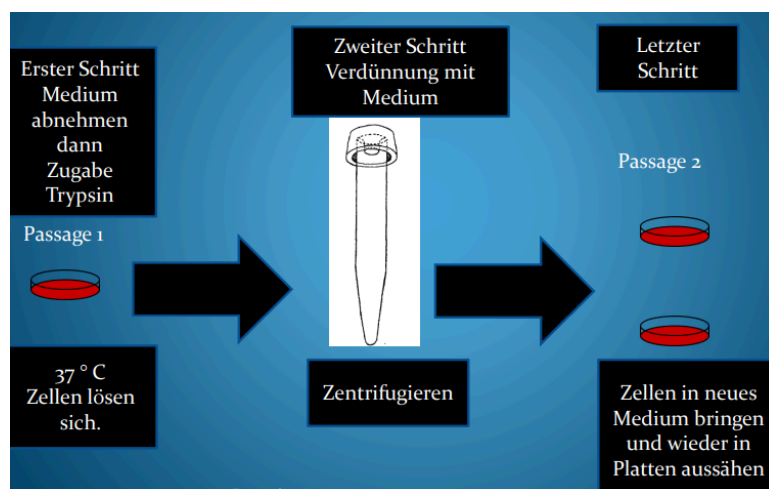


Zellkulturen

▼ Zusammenfassung

▼ Vorteile und Nachteile

- ermöglicht Studium der Zellen in Medium frei von Einflüssen des Körpers
- Zellen können jederzeit untersucht werden
- Zellen können überwachsen
 - Lösung über Subkultivierung (Passagieren = Trypsinieren)



→ Medium alle 2-3 Tage wechseln

! großes Problem: Kontamination (25% Mikroplasma, 15% Kreuzkontamination, 13% Viren, je 2% Hefen/ Pilze und Bakterien)

▼ Optimale Bedingungen schaffen

- Antibiotika ermöglichen Kontaminationen entgegen zu wirken
- Theorie: Ansammlung negativer Stoffe führt zu Zelltod
 - Mit dem richtigen Nährmedium werden Zellen unsterblich
 - Erst MEM, dann DMEM (mit mehr Aminosäuren und Vitaminen)
- Sterile Werkbänke: Transportieren Luft von Person weg, Hepa Filter filtern Partikel > 0,3 Mikrometer
- Inkubatoren sorgen für optimale Temperatur (37°C), CO₂-Gehalt (5%) und Luftfeuchtigkeit (95%)
- Zellen sollen eingefroren werden, um länger haltbar zu sein
 - in flüssigem Stickstoff können Zellen unendlich lang überleben

! Theorie aber nicht umsetzbar, Zellen können sich somatisch nur begrenzt teilen (Telomerverschleiß), maximal Passage 50

▼ Zelllinien

- immortalisierte Zellen (z.B. Krebszellen können sich unendlich oft teilen)
→ ungeordnetes Zellwachstum
- Vorteil: unsterblich
- Nachteil: Abweichendes Verhalten bei Medikamentengabe
- werden mittels Viren immortalisiert

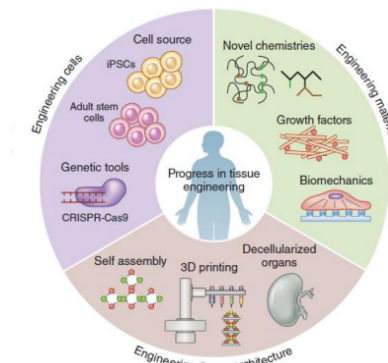
▼ Anwendungen

- Biopharmazeutika
 - Monoklonale Antikörper:
 - Fusion von B-Zellen mit immortalisierten Krebszellen
→ Hybridoma
 - es entstehen hochspezifische Antikörper
→ präziser, aber teurer
- therapeutische Proteine
- Diagnostik (Antikörper für Tumormarker)
- Testsystem für Medikamente/ Produkte

