

**Untersuchungen zur Kryokonservierung und  
Einschlussimmobilisierung therapeutisch relevanter  
Zellsysteme**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

– Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften –

der Universität des Saarlandes

von

Dipl. Biol. Friederike Ehrhart

Saarbrücken

2008

Tag des Kolloquiums: .....

Dekan: .....

Berichterstatter: .....



# Inhaltsverzeichnis

1	Einführung.....	1
2	Kryobiophysikalische und biotechnologische Grundlagen.....	5
2.1	Biophysikalische Prozesse beim Einfrieren von Zellen.....	5
2.1.1	Gefrieren wässriger Lösungen.....	5
2.1.2	Zellschädigung beim Einfrieren und Auftauen.....	10
2.1.3	Kryoprotektive Substanzen.....	12
2.1.4	Probleme bei der Kryokonservierung von Geweben.....	16
2.2	Einschlussimmobilisierung mit Alginaten.....	19
2.2.1	Gewinnung von Alginat.....	19
2.2.2	Einschlussimmobilisierung von Zellen.....	21
2.2.3	Probleme der therapeutischen Anwendung.....	23
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Techniken zur Zellkultur.....	25
3.1.1	Zellen und Zellkultur.....	25
3.1.2	Sphäroidherstellung.....	25
3.1.3	Isolation primärer Zellen.....	27
3.1.4	Vitalitätstests und Nachweis spezieller Stoffwechselleistungen.....	28
3.1.5	Elektronenmikroskopie: REM/TEM.....	31
3.2	Kryokonservierung.....	32
3.2.1	Zubereitung der Kryomedien und deren Zugabe.....	32
3.2.2	Kryokonservierungsprotokolle.....	33
3.2.3	Kryomikroskopie und Hochgeschwindigkeitskryomikroskopie.....	34
3.3	Methoden zur Immobilisierung von Zellen mit Alginat.....	36
3.3.1	Prozessierung und Reinigung von Alginat.....	36
3.3.2	Herstellung massiver Alginatkapseln.....	37
3.3.3	Herstellung von Alginatsheets.....	39
3.3.4	Herstellung von Alginatschichten, -spots und -patches.....	40
3.3.5	Strukturierung von Alginat.....	41

4	Resultate .....	43
4.1	Entwicklung und Validierung von Immobilisierungstechniken.....	43
4.1.1	Untersuchung zu Vernetzungseigenschaften und Materialeigenschaften .....	43
4.1.2	Wachstum und Differenzierung von Neuronalen Zellen in einer Alginatkapsel ..	53
4.1.3	Herstellung und Manipulation von Alginat-Zellkonstrukten .....	63
4.1.4	Untersuchungen an Zellen auf bzw. unter Alginatschichten.....	75
4.2	Immobilisierung in der Kryobiologie .....	78
4.2.1	Kryokonservierung humaner Tumore für diagnostische Zwecke .....	78
4.2.2	Untersuchungen zur Kryokonservierung von verkapselten Zellen und Zellsystemen für therapeutische Zwecke.....	91
4.2.3	Kryokonservierung von Alginat-Zell-Systemen für Anwendungen im tissue engineering.....	99
5	Diskussion .....	102
6	Zusammenfassung .....	117
7	Literaturverzeichnis .....	118
8	Anhang .....	127
	Abkürzungen .....	127
	Erklärungen .....	128
	Lebenslauf .....	133



---

## 1. Einführung

Der Begriff der Kryobiologie etablierte sich erst spät in den 1950er Jahren während Beobachtungen von Lebewesen bei tiefen Temperaturen viel früher dokumentiert wurden. Bereits 1683 wurde von R. Boyle eine Analyse zu „New Experiments and Observations Touching Cold“ veröffentlicht, die Auswirkungen von kryogenen Temperaturen auf lebende Organismen beschrieb (zitiert in Muldrew und McGann 1997). A. Leeuwenhook und R. Hooke, beide Erbauer und Nutzer von ersten Mikroskopen auf Glaslinsenbasis, beschrieben erste Beobachtungen an Schneeflocken und gefrierenden Pflanzenteilen (Muldrew und McGann, 1997). Die moderne Kryobiologie beginnt mit der Beobachtung von Luyet (1938), dass einige Hefezellen die Prozedur des Abtötens durch Einfrieren überleben. Die bemerkenswerte Erkenntnis aus dieser Beobachtung, die bis heute Gültigkeit hat, war, dass die hauptsächliche Schädigung der Zellen durch den Phasenübergang von Wasser passiert. 1949 wurde durch einen Zufall das erste Kryoprotektivum entdeckt. Glycerin wurde im Labor von A. Smith und C. Polge zur Immobilisierung von Spermien für mikroskopische Beobachtung benutzt und nach versehentlichem Einfrieren dieser Lösung eine außergewöhnlich hohe Motilität nach dem Auftauen festgestellt (Polge et al. 1949). Erste mathematische Modelle zur Entstehung von intrazellulärem Eis wurden 1963 von Mazur aufgestellt und 1982 von Diller mittels Kryomikroskopie verifiziert (Diller und Cravalho 1971, Diller 1997).

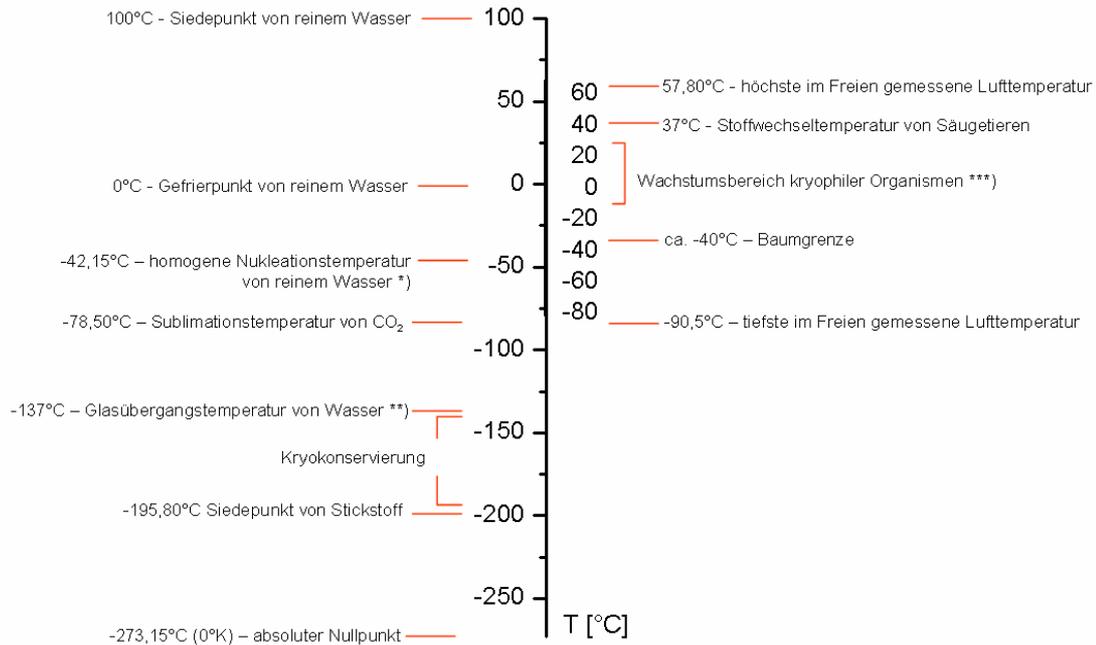
Ziel der Konservierung allgemein ist es, lebende Zellen verlustarm über lange Zeit (Jahrzehnte) zu konservieren. Kryokonservierung hat in der biomedizinischen Forschung den Vorteil, dass Kosten für die Kultivierung reduziert werden, da nicht benötigte Zellen nicht weiterkultiviert werden müssen, die genetische Drift verhindert wird und das Risiko für Kontamination oder Kreuzkontamination der Kultur sinkt. Ein Risiko ist bei der Lagerung von Proben in der Flüssig- oder Gasphase von Stickstoff zwar vorhanden, aber sehr gering im Vergleich zur Kultivierung<sup>1</sup>. In der medizinischen Praxis sind bisher nur wenige kryokonservierte Zellmodelle in Gebrauch. Beispielweise werden kryokonservierte Blutpräparate (Erythrozyten, Plasma) in der Intensiv- und Notfallmedizin genutzt, erythropoietische Stammzellen zur Leukämitherapie aber vor allem profitiert die Reproduktionsmedizin von der ständigen Verfügbarkeit und Lagermöglichkeit gefrorener Zellen (Spermien, Embryonen, Oozyten). Experimentell wird bereits mit kryokonservierten Gewebetransplantaten, wie z.B. Cornea, Herzklappen und Ovarialgewebe, gearbeitet, wobei ein breiter Einsatz im klinischen Alltag noch in der Zukunft liegt.

Um lebendes biologisches Material nach der Kryokonservierung verlustarm wiederzugewinnen, muss die intrazelluläre Eisbildung entweder komplett vermieden oder die Zellen müssen effektiv vor den, durch Eisbildung verursachten, Schäden geschützt werden. Dazu bedient man sich ausgewählter Stoffe, die allgemein als Kryoprotektiva bezeichnet werden. Diese sind entweder membrangängig und wirken intra- und extrazellulär oder nicht – membrangängig und wirken rein extrazellulär. Intrazelluläre Kryoprotektiva haben den Nachteil, dass sie nach der Kryokonservierung wieder entfernt werden müssen um den normalen Metabolismus der Zelle nicht zu

---

<sup>1</sup> Fountain et al. 1997 haben in geschlossenen Kryoröhrchen in 1,2% der Proben (n = 583) eine Kontamination bei Lagerung in flüssigem Stickstoff beobachtet. Eingebachte offene Kulturplatten zeigten nach zweiwöchiger Inkubation in Flüssig- oder Gasphase bakterielle und fungale Kontamination. Die Kontamination in der Gasphase wurde durch Verspritzen/Verkochen von  $\text{IN}_2$  erklärt, wobei dieselben Keime auch durch Abstriche im Tank identifiziert wurden. Bielanski et al. 2003 haben Kreuzkontamination in Flüssigphase nachgewiesen, während Bielanski 2005 keine Kreuzkontamination fand, wenn die Proben 7 Tage in der Gasphase von Dry-Shippern gelagert wurde. Lagerung in der Flüssigphase wird generell als riskant eingestuft, (Bielanski et al. 2003, Clarke 1999, Fountain et al. 1997, Hawkins et al. 1996, Tedder et al. 1995) wobei das Risiko durch spezielle Versiegelung der Kryogefäße reduziert werden kann (Chen et al. 2006, Clarke 1999).

stören. Viele intrazelluläre Kryoprotektiva wirken bei Raumtemperatur sogar toxisch (z.B. Dimethylsulfoxid). Außerdem müssen sowohl während des Kühl- bzw. Auftauvorganges als auch während der Lagerung Situationen vermieden werden, die zu Umkristallisationsvorgängen führen können, wie z.B. zu langsame Auftauraten oder kurzzeitige Erwärmung auf über  $-130^{\circ}\text{C}$  während der Lagerung (z.B. durch Entnahme benachbarter Proben).



\*) Homogene Nukleationstemperatur: 231°K, P. Debenedetti & G. Stanley, Physics Today, 56 (6) (2003) 40 – 46.

\*\*) Glasübergang: 136°K, G. P. Johari, G. Asti and E. Mayer, Enthalpy relaxation of glassy water, J. Chem. Phys. 92 (1990) 809-810

\*\*\*) H. Weide, J. Páca, W.A. Knorre, Biotechnologie, Gustav Fischer Verlag, Jena 1987

**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der kryobiologisch interessanten Temperaturbereiche, wobei links die chemisch-physikalischen, rechts die biologisch relevanten Daten dargestellt sind. Der Bereich der Kryokonservierung lebender Zellen liegt zwischen  $-130^{\circ}\text{C}$  bis  $-196^{\circ}\text{C}$ .

Die Kryokonservierung von Einzelzellen ist heute mit den meisten Zellarten mit hohen Überlebensraten möglich. An die Grenzen stößt die Kryobiotechnologie bei der Kryokonservierung multizellulärer Systeme (z.B. Tumorgewebe, Langerhanssche Inseln). Generell muss bei der Kryokonservierung von Geweben eine hohe Überlebensrate eingehalten werden, da tote Zellen nicht aus dem Verband gelöst werden können und die überlebenden Zellen durch die unkontrollierte Freisetzung von Zytoplasma gefährden. Zusätzlich stellt sich das Problem des Erhalts der extrazellulären Matrix, um den Zusammenhalt des Gewebes zu sichern. Die Bildung von Eiskristallen im interstitiellen Bereich muss bei multizellulären Systemen ebenso kontrolliert werden wie die im Inneren der Zelle. Gewebe bestehen aus unterschiedlichen Zellarten, die unterschiedliche Bedürfnisse bezüglich Kryoprotektiva und Kühlprotokoll haben.

