Inkubator
- Bioreaktor (Bewegung)
- Andere Zellen
- Vorsicht vor Bakterien und Hefen, sonst Kontaminierung

Zellquellen:

- Zelllinie
 - primäre Zellen
 - adulte Stammzellen
 - embryonale Stammzellen
 - reprogrammierte (iPS-Zellen)
- } werden in der Vorlesung „Stammzellen“ besprochen

Warum verschiedene Zellquellen?

- Einsatz als was? Testsystem oder Implantation?
- Verfügbarkeit der Zellen
- Verfügbare Zeit
- Reproduzierbarkeit
- Eigenschaften der Zellen
- Bsp: Chronische Wunden (Diabetes) vs. akute großflächige Verbrennung

Zelllinie: immortalisierte Zellen, die sich unbegrenzt teilen können, aber mutieren

Bsp: HeLa Zellen (isoliert aus Zervixkarzinom)

- Viele verschiedene Zelllinien für verschiedene Zelltypen kommerziell erhältlich
- Einfache Kultivierungsbedingungen (günstig, schnell, reproduzierbar, ...)
- Viele zelltypischen 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

Primäre Zellen:

Gewinnung von primären Zellen:

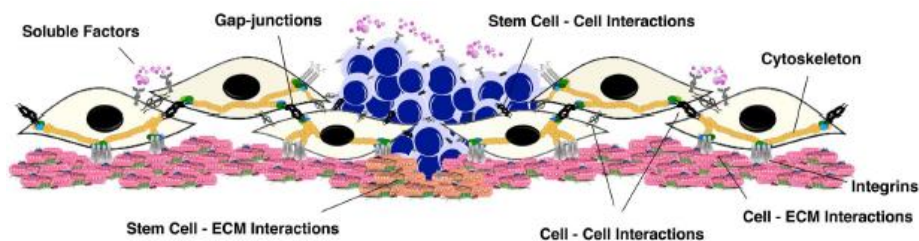
Ausgangsmaterial: Gewebe → Mechanische Zerkleinerung → Enzymatischer Verdau → Dichtegradienten Zentrifugation

- Isolation aus Gewebe
- Eigenschaften der Zellen wie „in vivo“
- autolog verwendbar (gleicher Spender wie Empfänger)
- Funktionell und ausdifferenziert

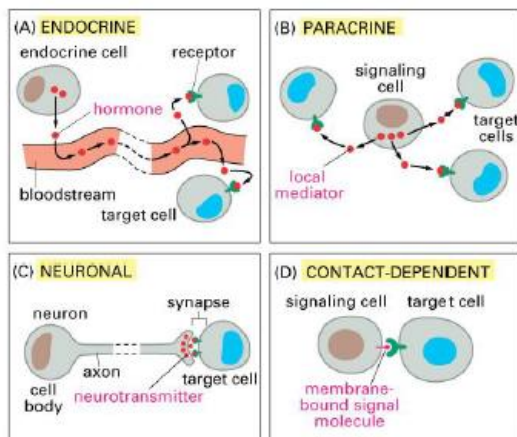
aber

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

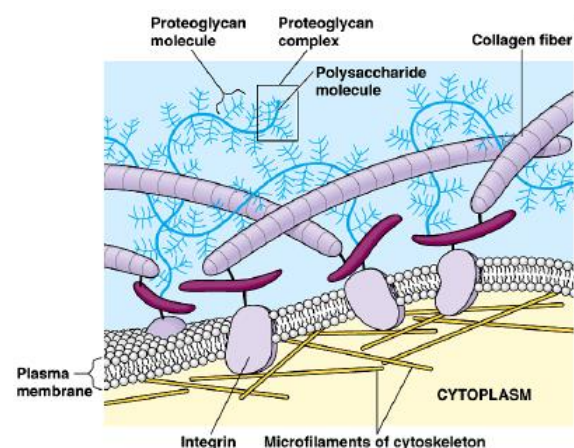
Zellinteraktionen:



Zell-Zell-Interaktionen:



Zell-Matrix-Interaktionen:



Trägerstrukturen/Biomaterialien: künstliche Matrix vs. Biologische Matrix

- Coated Cell Culture Flask
- 3D Gels
- 3D Electrospun Substrates

Bsp. Elektrospinning: Herstellung einer 3D Micro-Umgebung für in vitro Testsysteme

Bioreaktoren:

- Simulation zur Parametrierung von Bioreaktoren und zur Analyse von biologischen Prozessen
- Inkubatorsysteme für TE
- Entwicklung von Regelungs- und Steuerungssystemen
- Aufprägen von verschiedenen phys. Reizen (Druck, Fluss, etc.)

Nährstoffversorgung:

- Bisher: Aufbau einfacher Gewebe ohne Versorgungssystem → Diffusion
- Versorgungssystem für den Aufbau komplexer Strukturen notwendig

Analysemethoden:

- kolorimetrische Tests & ELISA
- Immunhistochemie
- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- Microarrays
- Gelelektrophorese
- FACS
- Raman

Stand der Technik:

→ Testsysteme

- Hautäquivalent (Haut in vivo vs. Haut in vitro)
- Darmtestsystem (PET-Insertmembran vs. Natürliche Trägerstruktur / statisch vs. Dynamisch)

→ Implantate

- Knorpelimplantat
- Hautimplantat
- Zelltransplantationen

ECM

Gewebe besteht nicht nur aus Zellen, sondern ECM als komplexem Geflecht aus Makromolekülen und Proteinen. Essenziell für Adhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung.

→ Fasern

- Retikuläre Fasern
- Kollagene Fasern
- Elastische Fasern

→ Nicht-faserbildende ECM Bestandteile

- Proteoglykane (PGs)
- Glykosaminoglykane (GAGs)
- Fibronectin, Laminine
- Matrizelluläre Proteine

ECM ist je nach Aufgabe des Gewebes unterschiedlich aufgebaut (z.B. Knochen vs. Blutgefäß)

Bindegewebe:

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

Epithel:

- Hauptbestandteil: Zellen (Zellschichten)
- Wenig ECM (Basallamina)
- Viele Zell-Zell Kontakte → verbinden Zellen mit Nachbarzellen oder Substraten

Wichtig: nicht immer direkter Zell-Zell-Kontakt, sondern manchmal Distanz zw. Zellen

Sekretion der ECM durch Zellen:

- Im Bindegewebe: Fibroblasten

- Im Knorpel: Chondrozyten
- Im Knochen: Osteoblasten

Aufbau der ECM-Proteine findet innerhalb und außerhalb der Zelle statt

- Innerhalb: Proteinsynthese
- Außerhalb: Bildung größerer Konstrukte z.B. Kollagenfasern

Wesentliche 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
- und vieles mehr

Beispiele für spezialisierte ECM:

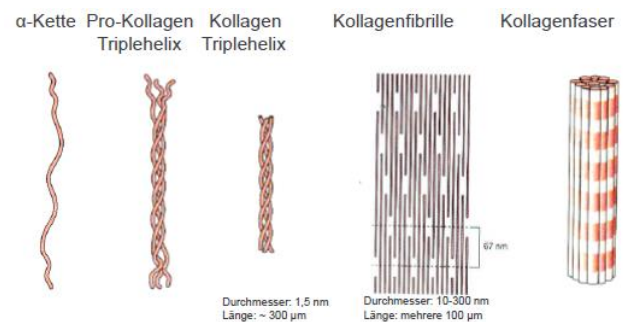
- Knochen & Zähne: Einlagerung von Kalk in die ECM
- Augen (Hornhaut): durchsichtige Struktur
- Sehnen: seilartige Struktur (Zugfestigkeit)
- Basalmembran: Grenze zwischen Epithel u. Bindegewebe

Kollagene Fasern:

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

Aufbau von Kollagen:

- Kollagenbündel Durchmesser 2-20µm
- Hohe Zugfestigkeit in Längsrichtung (lassen sich nicht dehnen!) → auch im Knochen und im Dentin
- im Gewebe: in Belastungsrichtung ausgerichtete Kollagenfasern
 - in jede Richtung beanspruchtes Gewebe: Fasern liegen geflechtartig vor (z.B. Haut)
 - In eine Richtung beanspruchtes Gewebe: Fasern parallel ausgerichtet (z.B. Sehnen)



- Fibrilläre Kollagene: Kollagene des Typs I, II, III, V und XI (1,2,3,5,11)
- Netzbildende Kollagene: Kollagene des Typs IV, VIII und X (4,8,10)