▼ Zellquellen

- embryonale Stammzellen (ethisch problematisch)
- iPSCs:
 - Induzierte pluripotente Stammzellen
 - unbegrenzte Teilung
 - aus adulten Stammzellen

▼ Tissue Engineering



- Bsp. Microtie (Verkümmerung des Ohres)
- Ohrmaus (1997): Chondrozyten gezüchtet und unter Mäusehaut gepflanzt

- 2022 dann erstes komplett gedrucktes Ohr

▼ Zellkulturarten

- Adhärente Zellen:
 - binden an Kultursubstrat
- Feederzellenkultur:
 - Schicht, die sich nicht mehr teilt
 - kultivierte Zellen werden darüber gesät
 - Feeder Schicht produziert Stoffe für darüberliegende Zellen
- Differenzierungskultur:
 - verschiedene Faktoren werden zu den Zellen gegeben
 - können dann schrittweise differenzieren
- Suspensionkultur:
 - Keine Bindung an Oberfläche der Kulturflasche
- Spheroid Kulturen:
 - Zellen lagern sich zu Zellaggregaten (Spheroïden) zusammen
 - wird über Well mit geringer Adhärenz erreicht
 - viel in Tumorforschung, da sehr ähnlich
- Organotypische Kulturen:
 - Organähnliche Strukturen ohne Blutversorgung
 - binden an Oberfläche der Zellkultur
 - Werden durch ein Gerüst (Matrigel, Kollagen) mit Stammzellen gebildet
 - bilden Organspezifische Zellen aus

Hämokompatibilität

▼ Zusammenfassung

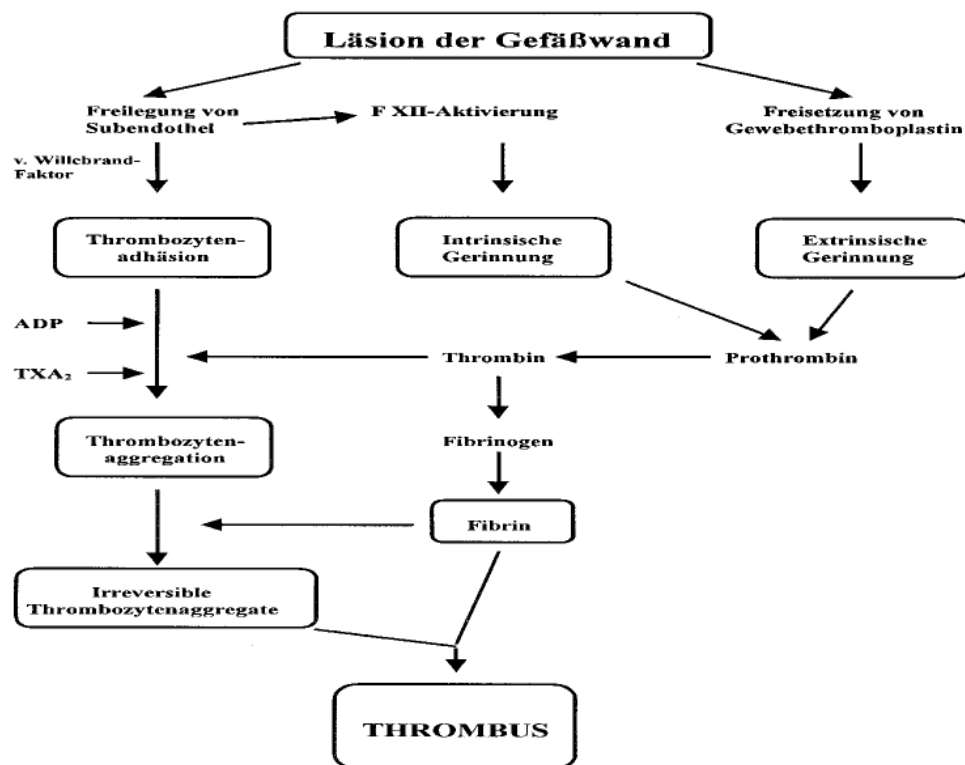
▼ kardiovaskuläre Krankheiten

- sind die Nummer 1 Todesursache weltweit
- mittels Stent oder Bypass Operationen
 - ohne hochspezialisierte Geräte nicht möglich
 - z.B. stent graft, Oxygentor, Stents, Vascular graft, VAD, Herzklappe
- ! trotzdem noch oft schlechte Hämokompatibilität, Koagulation, Entzündungsreaktion, SIRS, Sepsis