Das wissenschaftliche Ziel dieser Arbeit war es die Kryokonservierbarkeit multizellulärer Systeme im direkten Vergleich mit Einzelzellen und künstlichen Zell-Matrix Konstrukten zu untersuchen um daraus neue Ansätze zur Kryokonservierung von Geweben zu finden. Dazu wurden

unterschiedliche Ansätze verfolgt: Die Verwendung von unterschiedlichen Zellsorten und -systemen (z.B. Suspension, multizelluläre Systeme, Gewebeteile, adhärenente Zellen) (s.h. Tabelle 1.1) erfordert an die jeweiligen Bedingungen angepasste Kryokonservierungsmethoden, wobei das Ausmaß der Unterschiede in den optimalen Kryokonservierungsbedingungen kaum systematisch erforscht ist. Zudem sind bisher für adhärenente Zellen auf Oberflächen oder multizelluläre Systeme wenig erfolgreiche Methoden bekannt. In diesem Zusammenhang wurde für multizelluläre Systeme ein allgemeines Modell entwickelt, mit dessen Hilfe standardmäßige Tests zur Erprobung neuer Kryoprotektiva und -protokolle erstellt werden können ohne auf primäre Zellen zurückgreifen zu müssen. Neue Kryoprotektiva (z.B. Stärkehydrolysat und Trehalose) und -protokolle, z.B. der Einschluss in eine 3D oder 2D – Matrix aus Hydrogel, wurden für die Anwendung auf unterschiedlichen Zellsystemen optimiert. Der Erfolg dieser neuen Techniken und Protokolle wurde mittels bekannter Zellkulturmethoden (Lebend/Tot -Färbung) und neu entwickelter Methoden, wie z.B. Hochgeschwindigkeitskryomikroskopie, ermittelt.

**Tabelle 1.1:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen

Name	Typ		Ursprung	Durchmesser [µm]
L929	Adhärenente Fibroblasten	Zelllinie	Maus	20
PC-3	Adhärenente Prostatakarzinomzellen	Zelllinie	Human	25
N2a	Adhärenente Neuroblastomazellen	Zelllinie	Human	20
Erythrozyten	Nicht adhärenente kernlose Blutzelle	Primärzellen	Human	5
Neuronale Vorläuferzellen	Adhärenente neuronale Zellen	Primärzellen	Ratte	10
Neuroaggregate	Zellverbände aus neuronalen Vorläuferzellen, die im Laufe der Kultivierung differenzieren	Primärezellen	Ratte	50 – 450
Langerhanssche Insel	Funktionale Zellverbände, Organ	Primärzellen	Ratte oder Human	80 – 500
Sphäroide	Zellverbände	Zelllinie oder aus Primärzellen		80 – 500
Tumorgewebe	Pathogener Zellverband, Ovarial- oder Mammakarzinomgewebe	Primärzellen	Human	1000

Immobilisierung wird nicht nur in der Industrie zur Produktion von Biomolekülen (Enzyme zur Verwendung im Waschmittel) und Katalyse eingesetzt, sondern zunehmend in der regenerativen Medizin, der „roten“ Biotechnologie (Zellen mit dreidimensionaler Anheftungsmöglichkeit, z.B. in Collagenschwämmen oder Alginatematrizen, verhalten sich in vielen Fällen „natürlicher“, d.h. sie entwickeln oder behalten ihre physiologische Funktionalität eher, als in rein oberflächenbasierter Kultur). Zellen, die ohne Anheftungsmöglichkeit gehalten werden, reduzieren die Zellteilungs- und/oder erhöhen die Apoptoserate (Hersel et al. 2003, Reddig und Juliano 2005). Chondrozyten, beispielsweise, produzieren nur in dreidimensionaler Umgebung das für Knorpel typische Kollagen, was einen Grund für die schlechte Heilung von Knorpeldefekten darstellt (Weber et al. 2002, Steinert et al. 2003). Das zunehmende Interesse der Biomedizin an Zell-Matrix Konstrukten treibt nicht nur die Herstellungstechniken voran, es besteht außerdem ein gesteigertes Interesse an der Kryokonservierung solcher Konstrukte zum Zweck späterer Unter-

---

suchungen, dem Zusammentragen kleinerer Mengen (so genanntes „Pooling“) und Lagerhaltung. Systematische Untersuchungen zu den Grundlagen der Kryobiophysik von matrixumschlossenen Zellen sollten daher in dieser Arbeit angestellt werden.

Obwohl die Verkapselung von Zellen in sphärische Alginatkapseln bereits erfolgt und, z.B. bei Langerhansschen Inseln zur Diabetestherapie, bereits in Tierversuchen erprobt wird zeigt die Verkapselungstechnik noch elementare Schwächen. Die überwiegend dezentrale Lage der eingeschlossenen Inseln, der Einschluss von Luftblasen und der mechanische Stress während der Kompartimentierung und des Eintropfens ins Polymerisationsbad zeigen den Optimierungsbedarf. Zudem sind kaum Methoden bekannt um die Verkapselungskinetik zu untersuchen.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung und Verbesserung der Verkapselung von lebenden Zellen oder Geweben mit Alginaten. Dabei wurde mittels Hochgeschwindigkeitsfotografie bzw. -video eine Methode zur Charakterisierung des Vernetzungsvorganges entwickelt. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen geben Aufschluss über die Vernetzungskinetik von Alginat allgemein und über das verwendete Alginat und die Versuchsbedingungen im Besonderen. Es zeigte sich, dass die Deformations – Zeit – Kurve, der „Fingerabdruck“, eines eintropfenden Alginats hoch charakteristisch ist. Außerdem wurde, aus diesen Erkenntnissen abgeleitet, eine Methode entwickelt, mit der Zellen im adhärenen Zustand mit Alginat beschichtet werden können, was nicht nur zu einer flexiblen Technik zum „tissue engineering“ ausgebaut wurde, sondern auch entscheidende Vorteile zur Kryokonservierung adhärenter Zellen brachte. Das Verfahren, lebende Zellen *in situ* mit Hydrogelen zu beschichten, wurde letztlich zum Patent angemeldet.

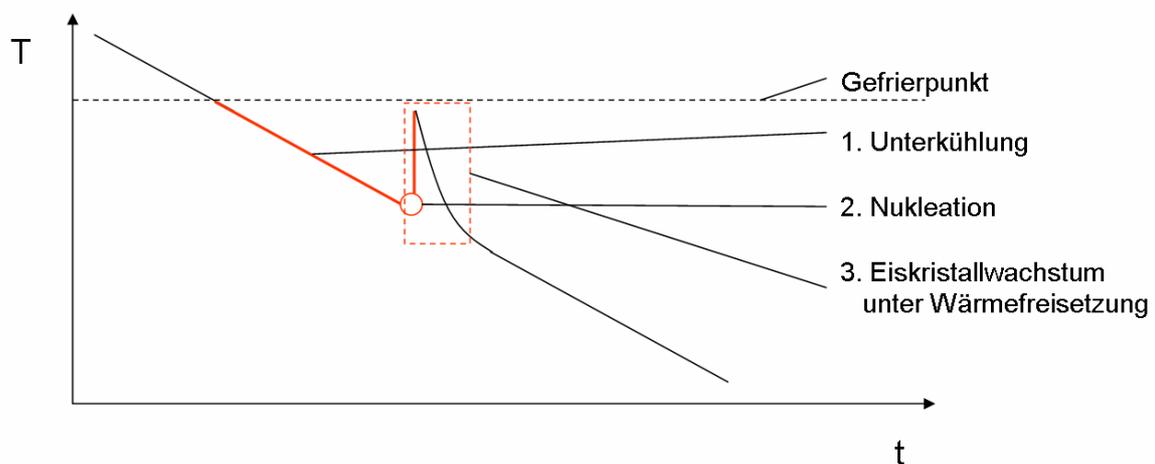
## 2. Kryobiophysikalische und biotechnologische Grundlagen

### 2.1 Biophysikalische Prozesse beim Einfrieren von Zellen

#### 2.1.1 Gefrieren wässriger Lösungen

##### Definition Gefrierpunkt:

Der **Gefrierpunkt** ist die Temperatur, bei der ein Kristall in seiner Schmelze stabil ist. Wird die Temperatur erhöht, schmilzt der Kristall, wird sie erniedrigt, wächst er. Der Gefrierpunkt ist meistens identisch mit dem Schmelzpunkt.<sup>2</sup>



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des typischen Temperaturverlaufes beim Gefrieren wässriger Lösungen. Deutlich zu unterscheiden sind die Unterkühlungsphase, die Nukleation, die durch einen plötzlichen Temperaturanstieg gekennzeichnet ist und das darauf folgende Eiskristallwachstum.

Wenn die Temperatur einer Schmelze unter den Gefrierpunkt fällt, wird es energetisch günstig in den festen Aggregatzustand überzugehen. Das Gefrieren von Wasser oder wässriger Lösung geschieht in drei Phasen: Unterkühlung, Nukleation und Eiskristallwachstum (Abbildung 2.1). Von unterkühlter Lösung spricht man, wenn die Temperatur unterhalb des Gefrierpunktes liegt, aber noch kein Eis entstanden ist. Der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Gefrieren ist die Nukleation, die Entstehung eines Kristallkeims (auch Kristallembryo genannt). Wasser bildet ein Netzwerk von Molekülen, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Dieses Netzwerk wird als „flickering cluster“ beschrieben. Zur Umlagerung des Netzwerks vom Flüssig- zum Kristallzustand, müssen diese Bindungen gelöst werden, bevor das Kristallgitter entstehen kann. Der unterkühlte Zustand ist eine metastabile Phase und kann z.B. durch mechanische Erschütterung bereits beendet werden.

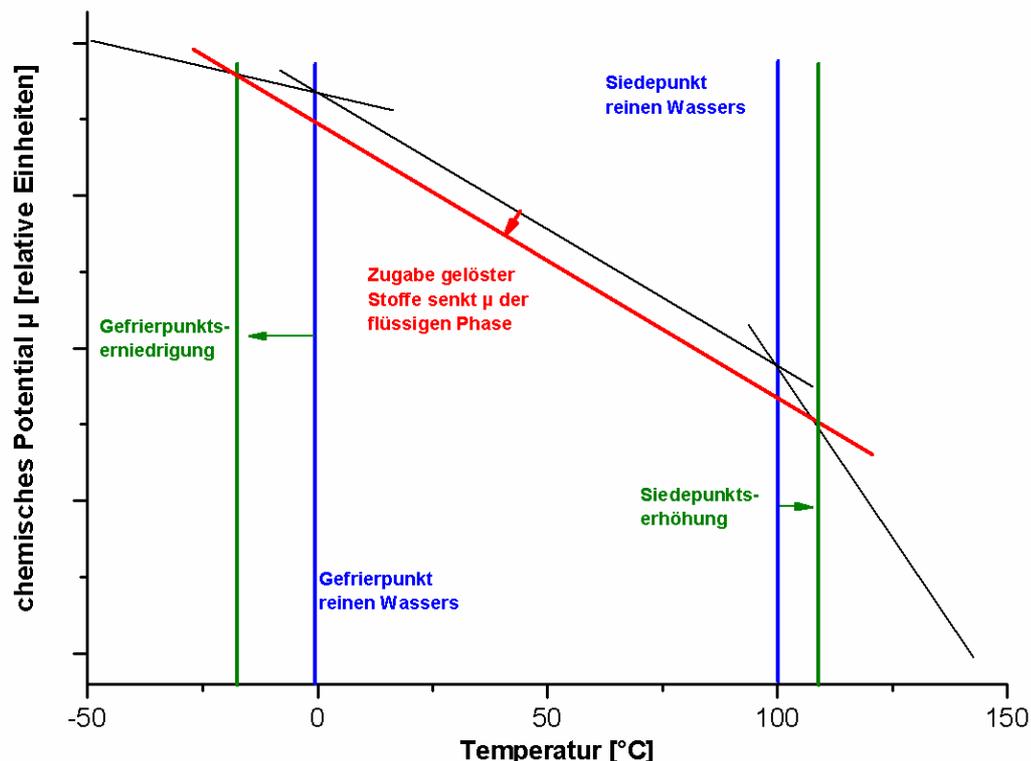
Spontane Zusammenlagerung von Molekülen zu kristallartigen Aggregaten findet in der flüssigen Phase ständig statt aber durch die freiwerdende Energie (die Entropie nimmt ab beim Phasenübergang von flüssig zu fest, d.h. die Enthalpie nimmt zu, was zu einer hohen Oberflä-

<sup>2</sup> Der überwiegende Teil der dargestellten Informationen und Sachverhalte aus der physikalischen Chemie der Eisbildung in diesem und folgenden Kapiteln sind entnommen aus Fletcher (1974) und Hobbs (1974).

chenenergie an der Phasengrenze führt) dissoziieren die Kristallkeime genauso schnell wieder. Erst ab einer bestimmten Größe ist ein Kristallkeim stabil und wächst. Die kritische Größe sinkt mit abnehmender Temperatur. Bei  $-40^{\circ}\text{C}$  beträgt die kritische Größe  $11,3 \text{ \AA}$  (Radius) d.h. es sind ca. 190 Wassermoleküle notwendig um die minimale Größe eines stabilen Nukleationskeimes zu bilden (Fletcher 1970). Nukleation ist ein Vorgang der bei einer bestimmten Temperatur mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit stattfindet. Je größer das Wasservolumen, desto wahrscheinlicher bildet sich irgendwo ein Kristallembryo, der groß genug ist, als Kristallisationskeim zu dienen. Das Kristallwachstum setzt in unterkühlter Flüssigkeit ein, sobald mindestens ein Kristallkeim entstanden ist.