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

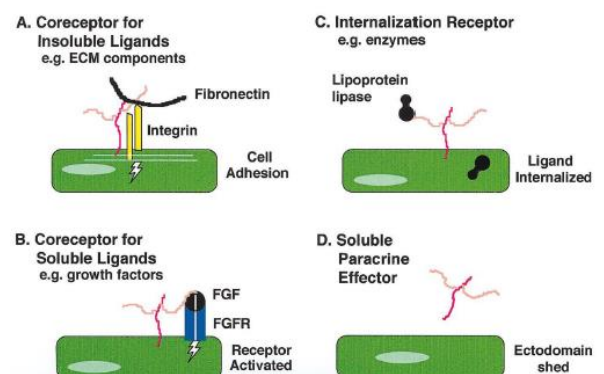
- **Wichtig:** Elastische Fasern sind häufig im Verbund mit Kollagenfasern, um nicht überdehnt zu werden und umgekehrt um die Kollagenfasern wieder in die ursprüngliche Lage zurückzubringen.
- Hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren
- Kovalente Bindungen zwischen Lysyl-Resten (Desmosin und Isodesmosin) stabilisieren die elastischen Fasern
→ Machen Elastin zu einem wasserunlöslichen, hitzestabilen und chemisch und Proteinase-resistentesten Protein (Ausnahme: Elastasen)

Proteoglykane (PG):

- Kernprotein + Seitenketten aus sulfatierten GAGs (werden anhand ihrer GAG-Ketten kategorisiert)
- Aufgaben:
 - Bildung von Gelen untersch. Porengröße und Ladungsdichte
 - Signalübertragung
 - Entzündung
- Bilden große Polymerkomplexe mit anderen PGs, HA oder Faserproteinen (Kollagen)
- Heterogenität: mindestens eine GAG-Kette ist an Kernprotein angehängt
- Small Leucine-rich PGs (SLRPs): Bsp. Decorin (Kollagenbildung, Reg. Wachstumsfaktoren, Reg. Zellwachstum, anti-fibrotisch)

Glykosaminoglykane (GAGs):

- lange unverzweigte Polysaccharidketten
- bestehend aus Disaccharideinheiten
- sehr hydrophil
- starke Anionen (stark sauer)
- Bsp. einfachstes GAG: Hyaluronsäure → nicht wie andere GAG kovalent an Protein gebunden, wird nach Gewebsbildung von Hyaluronidase abgebaut



Fibronectin (Glykoprotein):

- Proteinanteil überwiegt, kurze Kohlenhydrateinheiten
- Aufgabe:
 - Strukturierung der Matrix
 - Zelladhäsion
 - Zellmigration
- über Disulfid-Brücken kovalent verbundenes Heterodimer
- lösliche und unlösliche Form
- RGD-Sequenz

Laminine (Glykoproteine):

- Bestandteil der Basallamina
- Protein-Trimer aus α -, β -, und γ -Kette
- Nomenklatur:
 - Bsp: Laminin511 - α 5, β 1, und γ 1-Kette
 - bilden Netzwerke
 - viele Bindungsstellen

- sind verbunden mit Kollagen Typ IV über Nidogen, Fibronectin und Perlecan
- wichtige Aufgaben bei Entwicklung, Zelldifferenzierung und Zellmigration

Matrizelluläre Proteine:

- ECM Proteine, die NICHT primär eine strukturelle Rolle spielen, sondern Zell-Matrix-Interaktionen steuern
- Eigenschaften:
 - Während Entwicklung und nach Verletzungen stark exprimiert
 - Vermindern Zelladhäsion (anti-adhäsiv) im Gegensatz zu den meisten Matrixproteinen
 - Meist normaler oder schwacher Phänotyp bei Knock-out Mäusen von matrizellulären Proteinen

Histologie: Russel-Movat Pentachrom

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

MMPs und TIMPs:

- Matrix-Metalloproteasen (MMPs)
 - zinkhaltige Endopeptidasen
 - eine oder mehrere Hämoexin- oder Vitronectin-Domänen, die dem Enzym bei der Verankerung in ECM oder Zellmembran helfen
 - Calcium-bindende Domäne → notwendig für Aktivierung
- Ab- und Umbau von Gewebe:
 - Morphogenese, Wundheilung, Angiogenese, Tumorwachstum
- Prozessieren von Signalmolekülen
- oft ganzes Netzwerk von MMPs und gleichzeitig von körpereigenen Proteaseinhibitoren (TIMPs)

[Angiogenese: Wachstum von Blutgefäßen, durch Sprossungs- oder Spaltungsvorgänge aus bereits vorgebildeten Blutgefäßen]

Anwendungsmöglichkeiten:

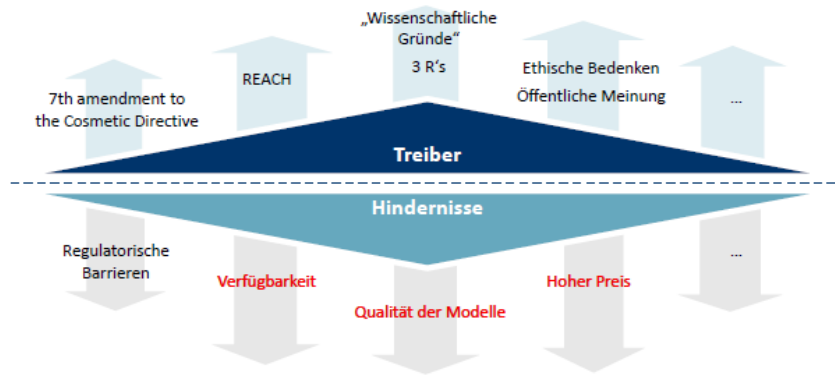
- Testsysteme:
 - Ersatz zu Tierversuchen
 - Simulation physiologischer Barrieren & Aufklärung zellulärer Mechanismen
 - Verbesserte Übertragbarkeit durch humane Zellen

– 3R: Reduction, Refinement, Replacement

– REACH: Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemical substances

➔ Dringende Notwendigkeit von humanbasierten Testsystemen

- Implantate
 - Verringerte Wartezeit
 - Verminderte Abstoßungsreaktionen durch patienteneigene Zellen



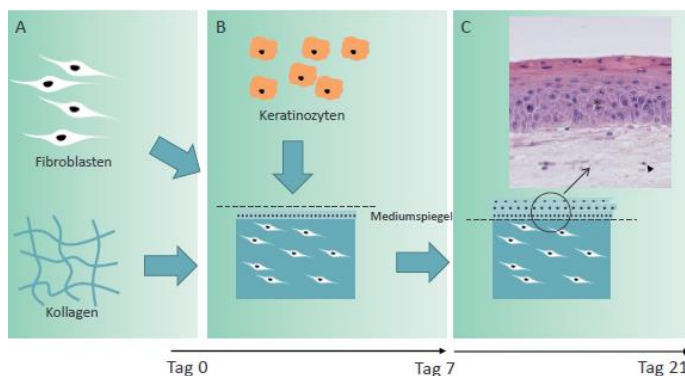
→ Automatisierte Herstellung von in vitro Modellen könnte diese Hindernisse aus dem Weg räumen

Verfahren TE:

Patient: Biopsie → Zellisolation → Zellexpansion → Gewebeherstellung → Gewebereifung

Zellisolation: durch Basalmembran lässt sich die Dermis (Fibroblasten/Endothelzellen) leicht von der Epidermis (Keratinocyten/Melanozyten) trennen

Herstellung der Hautmodelle:



In vitro Hautmodelle:

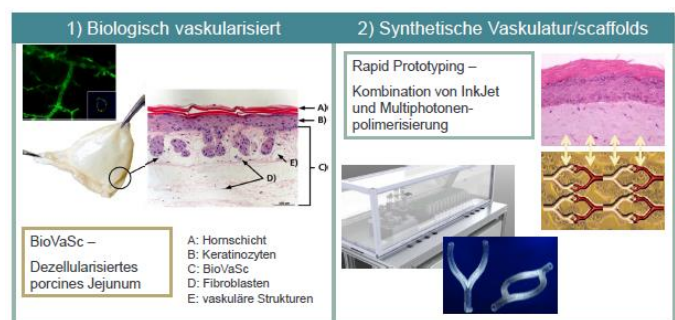
Korrosion/ Irritation	Penetration	Zellinteraktionen
- Risiko Abschätzung von chemischen Verbindungen (REACH) - Standardisierbares experimentelles Setup - Höhere Aussagekraft → Humane Zellen - Validiert nach OECD und ECVAM Richtlinien	- Reproduktion der Barrierefunktion der Haut - Abschätzung von transdermaler Penetration von Medikamenten	- Untersuchungen auf molekularen Level - Abschätzung von Nebenwirkungen von Therapien und Wirkstoffen - Zelltypen können je nach Fragestellung integriert bzw. Herausgenommen werden

Forschungsschwerpunkte von in vitro Hautmodellen:

- Histologie/Immunhistologie
- Genexpressionsanalyse / Microarray (DNA/RNA-Ebene)
- Entzündungsmarker (z.B. ELISA)
- Raman-Spektroskopie
- Pigmentierte Hautmodelle
- Krankheitsmodelle
- Infektionsmodelle
- Zerstörungsfreie Charakterisierung

Ausblick:

➔ Kein Modell ist optimal für alle Fragestellungen!