▼ Blut

- Hämokompatibilität = Verträglichkeit von Materialien gegenüber Blut
- Blut ist sehr komplex

- Hämostase: Koagulation und Fibrinolyse im Gleichgewicht
 - Koagulation:
 - zu viel: Myokardinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie, Tiefe Beinvenenthrombose
 - Aktivatoren: Thromboplastin, negativgeladene Oberflächen
 - Inhibitoren: Heparin, Hirudin, Warfarin, ASS



- Fibrinolyse:
 - zu viel: Hämatome, Retinale Blutung, Innere Blutung, Intrazerebrale Blutung
 - Aktivatoren: Kallikrein, t-PA, Streptokinase
 - Inhibitoren: Aprotinin, PAI, Antiplasmin

▼ Hämkompatibilität

- Probleme bei Blutkontakt:
 - Koagulation
 - Entzündungsreaktionen
 - Fibrinolyse
- viele komplexe Testmethoden für alle Fehler/ Probleme
 - schlechtester Marker limitiert die Gesamtperformance

- es muss ziemlich frisches Blut verwendet werden, um zu testen (nicht rauchen, keine Medikamente, keine Schwangerschaft, orale Verhütungsmittel)
- Blut muss steril, langsam, ohne Vakuum abgenommen werden
- Als Antikoagulanzen kommt nur unfractioniertes Heparin in Frage , kein Zitratblut, kein Hirudin

▼ Testverfahren

- Chandler Loop Modell
- Durchflusszytometrie vom Vollblut
 - Thrombozytenaktivierung, Leukozytenaktivierung, Aggregatbildung
 - Größe und Oberflächenbeschaffenheit
- Western Blotting
- ELISA

With appropriate test models and usage of fresh human whole blood you can perfectly screen the hemocompatibility of medical devices in an early preclinical stage of device development

Tests for quality assurance of blood contacting medical devices

Short term animal experiments seem to be less sensitive compared to in vitro testing with fresh human blood

PBMC

▼ Zusammenfassung

▼ Hintergrund

= peripheral Blood Mononuclear Cells

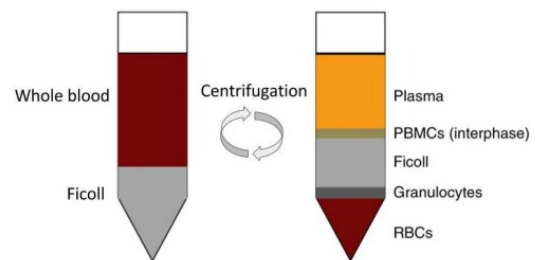
- einkernige Zellen des peripheren Blutes mit rundem, nicht-segmentierten Zellkern
- z.B. Monozyten, Lymphozyten
- Verwendung:
 - Immunologische Tests
 - Untersuchung von Infektionskrankheiten
 - Entwicklung von neuen Medikamenten
 - Hämatologische Erkrankungen
 - Toxikologie
 - Sensor in Monozyten-Aktivierungstests
- Entstehung
 - Entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) → Hämatopoese

- HSCs bilden während der Hämatopoese eine myeloische und eine lymphoide Linie
 - Innerhalb beider Linien gibt es Zellen, die zu den PBMCs gezählt werden
 - Wichtige Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems
 - Schutz gegen virale, bakterielle und parasitäre Infektionen; Zerstörung von Tumorzellen und Fremdstoffen