Wässrige Lösung kann selbst unter idealen Bedingungen nicht beliebig weit unterkühlt werden. Spätestens an der homogenen Nukleationstemperatur von etwa  $-40^{\circ}\text{C}$  (der aktuelle Rekord der Unterkühlung von reinem Wasser liegt bei  $-42,15^{\circ}\text{C}$ ) ist die minimale Größe so gering (ca. 190 Moleküle), dass sich Wassermoleküle spontan zu einem Nukleationskeim zusammenlagern. Die homogene Nukleationstemperatur ist abhängig vom Volumen. Für einen  $1\mu\text{m}$  großen Tropfen beträgt sie  $-39^{\circ}\text{C}$  und steigt um  $2^{\circ}\text{C}$  beim Anstieg des Tropfendurchmessers um den Faktor 10 (Rasmussen und MacKenzie 1972, zitiert in Steponkus 1992). Für tierische Zellen wird daher eine homogene Nukleationstemperatur im Bereich von  $-38^{\circ}\text{C}$  -  $-44^{\circ}\text{C}$  erwartet (Rall et al. 1983). Man spricht in dem Fall, wenn ausschließlich Wassermoleküle den Keim bilden, von homogener Nukleation.

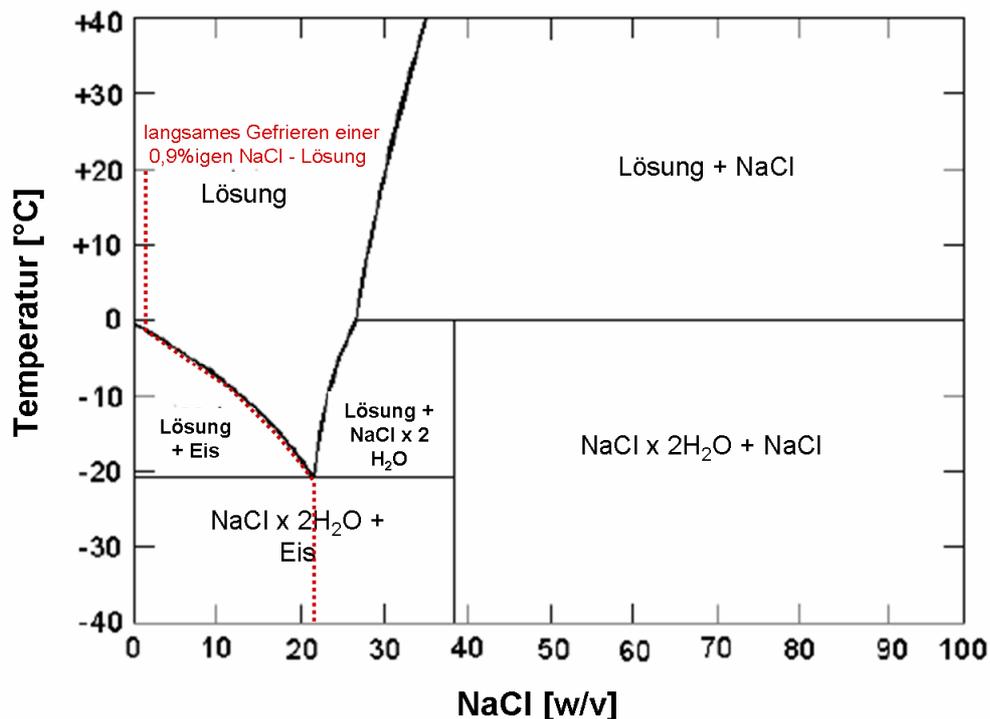
Heterogene Nukleation findet statt, wenn in der Lösung ein Nukleationskeim vorliegt, der nicht rein aus Wassermolekülen besteht. Ein Nukleationskeim kann ein Partikel („Staub“, Salz-



**Abbildung 2.2:** Die Veränderung des chemischen Potentials ( $\mu$ ) von flüssigem Wasser durch Zugabe von löslichen Stoffen (z.B. NaCl). Durch die Senkung des Potentials der flüssigen Phase sinkt der Gefrierpunkt bzw. steigt der Siedepunkt der Lösung, da bei einer bestimmten Temperatur stets die Phase mit dem niedrigsten  $\mu$  stabil ist.

kristall, Bakterie) oder auch eine Oberfläche mit bestimmten Eigenschaften sein. Sogar ein einzelnes Molekül kann ausreichend sein. Ein Nukleationskeim besitzt eine molekulare Oberfläche, die in ihrem Muster von Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren einem Eiskristall ähnelt. Man weiß z.B. von einigen Proteinen, die kryotolerante Pflanzen und Tiere als Nukleationskeime für die interstitielle Flüssigkeit produzieren, sobald sie kryogenen Temperaturen ausgesetzt werden (Duman et al. 1991). „Seeding“ bedeutet das kontrollierte Auslösen der Nukleation bei einer bestimmten Temperatur durch, z.B. Applikation von Kälteschock (Anfassen des Probenbehälters mit einer tiefkalten Pinzette, kurze drastische Temperatursenkung im elektrischen Einfriergerät), Einbringen eines Eiskeims (Osmometer) oder durch mechanische Erschütterung.

Für z.B. Hepatozyten konnte nachgewiesen werden, dass die kontrollierte Kristallisation bei  $-7^{\circ}\text{C}$  (oder  $-14^{\circ}\text{C}$ ) vorteilhaft für den Kryokonservierungserfolg ist. Von „Seeding“ spricht man allerdings auch bei der unkontrolliert einsetzenden intrazellulären Eisbildung, die bei vielen Zellen im Bereich von  $-10^{\circ}\text{C}$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$  eintritt (Mazur 1977). Zellen selbst besitzen keine Nukleationskeime, beispielsweise wurde bereits 1932 von Chambers und Hale nachgewiesen, dass trotz extrazellulärem Eis eine Amöbe nur gefriert, wenn sie mit einer tiefkalten Nadel punktiert wird (Chambers und Hale 1932, zitiert in Farrant 1977). Über die Ursachen existieren verschiedene Hypothesen: Eindringen von kleinen Eiskristallen wird von Mazur (1977) über wassergefüllte Membranporen oder -kanäle vermutet, während Steponkus und Dowgert (1981) mechanisch oder elektrisch induzierten Membrandurchbruch als Eintrittspforte vorschlagen. Toner et al. (1990) postuliert einen anderen Mechanismus, die oberflächenkatalysierte Nukleation, bei



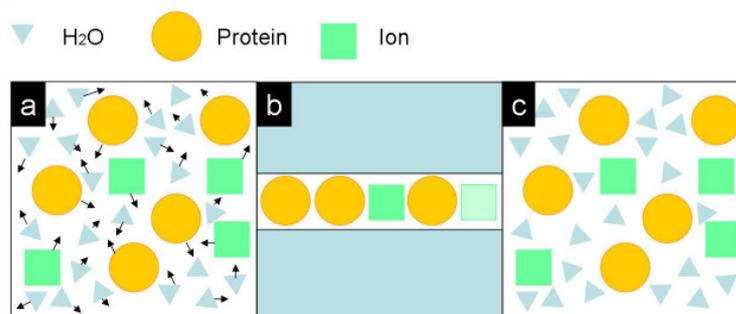
**Abbildung 2.3:** Binäres Phasendiagramm von NaCl und Wasser (verändert nach Muldrew und McGann, Cryobiology – A short course). Rot eingezeichnet ist der Temperatur und Konzentrationsverlauf beim langsamen Einfrieren einer isotonen NaCl-Lösung (9g/l). Sobald die Eiskristallisation einsetzt erhöht sich die Konzentration der Lösung was zu einer Erniedrigung des Gefrierpunktes führt. Ab einem Anteil von ca. 22% ist die Löslichkeit von NaCl in Wasser (bei dieser Temperatur) überschritten und fällt als hydratisiertes Salz aus.

der extrazelluläres Eis die Membran oder membrangebundenes Protein so verändert, dass sie auf der zytosolischen Seite als Nukleationskeim dient. Alternativ wird die volumenkatalysierte Nukleation genannt, die heterogene Nukleatoren im Zytoplasma annimmt.

Das Eiskristallwachstum nach der Nukleation läuft in drei Schritten ab: Annäherung des Wassermoleküls, Anbindung an den Eiskristall und Abfuhr der Kristallisationswärme. Die Geschwindigkeit des Kristallwachstums wird überwiegend bestimmt durch die mögliche Annäherungsgeschwindigkeit des Wassermoleküls, z.B. durch die Viskosität der Lösung bzw. die Verfügbarkeit von freien Wassermolekülen und die Abfuhr der Kristallisationswärme, z.B. durch Wärmeleitfähigkeit des Kristalls bzw. Flüssigkeit oder der Temperatur. Die Abfuhr der Kristallisationswärme bedingt die Form des Eiskristalls. Gefrieren z.B. wässrige Lösungen an der Oberfläche, wird die Wärme überwiegend über die Eisphase abgeleitet und an die Umgebungsluft abgegeben. Es entstehen Eiskristalle mit sehr glatter Oberfläche. Kristallisiert Eis in Flüssigkeit oder in Luft (aus Wasserdampf), werden dendritische Formen (Schneeflocken) bevorzugt, da die Austauschfläche an den Spitzen der Dendriten größer ist.

Liegt Wasser nicht in reiner Form vor, sondern enthält gelöste Stoffe, ist das Verhalten bei sinkender Temperatur komplexer. Gelöste Stoffe senken allgemein das chemische Potential ( $\mu$ ) von Wasser, was zu einer Erhöhung der Siedetemperatur und Senkung des Gefrierpunktes führt (Abbildung 2.2), da bei einer bestimmten Temperatur die Phase mit dem niedrigsten  $\mu$  am stabilsten ist. Dies ist eine so genannte kolligative Eigenschaft, da die Stoffmenge für das Ausmaß der Temperaturveränderung maßgeblich ist und nicht die Stoffart. Pro Osmol sinkt der Gefrierpunkt von Wasser um  $1,86^\circ\text{C}$ . Genutzt wird dieses Phänomen z.B. bei der Salzstreuung im Winter um Eisglätte zu verhindern. Im binären Phasendiagramm von Wasser-NaCl zeigt sich, dass der Gefrierpunkt der Mischung mit zunehmendem Anteil an NaCl bis zu einer minimalen Temperatur von ca.  $-21^\circ\text{C}$  sinkt (Abbildung 2.3). Beim Gefrieren wässriger Lösungen kommt es stets zu einer Phasentrennung von Lösungsmittel und gelösten Stoffen. Beim Phasenübergang kristallisiert Wasser und konzentriert die gelösten Stoffe auf. Ab der Löslichkeitsgrenze fallen zunehmend Feststoffe aus, so dass reines Eis und hydratisiertes Salz vorliegen. Diese Phasentrennung ist eines der Hauptschädigungsmechanismen beim Einfrieren von Zellen (Luyet 1938).

Ein weiteres Phänomen, das in abkühlenden Flüssigkeiten eintritt, ist die so genannte Vitrifikation (Verglasung), die in Konkurrenz zur Kristallisation auftritt (Abbildung 2.4). Während des Abkühlens erhöht sich die Viskosität einer Flüssigkeit durch die sich verringerende Molekülbewegung. Ab einer stoffspezifischen Temperatur, der Glasübergangstemperatur  $T_g$  (glass transition temperature), sind die Moleküle unbeweglich, so dass die Phase nicht mehr von einem Festkörper zu unterscheiden ist. Wassermoleküle sind z.B. ab  $-130^\circ\text{C}$  nicht mehr beweglich, was den Grund für die Mindesttemperatur bei der Lagerung biologischer Proben darstellt. Ab diesem Temperaturpunkt spricht man von einem Glas, wobei die Viskosität über  $10^{14}\text{Pa s}$  beträgt. Die Moleküle von Lösungsmittel und gelöstem Stoff sind im Glaszustand ohne feste Anordnung wie



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung der Phasen wässriger Lösungen. a: Flüssigkeit, die Moleküle sind zufällig verteilt und frei beweglich. b: gefrorene Lösung, es kommt zur Phasentrennung zwischen Lösungsmittel und gelösten Stoffen. c: Vitrifikation, keine Phasentrennung und keine Bewegung der Moleküle.

