

Schenke-Layland Labor

Einführung

▼ Zusammenfassung

▼ Was ist Tissue Engineering (TE)?

- interdisziplinäres Arbeitsgebiet von Ingenieurs-/ Lebenswissenschaften
- Aufklärung grundsätzlicher Mechanismen und Funktionen in gesundem und pathologischem Gewebe
- Ziel: Entwicklung von biologischen Ersatzgeweben

→ Unterstützung oder Ersatz von geschädigtem/ ausgefallenem Gewebe/ Organfunktionen

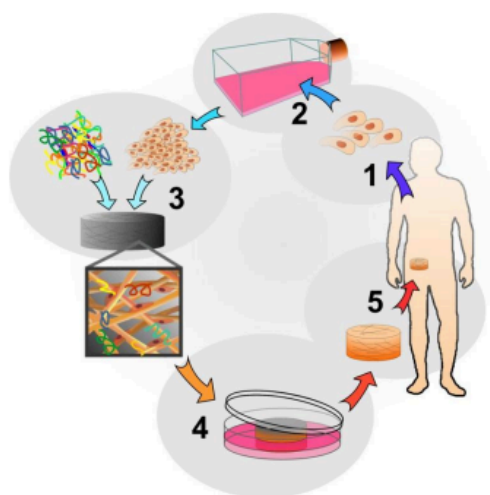
▼ Wozu TE?

- in Industrie als Testsysteme
- in Medizin als Organersatz
 - Ausgleich von Mangel an Spenderorganen
 - Mangel an Spenderorganen (aktuell autolog, allogene oder xenogene)

▼ Interdisziplinäres Arbeitsgebiet

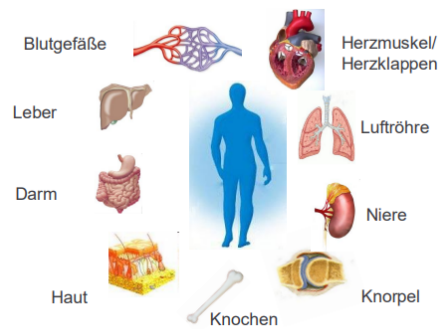
- Mediziner
- Zell-, Molekular-, Entwicklungsbiologen
- Immunologen
- Materialwissenschaftler, Chemiker
- Ingenieure, Bioverfahrenstechniker
- Medizintechniker

▼ Prinzip des TE



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

▼ Gewebearten



→ schwierig, über 200 Zelltypen mit individuellen Ansprüchen

→ jedes Organ besteht aus unterschiedlichen Zelltypen

▼ Grundbedürfnisse von in Vitro Zellen

- Nahrung/ Versorgung
- Inkubation
- Bioreaktor
- andere Zellen
- ! Bakterien und Hefe können die Zellen kontaminieren

▼ Zellquellen

- Zelllinie
- primäre Zellen
- adulte Stammzellen
- embryonale Stammzellen
- reprogrammierte Zellen (iPS)

→ verschiedene Zellquellen: Wofür eingesetzt, wie verfügbar sind die Zellen, wie viel Zeit hat man, Reproduzierbarkeit, Zelleigenschaften?

▼ Zelllinie

= immortalisierte Zellen, die sich unbegrenzt teilen können, aber mutieren

- HeLa: Erste permanente Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms
- HEK293, Jurkat, HepG2

Vorteile:

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

Nachteile:

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

▼ primäre Zellen

- Gewebe → mechanische Zerkleinerung → Enzymatischer Verdau → Dichtegradienten Zentrifugation

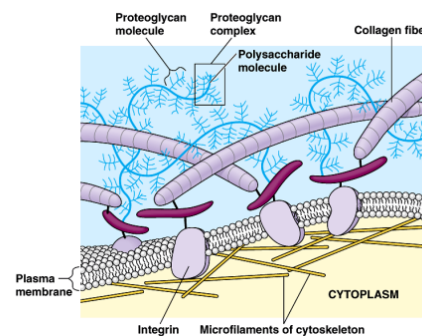
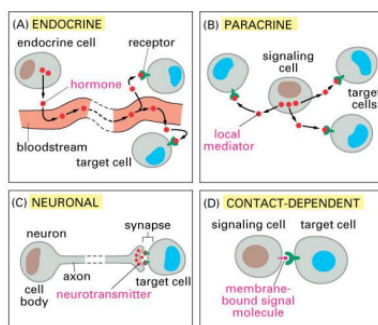
Vorteile:

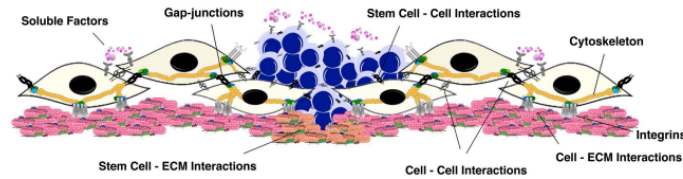
- Isolation aus Gewebe
- Eigenschaften der Zellen wie „in vivo“
- autolog verwendbar (gleicher Spender wie Empfänger)
- Funktionell und ausdifferenziert

Nachteile:

- 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





▼ Trägerstrukturen/ Biomaterialien

- künstliche vs. biologische Matrix
- Coated Cell Culture Flask
- 3D Gels
- 3D Electrospun Substrates
- Herstellung z.B. über Elektrosponning

▼ Bioreaktoren

- Simulationen zur Parametrierung von Bioreaktoren und zur Analyse von biologischen Prozessen
- Inkubatorsysteme für das Tissue Engineering
- Entwicklung von Regelungs- und Steuerungssysteme
- Ausprägen von verschiedenen Reizen (Druck, Fluss,...)
- Monitoring durch Messung des Transepithelialen elektrischen Widerstands

▼ 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

▼ aktueller Stand

- Hautäquivalent
- Darmtestsystem
- Knorpelimplantat aus Chondrozyten und Kollagen: klinischer Einsatz
- Hautimplantat aus Fibroblasten/Keratinocyten und Kollagen: klinischer Einsatz

- Zelltransplantationen: z.B. Stammzellen für Leukämie, Muskelzellen bei Inkontinenz

Extrazelluläre Matrix

▼ Zusammenfassung

▼ Was ist die Extrazelluläre Matrix (ECM)?