“Key challenge” um komplexere Hautmodelle aufbauen zu können

Dermagraft: körperfremder Ersatz aus Fibroblasten und Kollagen (klinischer Einsatz)

Knorpelimplantat: Carticel = körpereigener Ersatz aus Chondrozyten

Blutgefäßersatz:

Goldstandard für bypass-OPs:
autologe Arterien oder Venen

künstliche Gefäßprothesen:

- polyethylene terephthalate (PET, Dacron)
- expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE)
- **ABER:** nur gut bei größeren Gefäßen (> 6 mm)
bei kleineren Verstopfung durch
Thrombusformation
Grund: Fehlen von Endothelzellen!!
- **Herausforderung:**
Coronar-, Bein- oder Mikrogefäßoperationen

Blutgefäßimplantat:

- Großlumige Blutgefäße (Durchmesser >6mm)
- Körpereigene Endothelzellen und Kunststoffe

→ Implantate: nur sehr einfach aufgebaute TE-Konstrukte bisher im klinischen Einsatz (Haut, Knochen, Knorpel)

GMP: Good Manufacturing Practice (gute Herstellungspraxis) → Qualitätssicherungssysteme

Ziel der Richtlinien:

- Qualität: Beschaffenheit eines Arzneimittels (Identität, Dosierung, Reinheit, ...)
- Wirksamkeit
- Unbedenklichkeit

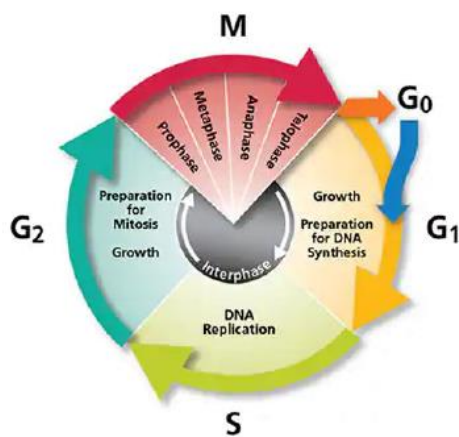
SOPs: Standard Operating Procedures → alles dokumentieren!

Stammzellen

Lernziele

- Was sind grundlegende Eigenschaften von Stammzellen?
- Welche Kategorien von Stammzellen gibt es?
- Wie unterscheiden sich die unterschiedlichen Stammzellen?
 - Woher bekommt man sie?
 - Welche Anwendungen haben sie?
 - Was für Vorteile und Limitationen haben sie?

Zellzyklus:



Seneszenz: permanenter Zellzyklus-Arrest

→ endliche Kapazität von Zellteilungen

- replikative Seneszenz: Telomerverkürzung und -schäden
- prä-mature Seneszenz: DNA-Schäden

→ Seneszenz unerwünscht für in-vitro-Kultur

Mechanismen von Stammzellen zur **Selbsterneuerung** (Telomer-Verlängerung):

- TERT: Enzymatische Verlängerung durch die Telomerase
- ALT: Alternative „Lengthening of Telomeres“

Begriff	Definition	Beispiel
Totipotent	Fähig in alle Zelltypen eines Embryos/Fötus und des sich entwickelnden Organismus zu differenzieren (alle drei Keimblätter + embryonaler Teil der Plazenta und Trophoblast)	Befruchtete Eizelle
Pluripotent	Fähig in alle Zelltypen eines Organismus zu differenzieren (alle drei Keimblätter)	Embryonale Stammzelle
Multipotent	Fähig in mehrere Zelltypen eines Keimblatts zu differenzieren	Hämatopoetische Stammzelle
Unipotent	Fähig zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in einen spezifischen Zelltyp	Keratinozyt

Stammzellen Definition:

- Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in versch. Zelltypen in Abhängigkeit von Stimulation (biologisch, mechanisch, elektrisch)
- Unterteilung in pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen), multipotente/ unipotente adulte Stammzellen (AS-Zellen) oder induziert pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen)
- **Einteilung nach Differenzierungspotenzial:**
 - Totipotent/omnipotent
 - Pluripotent
 - Multipotent
 - Unipotent
- **Einteilung nach Quelle**
 - Embryonal (=pluripotent)

- Adult (multipotent/unipotent) (alles älter als Embryo)
- Induziert pluripotent (pluripotent)

- Einteilung nach Ursprung

- Z.B. Hämatopoetische Stammzellen (Knochenmark)
- **Z.B. Neuronale Stammzelle (Gehirn)**

VERGLEICH VON STAMMZELLARTEN			
	Adult	Embryonal	Induziert pluripotent
Verfügbarkeit	Aus vielen Geweben isolierbar, aber limitierte Ausbeute	Limitiert verfügbar	Minimal-invasiv zugänglich
Differenzierungspotenzial	Multipotent oder unipotent	Pluripotent	Pluripotent
Virale Belastung	Relativ wahrscheinlich	Gering	Relativ wahrscheinlich
Kosten	Relativ kostengünstig	Teuer	Teuer
Ethik und Recht	unproblematisch	Umstritten und teilweise verboten	unproblematisch
Benötigte Expertise	Relativ gering	Hoch	Hoch
Differenzierung	Zeitintensiv, oft ineffizient oder nicht reproduzierbar	Zeitintensiv, oft ineffizient oder nicht reproduzierbar	Zeitintensiv, oft ineffizient oder nicht reproduzierbar

ADULTE STAMMZELLEN

Vor- und Nachteile

Vorteile	Nachteile
✓ Isolation von einer Vielzahl von Geweben	✗ Limitierte Ausbeute von Biospien
✓ Multipotent, mittel-hohes Differenzierungspotenzial	✗ Kostenintensive Isolation und Kultur
✓ Hohes Proliferationspotenzial	✗ Eventuell kein geeignetes Differenzierungs-Protokoll verfügbar
	✗ Nur spezifische Zelltypen/Gewebe können von AS-Zellen generiert werden

EMBRYONALE STAMMZELLEN

Vor- und Nachteile

Vorteile	Nachteile
✓ Unbegrenzte Proliferation	✗ Kosten- und zeitintensive Kultur
✓ Geringe virale Belastung (im Vgl. zu AS-Zellen)	✗ Eventuell kein geeignetes Differenzierungs-Protokoll verfügbar (geringe Ausbeute und/oder unreifer Phänotyp)
✓ Pluripotent, hohes Differenzierungspotenzial	✗ Ethisch umstritten

Erzeugung von iPS-Zellen: Methoden

- Somatischer Zellkerntransfer
- Zellfusion
- Reprogrammierung
- Kultur von Keimzellen

Differenzierung: von unspezialisierter zu hochspezialisierter Zelle

→ Probleme und Limitationen der Differenzierung von pluripotenten Stammzellen:

- Differenzierungseffizienzen sind oft niedrig
- Unterschiedliche Effizienzen in verschiedenen Laboren und mit verschiedenen Ausgangszellen
- Aufreinigung der Zellen aufwendig oder nicht möglich aufgrund fehlender Oberflächenmarker

Anwendungen:

- Regenerative Medizin:

- **autolog** (Spender=Empfänger) z.B. bei Chemotherapie oder Bestrahlung
- oder **allogen** (Spender ≠ Empfänger) z.B. bei Leukämie
- Wiederherstellung von beschädigtem Gewebe oder Organen
Stammzellen entnehmen → Diff. In bestimmten Gewebetyp → Transplantation
Bsp.: Verbrennungen, Parkinson, Schlaganfall, Herzerkrankungen, Diabetes
- Limitationen: Ausbeute bei AS-Zellisolation meist zu gering für Therapie, ungenügende Zellzahlen durch Verlust vieler Zellen bei Injektion, ungenügende Anzahl der verabreichten Zellen überleben und integrieren ins Gewebe
- Gewebemodelle
 - Organe werden in vitro nachgeahmt
 - SZ können in viele oder alle Zelltypen des Körpers differenzieren
 - Genetische und physikalische Manipulation möglich
 - Vorteile: Vermeidung von Tierversuchen, Human-basierte Systeme sind bessere Modelle für hum. Physiologie als Tiermodelle, Personalisierung möglich
- Entwicklungsbiologische Modelle
Forschungsgebiete:
 - Verhalten von Stammzellen
 - Embryogenese
 - Differenzierung

Biomaterialien

Lernziele:

- Wie sind Biomaterialien definiert und eingeteilt?
- Was ist Fremdkörperreaktionen?
- Zu welchen Reaktionen kann es zwischen Gewebe und Implantat kommen?
- Typische Einsatzgebiete, Materialarten & Modifikationen von BM
- Aspekte bei der Auswahl des Biomaterials

Definition: „... a material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue organ and function of the body“

- Biokompatibilität vs. Biofunktionalität
- **Einteilung:** Ultrakurzzeitimplantate, Kurzzeitimplantate, Langzeitimplantate
- Knochengeführte (osseointegrative) Abutmente vs. Katheter / Herzschrittmacher

Fremdkörperreaktion: Kontakt zwischen „biologischem“ und „technischem System“ (passiert immer)

Einteilung:

- Nach der Anwendung
 - Passive medical devices → Implantate
 - bioactive medical devices → Drug Delivery Systeme
 - diagnostische Anwendungen → Biosensoren
 - Bioseparation → Dialysemembranen
- Nach Verwendungsdauer
 - Ultrakurzzeitimplantate < 1 Tag

- Kurzzeitimplantate < 1 Monat
- Langzeitimplantate > 1 Monat
- Nach Material
 - Polymere (Homopolymere oder Copolymere)
 - Synthetisch: hydrophob, hydrophil oder quellend
 - Natürlich: tierisch oder pflanzlich
 - Hydrogele: biologische, synthetische und **semisynthetisch?**
 - Metalle (Korrosionseigenschaften, formstabil, Wärmeleitfähigkeit, biokompatibel, ...)
 - Keramik (nicht elektrisch/wärmeleitfähig, hohe Biokompatibilität)

Oberflächenmodifikation:

- Mikroarchitektur: Topographie/Strukturierung bearbeiten (Adhäsion, Ausrichtung)
- Biologische Modifikation: Protein, Verkapselung von Wirkstoffen
- Chemische Modifikation: chemische Bindungen (Plasmabehandlung, Oxidation)
- Physikalische Modifikation (Hydrophilisierung, Ladungsänderung)

Parameter für die **Auswahl des Biomaterials:**

- Beständigkeit
- Thermische Eigenschaften
- Verbindungstechnik

Komplexe, dezellularisierte Matrices als Biomaterial: natürliche ECM als Beispiel

Was sind Paper?

- Veröffentlichung der Forschungsergebnisse und -methoden, Einordnung in Gesamtheit
- Darstellung der eigenen Kompetenzen wissenschaftliche Währung
- Kategorien: Original Paper (Full Paper, Short communication) vs. Review (Perspective)
- Peer-Review: wissenschaftliche Selbstkontrolle, Begutachtung durch „peers“; Expert*innen weltweit
- Prozess für Peer-Review
 - 1. Autor*innen erstellen Manuskript zu abgeschlossener Studie
 - 2. Einreichung des Manuskripts bei einem Journal
 - 3. Entscheidung des Editorial Boards des Journals über Aufnahme des Peer-Review
 - 4. Suche von Reviewer*innen durch Editor*in
 - 5. Min. 2-3 Review-Reports werden erstellt und an die Autor*innen weitergeleitet
Entscheidung Reject, Accept oder Major/Minor Revisions
 - 6. Falls alles gut → Veröffentlichung, falls nicht: Autor*innen adressieren mit Kommentaren → wird neu eingereicht und zurück zu 4.
- Probleme des Peer-Review:
 - Reviewer*innen sind auch „nur Menschen“ (können Fehler machen, u.U. nicht objektiv)
 - Dauer des Prozesses
 - Freiwilligkeit
 - Anonymität des Prozesses
- Lösungsansätze
 - Beidseitige Anonymisierung
 - Veröffentlichung der Reviewer Rep.
 - Gemeinsame Diskussion der Reviewer*innen
 - **PrePrints**: Vorveröffentlichung von Manuskripten
- Journal: wissenschaftliche Zeitschrift (mit gewissem Fokus)
 - von breitem Fokus bis zu extrem spezialisiert
 - Unterschiede in Anspruch bei „Neuheit“
 - veröffentlicht durch Verlage (Print oder online oder open access)
 - Unterschiede im Prestige → Impact Factor: durchschnittl. Anzahl Zitate pro Paper (H-Factor: beschreibt Anzahl X von Papern mit mehr als X Zitaten)
- Konfliktpotential Journale:
 - extrem profitables Business Modell von „privaten“ Verlagen

Analysemethoden

Fragestellungen zu TE:

- Vergleich zu nativem Gewebe
- Endogene Gewebewiederherstellung
- Degradation/Biokompatibilität
- Immunreaktion

Makroskopische Analyse:

- Phänotyp (Unterscheidung äußerlicher Merkmale)
- Gewebeanalyse (visuelle Gewebeuntersuchung)

Mikroskopische Analyse:

- Histologie: Beurteilung der Gewebe-Morphologie, Unterscheidung zwischen zellulären und extrazellulären Strukturen, Anwendung in Diagnostik und Pathologie
- Durchlicht-Mikroskopie vs. Auflicht-Mikroskopie (für lichtundurchlässige Probe)

Präparationstechniken:

1. Konservierung / Fixierung

- Physikalische Fixierung: Trocknung oder Hitze (nicht sehr geeignet für Histo)
- Chemische Fixierung: Entzug von Wasser und Vernetzung der Proteine

2. (Clearing: Extraktion von z.B. Lipiden, Anpassung der unterschiedlichen Brechungsindices)

3. Einbetten: entwässern, ausrichten und vorbereiten der Probe, Auswahl Einbettmedium

- Weichgewebe-Histologie: Paraffin oder Kryomedium (Kryo = schockfrieren)
- Hartgewebe-Histologie (Knochen, Zähne, Implantate):
Einbetten in Methacrylat- oder Epoxidharze, die anschließend aushärten

Alle Einbettmaterialien müssen vor der Färbung entfernt werden

4. Schneiden: Mikrotom vs. Kryotom

5. Färben: sollen vor allem Zellkerne, Zytoplasma, Kollagen und elastische Fasern anfärben

Farbstoffe:

- Chromophore Farbstoffe (wirken farbig mit Benzolring)
- Auxochrome Farbstoffe (verstärken Farbeffekt)
- Basische/azidophile, saure/basophile und indifferente/lipophile Farbstoffe

Färbep Prinzipien:

- Chemisch: irreversibel
- Physikalisch
- Chemisch-physikalisch: Effekte durch Dispersität der Farbstoffpartikel und Adsorptionseffekte

HE-Färbung:

- Hämatoxylin (azidophil): Kernfärbung
- Eosin (basophil): Plasmafärbung, ECM
- Protokoll: entparaffinieren, bläuen, differenzieren, eindecken

Movat-Pentachrom Färbung:

- elastische Fasern, Zellkerne: blau-schwarz
- Kollagen: gelb
- Proteoglykane: hellblau bis grün

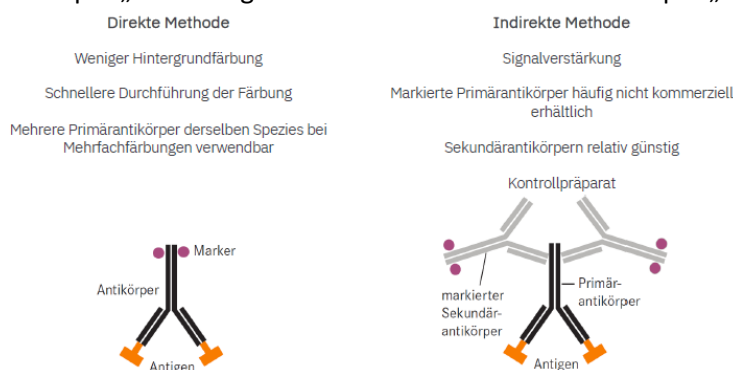
- Fibrin, Muskel: rot

Immunhistologische Färbungen:

- IHC: Immunhistochemie
- ICC: Immunzytochemie
- IF: Immunfluoreszenz

Antikörper:

- 2 leichte, 2 schwere Peptidketten
- Konstanter Bereich bestimmt Immunglobulinzugehörigkeit
- Variabler Bereich bestimmt den Bindungsbereich an entspr. Epitop des Antigens
- Produktion: Immunisierung eines Wirbeltiers, Gewinnung aus dem Serum
- Monoklonale vs. Polyklonale Antikörper
begrenzt vs. unbegrenzt verfügbar
- Detektion von Antikörpern: indirektes Antikörper-Labeling: nicht-markierter primär Antikörper „Anti-Antigen“ + markierter sekundär Antikörper „Anti-Spezies“