---

in einer Flüssigkeit, aber unbeweglich wie in einem Feststoff, eine Phasentrennung tritt somit nicht auf.

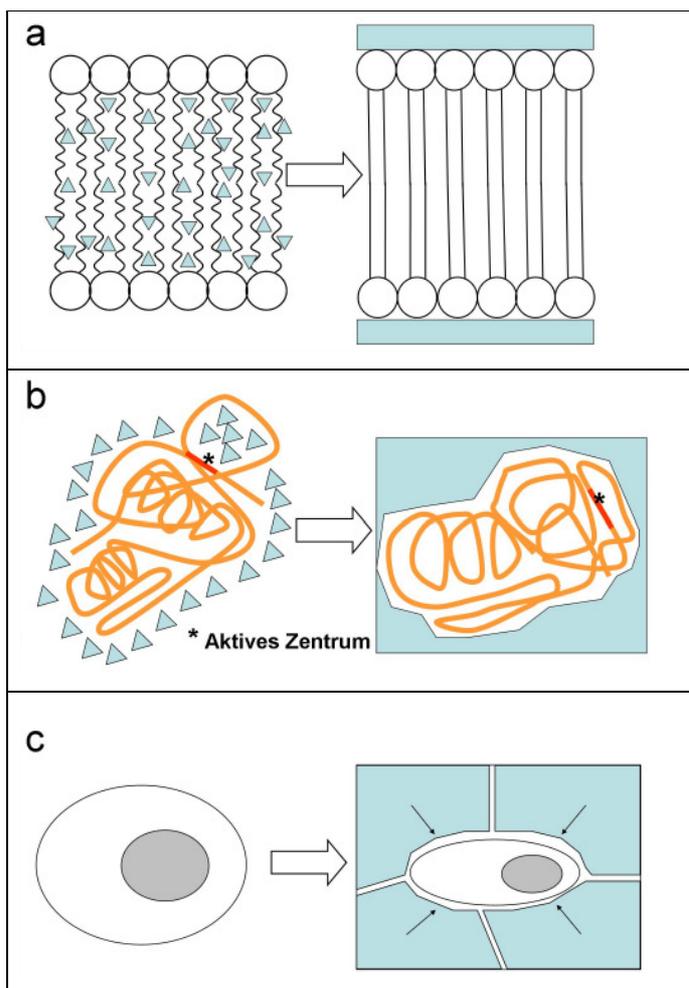
Die Wahrscheinlichkeit, mit der eine Lösung verglast, hängt von zwei Faktoren ab: vom gelösten Stoff bzw. den Eigenschaften einer Schmelze (solution approach), indem diese Stoffe die Viskosität einer Lösung erhöhen, und der Abkühlgeschwindigkeit (kinetic approach), die den Zeitrahmen für die Nukleation reduziert. Für wässrige Lösungen eignen sich Polysaccharide, Proteine, Polyalkohole, Mono- und Oligosaccharide und Zuckeralkohole. Die zwei Faktoren sind additiv, d.h. Kühlgeschwindigkeit und Konzentration können kombiniert werden, um die Vitrifikationswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Es ist beispielsweise möglich, reines Wasser zu vitrifizieren, wobei die erforderliche Kühlrate etwa  $10^6$  °C/s (Wolfe und Bryant 1999 und 2001) beträgt. Bei Zugabe von z.B. 48% Me<sub>2</sub>SO (w/w) kann die Kühlrate auf 2,5°C/min reduziert werden (Baudot 2000). Vollständige Vitrifikation ist in biologischen Proben schwer nachzuweisen bzw. schwer durchführbar. Tatsächlich werden oftmals kleine Eiskristalle in den Zellen oder im Medium beobachtet, so dass man in diesem Zusammenhang eher von einer teilweisen Vitrifikation oder praktischen Vitrifikation sprechen sollte, was in der kryobiologischen Literatur allerdings bisher nicht üblich ist.

### 2.1.2 Zellschädigung beim Einfrieren und Auftauen

#### Definition Kryokonservierung

**Kryokonservierung** heißt die Lagerung von Material bei tiefen Temperaturen. Im Bereich der Biomedizin werden lebende Zellen und Gewebe bei Lagertemperaturen unterhalb von  $-130^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Grundsätzlich sind tierische Zellen nicht in der Lage kryogene Temperaturen zu überleben, wobei Kryotoleranz durch Zugabe bestimmter Stoffe und Einhalten bestimmter, optimaler Kühlraten künstlich induziert werden kann. Die Schäden entstehen hauptsächlich durch das Einfrieren und Auftauen und nur unwesentlich durch die Lagerung bei tiefen Temperaturen selbst. Bei Temperaturen unterhalb von  $-80^{\circ}\text{C}$  laufen praktisch keine biochemischen Reaktionen mehr ab und unterhalb der Glasübergangstemperatur von Wasser ( $-130^{\circ}\text{C}$ ) sind Wassermoleküle immobil, so dass keine Umkristallisation mehr stattfindet. Lediglich physikalische Zerfallsprozesse, kosmische Strahlung und mechanische Erschütterung können die Lagerdauer reduzieren.



**Abbildung 2.5:** Schematische Darstellung der wichtigsten Schädigungsmechanismen beim Gefrieren von Zellen; a: Schmelzpunkterhöhung von Membranen, die zu verringerter Fluidität und Flexibilität der Membran führt und diese anfällig für mechanischen Stress macht, und b: Veränderung der Tertiärstruktur von Proteinen durch Wasserentzug (Denaturierung); c: Quetschung der Zelle beim Wachstum von Eiskristallen führt zur Schädigung des Zytoskeletts und membranumschlossenen Kompartimenten.

Beim Einfrieren von Zellen unterscheidet man zwischen zwei hauptsächlichen Schädigungsmechanismen. Zum einen quetschen wachsende Eiskristalle die Zellen und beschädigen das Zytoskelett (Abbildung 2.5 c) (Nei 1970, Takamatsu und Rubinsky 1999) ebenso wie intrazelluläre Membransysteme und den Zellkern (Bischof und Rubinsky 1993), zum anderen kommt es durch den Wasserentzug durch Kristallisation zu diversen schädlichen Effekten, die als „solution effects“ zusammengefasst werden (Farrant 1977). Durch die Erhöhung der Osmolarität allgemein und vor allem der Ionenkonzentration, kommt es zur Denaturierung von Proteinen. In der analytischen Biochemie ist dieser Effekt als „aussalzen“ von Proteinen bekannt und wird zur deren Aufreinigung eingesetzt. Mit dem weiteren Verlust des Wassers durch Kristallisation schwindet die Hydrathülle von Makromolekülen und der Membran. Die Hydrathülle spielt beim Erhalt der dreidimensionalen Struktur von Proteinen, und damit ihrer biochemischen Funktion, eine wichtige Rolle (Abbildung 2.5 b). Biologische Membranen besitzen einen Wasseranteil von etwa 10%, wobei Wassermoleküle sowohl in der hydrophilen Kopfreion als auch im lipophilen Teil der Lipide zu finden sind, wo sie als Platzhalter („Spacer“) fungieren. Wird dieses Wasser entzogen, lagern sich die Kohlenwasserstoffketten aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte) dichter zusammen. Durch den festeren Zusammenhalt erhöht sich der Schmelzpunkt der Membran. Das heißt die Membran geht vom Flüssigkristall- in den Gelzustand über. Im Gelzustand ist die Membran wesentlich weniger flexibel und bricht vor allem an der Kontaktzone zwischen Lipiden und Membranproteinen (Abbildung 2.5 a) (Crowe und Crowe 1984). Des Weiteren wurde das Auftreten starker elektrischer Felder durch Ladungstrennung beschrieben, das lokal zum elektrischen Durchbruch von Membranen führen kann (Steponkus et al. 1985, Grishchenko et al. 1989). Ebenso diskutiert wird das Entstehen von Radikalen, die Makromoleküle (Proteine, DNS, RNS, Lipide) zerstören.

1972 wurde von Mazur und Mitarbeitern beobachtet, dass das Überleben von CHO Zellen („Chinese hamster ovary tissue cells“) bei der Kryokonservierung (unter der Verwendung kryoprotektiver Substanzen, s.h. folgendes Kapitel) stark von der Kühlrate abhängt wobei es ein Optimum bei einer bestimmten Kühlrate gibt. Die daraus abgeleitete Zwei-Faktor Hypothese erklärt die Existenz des Optimums damit, dass es zwei verschiedene Faktoren gibt, die die Zelle beim Gefrieren schädigen, wobei der eine Faktor bei zu hohen, der andere bei zu niedrigen Kühlraten zum tragen kommt. Wird eine Zellsuspension unter den Gefrierpunkt abgekühlt, gefriert zuerst das extrazelluläre Medium, da es weniger gelöste Stoffe enthält und volumenmäßig größer ist als das Zytoplasma. Während des Gefrierens kristallisiert nur das reine Wasser und die darin gelösten Stoffe werden aufkonzentriert. Durch die Erhöhung der externen Osmolarität kommt es zum Ausstrom von Wasser aus der Zelle. Die gelösten Stoffe im Zytoplasma werden aufkonzentriert und der Gefrierpunkt weiter erniedrigt. Der weitere Verlauf der Vorgänge hängt wesentlich von der hydraulischen Leitfähigkeit der Membran ( $L_p$ ) und der Kühlrate ab:

1. Niedrige Kühlraten und/oder hohe  $L_p$  bewirken, dass die Zelle sehr viel Wasser abgibt. Dadurch wird der Gefrierpunkt zwar so weit abgesenkt, dass die Zelle eher verglast als gefriert, aber eine tierische Zelle kann nicht beliebig viel Wasser verlieren und am Leben bleiben. Einige Autoren berichten von einem sog. kritischen Minimalvolumen von ca. 30%, das die Zelle ohne tödliche Folgen nicht unterschreiten kann.

2. Ist die Kühlrate hoch und/oder  $L_p$  niedrig unterschreitet die Temperatur schnell den Gefrierpunkt des Zytoplasmas, was zur kritischen Eiskristallisation führt, sobald Nukleationskeime vorhanden sind oder die Temperatur unter die homogene Nukleationstemperatur fällt.

Um das Überleben der Zellen zu gewährleisten, muss also eine Kühlrate gewählt werden, die den Mittelweg zwischen Unterkühlung und Austrocknung beschreitet. Da jeder Zelltyp über eine spezifische  $L_p$  verfügt, muss auch die optimale Kühlrate für jeden Zelltyp einzeln ermittelt werden. Die Entstehung von intrazellulärem Eis wird allgemein als tödlich für die Zelle angesehen und soll bei der Kryokonservierung unbedingt vermieden werden. Um Vitrifikation des Zytoplasmas zu erreichen, wurden unterschiedliche Verfahren und Kryomedien entwickelt. Beim so genannten „equilibrium freezing“ (Mazur 1990) wird dem Zytoplasma durch langsames Abkühlen und Gefrieren kontrolliert Wasser entzogen und dadurch Vitrifikation des Zytoplasmas erreicht oder die gesamte Probe (Zellen und extrazelluläres Medium) durch „non-equilibrium freezing“ oder Vitrifikationsprotokolle (Fahy et al. 1984) verglast. Dies geschieht durch Applikation hoher Konzentrationen von kryoprotektiven Substanzen in Kombination mit sehr schnellen Kühlraten.

Beim Auftauen von Zellen kommt es intrazellulär vorübergehend zu sehr hohen Osmolaritäten, wenn die Eiskristalle schmelzen und das, in den „Taschen“ zwischen den Eisdendriten aufkonzentrierte Zytoplasma erst nach und nach verdünnt wird. Aufgrund des osmotischen Gradienten strömt daraufhin Wasser in die Zelle. Dies kann zur Lysis führen, wenn die Membran den hydrostatischen Druck nicht aushält. Hohe Auftaugeschwindigkeiten werden als vorteilhaft angesehen, weil die Membran schneller ihre Fluidität und ihre Flexibilität zurückgewinnt (Muldrew und McGann 1994). Auch bei vitrifizierten Zellen kann es beim Auftauen zu zusätzlichen Schäden kommen. Wenn vitrifizierte Zellen wieder erwärmt werden, müssen sie eine kritische Temperaturspanne überwinden. Das hochviskose, verglaste Zytoplasma wird flüssig, bevor der Schmelzpunkt erreicht wird. In diesem Zustand ist es unterkühlt und damit anfällig für Eiskeimbildung bzw. für das Gefrieren. Man spricht in dem Zusammenhang von Devitrifikation. Mazur et al. zeigte 1977, dass im Zytoplasma bereits beim Einfrieren Eiskristalle entstehen, die jedoch nicht weiter schädlich sind, sofern sie eine gewisse Größe nicht überschreiten.