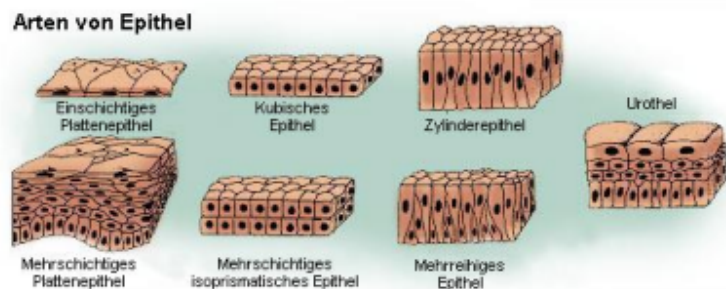
- gefüllt mit komplexem Geflecht an Makromolekülen und Proteinen
- Essentiell für Adhäsion, Migration, Proliferation, Differenzierung
- EZM beschreibt Gesamtheit aller Makromoleküle im Interzellularraum
- übernimmt stützende und funktionelle Aufgaben
- Fasern: Retikuläre Fasern, Kollagene Fasern, Elastische Fasern
- Nicht-Fasern: Proteoglykane, Glykosaminoglykane, Fibronectin, Matrizelluläre Proteine

▼ Bindegewebe

- Hauptsächlich ECM
- Faserförmige Polymere
- Kaum Zell-Zell Kontakte

▼ Epithelgewebe

- Hauptbestandteil: Zellen
- wenig ECM
- Viel Zell-Zell Kontakte



▼ Sekretion

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

→ Aufbau intra- und extrazellulär:

intrazellulär Proteinbiosynthese,

extrazellulär Bildung größerer Konstrukte (Fasern,...)

▼ Wesentliche Funktionen

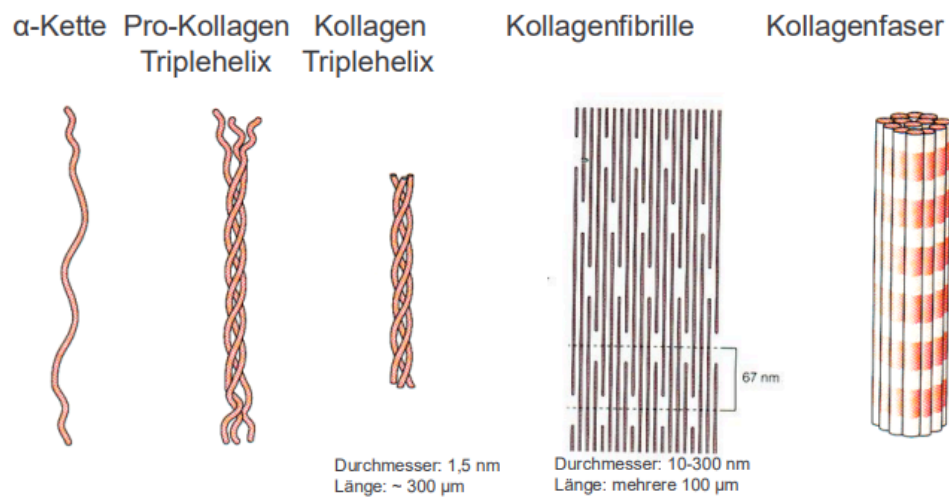
- Formgebung von Geweben und Organen
- bietet Möglichkeit zur Adhäsion von Zellen
- Kontrolle des Zellwachstums
- Zelldifferenzierung
- Beeinflussung der Gewebserneuerung/ Wundheilung
- Speicherung und Präsentation von regulatorischen Molekülen

▼ Spezialisierte ECM

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

▼ Kollagen

- 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



- Durchmesser von Kollagenbündeln: 2-20 µm
 - Hohe Zugfestigkeit in Längsrichtung
- nicht dehnbar
- auch in Knochen und Dentin
- Fasern sind nach Belastungsrichtung ausgerichtet
- Haut geflechtartig, Sehnen parallel

- **Fibrilläre Kollagene:** Kollagene des Typs I, II, III, V und XI
- **Netzbildende Kollagene:** Kollagene des Typs IV, VIII und X
- **Fibrillen-assoziierte Kollagene**
(Fibril-associated collagens with interrupted triple helices - **FACT**): Kollagene des Typs IX, XII und XIV
- **Perlenschnurartige Kollagene:** Kollagen Typ VI
- **Verankerungsfibrillen:** Kollagen Typ VII
- **Kollagene mit Transmembrandomänen:** Kollagene des Typs XIII und XVII

! nur Fasern von Typ 1 dürfen Kollagenfasern genannt werden

▼ Elastische Fasern

- quervernetzte Tropoelastin-Moleküle
- elastische Fasern aus Fibrillinen
- sehr dehnbar: 100-150%
- bilden sich während früher Entwicklung
- Schäden werden nur unzureichend repariert (in adulten Geweben)
- häufig mit Kollagen, um Überdehnung zu vermeiden und um Kollagen in ursprüngliche Lage zu bringen
- hoher Anteil an hydrophoben Aminosäuren
- kovalente Bindungen zwischen Lysil-Resten wirken stabilisierend

→ Desmosin und Isodesmosin

→ Lysil-Oxidase

→ machen Elastin wasserunlöslich, hitzestabil und Proteinase-resistent

- in Arterien konzentrische Ringe, als Netzwerke in Ohrenknorpel, Lungenalveolen,...
- von Fibroblasten und glatten Muskelzellen synthetisiert

▼ Proteoglykane

- Kernprotein + Seitenketten aus sulfurierten Glykosaminoglykanen (GAG)

→ werden nach GAG eingeteilt

- 4 Klassen:

GAGs	Kleine PGs	Große PGs
Chondroitinsulfat/Dermatansulfat	Decorin, kDa=36 Biglycan, kDa=38	Versican, kDa=260-370
Heparansulfat / Chondroitinsulfat	Testican, kDa=44	Perlecan, kDa=400-470
Chondroitinsulfat		Neurocan, kDa=136 Aggrecan, kDa=220
Keratansulfat	Fibromodulin, kDa=42 Lumican, kDa=38	