- Detektionsprinzipien: Fluoreszenz, kolorimetrisch, Chemilumineszenz
- Enzymgekoppelte Antikörper
- Signalverstärkung: ABC-Technik
- Antikörperbasierte Methoden: Immunhistologische Färbung, ELISA, FACS, MACS, Immunopräzipitation, Western Blot
- **Durchflusszytometrie:** Analyse von Partikeln in Flüssigkeitsstrom
Fluorescence activated cell sorting (FACS)
Messprinzip: Detektion der Lichtstreuung bzw. Emission, um Zellen zu zählen und identifizieren
Image Stream: Bildgebende Durchflusszytometrie
Bsp.: Zelltod (Apoptose/Nekrose) kann gut geimaged werden



- **MACS:** Magnetic activated cell sorting (Durchfluss der Zellpopulation durch starkes Magnetfeld → markierte Zellen werden zurückgehalten, Verfahren kann beliebig oft wiederholt werden)
- **ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay (basiert auf Antikörper-gekoppelten Enzymreaktion an Oberfläche)

- **Detektion-Kolorimetrie:** Absorptions-Spektrometrie
- **Point-of-care Diagnostik:** Bsp. Schwangerschaftstest mit hCG

Antigene:

- Lösliche oder unlösliche Peptid-, Glykosid- oder Nukleinsäurestruktur
- Sind immunogen, wenn sie eine adaptive Immunantwort auslösen

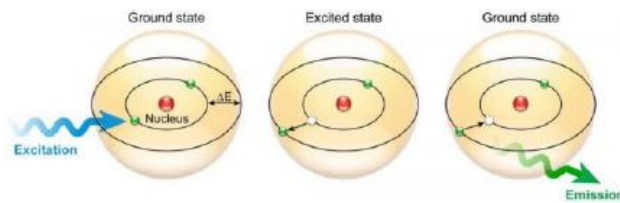
Fluoreszenz:

Eine Lichtwelle wird beschrieben durch die Amplitude A und die Wellenlänge λ

→ Je größer die Wellenlänge, desto geringer der energetische Gehalt

Stokes shift

das ausgehende Licht hat eine größere Wellenlänge als das eingehende Licht



- GFP: Grün fluoreszierendes Protein (war das erste)

Antikörperdetektion

Fluoreszenzbasierte Detektion	Enzymbasierte Detektion
+ Bessere Auflösung + Genaue Lokalisation und Struktur des Antigens sichtbar + mehrere Antigene parallel färbbar	+ Verstärkungseffekt + günstig + Färbungen sind länger haltbar
- Fluoreszenz bleicht aus - teuer - Probleme mit Autofluoreszenz der Probe möglich	- Weniger Informationen über Struktur und Lokalisation des Antigens - nur wenige Antigene parallel anfärbbar, keine Kollokalisationsstudien

Analyse von Nukleinsäuren:

- Gentest (DNA)
- RNA Isolation (Lyse der Zellen oder des Gewebes)

WICHTIG: RNasen sind überall

- RNA-Quantifizierung immer machen, RNA Qualität überprüfen ist optional
- RT-PCR: Amplifikation von Nukleinsäuren, Vervielfältigung spezifischer DNA Sequenzen
- Detektion RT-PCR: Separation von Nukleinsäuren durch Anlegen eines elektrischen Feldes, Nukleinsäuren sind negativ geladen und wandern zum Pluspol
- Real Time PCR: Detektion mittels Förster Resonanz Energie Transmission (FRET) Sonden
- PCR oft relative expression (quantitativ)

6. Mikroskopie

Beispielfragen:

Durchlicht-Mikroskopie: Detailgetreue im Bild ist abhängig von der Auflösung (minimaler Abstand zwischen zwei Punkten, die noch klar unterschieden werden sollen)

Warum Gewebe fixieren? Um Abbauprozesse zu stoppen (nicht wegen Farbstoff, nicht um Zellen zu entfernen)

Ein HE gefärbtes Gewebe weist violette Zellkerne auf, weil sie → basophile Organelle sind, die mit Hämatoxylin interagieren

Welche Faktoren müssen bei der Auswahl der Reihenfolge von Färbeschritten berücksichtigt werden? → Färbeprinzip (chemisch, physikalisch), pH-Wert, Lösungsmittel

Zusammenfassung

Funktionsweise von Durchflusszytometrie

Prinzip des ELISAs mit kolorimetrischer Detektion

Analyse von Genexpression

RNA Isolation und Qualität

cDNA Synthese

Grundschrirte einer PCR Reaktion

Kinetik der PCR Reaktion

Real-time Detektionsmethoden (SybrGreen und Taqman)

17.02.2023 PRAKTIKUM SCHENKE-LAYLAND HISTO

Welche Faktoren müssen bei der Reihenfolge von Movat Pentachrom-Färbungen beachtet werden?

- Färbeprinzip (chemisch/physikalisch)
- pH-Wert
- Lösungsmittel
- (nicht Temperatur)

Wie stellt man 3% Essigsäure aus 100% Essig her?

- 3mL + 100mL Wasser

Was trifft auf Phosphorwolframsäure zu?

- Muss frisch hergestellt werden
- Dient zum Dedifferenzieren saurer Farbstoffe
- Nicht: färbt Proteinstrukturen
- Nicht: wird zum Vorkonditionieren der Saffron-Färbung verwendet

Wozu und wie wird differenziert? (Erst wird überfärbt und dann Farbe wieder entfärbt)

Welcher Farbstoff färbt welche Zellkomponente ein?

- Verhoeffs Elastike Färbelösung (schwarz): Kerne / elastische Fasern
- Alcianblau (blau-grün): Mucus
- Brilliant Crocein-Särefuchsin: (rot): Muskelgewebe, Firbrinoid
- Saffron-Lösung (gelb): Kollagene

Oft handelt es sich um natürliche Farbstoffe z.B. Hämatoxylin

Cryoschnitt wird in pFA gelegt zur Fixierung

Datenanalyse

Vor-/Nachteile IF-Färbung:

- Hohe Spezifität
- Quantifizierung
- Ko-Lokalisierung
- Schwere Orientierung in der Probe
- Limitierte Anzahl an Zielmolekülen

Vor-/Nachteile Histologische Färbung:

- Übersichtsbilder
- Darstellung aller Gewebestrukturen/Kontrasterhöhung
- Unterscheidung unterschiedlicher Molekülgruppen
- Nur bedingte Quantifizierung

Quantitative Bildanalyse:

- Farben-Multichannel (separates Bild je Farbkanal) vs.
- RGB (additive Zusammensetzung des gesamten Farbspektrums aus den Grundfarben rot, grün, blau)
- Gray value intensity (GVI)

Welche quantitativen Aussagen können anhand von histologischen Bildern getroffen werden?

- Zellanzahl
- Zellgröße /-morphologie
- Abstände, Größe, Formen
- Nicht: Proteinexpressionen

Wie würden Sie die Dicke der **fibrotischen Kapsel** definieren?

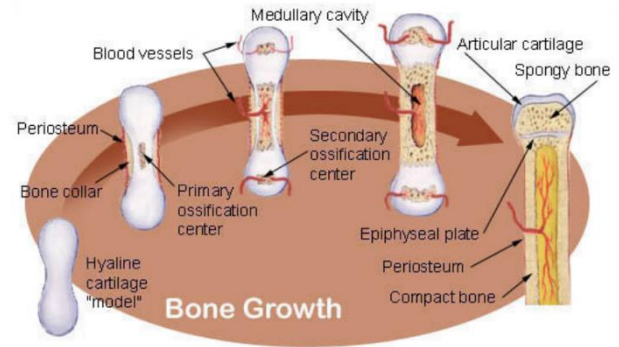
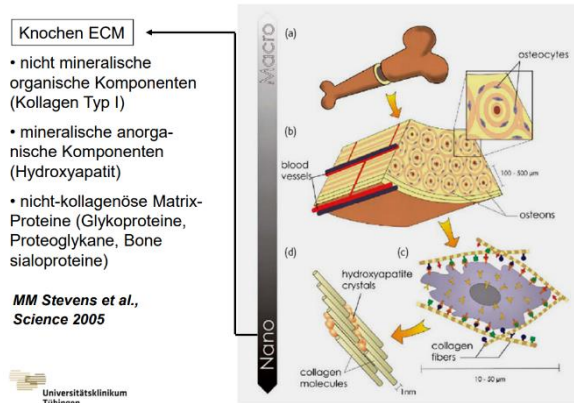
- Analyse, graphische Darstellung & statistische Auswertung