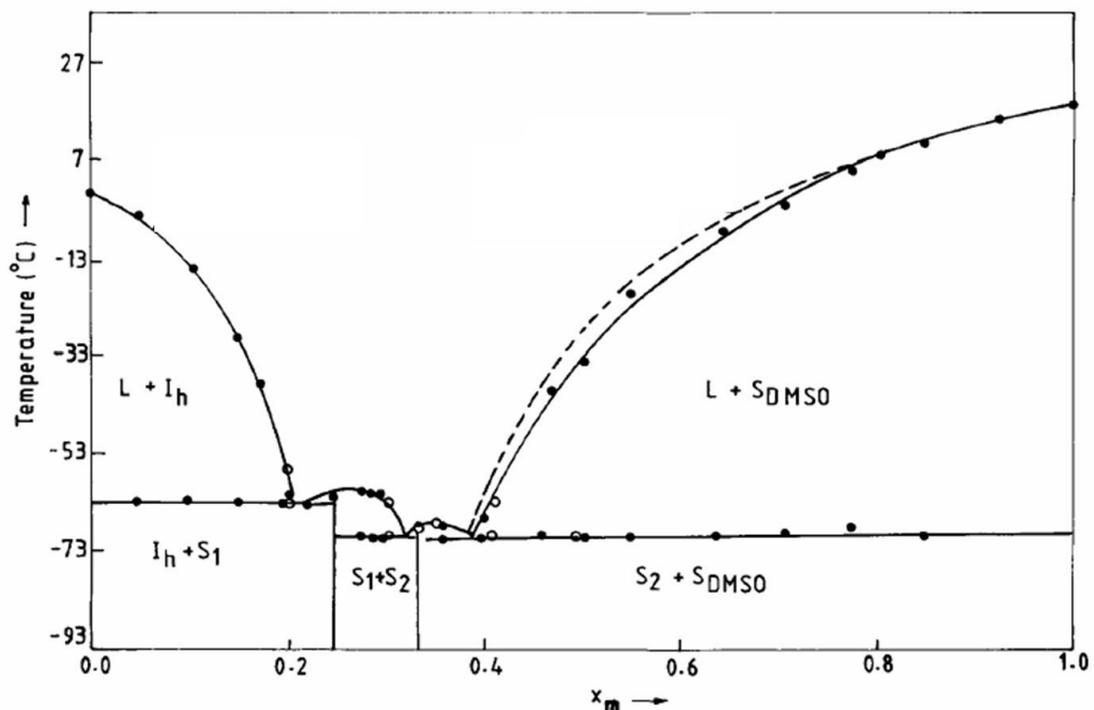
Beim Auftauen kann es aber zur Umkristallisation oder Rekristallisation kommen, wenn kleine Kristalle fusionieren oder auf Kosten des Wachstums von größeren Kristallen verschwinden. Große Kristalle sind energetisch günstiger, wegen des geringeren Oberflächen / Volumenverhältnisses aber für die Zelle auf jeden Fall schädlich. Durch hohe Auftauraten kann das Kristallwachstum jedoch bis zum Erreichen des Schmelzpunktes verringert und zumindest die Entstehung großer Kristalle verhindert werden. Während die unterschiedlichen Einfriergeschwindigkeiten je nach Art des verwendeten CPAs noch diskutiert werden, herrscht Einigkeit darüber, dass die Auftaurate so hoch wie möglich sein sollte (Wolfe und Bryant 2001). Mikroskopisch kann die Devitrifikation bzw. die Rekristallisation von Zellen beim Auftauen beobachtet werden. Vitrifizierte Zellen oder Zellen, die sehr kleine Eiskristalle enthalten, sind transparent, da kleinste Eiskristalle weder mit Licht- noch Elektronenmikroskopischen Methoden (Gefriersubstitution und TEM) detektiert werden können (Luyet 1955, Luyet et al. 1962). Wenn die Devitrifikation eintritt, kommt es zur Verdunkelung des Zytoplasmas, weil Eiskristalle im Gegensatz zu Glas das Licht streuen. Dieses Phänomen wird „flash-out“ genannt.

### 2.1.3 Kryoprotektive Substanzen

Tierische Zellen sind von Natur aus nicht in der Lage Einfrieren und Auftauen zu überleben, Kryotoleranz kann jedoch durch Zusatz von CPAs (cryoprotective agents) künstlich induziert werden. 1938 wurde von Szein entdeckt, dass Kryotoleranz in Froschspermien durch einfrieren in saccharosehaltiger Lösung erreicht werden kann. 1949 folgte die Entdeckung von Glycerin als CPA durch Polge und dessen Mitarbeiter.

Man unterscheidet generell zwischen membrangängigen und nicht - membrangängigen CPAs. Ebenfalls verwendet werden die Begriffe intra- und extrazelluläre CPAs, wobei beachtet werden muss, dass die so genannten intrazellulären CPAs auch im Extrazellulärbereich vorkommen. Zu den membrangängigen gehören kleine, amphiphile Moleküle wie Glycerin, Ethylenglykol und Dimethylsulfoxid ( $\text{Me}_2\text{SO}$ , DMSO) (Abbildung 2.7). Diese CPAs zeichnen sich durch ihre Eigenschaft aus in ähnlicher Art wie Wasser an Makromoleküle wie Proteine, Nukleinsäuren und Lipide zu binden. Die räumliche Struktur und damit auch die Funktion der Makromoleküle werden auf diese Weise bewahrt. Außerdem bilden einige CPAs wie  $\text{Me}_2\text{SO}$  in höheren Konzentrationen Komplexe mit Wasser (Abbildung 2.6). Wegen der Permeabilität der Membran befindet sich das CPA im Zytoplasma in etwa derselben Konzentration wie im Medium. Während des Gefriervorgangs, wenn die Lösung durch Wasserentzug aufkonzentriert wird, wird auch die Konzentration des CPA außer- und innerhalb der Zelle stark erhöht. Membrangängige CPAs verhindern in geringen Konzentrationen nicht das Gefrieren der Zelle, aber reduzieren die Menge und die Schäden durch intrazelluläres Eis (Lovelock 1953; Farrant 1969) möglicherweise auch durch Komplexbildung mit Wasser (Murthy 1998).

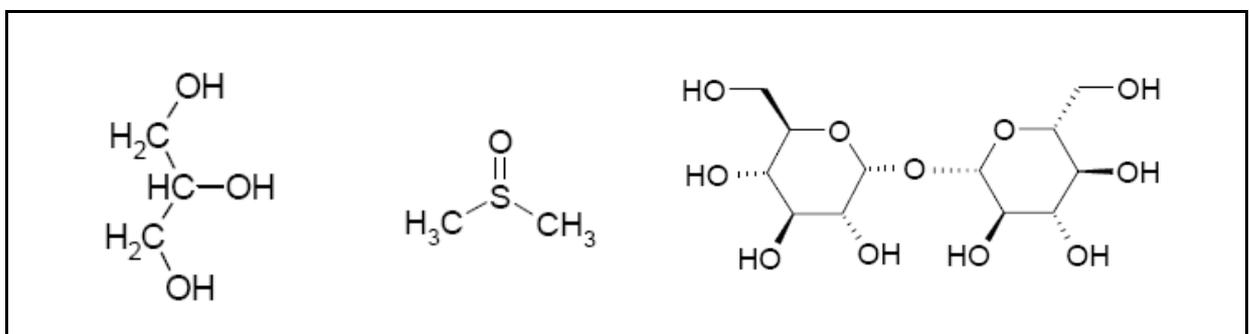
Von geringen Konzentrationen spricht man bei Konzentrationen von bis zu 1 Mol, was ca. 7,1%  $\text{Me}_2\text{SO}$  (v/v) oder 7,4% (v/v) Glycerin entspricht. Die Wirkung von  $\text{Me}_2\text{SO}$  wird durch den Ersatz der Hydrathülle von Makromolekülen erklärt. Tatsächlich konnte im Versuch eine Dehydrierung der Zellmembran unter gleichzeitiger Erhöhung der Membranpermeabilität durch Anwesenheit von geringen Mengen  $\text{Me}_2\text{SO}$  (wenige %) festgestellt werden (Gordeliy et al. 1998,



**Abbildung 2.6:** Gleichgewichtsphasendiagramm von Wasser und  $\text{Me}_2\text{SO}$  (verändert nach Murthy 1998). Die durchgezogenen Linien stellen die Liquiduskurve der Mischung dar. Ausgefüllte Punkte wurden durch DSC (differential scanning calometry), leere Punkte durch die Dielektrische Methode bestimmt.  $I_h$  steht für hexagonales Eis,  $S_1$  für das Vorhandensein von 1:1 Wasser- $\text{Me}_2\text{SO}$  Komplexen,  $S_2$  für 2:1 Komplexe und  $S_{\text{DMSO}}$  für kristallines  $\text{Me}_2\text{SO}$ . Demnach ist der Gefrierpunkt einer Wasser –  $\text{Me}_2\text{SO}$  Mischung zwischen 0,2 und 0,4 am niedrigsten mit ca.  $-63^\circ\text{C}$  -  $-70^\circ\text{C}$  ( $x_m$  = Molbruch; 0,2 – 0,4 entsprechen 54% - 76% (v/v)  $\text{Me}_2\text{SO}$ ).

Wood und Wood 1975). In hohen Konzentrationen (einige mol/l) angewendet können membran­gängige CPAs zur vollständigen Vitrifikation von Zellen und Medium führen. Die dafür notwendigen Konzentrationen ( $\text{Me}_2\text{SO}$  45% (w/w), was ca. 6,5M entspricht) würden bei Raumtemperatur innerhalb kurzer Zeit zum Zelltod durch Störung des Stoffwechsels und osmotischem Schock führen und müssen daher unter schrittweiser Erhöhung der Konzentration oder gekühlt zugegeben werden (sh. z.B. Pegg et al. (2006) Liquidus Tracking Method). Chen und Mitarbeiter dokumentierten (2007) das osmotische Verhalten einer Blutzelllinie und zeigten dass es, obwohl  $\text{Me}_2\text{SO}$  membran­gängig ist, zu einer osmotischen Reaktion kommt. Nach Austausch des Mediums gegen isotone  $\text{NaCl}$ -Lösung mit 1,5M  $\text{Me}_2\text{SO}$  (entspricht ca. 10%) schrumpfte die Zelle innerhalb von zehn Sekunden auf 70% ihres Normalvolumens und erreichte nach ca. zwei Minuten wieder ihr ursprüngliches Volumen. Bei dreifach konzentrierter PBS-Lösung (Osmolarität ca. 900mOsmol) zeigte sich nach anfänglichem Schrumpfen der Zelle keine Gegenregulation innerhalb des Versuchszeitraums von 120 Sekunden.

Nach dem Auftauen muss das CPA durch schrittweise Verdünnung kontrolliert aus der Zelle entfernt werden um starke osmotische Schwankungen zu vermeiden.  $\text{Me}_2\text{SO}$  als 10%ige Lösung wird zwar heute standardmäßig mit überwiegend hohen Überlebensraten (z.B. L929 90 – 98%; Ehrhart et al. 2008) zur Kryokonservierung von tierischen Zellen verwendet, dennoch besteht die Notwendigkeit andere Methoden zu entwickeln, da  $\text{Me}_2\text{SO}$  bei nicht kryogenen Temperaturen zytotoxisch wirkt und daher schwerlich für medizinische Anwendungen verwendet werden kann (Fahy 1986).  $\text{Me}_2\text{SO}$  kann außerdem bei Stammzellen Differenzierung auslösen (Adler et al. 2006, Katkov et al. 2006). Nicht-membran­gängige CPAs sind im Allgemeinen hochmolekulare Stoffe, wie z.B. Polysaccharide (HES (Hydroxyethylstärke), Dextrine und Karragene), Proteine und Polyalkohole. Auch Oligosaccharide, wie Saccharose und Trehalose und Methylamine (Betain) werden als CPAs verwendet. Die kryoprotektive Wirkung dieser Stoffe erklärt man sich durch den Schutz der Zellmembran von außen, Reduktion der Eismasse (Farrant 1969, Lovelock 1953) und durch den kolloidosmotisch induzierten Wasserentzug. HES wird zusammen mit Glukose in Blutbanken standardmäßig zur Kryokonservierung von Blutkonserven verwendet. Insgesamt gelten nicht-membran­gängige CPAs zurzeit als weniger effektiv als membran­gängige. Viele kryoprotektive Stoffe, membran­gängige und nicht-membran­gängige, zeichnen sich zusätzlich dadurch aus, dass ihre Viskosität bei Temperaturabnahme, oft auch in Kombination mit Aufkonzentrierung durch Eiskristallbildung, besonders stark zunimmt, was die Wahrscheinlichkeit der intra- und extrazellulären Vitrifikation erhöht (Kerr et al. 1994, Maltini et al. 1995, Morris et al. 2006).



**Abbildung 2.7:** Molekulare Struktur häufig verwendeter CPAs: Glycerin (links),  $\text{Me}_2\text{SO}$  (Dimethylsulfoxid, DMSO) (Mitte) und Trehalose (rechts). Im Vergleich der unterschiedlichen Kryoprotektiva fällt auf, dass sie insbesondere Wasserstoffbrückendonoren und -akzeptoren besitzen (Hydroxylgruppen).  $\text{Me}_2\text{SO}$  zeigt zudem eine wasserähnliche Struktur und Elektronegativitätsverteilung.