- Aufgaben:
 - Bildung von Gelen unterschiedlicher Porengröße und Ladungsdichte
 - Filtereigenschaften (Perlecan in der Niere)

- Signalübertragung
 - Bindung von sezernierten Signalmolekülen
 - Stimulation oder Inhibition von Aktivität
- Festhalten von Chemokinen an Entzündungsstelle
 - so können weiße Blutkörperchen eindringen
- Komplexbildung mit anderen PGs, Hyaluronsäure (HA), Faserproteinen und Kollagen
- Zelloberflächenrezeptoren
 - mind. eine GAG am Kernprotein

GAG:

- Lange unverzweigte Polysaccharidketten
- aus Disaccharideinheiten
- sehr hydrophil, stark sauer
- Wassereinlagerung → Bildung von Gelen (z.B. Kniegelenk)

SLRPs

- = small leucin-rich PGs
- z.B. Decorin, Biglycans, Fibromodulin, Lumican, PRELP, Asporin, Chondroadherin
- Decorin:
 - Kernprotein und Chondroitin-/ Dermatansulfat
 - besteht aus 3 Regionen (N-Terminal mit Chondroitin-/ Dermatansulfat, leucin-reiche Mitte und Cystein-reiches C-Terminal)
 - Kollagenbildung
 - Regulierung von Wachstumsfaktoren
 - Regulation des Zellwachstums
 - anti-fibrotisch

Hyaluronsäure

- einfachstes GAG: sulfatfreies, repetitives Disaccharid
- nicht kovalent an Proteine gebunden
- Druckfestigkeit von Geweben und gelenken
- Wasserspeicherung (Auge: 98% Wasser an 2% HA gebunden)
- Wesentlicher Bestandteil der Gelenkflüssigkeit
- Wundheilung

Heparansulfat

- meist an der Zelloberfläche an Syndecan- oder Glypican-kernproteine gebunden
- Co-Rezeptoren

- viele Proteine, die an Heparansulfat gebunden sind, sind z.B. an Wundheilung, Immunabwehr, Energiestoffwechsel beteiligt

Fibronektin

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

Laminine

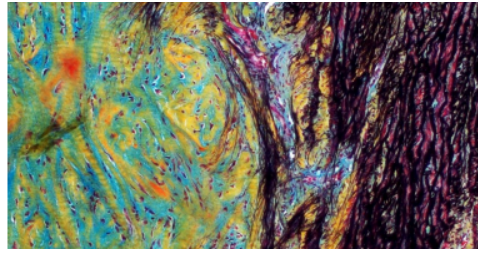
- Bestandteil der Basallamina
- Protein-Trimer aus α -, β -, und γ -Kette
- bilden Netzwerke
- viele Bindungsstellen
- mit Kollagen IV verbunden
- Aufgaben bei Entwicklung, Zelldifferenzierung, Zellmigration
- können mit Zelloberflächenrezeptoren interagieren

Matrizelluläre Proteine

- ECM Proteine, die Zell-Matrix-Interaktionen steuern
- Regulieren Zellfunktionen durch Interaktionen mit
 - Zelloberflächenrezeptoren
 - Proteasen
 - Wachstumsfaktoren
 - Strukturelle Matrixproteine
- Eigenschaften:
 - Während Entwicklung und nach Verletzung stark exprimiert
 - Vermindern Zelladhäsion

▼ Histologie

- Russel-Movat-Pentachrom



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

▼ MMPs und TIMPs

- MMPs
 - Matrix-Metalloproteasen
 - zinkhaltige Endopeptidasen
 - Ab- und Umbau von Gewebe
 - Morphogenese, Wundheilung, Angiogenese, Tumorwachstum
 - Prozessieren von Signalmolekülen
 - Netzwerk von MMPs und TIMPs (körpereigene Proteaseinhibitoren)

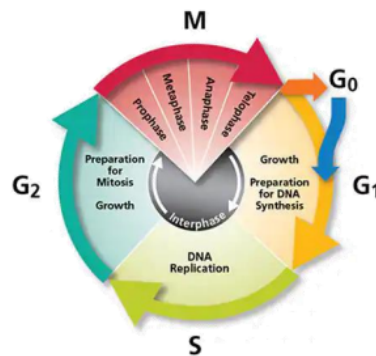
Stammzellen

▼ Zusammenfassung

▼ Zellproliferation

- Zellzyklus:

Zellzyklus und Hayflick-Grenze



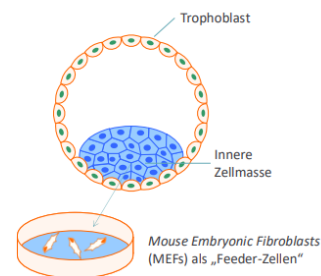
- Seneszenz durch Telomerverkürzung und DNA-Schäden (replikative Seneszenz) oder Onkogen-Aktivierung (prämaturre Seneszenz)
 - ! unerwünscht für langzeitige in-vitro Kultur
- Mechanismen der Telomer-Verlängerung
 - Enzymatische Verlängerung durch Telomerase (TERT)
 - Alternative "Lengthening of Telomeres" (ALT)
 - Telomer-Trimmen, um Telomer-Verlängerung und genetische Instabilität auszugleichen

▼ Stammzellen

- besitzen Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in verschiedene Zelltypen nach Stimulation
- abhängig von Differenzierungspotential und Ursprung:
 - pluripotente embryonale Stammzellen
 - multipotente oder unipotente adulte Stammzellen
 - induzierte pluripotente Stammzellen

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

- embryonale Stammzellen:
 - das erste Mal aus Maus isoliert
 - Isolation aus der inneren Zellmasse
 - Trophoblast wird entfernt (mittels AK oder Laserablation)
 - pluripotent
 - aktive Telomerase (unendliche Proliferation)
 - Herstellung in Europa verboten, Import von Zellen vor Stichtag erlaubt