Bestimmen Sie den Collagengehalt der fibrotischen Kapsel

- Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge an Kollagen 1

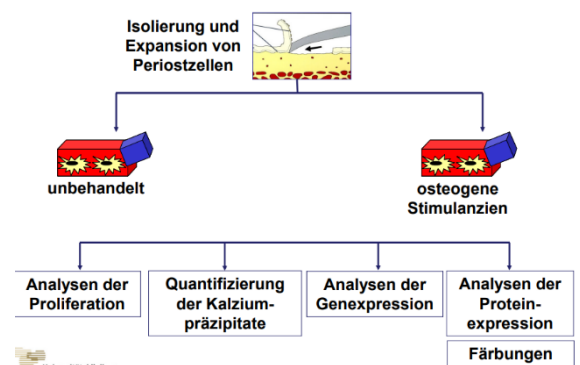
- Bei Zahnlosigkeit: Knochengewebe bildet sich zurück, muss rekonstruiert werden
- Tumore → Kieferknochenresektion
- LKG-Spalte

Hierarchische Organisation des Knochens



Knochenwachstum

- Stammzellen: Osteoblasten (hämatopoetisch) vs. Osteoklasten/Osteozyten (mesenchymal)
- Gold Standard für die autologe Knochenregeneration: Entnahme eines Teil des Knochens, um einen anderen Knochen in der MKG-Chirurgie zu ersetzen
- Quellen für Stammzellen: embryonal, fetal, Nabelschnur, adult
- Reminder: Thrombozyten fördern Blutgerinnung, Erythrozyten transportieren Sauerstoff
- Osteogene Vorläuferzellen aus anderem Gewebe:
 - Knochenmark
 - Zahnpulpa
 - Nabelschnurblut (cord blood)
 - Nabelschnurgewebe (cord Wharton's jelly)
 - Fettgewebe
 - Fruchtwasser (amniotic fluid)
 - kompakter Knochen
 - Periost (Knochenhaut)
 - Synovialmembran
- In vitro Kultivierung von Stammzellen:
- **Für Knochen: multipotente mesenchymale SZ**
- Proliferation antiproportional zu Differenzierung
- FACS-Analyse: Durchflusszytometrie
- Biomaterialien für Knochen TE
 - Synthetische Polymere
 - Keramiken
 - Kompositmaterialien
 - Metalle
- Eigenschaften von BM für Knochen TE
 - Biokompatibilität
 - Biologische Abbaubarkeit
 - Mechanische Eigenschaften
 - Architektur von Poren
 - Oberflächenbeschaffenheit
- RNA-Extraktion durch 3D-Zentrifugation



- Biofunktionalisierung von BM: RGD-Peptide
- TE-Vorgehensweise in der MKG-Chirurgie: Autologe Stammzellen + Biomaterial = TE

28.02.2023 ALEXANDER-FRIEDRICH

Immunogenität von mesenchymalen Stammzellen (MSC)

- Teile des Immunsystems:

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

- Phagozyten („Fresszellen“)
 - o Makrophagen
 - o Granulozyten
 - o Dendritische Zellen
- T-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)
- 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:
 - o MHC I: auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert, schützt gesunde Zellen vor dem Zerstörungsmechanismus durch natürliche Killerzellen
 - o MHC II: ist auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert, wird von dem T-Zell Rezeptor der T-Helferzellen erkannt
- Akute lymphatische Leukämie
 - o Folge: Knochenmarkinsuffizienz mit Mangel an Erythrozyten und Thrombozyten
- Adulte Stammzellen aus dem Knochenmark: hämatopoetische Stammzellen
- **GVHD** (Graft-versus-host disease): häufigste Komplikation nach Knochenmark-/ Stammzelltransplantation von einer fremden Person (allogen), werden als fremd erkannt
→ MSC als Therapieform, schwächen die allogene Abstoßung ab
- **MSC**
 - o sind hypoimmunogen
 - o Exprimieren HLA-G
 - o Inhibieren die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen
 - o Modulieren die T-Zell Proliferation und den T-Zell Phänotyp
 - o Bilden ein lokales immunsuppressives Milieu, produzieren immunsuppressive Faktoren

Wiederholen: mesenchymale, pluri-, multipotente Stammzellen, etc.

Kryokonservierung

- Dichteanomalie des Wassers: höchste Dichte bei 4°C

Kryoprotektive Substanzen:

- Ziel: Erhöhung der Konzentration gelöster Substanzen in der Zelle
- Eigenschaften: sehr gute Löslichkeit in Wasser auch bei niedrigen Temp., geringe Toxizität, ...

Konditionieren:

- DMSO 10% ist üblich

Klinische Anwendung:

- Eizellen
- Spermien

Azellularisierung

Probleme:

- Knappheit an Transplantationsorganen
- Verteilungsgerechtigkeit (Dringlichkeit und Erfolgsaussicht)
- Organhandel
- Abstoßungsreaktionen

Einteilung in drei Kategorien

- Chemische Agentien: Säuren und Basen
 - o Peroxyessigsäure: entfernt Nukleinsäuren mit geringen Effekten auf die EZM-Zusammensetzung und Struktur
 - o Hypertone Kochsalzlösung
 - o Hypotone Kochsalzlösung
- Chemische Agentien: Detergenzien
 - o SDS
 - o Triton 100
- Physikalische Agentien:
 - o Temperatur

Fazit:

- Azellularisierung verlangt den Einsatz von nicht physiologischen chemischen oder biologischen Agentien
- Schädigung der EZM könnte die Folge sein
- Eine vollständige Azellularisierung ist der Schlüssel für eine mögliche Neubesiedelung

Einführung in die Zellkultur

Theoretischer Teil:

- Trypsinieren: 1. Zugabe von Trypsin, 2. Verdünnung mit Medium, 3. Zellen in neues Medium bringen und wieder in Platten aussähen
- Größtes Problem von Zellkulturen: Kontaminationen (Bakterien, Mykoplasmen, Kreuzkont., ...)
- Harrisons Lösung: Antibiotische Behandlung
- Passage 0: Primäre Zellen
Passage 1-49: Wachstum und Teilung
Passage >50: Zelloptose
- Wozu braucht man Zellkultur?
 - o Grundlagenforschung (Genetik, Zelluläre Prozesse, Krebsforschung)
 - o Tissue Engineering
 - o Biopharmazeutika
- Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) sind eine Form von pluripotenten Stammzellen, die aus somatischen Zellen gewonnen werden

Praktischer Teil:

- Sicherheitseinweisung...
- Zelltypen
 - o Adhärente Zellen: binden an das Kultursubstrat (an den Boden der Kulturflasche)
 - o Feederzellenkultur
 - o Differenzierungskultur (verschiedene Faktoren zu Kultur geben)
 - o Suspensionskultur (keine Bindung an Oberfläche der Kulturflasche)
 - o Spheroid Kulturen
 - o Organotypische Kulturen (Organoids)

Blutkontakt Vitale Implantate: Hämkompatibilität

- Bypass hält meist deutlich länger als Stent
- **Biokompatibilität** geteilt in **Zytokompatibilität** (Zellen und Gewebe) und **Hämkompatibilität**
- **Hämostatische Balance**: Koagulation vs. Fibrinolyse* → s.u.
 - o **Koagulation** – Inhibitor: Heparin, Hirudin – Aktivator: Thromboplastin
 - o **Fibrinolyse** – Inhibitor: Aprotinin, PAI, Antiplasmin - Aktivator: Kallikrein, t-PA, Streptokinase/r-t-PA
 - o **Inflammation**: Post-Pump-Syndrome, Leukozyten-Infiltration, Multiorganversagen, ...
- Hämkompatibilität Anforderungen (lässt sich in Modellen gut testen und nachweisen)
 - o Thrombose
 - o Koagulation
 - o Blutplättchen
 - o Hämatologie
 - o **Komplementsystem**: System von Plasmaproteinen, das im Zuge der Immunantwort auf zahlreichen Oberflächen von Mikroorganismen aktiviert werden kann
- In vitro Modelle sind viel sensitiver

*[**Fibrinolyse** (Fibrinspaltung) ist die Bezeichnung für die körpereigene Auflösung eines Blutgerinnsels (Thrombus) durch das Enzym Plasmin. Dabei spaltet Plasmin die Fibrinpolymere, welche den Thrombus zusammenhalten, in kleine Fibrinabbauprodukte, und der Thrombus zerfällt]

14.03.2023 AVCI-ADALI-LABOR

Seminar zu Poster-Präsentationen

- Titel, Autoren
 - Einleitung
 - Materialien & Methoden
 - Ergebnisse (größter Teil)
 - Diskussion
 - Schlussfolgerung
 - Quellen, Danksagungen
 - ➔ So wenig Text wie möglich (ca. 20%)
-
- Color Scales und Grey Scales beachten

Journal Club

- Materialien eher kurzgehalten
- Schlussfolie mit der eigenen Meinung zum Paper
- Farbschema durchziehen
- Diagramm-Beschriftungen
- Auf englisch
- 15 min, Zeit wird gestoppt
- + 5-10 min Fragen und Diskussion

Zellcharakterisierung mittels PCR

Methode zur gezielten in vitro Vervielfältigung von DNA-Fragmenten → basiert auf Grundprinzipien der DNA-Vervielfältigung mit ... Eigenschaften