Besondere Aufmerksamkeit gilt seit einigen Jahren der Trehalose (Abbildung 2.7). Dieses Disaccharid aus zwei Glukoseeinheiten wurde in zahlreichen kälte- und austrocknungstoleranten Lebewesen, wie Hefen, Tardigraden und einigen Nematoden nachgewiesen und als die entscheidende Substanz für deren Überleben ausgemacht (Crowe und Crowe 2000). Trehalose ersetzt die Hydrathülle von Proteinen und Membranen, indem es mit ihren Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken zu denen der Makromoleküle bildet („water-replacement theory“). Membranen, die in Gegenwart von Trehalose dehydriert wurden, behielten den Flüssigkristallcharakter bei (Crowe et al. 1984, Leslie et al. 1994, Crowe et al. 1998). Auf Zellmembranen hat dieser Zucker zudem einen „verhärtenden“ Effekt: die hydraulische Leitfähigkeit der Membran wird gesenkt (Anchoroguy et al. 1987, Reuss et al. 2004). Die Reduktion der hydraulischen Leitfähigkeit könnte dazu beitragen, dass die Antwort auf kurzfristigen osmotischen Stress beim Einfrieren und Auftauen, das Schwellen oder Schrumpfen der Zelle, langsamer verläuft und daher geringere Ausmaße annimmt.

Trehalose hat inzwischen weitreichende Verwendung in der Kryokonservierung von tierischen Zellen gefunden. Da CPA ihre Wirkung am besten entfalten, wenn sie an beiden Seiten einer Membran vorliegen wurden zahlreiche Methoden entwickelt, den membranimpermeablen Zucker in tierische Zellen einzuschleusen. Der Einbau der Gene, die für die Trehalosesynthese notwendigen Enzyme codieren, wurde zwar erfolgreich an humanen Fibroblasten durchgeführt (Guo et al. 2000) und die Zellen überlebten die vollständige Austrocknung, aber an Zellen, die für die Transplantation oder die Fortpflanzung bestimmt sind, kann Genmanipulation aufgrund des unkontrollierten Einbaus ins Genom nicht angewendet werden. Humane und murine Oozyten, denen mit einer Mikrokanüle Trehalose injiziert wurde, können mit Überlebensraten von ungefähr 80% kryokonserviert werden (Eroglu et al. 2002 und 2003). Dieses Verfahren ist aber offensichtlich nur für sehr große Zellen geeignet.

Eine andere Methode macht sich die mit dem Phasenübergang bei niedrigen, aber nicht kryogenen Temperaturen verbundene, vorübergehende Permeabilität der Membran zunutze (Beattie et al. 1997). Trehalose kann aber auch durch Pinocytose und andere unspezifische Wege in Zellen gelangen. Inkubation der Zellen in trehalosehaltiger Lösung kann bereits ausreichend sein, um das Überleben der Zellen zu gewährleisten. Um auf diese Weise genügend Trehalose in eine Zelle einzubringen, muss die Zelle über ein sehr hohes Oberfläche/Volumenverhältnis verfügen. Thrombozyten, auf diese Art mit Trehalose beladen, wurden erfolgreich gefriergetrocknet und rehydriert (Wolkers et al. 2001). Eroglu und Mitarbeiter (2000) benutzten ein gentechnisch verändertes  $\alpha$ -Hämolysin von *Staphylococcus aureus* um Trehalose in Fibroblasten und Keratinozyten einzuschleusen. Für Zellen, unterschiedlicher Art und Größe, eignet sich z.B. die Elektroporation in trehalosehaltiger Lösung (Mussauer et al. 2001, Shirakashi et al. 2002).

Des Weiteren sind so genannte akzessorische Stoffe bekannt, die in sehr geringen Konzentrationen in Kombination mit einem CPA verwendet werden und dessen Kryokonservierungserfolg erhöhen. Enzymatische Katalysatoren, die reaktive Sauerstoff-Spezies oder Sauerstoff selbst abbauen, können den Kryokonservierungserfolg steigern. Katalase, allein oder in Kombination mit Superoxid Dismutase, erhöht deutlich die Überlebensrate von Mausoozyten wenn es in Konzentration von wenigen 10 U/ml zugegeben wurde (Dinara et al. 2001, Sasnoor et al. 2005). Ähnlich wirkt Oxyrase, ein Enzym aus *E. coli* (Mazur et al. 2000). Auch Radikalfänger auf nicht-enzymatischer Basis wie Ascorbinsäure, reduziertes Glutathion oder Tocopherol, wurden bereits verwendet. Eine weitere Möglichkeit, die oft bei der Kryokonservierung von Spermien verwendet wird, ist die Zugabe von Cholesterin zur Modifikation der Membranfluidität. Cholesterin wirkt stabilisierend auf die tierische Zellmembran, beispielsweise wird es vermehrt bei der Kälteakklimatisierung produziert (in Pflanzen verläuft die Regulation des Membranschmelzpunktes über Sättigung- bzw. Desaturierung der Fettsäureketten). Cholesterin lagert sich zwischen die

Phospholipide und verhindert zu starke hydrophobe Wechselwirkungen, senkt also deren Schmelzpunkt. Anti-Freeze – Proteine (AFP) können die Vitalität von Zellen nach der Kryokonservierung ebenfalls positiv beeinflussen. Die Hämolyse roter Blutzellen nach der Kryokonservierung in HES (Hydroxyethylstärke) wurde beispielsweise durch Zugabe von AFP aus der Winterflunder von 45% auf 15% reduziert (Carpenter und Hanssen 1992).

Lagerungszeiten von 2 bis 315 Tagen von humanen Spermien auf Trockeneis sind nach Sawada (1964) möglich, wobei die Motilität der Spermien ab  $-79^{\circ}\text{C}$  rapide abnimmt (Ackerman 1968). Auch spätere Versuche mit humanen Blutplättchen (2 Jahre bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , Valeri et al. 2006) oder peripheren Blutstammzellen (Lagerdauer unter 6 Monate, Galmes et al. 2007) zeigen, dass man diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagern kann. Diese tiefkalten Temperaturen haben im Gegensatz zur Lagerung bei anderen Temperaturbereichen (Trocknung und Lagerung bei Raumtemperatur, Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$ , Kryokonservierung bei  $-20^{\circ}\text{C}$ ) den entscheidenden Vorteil dass biochemische, chemische und physikalische Reaktionen bzw. Vorgänge so sehr verlangsamt werden (bzw. die Bewegung von Wassermolekülen komplett unterbleibt), dass das Material nach Jahrzehnten noch nahezu unverändert vorgefunden wird.

Die empfohlene Lagertemperatur von unterhalb  $-130^{\circ}\text{C}$  ergibt sich aus der Glasübergangstemperatur von (reinem) Wasser. Unterhalb dieser Temperatur finden keine Bewegungen der Wassermoleküle statt, die zur Umkristallisation (große Kristalle wachsen auf Kosten der Kleinen) führen (Meryman 1963). In einem groß angelegten Experiment zeigten Vysekantsev et al. 2005, dass die einjährige Lagerung verschiedenster Zellen (*E. coli*, *S. cerevisiae*, embryonale Leberzellen, u.a.) bei Temperaturen von  $-100^{\circ}\text{C}$  bis  $-196^{\circ}\text{C}$  ohne Vitalitätsverlust möglich ist. Temperaturschwankungen von z.B.  $-196^{\circ}\text{C}$  auf  $-100^{\circ}\text{C}$  hatten dagegen bei allen Zelltypen einen drastischen Rückgang der Vitalität zur Folge, wobei unklar ist, ob bei der Umlagerung kurzfristig und unkontrolliert höhere Temperaturen aufgetreten sein könnten. Kryoröhrchen mit einem Volumen von 1ml können sich, wenn sie aus dem Lagerbehälter entnommen werden und bei Raumtemperatur gehalten werden, innerhalb einer Minute von  $-80^{\circ}\text{C}$  auf ca.  $-10^{\circ}\text{C}$  erwärmen (unveröffentlichte Daten). Zusammenfassend kann man sagen, dass kurze Lagerzeiten von bis zu 2 Jahren für bestimmte Zellen (Spermien und Thrombozyten) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  möglich sind, für längere Lagerzeiten Temperaturen unterhalb  $-130^{\circ}\text{C}$  empfehlenswert sind. Das Problem bei der Kryokonservierung ist weniger die Lagerung, sondern die dazugehörigen Einfrier- und Auftauprozesse.

### 2.1.4 Probleme bei der Kryokonservierung von Geweben

Kryokonservierte Gewebe werden bereits klinisch eingesetzt z.B. kryokonserviertes Ovarialgewebe um die Fertilität nach Zytostatikabehandlung wiederherzustellen (Woods et al. 2004, Picton et al. 2000). Generell gilt jedoch, dass Gewebe mit geringerem Erfolg als Einzelzellen kryokonserviert werden können, z.B. Chondrozyten überleben als Einzelzellen zu 80% die Kryokonservierung, Zellen im Knorpelgewebe mit 5% (Pegg 2001). Ein Unterschied zwischen Geweben und Einzelzellen ist die Größe, die die Diffusionsstrecke für CPAs verlängert. Die Diffusion ins Innere des Gewebes dauert länger, während äußere Zellschichten längere Inkubationszeiten ertragen müssen.

Unter der Annahme, dass die Diffusion durch Gewebe nicht verlangsamt wird, erreichen daher  $\text{Me}_2\text{SO}$ -Moleküle in einem  $400\mu\text{m}$  großen Sphäroiden bereits nach 22s das Zentrum, während ein Angleich an die Außenkonzentration in ca. 66s erreicht wird. In einem Gewebestück von ca. 2mm Durchmesser findet der Angleich erst nach ca. 30min statt (s.h. auch Abbildung 5.3). Newton et al. 1998 bestimmte experimentell mittels NMR (nuclear magnetic resonance) einen

relativen Anteil von  $\text{Me}_2\text{SO}$  in einem Gewebezylinder (4mm Durchmesser und 2mm Dicke) nach ca. 90min Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  von 0,9. Unterschiedliche Gewebe zeigen jedoch unterschiedliche Gleichgewichtskonzentrationen von CPAs nach einer Stunde Inkubationsdauer: Arterien (Kaninchen): 99-100% der Außenkonzentration von  $\text{Me}_2\text{SO}$ , während Lebergewebe nur 75% der Außenkonzentration aufnimmt (Bateson et al. 1994 und Fuller et al. 1994, beide zitiert in Elmoazzen et al. 2005). Dies wird durch unterschiedliche osmotische Drücke der biologischen Komponenten im Gewebe erklärt, die das Gegengewicht zur extrazellulären Lösung darstellen (Elmoazzen et al. 2005).

Die Diffusionsgeschwindigkeit errechnet sich nach der Einstein-Smoluchowski-Gleichung:

$$x^2 = 2 Dt$$

$x$  = Strecke

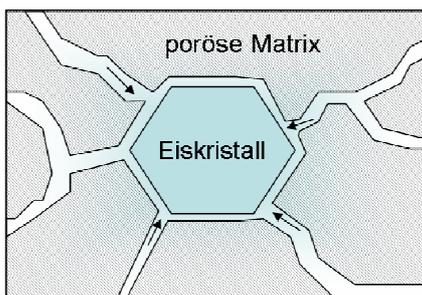
$D$  = Diffusionskoeffizient ( $\text{Me}_2\text{SO} = 0,9 \times 10^{-3} \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ )

$t$  = Zeit

wie folgt: 
$$\frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{2D}{\Delta x}$$

Nicht nur das Eindringen von Kryoprotektiva, sondern auch das Ausströmen von Wasser und der Entzug von Wärme sind in großen Gewebeteilen verlangsamt. In großen Proben (cm-Bereich) kann das Auftreten von thermomechanischen Spannungen bzw. von Spannungsrissen beim Einfrieren direkt beobachtet werden. In kleinen Hepatozytensphäroiden (ca. 75-150 $\mu\text{m}$  Durchmesser) wurde von Korniski et al. (1999) ein im Vergleich zu Einzelzellen deutlich verlangsamer Wasserausfluss bei osmotischen Schwankungen durch Kühlung bzw. Eisbildung nachgewiesen. Verlangsamer Wasserausfluss begünstigt die Bildung von gefährlichem intrazellulärem Eis, wobei bei multizellulären Systemen zusätzlich die extrazelluläre Eisbildung berücksichtigt werden muss. Eisbildung zwischen den Zellen (interzelluläre Eisbildung) zerstört Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen ebenso wie Blutgefäße in vaskularisierten Geweben (Acker et al. 2000 und 2001). Das Wachstum von interzellulärem Eis wird durch Zufluss von Wasser durch Poren im Gewebe und durch Diffusion aus den Zellen gefördert (Abbildung 2.8).