Anwendungen

Embryonale Stammzellen

- Human-basierte in vitro Zellkulturmodelle
z.B. ESC-abgeleitete Kardiomyozyten/cardiomyocytes zur Untersuchung von Herzkrankheiten
Advantage: easy manipulation of ESCs (physically and genetically)
- Entwicklungsbiologie
- Medikamentenentwicklung
- Disease modelling
- Zelltherapie
- Regenerative Medizin
- Tissue engineering

- Adulte Stammzellen
 - jedes Organ hat spezialisierte adulte Stammzellen, multi oder unipotent
 - Gewinnung über Knochenmarkpunktion, Biopsien und aus Blut
 - schwer zu identifizieren, selten
 - Einteilung nach Ursprung (hämatopoetische, neuronale,... Stammzellen)

Anwendungen

Adulte Stammzellen

Medizinische Anwendungen

- Stammzelltherapie für Leukämie und Lymphoma
- Erster Nachweis verbesserter Regeneration für Stammzelltherapien von Herzinfarkt und Multiple Sklerose

Problem:

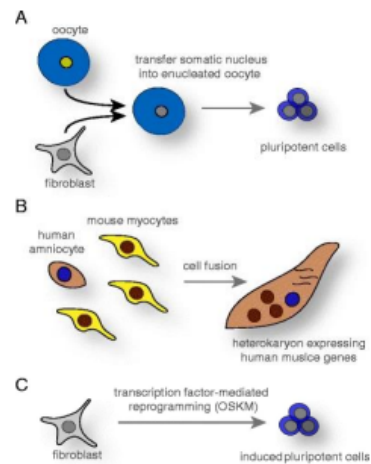
Ertrag bei adulter Stammzellisolation oft für therapeutische Ansätze zu gering
bisher nur für Blut- und Knochenmark-abgeleitete adulte Stammzellen ausreichend

Nicht-klinische Anwendungen

- In vitro Forschung
- 3D Zellkulturmodelle
- On-chip Differenzierung (z.B. wenn Primärzellen nicht verfügbar oder stabil sind)

• iPSCs

- Transformation von adulten in pluripotente Stammzellen
- unbegrenzt propagieren und in jeden Zelltyp differenzieren
- Methoden:
 - somatischer Zellkerntransfer
 - Zellfusion
 - Reprogrammierung
 - Yamanaka-Faktoren: Oct4, Sox2, Lin28, Nanog



Anwendungen

Induziert pluripotente Stammzellen

Medikamentenentwicklung (safety and efficacy testing)
Patienten-spezifische Testmodelle
Tissue engineering
Präzisionsmedizin & personalisierte Medizin

	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

▼ Differenzierung

- Waddington Landscape:
 - Differenzierungspotential als Berg-Tal-Landschaft
 - Kugel rollt von Berg (totipotent) ins Tal (pluripotent)
 - verschiedene Täler = verschiedene Zellschicksale
 - durch Reprogrammierung gewinnt die Kugel an Höhe
- Embryoid Bodies:
 - pluripotente Stammzellen können selbst-organisierte 3D-Strukturen bilden
 - EBs rekapitulieren frühe in-vivo-Embryogenese
 - können verwendet werden, um stärker differenzierte Zellen zu produzieren

- aus pluripotenten Stammzellen:
 - aus Monolayer-Differenzierung
 - schrittweise Zugabe von Wachstumsfaktoren, mechanischer Stimulation und anderen Faktoren
 - Probleme und Limitationen
 - Differenzierungseffizienzen sind oft niedrig
 - Lange Differenzierungszeiten
 - Unterschiedliche Effizienzen in verschiedenen Laboren und mit verschiedenen Ausgangszellen
 - Aufreinigung der Zellen aufwendig oder nicht möglich aufgrund fehlender Oberflächenmarker (Beispiel Kardiomyozyten)
 - Vorteile
 - Leicht verfügbar (viele Ursprungsgewebe, minimal invasiv)
 - Pluripotente Stammzellen können (unendlich) lange expandiert werden
 - Breites Differenzierungsspektrum
 - Weniger ethische Bedenken
 - Autologe Quelle möglich

Analysemethoden I

▼ Zusammenfassung

▼ Analyse-Ebenen

- erfasst den aktuellen Zustand eines Systems
- erfasst Änderungen eines Zustands durch einen äußeren Stimulus

→ qualitative oder quantitative Ergebnisse

- Makroskopische Analyse:

- Phänotyp

→ Unterscheidung äußerlicher Merkmale

- visuelle Gewebeuntersuchung

- Mikroskopische Analyse

- Histologie

- = Lehre von Gewebe, mikroskopische Anatomie
- wird an hauchdünnen Schnitten durchgeführt (optische Dichte von Gewebe)
- Erhöhung des Kontrasts durch Reaktion mit Farbstoff

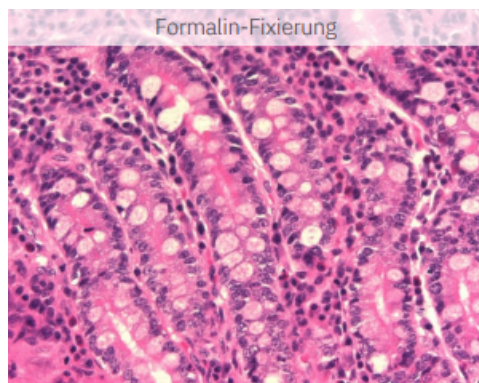
- Durchlicht-Mikroskopie

- Durchleuchtung einer transparenten Probe

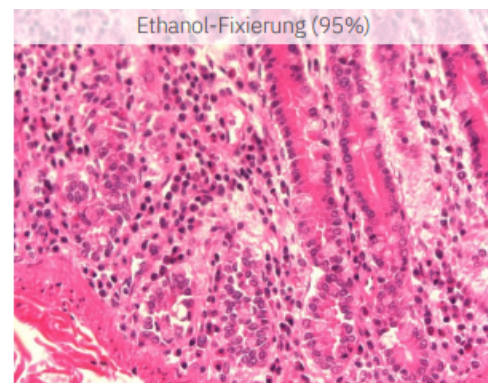
- ! Auflichtmikroskopie für lichtundurchlässige Proben