▼ Monozyten-Aktivierungstest

- Pyrogene = fiebererregende Substanzen, die im menschlichen Körper lebensbedrohliche Symptome auslösen können
- Testarten
 - Rabbit Pyrogen Test (RPT)
 - Kaninchen in Käfigen werden geimpft
 - Limulus Amebocyte Lysate Test (LAL Test)
 - Krabben können hergestellt, werden eingefangen und anscheinend wieder freigelassen
 - Monozyten- Aktivierungstest (MAT)
- Methode:

- Isolation mittels Dichtegradientenzentrifugation
 - Zellpopulationen innerhalb der Leukozyten unterscheiden sich in ihrer Dichte/ Sedimentationsgeschwindigkeit
 - Separationsmedien, bestehend aus Salzen oder Polysacchariden, erzeugen Dichtegradienten
 - Auftrennung von Partikeln nach ihrer Dichte (z.B. Nukleinsäuren, Lipoproteine, Zellorganelle oder Zellpopulationen)
 - Verdünnung des Vollblutes mit PBS
- Zellzahlbestimmung mittels Zählkammer



PCR

▼ Zusammenfassung

▼ DNA

- Aufbau:

- 4 Basen (Nukleotide), die über Phosphodiesterbindungen kovalent verbunden sind
- Antiparallele, komplementäre Stränge, die über Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden
- 3' Ende trägt freie OH-Gruppe, 5' Ende trägt freie Phosphatgruppe
- DNA wird semikonservativ synthetisiert

▼ Polymerasekettenreaktion (PCR)

- Methode zur gezielten Vervielfältigung
- Grundprinzip
 - Schritt 1: Denaturierung der dsDNA in ssDNA bei 93-95°C
 - Schritt 2: Primer-Annealing (Oligonukleotide) binden an ssDNA bei 50-60°C
 - Schritt 3: Elongation durch DNA-Polymerase bei 72°C
- Begriffe:
 - PCR = Enzymatische Vervielfältigungsmethode bei der in mehreren Amplifikationsrunden Primer verlängert werden. Temperatur wechselt periodisch, so dass der Zyklus wiederholt werden kann
 - Amplifizierung = Prozess in dem die Anzahl der Kopien eines bestimmten DNA-Moleküls in einer PCR vervielfältigt werden
 - Amplikon = DNA-Abschnitt, der in der PCR vervielfältigt wurde
- $N = N_0 \cdot 2^n$

▼ Entwicklung

- vor Thermocycler: 8 Stunden pro PCR
- mit Thermocycler: PCR automatisiert, Tendenz zur schnelleren Entwicklung

▼ Komponenten

- Template DNA = Molekül, das die zu amplifizierende Sequenz enthält
- Sense und Antisense Primer
- dNTPs als Substrate
- Thermostabile DNA Polymerase (taq-Polymerase aus thermophilen Bakterien)
- Polymerase Puffer (optimaler pH-Wert, Salzkonzentration)
- MgCl₂ (beeinflusst Primer Annealing und Polymerase Aktivität)

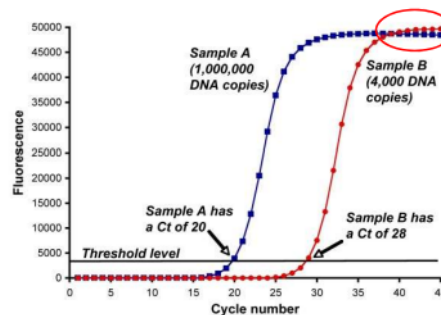
▼ Probleme

- Kontamination
 - nach PCR: Urmengen an bestimmter Sequenz im Labor
 - Kreuzkontamination kann zu falsch positiven Ergebnissen führen
- Vermeidung von Kontaminationen:
 - Immer eine NTC durchführen
 - Kontrolliert arbeiten