Grundprinzip der PCR:

- Enzymatische Vervielfältigungsmethode
 - In mehreren Amplifikationsrunden werden Primer entlang einer Matrizen-DNA verlängert
 - Temperatur wechselt periodisch
 - DNA wird immer wieder denaturiert
 - Theoretische Anzahl amplifizierter DNA-Moleküle: $N = N_0 * 2^n$ (bis Plateauphase)
N = Amplifizierte DNA-Anzahl
N₀ = Anfangszahl
N = Anzahl der Zyklen
 - Größtes Problem ist die Kontamination (Kreuzkontamination)
 - Vermeidung von Kontaminationen:
 - o Immer eine NTC (no template control?) durchführen
 - o Heftige Luftbewegungen vermeiden
 - o Gestopfte Pipettenspitzen
 - o Räumliche Trennung
 - o Alles steril, UV-Bestrahlung, etc.
1. **Denaturierung** (93-95°C) Auftrennung der dsDNA (double stranded DNA) in ssDNA
 2. **Primer-Annealing** (Hybridisierung bei 50-60°C): zwei kurze DNA-Matrizen komplementäre einzelsträngige Oligonukleotide (Primer) binden an ssDNA → kurze Doppelstrangbereiche
 3. **Elongation** (72°C): DNA-Synthese durch eine DNA-Polymerase

PCR-Komponenten:

1. **Template DNA** (DNA-Matrix) 0.5-50ng: DNA-Molekül, das die zu amplifizierende Sequenz enthält
 2. **Sense und Antisense Primer** (jeweils 0.1-2µM): zwei kurze komplementäre Oligonukleotide, die an die DNA binden und zur Vermehrung des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitts führen (Startstelle für Polymerase)
 3. **dNTPs** (20-250µM): Desoxyribonukleosidtriphosphate wie dATP, dCTP, ...
 4. **Thermostabile DNA-Polymerase** (0.5-2.5 U/rxn): katalysiert die Reaktion
 5. **10x Polymerase Puffer** (optimaler pH-Wert, Salzkonzentration)
 6. **MgCL2** (1-5 µM): beeinflusst die Primer Annealing und Polymerase Aktivität
- **Real time PCR:** Zunahme der DNA-Konzentration korreliert mit einer Zunahme eines Fluoreszenz-signals das in Echtzeit gemessen wird
 - **CT „Treshold Cycle“:** Quantifizierung in der real time PCR
 - Endpunkt: Unterschiede der ursprünglichen Kopienzahlen können nicht mehr festgestellt werden
 - Möglichkeiten zur Detektion von PCR-Amplifikatoren in real time PCR:
 - o Detektion mittels interkalierender Fluorophore (SYBR Green)

- Detektion mittels Fluorophor-markierten genetischen Sonden (TaqMan-Sonden)
- **Haushaltsgen** (housekeeping gene): nicht-reguliertes Gen das exprimiert wird (unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen, Gen das im Transkriptionsprozess der Zelle keiner Regulation unterliegt)

Wichtig:

- Ablauf PCR
- Komponenten der PCR
- Ct-Wert
- RT qPCR Durchführung
- Haushaltsgen (bei Praktikum GAPDH als positive control, um Vergleich zu haben. Falls zb. Wert von 28, wüsste man, dass am Setting schon ein Fehler vorlag.)

Bioprinting [SANDRO]

- Hydrogele werden mit Wasser benetzt und quellen dabei auf
- Beispiele für Biotinten: dezellularisierte ECM, Hyaluron, Kollagen, Fibrinogen, Matrigel, ...
- Druckverfahren: Luftdruck, Kolben, Rotation
- TPP-Druck (keine Nadel, aber teuer und komplex)
- Stereolithographie (SLA) mit Laser

Isolierung von Primärzellen aus Vollblut (PBMC)

PBMC = Peripheral blood mononuclear cells

- Einkernige Zellen des peripheren Blutes, die einen runden, nicht-segmentierten Zellkern besitzen
- Bsp: Monozyten, Lymphozyten
- Entstehung aus hämatopoetischen Stammzellen (**HSCs**) → Hämatopoese
- HSCs bilden während der Hämatopoese eine myeloische und lymphoide Linie, innerhalb beider Linien gibt es PBMC
- Verwendung von PBMCs in immunologischen Tests, Untersuchung von Infektionskrankheiten, Entwicklung von neuen Medikamenten, ...

Pyrogene = fiebelerzeugende Substanzen, die im menschlichen Körper lebensbedrohliche Symptome auslösen können

Pyrogenkontamination medizinischer Produkte = lebensbedrohlich!

Monozyten Aktivierungstests:

- Kaninchen Test
- Limulus Test
- Monozyten Aktivierungstest

Zytotoxisch = Zytotoxizität, auch Cytotoxizität, ist die Fähigkeit einiger chemischer Substanzen, Zellen und Gewebe zu schädigen. Diese Schädigung kann im Zuge einer Immunreaktion auch durch Zellen des Immunsystems vermittelt werden, z. B. durch zytotoxische T-Zellen, natürliche Killerzellen, Makrophagen oder Neutrophile.

Klausur:

Zwei Fragen zu VL heute 20.03. ^^

Antworten dazu alle auf den Folien

Keine Frage zum Monozyten-Aktivierungstest

Hauptsächlich um PBSCs und zur Methode

Klausurfragen:

Was ist die Wirkungsweise von Ampicillin?

- ➔ Breitbandantibiotikum
- ➔ Blockiert ein Enzym, welches an der Zellwandsynthese beteiligt ist

Wirkung der Kalilauge auf gramnegative Bakterien?

- ➔ Löst die Zellmembran von gramnegativ-Bakterien und die DNA tritt als viskoser Faden aus

(aufgrund der Zellwand lysiert die DNA)

E. Coli = gramnegativ

23.03.2023 TOBIAS WALKER (LS medcap) tobias.walker@lsmedcap.com

Medical Valley Hechingen

QA /RA = Quality Affairs (Management) / Regulatory Affairs

LS medcap ist Vermittlung / Ansprechpartner für Praktika, Jobs, Abschlussarbeiten, etc.

Joline GmbH:

- Produkt zur Biopsie von Herzmuskelgewebe
- Einspritzen von Zement (über Ballon) in Wirbel, der bei Osteoporose zusammenfällt
- OEM-Hersteller von Stent.-Systemen (verkauft von anderen Firmen)
- Dialyse Katheter (Kurzzeit / Langzeit)

Qatna:

- Stopfen auf Vorhof-Ohr als Schlaganfall Prophylaxe als Alternative zu Blutverdünner

Cardiobridge:

- Käfig & Propeller für Arterie am Herz

Bentley:

- Stentgrafts

RCP: representative concentration pathway

Ejection-Fraction: 70-30 normal

IABP (Intraaortale Ballonpumpe): Studie 2012 bewiesen, dass es keinen Unterschied macht

→ Wichtig: nachweisen, dass Produkt für Patient sicher und notwendig ist

Neu: ECLS-Systeme, Impella (nicht-chirurgische Herzpumpe)

Anforderungen für die Zulassung von Medizinprodukten:

- Vollständiges QM-System nach ISO 13485 Zertifizierung (QM)
- Technische Dokumentation und erklärte Konformität
- Baumuster wurde durch entsprechende Stelle überprüft

AUDIT: Prüfstelle für Kontrolle und Zertifizierung

Risk assessment criteria: Severity Rating 1-5

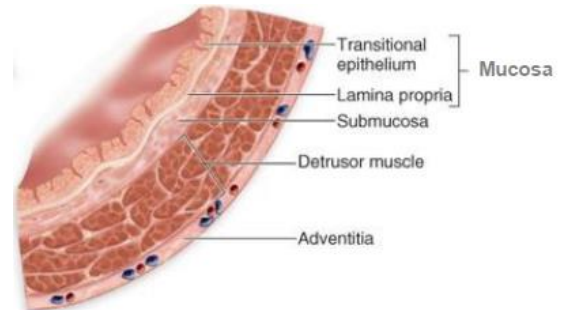
Human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hPSC-CMs)

Bioartifizielles Urothel zur Geweberekonstruktion

- **Urothel** = Übergangsepithel der ableitenden Harnwege (Nierenbecken, Harnleiter, Harnblase und oberer Harnröhre)

- **Übergangsepithel:**

- o Mehrschichtig oder mehrreihiges Epithel
- o 2-10 Zellschichten
- o Ungefüllter Zustand hochprismatisch
- o Flacht mit zunehmender Füllung ab
- o Dehnung durch Reservefalten in Zellmembran ermöglicht
- o Pilzartige Deckzellen = Schirmzellen