▼ Präparationstechniken

1. Konservierung
Beibehalten des Gewebezustandes zum Zeitpunkt der Entnahme
 2. Einbetten
Entwässern, Ausrichten und Vorbereiten der Probe für bessere Handhabung in den nächsten Schritten Auswahl des Einbettmediums je nach Probe
 3. Schneiden
Minimierung der Gewebedicke um Visualisierung einzelner Strukturen zu ermöglichen
 4. Färben
Identifizierung definierter Gewebebestandteile
 5. Mikroskopie
Festhalten der strukturellen Zusammensetzung des Gewebes
- Fixieren
 - stoppt biochemische Reaktionen und schützt vor Verfall
→ Erhalt der Gewebsstrukturen
 - physikalisch:
 - Trocknen oder Hitze
 ! führt zu morphologischen Schäden (also nichts für Histologie)
 - chemisch
 - Zugabe von Fixiersubstanzen (am häufigsten formalinhaltig)
 → Entzug von Wasser und Vernetzung der Proteine
 - Gründe:
 - Abbauprozesse stoppen
 - bessere Bindung des Farbstoffs
 - Zellen entfernen



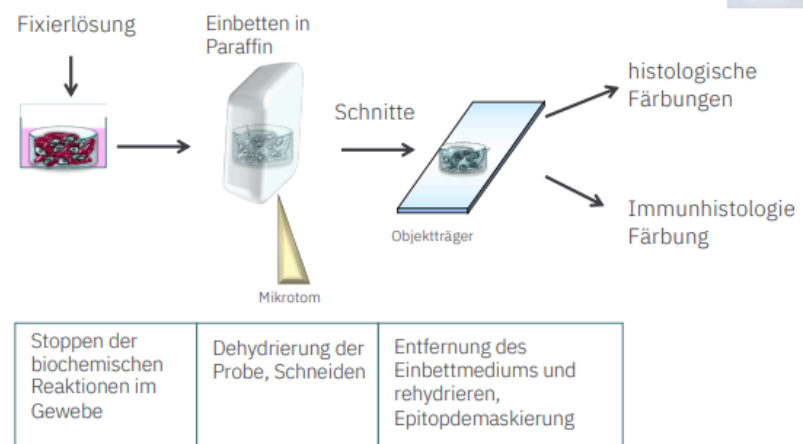
Quervernetzende Fixierung
Leichte zelluläre Schrumpfung
Guter Erhalt extrazellulärer Bestandteile und der Zellkerne



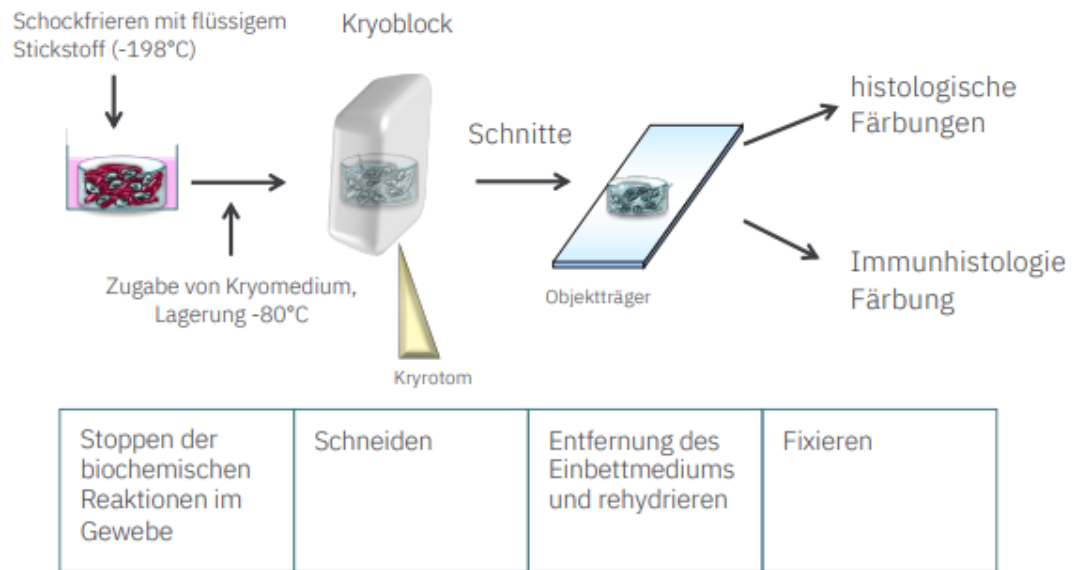
Denaturierende Fixierung
Starke Schrumpfung der zytoplasmatischen und extrazellulären Elemente

- Clearing:
 - Extraktion von Lipiden und gelösten Bestandteilen
 - organische Lösungsmittel, hyperhydrierende Lösungen oder Lösungen mit erhöhtem Brechungsindex
 - Anpassung der Brechungsindices, Gewebe werden transparent
- Einbetten:
 - ! Probeneigenschaften bestimmen Eigenschaften des Einbettmediums
 - ! Einbettmedium muss vor Färbung entfernt werden
 - Weichgewebe-Histologie:
 - Standardmethode für Großteil aller Gewebe
 - Einbetten in Paraffin oder Kryomedium
 - Schneiden über Metallklinge (Mikrotom, Kryotom)
 - Hartgewebe-Histologie
 - für Knochen und Proben mit festen Implantatbestandteilen
 - Einbetten in Methacrylat- oder Epoxidharze
 - Schneiden mit Diamantsäge
- Paraffinschnitte:

Paraffinschnitte



- Kryoschnitt:



▼ Histologische Färbungen allgemein

- Allgemeines:
 - dienen der Darstellung unterschiedlicher Gewebsstrukturen (Übersichtsfärbung)
 - Standardfärbungen für Zellkerne, Zytoplasma, Kollagenfasern und elastische Fasern
 - Färbungen können reversible oder irreversible Mechanismen haben
 - Unterschiedliche Affinitäten zwischen Farbstoffen und Gewebebestandteilen
 - Elektrostatische Wechselwirkungen
 - Chemische Bindungen
 - Faktoren, die bei Reihenfolge berücksichtigt werden
 - Temperatur
 - Färbeprinzip
 - pH-Wert
 - Lösungsmittel
- Farbstoffe
 - sind selbst farbig, binden an Substrat
 - werden durch Bindungsreaktionen oder histochemische Reaktionen farbig
 - enthalten chromophore (Benzolring) oder auxophore (Verstärkt Farbeffekt) Gruppen
- Zielstrukturen