Neben den biophysikalischen Problemen bei der Kryokonservierung von multizellulären Systemen ergeben sich Schwierigkeiten bei der experimentellen Durchführung. Primäre Proben zeichnen sich durch hohe Heterogenität aus. Dabei kann der Zustand des Spenders, Alter, Geschlecht, Immunstatus und die natürliche genetische Variabilität eine Rolle spielen. Bei speziellen Proben, wie z.B. Tumorgewebe, beeinflusst die medizinische Vorbehandlung durch z.B. Zytostatika den Zustand der Probe.

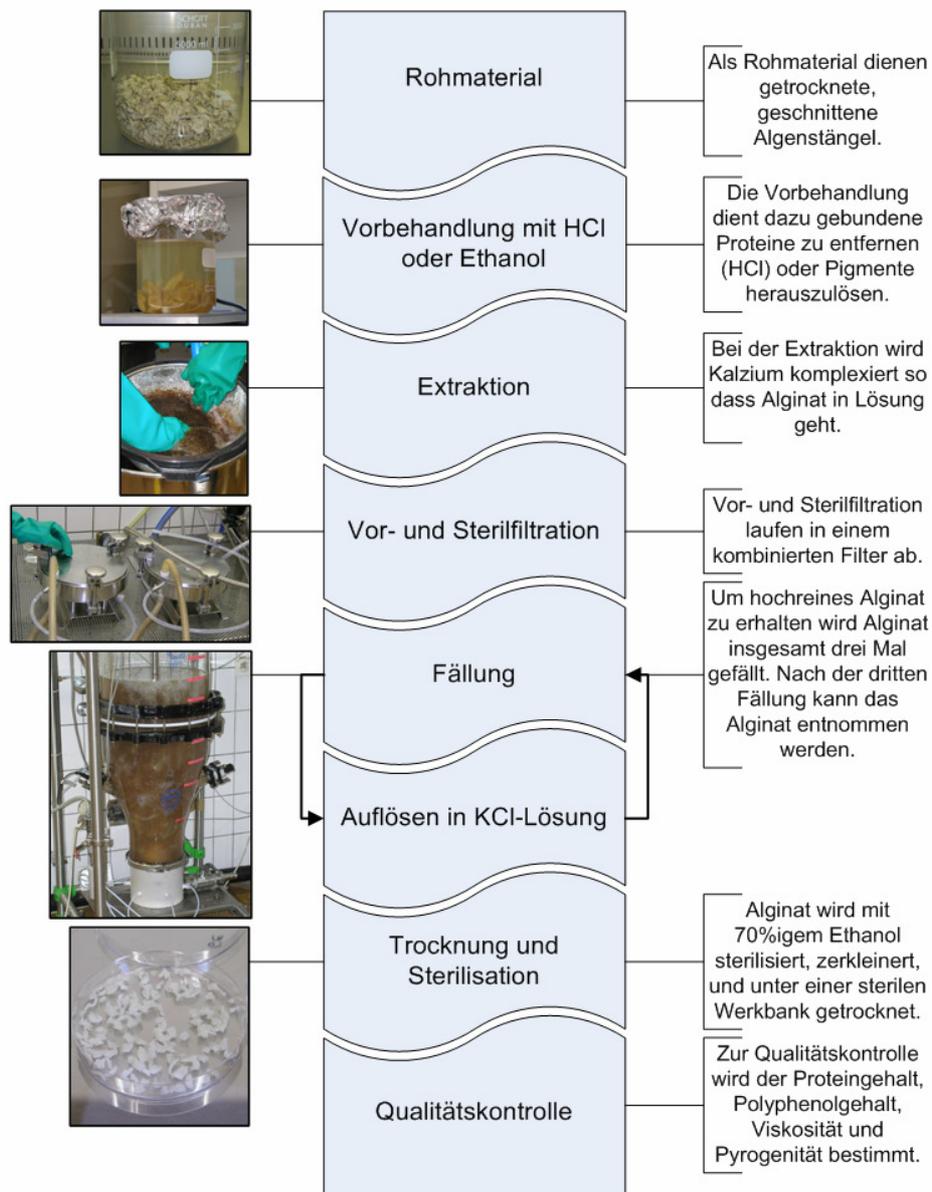


**Abbildung 2.8:** Eiswachstum im interzellulären Bereich. In einer porösen Matrix wird der Eiskristall durch Zufluss von Wasser durch Poren (im Gewebe oder Blutgefäße) sowie durch Diffusion von Wasser aus Zellen genährt. Das Kristallwachstum kann Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte sprengen.

---

Auch die Verfügbarkeit und Häufigkeit der Proben ist nicht immer gegeben; um an humane Gewebeproben zu gelangen, ist ein Zugang zu einer Spezialklinik mit hoher Probenfrequenz notwendig. Eine Abhilfe schaffen hier in begrenztem Maß Modellsysteme, an denen die grundsätzlichen Phänomene und biophysikalischen Probleme bei der Kryokonservierung untersucht werden können. Für multizelluläre Systeme bieten sich hier Sphäroide an (Holtfreter, 1944; 1947; und Moscona, 1952; 1957; beide zitiert in Santini et al., 2000). Zur Untersuchung der Carcinogenese (Tumorzellen), Angiogenese (Tumorzellen, Fibroblasten), Wundheilung, Zellmigration und Gehirnentwicklung (neuronale Vorläuferzellen) werden unterschiedlichste Zelltypen verwendet (Landry 1982, Oudar 2000). Um Angiogenese in Tumorsphäroiden auszulösen, lässt man die Sphäroide eine kritische Größe überschreiten oder reduziert die Sauerstoffversorgung, so dass durch Unterversorgung stagnierende bis nekrotische Kerne entstehen. Zur Simulation von gesunden Gewebeteilen oder Langerhansschen Inseln in der Kryobiologie sollten daher gut versorgte, vitale Sphäroide eingesetzt werden.





**Abbildung 2.10:** Gewinnung von UHV-CG Alginat; Als Ausgangsmaterial dienen getrocknete und geschnittene Algenstängel, die an der Küste von Chile manuell geerntet wurden. Nach der Rehydrierung werden die Algenstängel entweder mit HCl (*L. trabeculata*) oder Ethanol (*L. nigrescens*) vorbehandelt. Um das in der Alge vorliegende Ca-Alginat in Lösung zu bringen, werden Komplexbildner (EDTA, Iminodisuccinat) dazugegeben, ebenso (bei *L. trabeculata*) Natriumglukonat, um Eisen zu binden. Darauf folgt die Vor- und Sterilfiltration, wobei das Algenextrakt in den Fällungsreaktor überführt wird. Die Reinheit des Alginats wird sukzessive durch drei aufeinander folgende Fällungs- und Lösungsschritte (in Kaliumchloridlösung) erhöht. Nach der dritten Fällung kann das Alginat aus dem Reaktor entnommen und zur Weiterverarbeitung in eine Sterilbank überführt werden. Dort wird Alginat mit Ethanol sterilisiert, zerkleinert und getrocknet. Nach der Qualitätskontrolle, die Viskosität, Protein und Polyphenolgehalt sowie die Pyrogenität prüft, kann das getrocknete Alginat verwendet werden.

Die frisch geernteten Algenstängel werden vor Ort geschält, geschnitten, mit Antiseptika (z.B.  $\text{Ag}^+$ ) behandelt und steril getrocknet. In der Alge liegt Alginat als Ca-Alginat vor. Im Labor werden daher mit einer Lösung aus Komplexbildnern  $\text{Ca}^{2+}$  und Schwermetalle (Braunalgen akkumulieren in großen Mengen Schwermetalle) gebunden und Alginat geht in Lösung. Nach der Sterilfiltration, bei der die ungelösten Algenreste und Mikroorganismen entfernt werden, wird Alginat mehrfach mit Ethanol gefällt und in KCl-Lösung wieder gelöst (Abbildung 2.10). Dabei werden vor allem Fucoideane (ein weiteres, allerdings hoch mitogenes Zellwandpolymer der Braunalgen), Proteine und Polyphenole entfernt. Nach einem letzten Fällschritt wird Alginat zur Sterilisation in 70%igem Ethanol eingelegt, mit einer Schere in ca. 2mm große Granulatstücke zerlegt und ca. 2 Tage steril getrocknet. Vor der Verwendung wird der Protein- und Polyphenolgehalt spektrophotometrisch bestimmt, da diese Werte über die hauptsächlich enthaltenen Verunreinigungen Aufschluss geben. Auch der Endotoxingehalt muss getestet werden, da die kritische Grenze bei 100EU/g (european units) liegt, über der Alginat nicht mehr für in vivo Studien geeignet ist (de Vos et al. 1997). Die Viskosität wird anhand einer 0,1%igen Lösung in Wasser bestimmt, welche zwischen 20 und 90mPas liegen sollte. Außerdem wird über Inkubation von Alginat in Kulturmedium bei 37°C die Sterilität der Charge geprüft. Weitere Qualitätssichernde Untersuchungen sind die Bestimmung der durchschnittlichen Moleküllänge sowie die Mitogenität des Alginats.

### 2.2.2 Einschlussimmobilisierung von Zellen

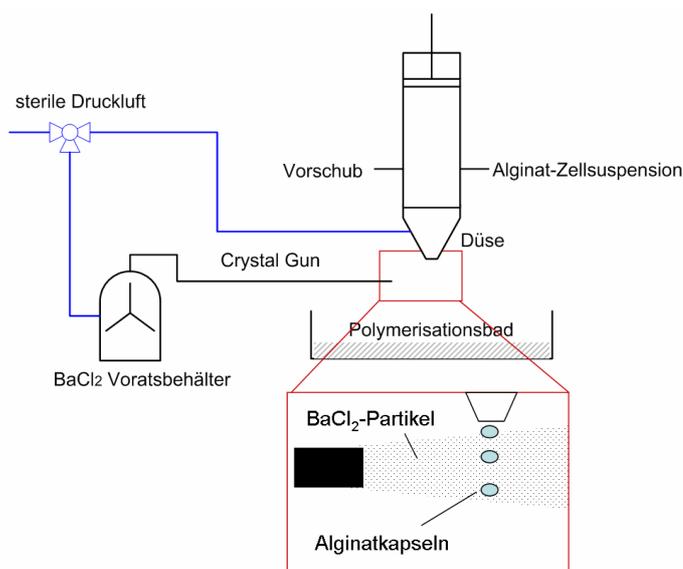
Die langen Molekülketten von Alginat bestehen aus Mannuron- und Guluronsäure, die homopolymere Regionen (M- oder G-Blöcke) bilden, die von heteropolymeren Regionen (MG-Blöcken) unterbrochen werden. Die linearen Polymere bilden bei Zugabe von multivalenten Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{3+}$  ionotrope Gele, in denen die Carboxylgruppen der Guluronsäureketten über die Kationen miteinander vernetzt werden, wobei das so genannte „egg box“-Modell entsteht (Abbildung 2.9) (Grant et al. 1973, Smidsrod 1974, Braccini et al. 2001). G-Blöcke bilden im Gegensatz zu M-Blöcken helikale Strukturen mit exponierten Bindungsstellen für Kationen.

Der Übergang von der Lösung zum Gel in Anwesenheit von zweiwertigen Kationen läuft in drei Schritten ab: 1. Bindung von (z.B.)  $\text{Ca}^{2+}$  an Guluronsäure (Monokomplex), 2. Annäherung und Bindung eines zweiten G-Blocks (Dimer, „egg-box“), 3. Zusammenschluss mehrerer Dimere zu Multimeren (Gelbildung) (Fang et al. 2007). Im Gegensatz zu thermotropen Gelen (z.B. Gelatine, Agar-Agar) ist Ca- oder Ba-Alginat bei physiologischen Temperaturen stabil und weist eine hohe mechanische Stabilität auf. Hydrogele von hoher mechanischer Stabilität werden mit Hilfe von  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Ba}^{2+}$  gewonnen, während  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  eher weiche Gele bilden. Bei der Einschlussimmobilisierung oder Verkapselung werden Zellen, Gewebe oder Organe innerhalb einer dreidimensionalen Alginatmatrix eingeschlossen, wobei eine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie die Abgabe von Stoffwechselprodukten (z.B. Insulin) und Kohlenstoffdioxid gewährleistet bleiben.