- Heftige Luftbewegungen vermeiden
 - Gestopfte Pipettenspitzen verwenden
 - Reaktionsgefäße vorsichtig öffnen, abzentrifugieren
 - Räumliche Trennung in verschiedene Arbeitsbereiche
 - UV-Bestrahlung der Oberflächen
- konventionelle PCR kann nicht quantifizieren
→ Lösung qRT-PCR

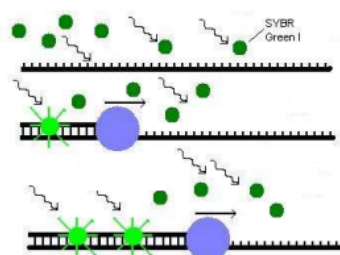
▼ Real-Time PCR

- hat eine Fluoreszenzdetektionseinheit
- Threshold Cycle (Ct) = Zyklus, in dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt

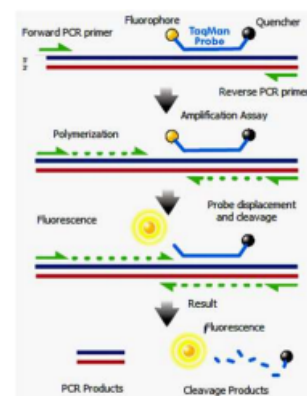


- Je höher die Anzahl an Anfangskopien einer DNA, umso schneller steigt die Fluoreszenzintensität und umso niedriger der Ct-Wert
- Detektion mittels interkalierender Fluorophore (SYBR Green) oder mittels genetischen Sonden (TaqMan-Sonden, teuer)

SYBR Green™-Prinzip



TaqMan™ - Sonden



- Absolute Quantifizierung: Quantifizierung von Kandidatgenen mit Hilfe vordefinierter Standards

- Relative Quantifizierung: Normalisierung mit Referenzgen
- Haushaltsgen: nicht-reguliertes, konstitutiv exprimiertes Gen, das unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird

FACS

▼ Zusammenfassung

= Fluorescence Activated Cell Sorting

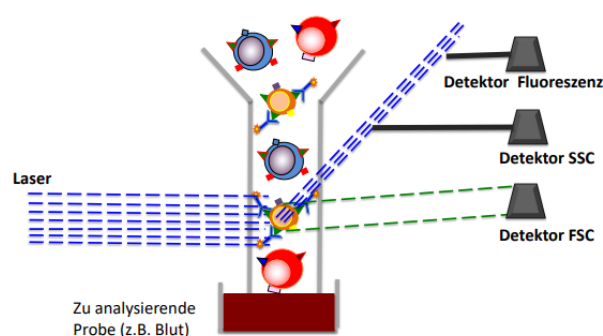
▼ Nachweis von Proteinen

- Messung der Gesamtproteinmenge
 - Bicinchoninsäure Assay (BCA)
- Auftrennung verschiedener Proteine in einem Proteingemisch
 - SDS-PAGE (Gelelektrophorese)
- Detektion eines spezifischen Proteins
 - Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)
 - Durchflusszytometrie

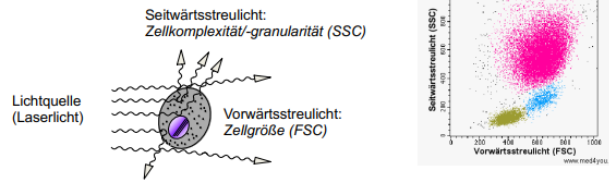
▼ Was ist FACS?