Anatomie der Blase

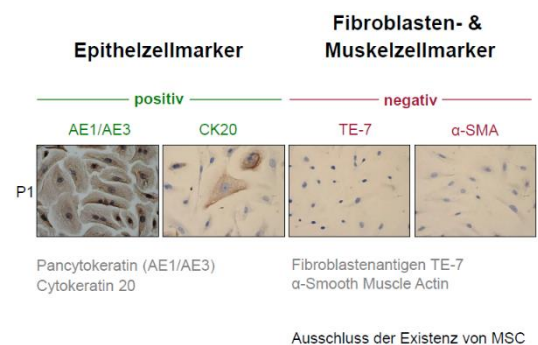
- Basalzellen: sitzen alle auf der Basalmembran
- Intermediärzellen: nur teilweise auf der Basalmembran
- Deckzellen: oberste Zellschicht mit parallel ausgerichteten Kernen; Zytoplasma apikal deutlich verdichtet (Crusta)
- **Crusta:** eng aufeinanderliegende Mikro- und Intermediärfilamente, eingelagerte Membranvesikel, Barrierefunktion gegen Infektionen
- **Harnröhrenstrikturen:** Harnröhrenverletzung → Narbenbildung → Verengung des Lumens
Strikturen = hochgradige Einengung (Einschnürung, Enge, Verengung) eines Hohlorgans (z.B. Speiseröhre, Darm) oder eines Kanals (z.B. Magenausgang, Harnröhre). Mögliche Ursachen sind vielfältig, zum Beispiel Entzündungen, Operationen, Narben oder auch ein Tumor.
- Harnröhrenverletzung ist direkte oder indirekte Folge von:
 - o Transurethrale Prostatektomie (6-9%)
 - o Beckentrauma
 - o Endoskopische Eingriffe
 - o Katheter Einlage (20%)

→ 50% aller Strikturen haben iatrogene Ursache

- Therapie:
 - o Endoskopische Schlitzung (Urethrotomia interna)
 - o End-zu-End-Anastomosen
 - o Gestielte/freie Transplantate

→ Therapie allerdings nicht für alle Patienten geeignet

- Herstellung Urothelersatz I
 - o Biopsat oder Blasenspülflüssigkeit
 - o Isolierung und Kultivierung der Urothelzellen (UC)
 - o Induktion der Stratifizierung
 - o Autologes mehrlagiges Urotheltransplantat
- IF-Färbung:
 - o Rot = PKH26, UC-Markierung
 - o Blau = DAPI
 - o Grün = spezifisches Antigen
- Marker Urothel:
 - o P63
 - o CK20
 - o AE1/AE3



- Der Weg in die Klinik: In vitro Versuche → Kleintiere → Großtiere → Klinische Studie

ZUSAMMENFASSUNG:

- Urothelzellkultur wird aus Biopsiegewebe oder Blasenspülflüssigkeit gewonnen
- Herstellungsschritte: 1. Passage, 2. Stratifizierung, 3. Ablösen
- Vergleichbare Histologie und Markerexpression mit nativem Urothel
- Erfolgreiche Integration in Klein- und Großtiermodelle
- Vorbereitung zur Anwendung in klinischer Studie (Herstellungserlaubnis)
- Offene Fragen:
 - funktionale Differenzierung in vivo
 - Strikturrezidiv (Die Striktur ist eine zu Rezidiven neigende Erkrankung)

Immunhistochemie und Immunzytochemie

- Antikörper-vermittelte Methoden:
 - ELISA
 - Immuno- oder Western-Blot
 - Immunpräzipitation
 - Enzymassay
 - Immunhistochemie
 - Immunzytochemie

Immunhistochemie bzw. -zytochemie kombiniert histologische, immunologische und biochemische Methoden zur Identifikation bestimmter Zielstrukturen
Die Zielstruktur kann aus verschiedenen chemischen Komponenten bestehen, muss aber "immunogen" sein (Herstellung des AK)
- Welche subzellulären Strukturen lassen sich färben?
 - Zytoplasma
 - Kern / Chromatin
 - Membranen / Lipide
 - Proteine
- Technische Variablen für IHC / ICC
 - Auswahl des Antikörpers – mAB / Serum
 - Methode der Gewebe- bzw. Zellfixation
 - Gewebeschnitte: Paraffinschnitt - Kryoschnitt
 - Antigen Retrieval
 - Verdünnung des Antikörpers
 - Verdünnungsmedium
- Technische Variablen für Antikörperdetektion
 - Kontrolle / Isotypkontrolle
 - Direkte – indirekte Färbung
 - Inkubation mit Präimmunserum
 - Enzymatische Detektion
 - Detektion durch Farbstoff (Fluoreszenz)
 - Detektion durch Radioisotopen

Einfluss der Antikörper auf das Resultat

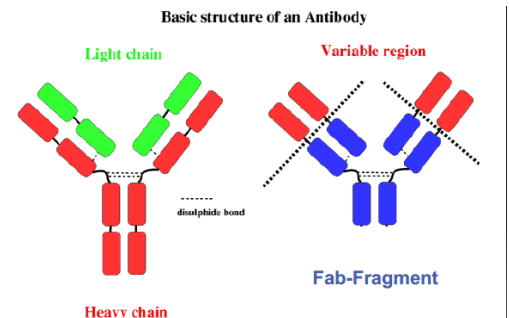
- Immunisierung
 - Spezies der Immunisierung (Kaninchen, Nager, ...)

- Immunisierung mit gesamtem Antigen
- Immunisierung mit Epitop, N-terminus, C-terminus, spezifischem Peptid
- Immunisierung mit modifiziertem Antigen
- Booster-Immunisierung
- Verarbeitung
 - Monoklonaler Antikörper (mAB)
 - Isotyp (IgD, Gx, M, A, E)
 - Aszites, B-Zellüberstand oder aufgereinigt
 - Polyklonaler Antikörper (i.d.R. Serum)
 - Affinitätsgereinigt am Antigen oder Antikörper

Struktur eines Antikörpers (Bsp. IgG):

Monoklonale vs. Polyklonale Antikörper:

Monoklonaler AK	Polyklonale Seren
▫ Maus, Ratte, Kaninchen ▫ B-Hybridoma / Fusion ▫ aufwändige Klonierung ▫ aufwändiger Screen ▫ gute Vergleichbarkeit in der Qualität ▫ gute Mengenproduktion ▫ evtl. schwache Affinität wenn spezifisches Epitop "versteckt"	▫ viele Spezies (z.B. Huhn) ▫ evtl. Spezifität geringer ▫ i.d.R. Affinität gut ▫ evtl. höhere Variabilität ▫ simple Herstellung ▫ besser geeignet bei denaturierten Antigenen z.B. Immunoblot, Paraffinschnitt da nicht nur gegen 1 Epitop



Jeder Antikörper muss für die gewünschte Anwendung geeignet sein

- Immunhistochemie auf Paraffinschnitten – Kryoschnitten
- Durchflusszytometrie – Immunzytochemie
- Immunpräzipitation – Immunoblot

→ testen, validieren!

Paraffin- vs. Kryoschnitte:

Paraffin	Gefrierschnitt
▫ Organische Lösungsmittel ▫ Hitze – Paraffin ▫ -> Verlust der Epitope ▫ Simple Lagerung ▫ Antigenität evtl nicht stabil, evtl. neue Schnitte tiefer im Block erstellen	▫ schonender für Epitope ▫ schlechtere Histologie ▫ schlechtere Morphologie ▫ Auflösung bei höherer Vergrößerung schlechter ▫ Lagerung bei -80°C ▫ Kryoschnitte, Mounting auf Objekträger aufwändiger

Antigen retrieval auf Paraffinschnitten:

Chemisch-Physikalisch	Proteolytisch in Puffer
▫ Bedecke Probe mit: ▫ Citrate 6.0 ▫ Tris-EDTA 9.0 ▫ EDTA 8.0 ▫ Inkubation über WB im Dampf für 15-30 min ▫ N.B. Tropfenbildung	▫ Proteolytisch in Puffer ▫ Proteinase K, Pronase, etc. ▫ kann Epitope zerstören ▫ schlechte Morphologie

- Nach Fixierung immer Permeabilisierung der Probe!
- Fixation mit Aceton / Methanol oä.
- Permeabilisierung mit Triton-X-100, Tween-20, Brij-35 oä. Oder Saponinen
- Mit Blockieren!
- Positive Kontrolle / negative Kontrolle (Probe OHNE das Antigen)

- Enzym-gekoppelte Färbungen: geeignet für Durchlichtmikroskopie, nur zwei Farbvarianten üblich (braun/blau)
- ABC Methode:
 - Add primary Antibody
 - Add biotinylated secondary antibody
 - Add avidin/biotinylated enzyme complex
 - Add enzyme substrate