Stoffgruppe	Strukturbeispiel
Protein	Zytoplasma Bindegewebe Muskel
Kohlenhydrate	Becherzellen Basalmembran Knorpel
Lipide	Fettgewebe Myelin
Nukleinsäuren	Zellkerne
Mineralien	Knochen

- Einteilung von Farbstoffen

Farbstoffeigenschaft	Zielstruktur	Beispiel
Basisch, azidophil	DNA, Elastin	Methylenblau, Fuchsin, Alcianblau, Hämatoxylin
Sauer, basophil	Plasma, Kollagen	Eosin, Kongorot
Indifferent = lipophil	Fett	Sudan III, Scharlachrot, Öl-Rot

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

- Färbungen

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
Von Kossa	Kalzium
Movat-Pentachrom	Extrazelluläre Matrix (Kollagen, elastische Fasern, Proteoglykane)

- Färbeprinzipien:

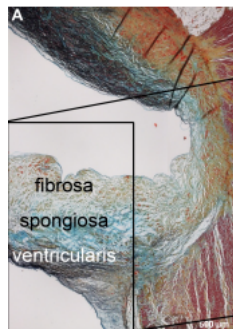
- chemisch
 - beruht auf chemischen Bindungen
 - nicht mehr entfärbbar
 - PAS: Zellkerne blau, Becherzellen rot
- physikalisch:
 - beruht auf unterschiedlicher Löslichkeit der Farbstoffe
 - Öl-Rot: Lipide rot, Zellkerne blau
- chemisch-physikalisch

- Effekte durch Dispersität der Farbstoffpartikel und Adsorptionseffekte
- HE-Färbung

▼ HE Färbung

- Hämatoxylin ist positiv geladen und azidophil
 - bindet an saure Bestandteile der DNA
 - Kernfärbung (Zellkern = basophile Organelle)
- Eosin ist negativ geladen und basophil
 - bindet an positive Gewebsbestandteile (Proteine, Kollagen)
 - Plasmafärbung, EZM Färbung
- Ablauf:
 - Entparaffinieren (Xylol) und schrittweise Rehydrierung über absteigende Ethanolreihe, spülen
 - Bläuen: Hämalun: Flxierung und Intensivierung durch Änderung des pH-Werts: von rot zu blau durch leicht alkalischen pH des Leitungswassers
 - Eosin, mit Aqua d. differenzieren (überschüssige Farbanteile entfärben)
 - dehydrieren in aufsteigender Ethanolreihe
 - aufhellen der Schnitte, Entfernung des Ethanols durch Xylol
 - eindecken mit xylollöslichem Eindeckmedium, Deckglas
 - langfristige Konservierung

▼ Movat-Pentachrom Färbung



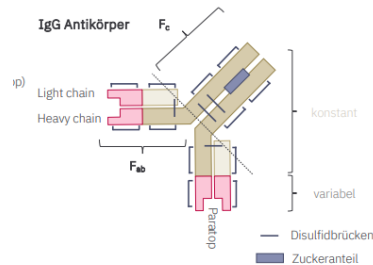
- Alcianblau: färbt Proteoglykane hellblau bis grün
- Brilliant Crocein-Säurefuchsin: färbt Fibrin und Muskel rot
- Hämatoxylin: färbt elastische Fasern, Zellkerne blau bis schwarz
- Saffron: färbt Kollagen gelb

▼ Immunhistologische Färbung

= Gezieltes Färben von Proteinen im Gewebe oder zellspezifischen Markerproteine mithilfe von Antikörpern

- Immunohistochemie (IHC), Immunzytochemie (ICC), Immunfluoreszenz (IF)

- Antikörper
 - 2 leichte und 2 schwere Ketten
 - variabler Bereich bestimmt Bindungsbereich am Epitop eines Antigens
 - konstanter Bereich bestimmt Immunglobulinzugehörigkeit (Isotyp)



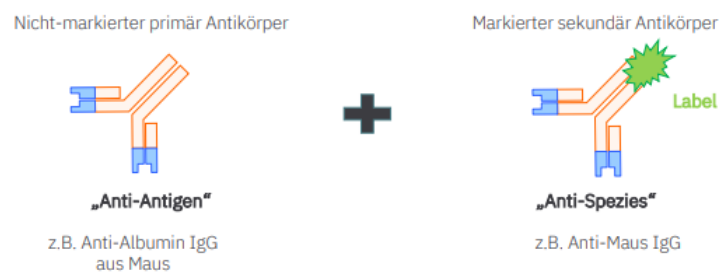
- Antigene
 - Lösliche oder unlösliche Peptid-, Glykosid-, Nukleinsäurestruktur
 - Antigenepitope werden von Rezeptoren an Immunzellen und Antikörpern erkannt
 - immunogen = lösen adaptive Immunantwort auf
 - Erkennung des Antigens
 - Aktivierung von T-Helferzellen und B-Plasmazellen
 - Antigen-Antikörper-Komplex zur Elimination
- Polyklonale Antikörper
 - Immunisierung eines Wirbeltiers (Maus, Ziege, Kaninchen, Schaf)
 - Injektion des Antigens
 - Gewinnung von Antikörpern aus dem Serum z.B. mittels Affinitätschromatographie
 - Antikörper gegen verschiedene Epitope eines Antigens (polyklonal)

! Tierschonender: Immunisierung von Hühnern, Gewinnung von IgY aus Eiern
- Monoklonale Antikörper
 - Hybridom-Technologie
 - Hybridzellen aus Fusion von immortalisierten Myelomazellen und B-Zellen immunisierter Mäuse
 - Selektion von fusionierten und nicht-fusionierten Zellen mittels Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin Medium
 - Isolation der Hybridzellen und Testen der Antikörperspezifität
 - Klonierung
 - unbegrenzte Produktion von AK gegen ein Epitop
 - alle AK stammen aus einer ursprünglichen B-Zelle