- Experimentelle Technik zur Analyse von Zellen in Vitro mittels Laser
 - Zytometrie = "Zellvermessung"
 - es können sehr viele Zellarten untersucht werden (Blutzellen, Tumorzellen, Stammzellen, Differenzierte Zellen, Bakterien, Hefen,...)
- ! sie müssen aber als Suspension vorliegen

▼ Prinzip



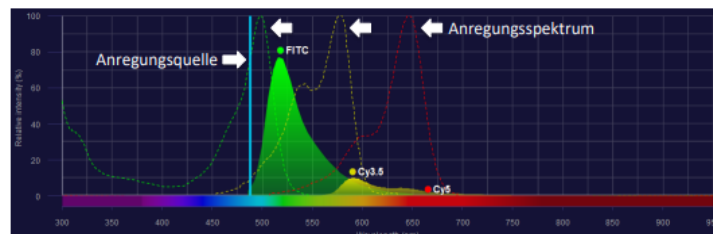
- Vorwärtsstreulicht (FSC) → Zellgröße
- Seitwärtsstreulicht (SSC) → Granularität



- bestimmte Zelltypen weisen eine spezifische Größe und Granularität auf

▼ Zellcharakterisierung mit AK

- Antigene können mit AK + Fluorochrom markiert und sichtbar gemacht werden
→ je mehr AKs an eine Zelle gebunden, desto stärker ist ihr Signal
- Fluorochrome absorbieren Licht in bestimmter Wellenlänge und emittieren Fluoreszenzlicht
→ je näher die Wellenlänge des Lasers am Maximum des Anregungsspektrums, desto stärker das Fluoreszenzsignal



- PE (rot) und FITC (grün) sind gängige Fluorochrome
- mit unterschiedlichen AKs und verschiedenen Fluorochromen kann eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse stattfinden (können selbe Anregungswellenlänge haben)
- Filter ermöglichen gezieltes Ein-/ Ausgrenzen von Wellenlängen
 - Longpassfilter: Licht ab bestimmter Wellenlänge kann passieren
 - Shortpassfilter: Licht bis bestimmter Wellenlänge kann passieren
 - Bandpassfilter: Licht bei bestimmter Wellenlänge kann passieren

▼ Intrazelluläre Färbung

- z.B. Strukturproteine oder Transkriptionsfaktoren
- Zellmembran muss dazu aufgeschlossen werden
 - Detergenzien oder Saponine permeabilisieren Zell- und Zellkernmembran
 - Zelle muss fixiert (z.B. PFA) und nach Inkubation mit AKs gewaschen werden

▼ Sortierung

- Vibration unterteilt Flüssigkeitsstrom in kleine Tröpfchen
→ eine Zelle pro Tropfen
- Elektrisches Feld lenkt die Zellen in unterschiedliche Gefäße

▼ Analyse von Endothelzellspezifischen Oberflächenproteinen

▼ Endothelzellen

- Größe: 0.1 - 1 µm flach und 10 - 25 µm breit
- Besitzen einen Zellkern
- Stark abgeflachte, polygonale Form
- Verbinden sich untereinander durch
 - Desmosomen
 - Tight junctions

▼ Funktion

- Stehen in direktem Kontakt mit Blut
 - bilden die innerste Zellschicht der Blutgefäße
 - ermöglichen stringenten Zellfluss
 - Ernährung und Sauerstoffversorgung aller Körperzellen
 - an Immunreaktion beteiligt: ermöglichen, dass zirkulierende Immunzellen Blutgefäße verlassen können
- ! bei Funktionsverlust: Krankheiten des HK-Systems

▼ Marker

- CD31 (PECAM-1)
 - Verbindungen zwischen benachbarten Zellen
- CD144 (VE-Cadherin)
 - Schlüsselrolle bei endothelialer Barrierefunktion und Angiogenese
- VEGF Receptor 2
 - Steuert Angiogenese und Vaskulogenese
- VWF (von Willebrand Faktor)
 - Durch Endothelzellen synthetisiert

- **CD = Cluster of differentiation**
- **Oberflächenmoleküle** von Zellen (ursprünglich für Leukozyten)
- Können von **Antikörpern erkannt** werden
- **Struktur:**
 - Meist Proteine
 - Kohlenhydrate
- Oft **zellspezifische Expression**
- Aktuell 371 **CD Nummern** aber 417 **CD Moleküle**
- Unterschiedliche **Funktionen**
 - Rezeptorfunktion
 - Signalfunktion
 - Enzymatische Aktivität
 - Interzelluläre Kommunikation