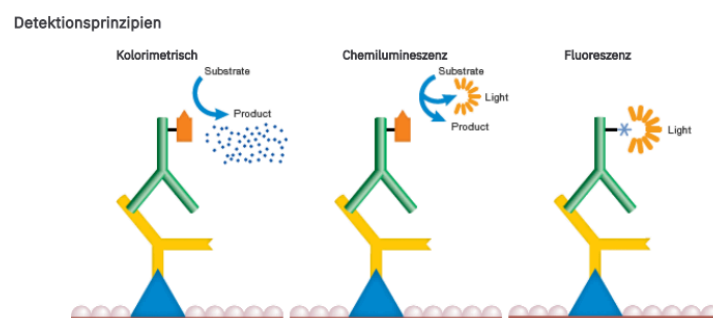
- Vergleich:
 - Polyklonal:
 - Anti-Maus-IgG-Antiserum vom Kaninchen
 - verschiedene AK
 - begrenzte Menge
 - Chargenunterschiede
 - unterschiedliche Epitopspezifitäten
 - Kreuzreaktionen vermutlich
 - Spezifität
 - unspezifische AKbindung führt zu Hintergrundfärbung
 - Waschpuffer werden mit Proteinen versetzt, um unspezifische Bindung abzublocken (BSA, Magermilchpulver, Fischgelatine)

▼ Detektion der AK

- Indirektes AK-Labeling



- Signalverstärkung
- Markierte Primär-AK häufig nicht kommerziell erhältlich
- relativ günstig
- Kontrollpräparat
- Direkte Methode
 - weniger Hintergrundfärbung
 - schnellere Durchführung der Färbung
 - mehrere Primär-AK derselben Spezies bei Mehrfachfärbung verwendbar



- Enzymgekoppelte AK
 - AK-Bindung durch Umsetzung eines Substrats zu farbigem, unlöslichem Produkt sichtbar
 - Horseradish peroxidase (HRP)
 - oxidiert DAB
 - dunkelbrauner unlöslicher Niederschlag
 - Alkalische Phosphatase (ALP)
 - Substrat: organische Phosphatverbindungen
 - in situ Hybridisierung
- Signalverstärkung
 - ABC-Technik
 - Einsatz von biotinylierten sekundären AK
 - Avidin und Streptavidin
 - Bildung eines ABC-Komplexes
 - je Antigen ist eine höhere Anzahl an signalgebendem Enzym gebunden
 - Signalverstärkung
 - Nachweis sehr geringer Antigenmengen
 - !Endogenes Biotin muss geblockt werden
 - ELISA, FACS, MACS, Immunopräzipitation, Western Blot
- Immunofluoreszenzfärbung (IF)
 - Immunohistochemie mit Fluoreszenz-aktivem Farbstoff als direktes oder indirektes Label
 - Beispiele
 - CD31 (PECAM): Marker für Endothelzellen
 - wird auf Zelloberfläche exprimiert
 - bildet Endothel-spezifische Zell-Zell Kontakte
- Fluoreszenzmikroskopie
 - je größer die Wellenlänge, desto geringer der energetische Gehalt
 - stokes shift: ausgehendes Licht hat größere Wellenlänge als eingehendes Licht
 - Aufbau wie Lichtmikroskop
 - Fluoreszenzinduzierende Lichtquelle, UV-Lampe, Laser mit Anregungswellenlänge
 - Filter zur Trennung von Anregungs- und Emissionslicht
 - besondere Detektoren
 - Farbstoffe:
 - Farbstoffe, die kurzwelliges Licht absorbieren und langwelliges Licht emittieren

- jedes Fluorochrom besitzt charakteristische Anregungs- und Emissionsspektrum
- DAPI wird zur Zellkernfärbung eingesetzt
- Grün fluoreszierendes Protein (GFP)
 - aus β -Faltblättern
 - häufig in vivo (nicht-toxisch)

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 Kolkalisationsstudien

Analysemethoden II

▼ Zusammenfassung

▼ Durchflusszytometrie

- Analyse von Partikeln in Flüssigkeitsstrom
- Lebendmarkierung durch Zelloberflächenmarker
- FACS: Trennung über elektrisches Feld
 - Hochdurchsatzmethode
- ! keine Informationen über Lokalisation des Markers in der Zelle
- ! falsch positive Ergebnisse durch Autofluoreszenz möglich
- Messprinzip:
 - Detektion der Lichtstreuung/ Emission mittels PMTs
 - Vorwärtsstreuung (FSC): Größe der Zellen
 - seitliche Streuung (SSC): Oberflächenbeschaffenheit
 - Fluoreszenz
- Darstellung
 - Streuung: Darstellung als scatter plot
 - elektronische Eingrenzung nach SSC und FSC
 - Fluoreszenz: Histogramme oder Dot Plot
 - Histogramme: Häufigkeit und Intensität
 - Dot Plot: Expression von 2 Markern



▼ Image Stream

- Bildgebende Durchflusszytometrie (Kombination aus FACS und Mikroskopie)
- gesamte Zelle bleibt optisch im Fokus
 - 5 Laser, 12 Bildkanäle, 2 CCD Kameras
- Hochdurchsatz
- Anwendungen
 - Analyse von Morphologie und Formveränderungen (z.B. durch Chemokine induziert)
 - Einschluss von Proteinen und Partikeln (Phagozytose) Zell-Zell Interaktionen (Immunsynapsen etc.)
 - Apoptose und Autophagy, Nekrose
 - Ko-Lokalisation von Markern innerhalb von Zellen oder an der Zelloberfläche
 - Nukleare Translokation
 - Zellzyklus und Mitose
 - Protein-Protein Interaktionen (FRET)

▼ MACS

- = Magnetic activated cell sorting
- Zellen werden mit AK-assoziierten Magnetpartikeln inkubiert
- Durchfluss durch ein starkes Magnetfeld
 - markierte Zellen werden zurückgehalten
 - Verfahren kann beliebig oft wiederholt werden
- Magnetpartikel werden aus Zelle ausgeschleust