Praktikum

▼ Zusammenfassung

▼ Materialien

- EnGS-Medium für HUVECs
- DMEM mit 10% FBS für HEK-Zellen (Medium)
- Trypsin/EDTA zum ablösen der Zellen
- DPBS- (without Ca²⁺/Mg²⁺) zum waschen der Zellen
- Erythrosin B zum färben, um auszuzählen

▼ Ablauf

- Medium erwärmen, Zellen beurteilen, Sterilbank vorbereiten
- Zellrasen mit DPBS waschen und absaugen
- Trypsin (EDTA) auf Zellen geben, inkubieren und Zellablösung kontrollieren
- Medium auf Zellen geben, um Ablösevorgang zu stoppen
- Zellsuspension in Falcon geben zentrifugieren, Flüssigkeit absaugen
- Zellpellet resuspendieren, auszählen, Konzentration berechnen

$$c = \frac{\text{gezählte lebende Zellen}}{\text{Anzahl der großen gezählten Quadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10.000$$

- Zellsuspensionsvolumen berechnen, Medium in Wells vorlegen, Zellen in berechnetem Volumen aussäen, wieder kultivieren

Potenzielle Fragen

▼ Fragen

- Wie unterscheiden sich primäre Zellen von Zelllinien?
 - primär: endlich kultivierbar
 - Zelllinie: unendlich wegen Tumoren und Viren
- Wofür steht HUVEC oder HEK-Zellen?
 - Human Umbilical Vein Endothelial Cells (primäre Zellen)
 - Human Endothelial Kidney Zellen (Zelllinie)
- Welches Medium für HUVEC oder HEK?
 - EnGS
 - DMEM
- Welche Funktion hat DPBS beim ablösen der Zellen?
 - Tote Zellen wegwaschen
 - spülen

- Wie ändert sich die Passage mit dem Ablösen?
 - wird um 1 erhöht
- Welche Zellen färbt Erythrosin B rot?
 - Tote Zellen
- Was ist wichtig beim zentrifugieren?
 - Ausgleich (symmetrisch reinstellen)
- Formel für Verdünnung

$$c = \frac{\text{gezählte lebende Zellen}}{\text{Anzahl der großen gezählten Quadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10.000$$

- Gängige Methode zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Substanzen
 - Bestimmung des Hemmhofdurchmessers
- Wie ist die Wirkungsweise von Kanamycin?
 - Es lagert sich an die 30S Untereinheit des Ribosoms an
 - es hemmt die Proteinbiosynthese
- Kreuzen Sie die richtigen Aussagen an
 - Grampositive Bakterien besitzen im Gegensatz zu gramnegativen Bakterien eine dicke Peptidoglykanschicht (Murein)
 - Zellwand von gramnegativen Bakterien wird durch Kalilauge lysiert, Zellen brechen auf und DNA wird freigesetzt
 - gramnegative Zellen besitzen in der äußeren Zellmembran verankerte Lipopolysaccharide, welche bei Lyse als Endotoxine wirken
- Was ist wichtig für ein Medizinprodukt?
 - Sicherheit und Performance
- Was gehört in die technische Dokumentation?
 - Produktbeschreibung und Spezifikation, Varianten und Zubehörteile
 - vom Hersteller zu liefernde Informationen
 - Informationen zu Auslegung und Herstellung
 - Grundlegende Sicherheits- und Leistungsanforderungen
 - Nutzen-Risiko-Analyse und Risikomanagement
 - Verifizierung und Validierung des Produkts
- Was ist die Seldinger Technik?
 - Punktion mit Nadel, vorschieben eines Führungsdrahtes, Katheter über den Draht platzieren, Draht wieder herausziehen
 - sicheres Einführen von Kathetern, Drainagen