▼ ELISA

- basiert auf einer AK-gekoppelten Enzymreaktion an Oberfläche
- Reaktion wird optisch detektiert und Analyt auf Basis einer Standardreihe quantifiziert
- AK- oder Antigenspezifisch

▼ Kolorimetrie

- = Absorptions-Spektrometrie
- Konzentrationsbestimmung von farbigen Substanzen

- Standard mit bekannter Konzentration, um Vergleich zu haben
- Immer anhand einer Referenzreihe

▼ Analyse von Nukleinsäuren

- DNA und RNA
- Gentest
 - Chromosomenkartierung
 - DNA-Sequenzierung
 - Fragmentlängenanalyse
 - Fragmentlängenpolymorphismen

▼ PCR

1. Isolation von RNA

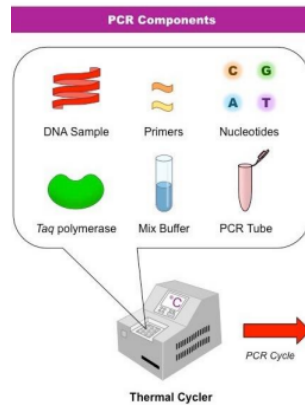
- Lyse der Zellen, Trennung der RNA von Proteinen und genomischer DNA
- Elution der RNA

2. Synthese der cDNA

3. PCR zur Vervielfältigung des Zielgens in der cDNA

4. Nachweis des PCR-Produkts

- RT-PCR
 - RNA Quantifizierung: UV Absorption bei optischer Dichte von 260 nm
 - RNA Qualität:
 - Auftrennung nach Größe durch Gelelektrophorese
 - RNA zeigt Peaks für 18S und 28S rRNA
 - cDNA-Synthese
 - umschreiben von RNA in cDNA mittels reverse Transkriptase
 - RNA-abhängige DNA Polymerase
 - Primer komplementär zum Poly-A-Ende
 - anknüpfen von komplementären Basen
 - Amplifikation von Nukleinsäuren



- Detektion
 - Separation durch anlegen eines elektrischen Feldes
 - Nukleinsäuren wandern zum Pluspol
 - Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von Molekulargewicht
 - Nachteile: geringe Auflösung/ Empfindlichkeit, keine Automatisierung, Quantifizierung bedingt möglich
 - mittels FRET Sonden: Fluorophor (donor) transferiert Energie auf eng benachbartes Molekül (acceptor)
 - abhängig von Abstand und Überlappung der Emissions- und Anregungsspektren
 - Sybr-Green (bindet an doppelsträngige DNA)
 - TaqMan (Reporter und Quencher: wenn räumliche Nähe, kein Signal, bei Elongation dann Emission)
- Kinetik der PCR
 - Sättigung der Reaktion in Plateau-Phase durch Verbrauch von Primern und Nukleotiden
 - Echtzeit PCR ermöglicht zeitaufgelöste Quantifizierung der DNA mittels Fluoreszenzsignal

Anwendungen des TE

▼ Zusammenfassung

▼ Regenerative Medizin

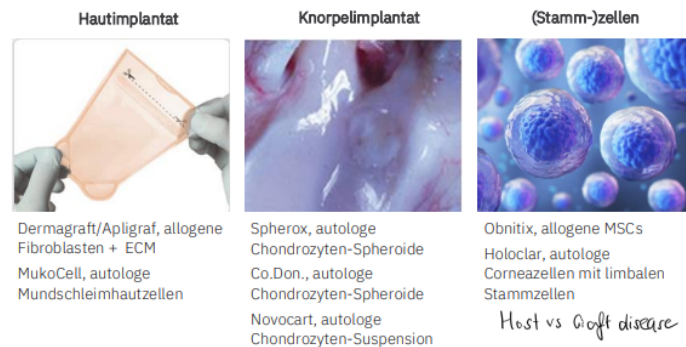
- Implantate
- Zelltransplantation
- verringerte Wartezeit auf Spenderorgane
- verminderte Abstoßungsreaktion durch patienteneigene Zellen
- ATMPs
- Limitationen:

- Translation auf klinische Studien

▼ Testsysteme

- Ersatz zu Tierversuchen (3R: Reduce, Refinee, Replace)
- Simulation physiologischer Barrieren
- Aufklärung zellulärer Mechanismen
- Verbesserte Übertragbarkeit durch Verwendung humaner Zellen
- Anwendungen:
 - Medikamentenentwicklung
 - Drug Testing
 - Personalisierte Medizin
 - Krankheitsmodellierung

▼ Stand der Technik



- Nur 2 TEP erhielten in der EU die Marktzulassung

▼ Stammzellen

- Probleme/Gefahren
 - Differenzierungseffizienzen sehr niedrig
 - Identifikation des gewünschten Zelltyps
→ Sicherstellung, dass ausschließlich der gewünschte Zelltyp verabreicht wird, kaum möglich
 - Gefahr der Entartung
→ Tumorbildung nach Implantation
- Limitationen
 - Ausbeute bei adulter Stammzell-Isolation meist zu gering für eine Therapie
→ Aktuell, ausreichende Zahl von Stammzellen nur von Knochenmark und Blut
 - Ungenügende Zellzahlen durch Verlust vieler Zellen bei Injektion
 - Ungenügende Anzahl der verabreichten Zellen überleben und integrieren ins Gewebe
- Hämatopoetische Stammzellen

- kein ATMP
- autolog bei kindlichen malignen Tumoren
- allogene bei Leukämie

Zusammenfassung

- Dringende Notwendigkeit von humanbasierten Testsystemen (3R-Prinzip, REACH, Vergleichbarkeit)
- Kein Modell ist optimal für alle Fragestellungen
- Implantate: Nur sehr einfach aufgebaute TE-Konstrukte im klinischen Einsatz (Haut, Knorpel, Knochen)
- Für kommerzielle Vermarktung ist eine Abwägung von Faktoren wie Komplexität, Reproduzierbarkeit, Automatisierbarkeit & Regulatorischen Anforderungen relevant