Diese in Alginatkapseln eingeschlossenen Zellen, Gewebe oder Organe, spielen vor allem bei der immunisolierten Transplantation eine wichtige Rolle. Durch die räumliche Abschirmung des Transplantats gegen das Immunsystem kann dessen Abstoßung verhindert werden, ohne dass sich der Empfänger einer immunsuppressiven Behandlung unterziehen muss. Zudem lässt sich durch die Verwendung artfremder Gewebe die Knappheit an Spenderorganen umgehen. Weit fortgeschritten ist die Verkapselung und Implantation Langerhansscher Inseln (Lim und Sun

1980, de Vos et al. 1996, Zimmermann et al. 2004 und 2005) zu Diabetestherapie. Immobilisierte Zellen werden zudem vielfach als Modellsysteme für Gewebe genutzt, um z.B. die Auswirkungen einer 3D Umgebung auf Mitose, Apoptose oder Differenzierung zu testen. Die Auswirkungen der Einschlussimmobilisierung unterscheiden sich je nach Zelltyp und Verkapselungsbedingung. Vielfach angewandt werden dreidimensionale Alginatmatrizen in der Erforschung der Knorpelregeneration. Die multipotente Zelllinie CeH10T1/2 beispielsweise weist in Monolayerkultur Markerproteine von Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten auf. In einer Alginatkapsel werden bevorzugt Chondrozytenmarker (Kollagen II, CS4, CS6) exprimiert (Weber et al. 2002, Steinert et al. 2003). In Alginat verkapselte Zellen heften sich nicht bzw. nur schwach an Alginat an, da dieses nicht die adhäsionsfördernden Eigenschaften (z.B. spezifische Bindestellen, positive Ladung) von ECM besitzt. Für die optimale Funktion von Zellen (Proliferation, Migration, Apoptosehemmung) ist die Ankopplung an ECM, bzw. die dadurch ausgelösten Signale notwendig (Redding et al. 2005). Die Adhäsion von Zellen an die Alginatmatrix kann jedoch durch Zumischung von ECM-Molekülen verbessert werden, was z.B. positive Auswirkungen auf die chondrogene Differenzierung hat (Pound et al. 2007). Neben ECM sind weitere Möglichkeiten bekannt, die Eigenschaften der Alginatmatrix zu verändern. Die Zumischung von Serumalbumin zeigte sich beispielsweise vorteilhaft beim Erhalt der Vitalität von Langerhansschen Inseln (Schneider et al. 2003).

Man unterscheidet bei der Herstellung der Alginatkapseln verschiedene Verfahren. Am gebräuchlichsten ist die Eintropfmethode in polymerisierende Lösung, wobei der Tropfenabriss entweder durch elektrostatische Ladung, Vibration oder koaxiale Luftströme kontrolliert werden kann. Als etabliert wird die Verkapselungsanlage verwendet, wie sie in Abbildung 2.11 dargestellt und in Zimmermann et al. 2001 detailliert beschrieben ist. Zunächst werden Zellen oder Gewebe mit Alginatlösung (Na- oder K-Alginat) suspendiert. Mit Hilfe der Verkapselungsanlage werden kleine Tropfen abgerissen, die in ein  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Ba}^{2+}$ -haltiges Polymerisationsbad getropft. In diesem Polymerisationsbad findet die Vernetzung von Alginat und Kationen zur Alginatmatrix statt. Da die Kationen zunächst an der Oberfläche angreifen und dann erst langsam ins Innere des Alginattropfens diffundieren, kommt es dabei zu einer inhomogenen Vernetzung: die Kapselperipherie ist stark vernetzt, wohingegen der Kapselkern nur relativ schwach vernetzt bleibt (NMR-Untersuchung des Anteils an gebundenem Wasser s.h. Manz et al. 2004). Auswirkung auf den Vernetzungsgrad (Zimmermann et al. 2001, Wolf et al. 2005).



**Abbildung 2.11:** Schematische Darstellung des Verkapselungsvorganges. In die Verkapselungsanlage wird eine Suspension aus flüssigem Alginat und Zellen gegeben, die mit Hilfe einer Düse und einem koaxialen Luftstrom in kleinste Tröpfchen gerissen wird (Kompartmentierung). Während der Fallstrecke werden die Tröpfchen mit  $\text{BaCl}_2$  Staub gesprüht, um interne Polymerisation auszulösen, welche die Vernetzung homogener macht. Beim Eintreffen ins Polymerisationsbad bzw. der anschließenden Inkubation diffundieren zweiwertige Kationen in die Kapsel und sorgen für eine durchgehende Vernetzung des Alginats. Nach anschließenden Waschschritten um Reste von Polymerisationsbad zu entfernen, können die Kapseln verwendet werden.

Außerdem haben sowohl die Konzentration der vernetzenden Ionen als auch die Einwirkzeit eine direkte Bei Anwendung der „crystal gun“-Methode wird die externe um die interne Vernetzung erweitert, indem  $\text{CaCl}_2$ - oder  $\text{BaCl}_2$ -Kristalle in die flüssigen Alginatropfen geschossen werden, bevor diese im Polymerisationsbad eintreffen. Dadurch erreicht man eine homogene Vernetzung der Alginatmatrix, d.h. auch im Kapselinneren befindet sich das Alginat in einem gelartigen Zustand. Der Beschuss mit Kristallen beeinträchtigt dabei die Vitalität von den bisher getesteten Zellen nicht. Alginatkapseln können zusätzlich durch Proteine, wie humanes Serumalbumin (HSA) oder Poloxamer (Pluronic) modifiziert werden. Der Einschluss osmotisch aktiver Stoffe verändert die Wasserstrukturierung innerhalb der Alginatkapseln, die zu 98% aus Wasser bestehen, wodurch die Wasseraufnahme aus dem Medium und damit das Anschwellen der Alginatmatrix verringert wird.

Eine weitere Technik zur Einschlussimmobilisierung von Zellen in Alginat, bei der beliebig formbare dreidimensionale Konstrukte geschaffen werden können, ist die „moulding“ Technik. Dabei wird der flüssigen Alginat-Zellsuspension  $\text{CaSO}_4$  oder  $\text{BaSO}_4$  (als Suspension oder Pulver) zugemischt, diese in eine Gussform injiziert oder gegossen und ca. 5min zur initialen Polymerisation belassen. Gegebenenfalls kann eine weitere Inkubation in z.B.  $\text{CaCl}_2$  – Lösung erfolgen, um die mechanische Stabilität zu erhöhen (Chang et al. 2001, Lee et al. 2007). Um Abdrucke bzw. Abgüsse von Oberflächenstrukturen mit Alginat zu machen, hat sich ein weiteres „molding“-Verfahren bewährt (Franzesi et al. 2006). Dabei wird flüssiges Alginat auf die strukturierte Oberfläche gegossen und das Alginat mit einem Agarosesheet oder – block bedeckt. Die Agarose wurde mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung angesetzt. Dabei diffundiert  $\text{Ca}^{2+}$  in Alginat und vernetzt dieses. Nach Abnahme des Agaroseblocks kann das Alginat durch Nachpolymerisation mit  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zusätzlich verfestigt werden, bevor es von der Oberfläche abgenommen wird.

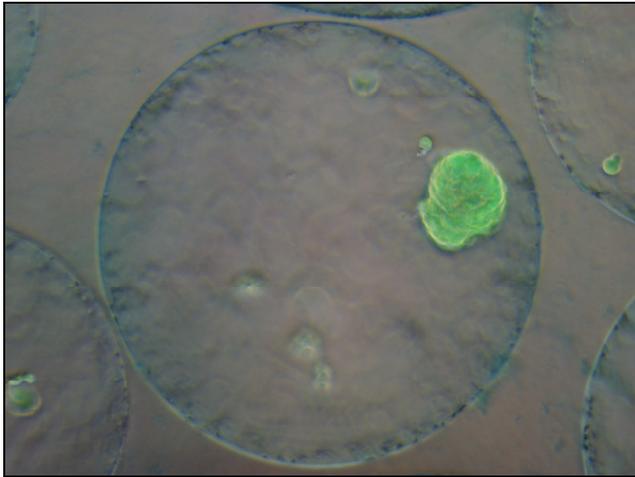
### 2.2.3 Probleme der therapeutischen Anwendung

Kommerziell erhältliche Alginat erfüllen zurzeit die Voraussetzungen zur Anwendung in der immunisolierten Transplantation nicht. Obwohl endotoxinarme Alginat angeboten werden, kann die Quelle des Alginates nicht definiert werden, so dass der G/M Anteil unbekannt ist bzw. aufwändig selbst bestimmt werden muss und je nach Charge variiert. Verunreinigungen durch unterschiedliche bakterielle (vor allem deren pyrogener Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid), pflanzliche, tierische und anthropogene Stoffe sowie der Aufreinigungsprozess (Formaldehydbehandlung) selbst, lassen zwar dieses Alginat für Lebensmittel und Kosmetikindustrie zu, jedoch nicht für Transplantationszwecke. Außerdem spielt das Molekulargewicht eine entscheidende Rolle zur Verträglichkeit von Alginathydrogelen. Große Moleküle und Polymere werden generell weniger vom Immunsystem angegriffen als kleine. Kommerzielles Alginat besitzt im Allgemeinen eine geringe Viskosität, während das manuell aufgereinigte Alginat hoch viskos ist. Beispielsweise werden kommerzielle Alginat in Konzentrationen von ca. 2%, angesetzt während das UHV Alginat für Kapselherstellung 0,65% - 0,7%ig verwendet wird.

Extraktionsprozess und Ernte mussten neu gestaltet und in Tierversuchen auf Verträglichkeit und Langzeitstabilität getestet werden, bevor die Zulassung für medizinische Zwecke erfolgen kann. Nach ersten Versuchen (Implantation von Leerkapseln in Mäusen) zeigte sich, dass die Alginatkapseln, die aus von Hand im Labor extrahiertem Alginat hergestellt wurden, weder fibrotischen Überwuchs noch deutliche Volumenzunahme aufwiesen. Für die klinische Zulassung muss jedoch die Produktion auf größere Maßstäbe skaliert sowie umfassende SOPs (standard

operating procedures) nach GMP/GCP (good manufacturing/clinical practice) angefertigt werden, was zurzeit noch in Arbeit ist.

Neben der Verfügbarkeit von UHV-CG Alginat zeigt sich der Verkapselungsprozess selbst optimierungsbedürftig. Das derzeitige System, das die Alginatlösung über Sprühtechnik in kleinste Tröpfchen zerlegt und in Polymerisationsbad fallen lässt, produziert Alginatkapseln mit



**Abbildung 2.12:** L929 Sphäroid (grün) in einer Alginatkapsel. Deutlich zu erkennen ist die stark dezentrale Lage des Sphäroiden. Der Sphäroid wurde mit FDA gefärbt (eine Fluoreszenzbelichtung sorgt für die Sichtbarkeit der grünen Farbe) die Kapsel mit Alcianblau.

eingeschlossenen Partikel nicht zentriert werden können (Abbildung 2.12). Eine inhomogen dicke Alginatschicht um die Zellen sorgt für unterschiedlich lange Diffusionsstrecken und in Extremfällen für Angriffsmöglichkeiten des Immunsystems, wenn die Alginatschicht an einer Stelle zu dünn ist. Neue Verkapselungstechniken, wie z.B. mikrofluidische Systeme, sollen an diesen Problemen ansetzen (Zimmermann et al. 2005).

einer statistischen Verteilung von eingeschlossenen Partikeln (z.B. Langerhanssche Inseln). Die Produktion von Leerkapseln lässt sich dabei kaum vermeiden, was bedeutet, dass nach dieser Verkapselung aufwändig entfernt werden müssen, da sich sonst das Transplantatvolumen stark vergrößert. Es sind etwa  $1 \times 10^6$  Inseln notwendig, um bei einem Erwachsenen Normoglykämie herzustellen was einem Transplantationsvolumen von ca. 520ml entspricht (angenommen wird eine Kapselgröße von 500µm Durchmesser und eine Insel pro Kapsel). Es versteht sich, dass ein größerer Anteil von Leerkapseln nicht toleriert werden kann. Eine zusätzliche Problematik besteht in der Verkapselungstechnik darin, dass die einge-

---

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Techniken zur Zellkultur

#### 3.1.1 Zellen und Zellkultur

L929 Zellen wurden von der DSZM (Deutsche Sammlung von Zellen und Mikroorganismen) bezogen und in ein Kulturmedium bestehend aus 450ml DMEM, 50ml FBS und 1ml Gentamycin (1g/ml) (Zellkulturmedien und Zusätze wurden wenn nicht anders genannt von PAN Biotech, Aidenbach bezogen) kultiviert. Wahlweise wurden Kulturflaschen (Corning, Niederlande) mit 25cm<sup>2</sup> (T25) oder 75cm<sup>2</sup> (T75) Kulturfläche verwendet. Die Zellen wurden etwa 2x pro Woche passagiert, indem das Kulturmedium entfernt und 1ml (T25) oder 3ml (T75) Trypsin/EDTA – Lösung (0,02%/0,025%) dazugegeben wurde. Sobald die Zellen sich abgerundet, aber noch nicht abgelöst haben, (mikroskopische Kontrolle) wurde die Trypsinlösung entfernt und die Zellen mit 5ml (T25) bzw. 10ml (T75) Kulturmedium abgespült. 2ml der Zellsuspension wurden mit 11ml Kulturmedium in eine neue T75-Kulturflasche gegeben, 0,7ml mit 5ml Kulturmedium in eine T25. L929 wurden bis zu einer Passagennummer von etwa 150 verwendet. Kultiviert wurden die Zellen, sofern nicht anders angegeben, in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub>-Begasung, 37°C und annähernd 100% Luftfeuchtigkeit.

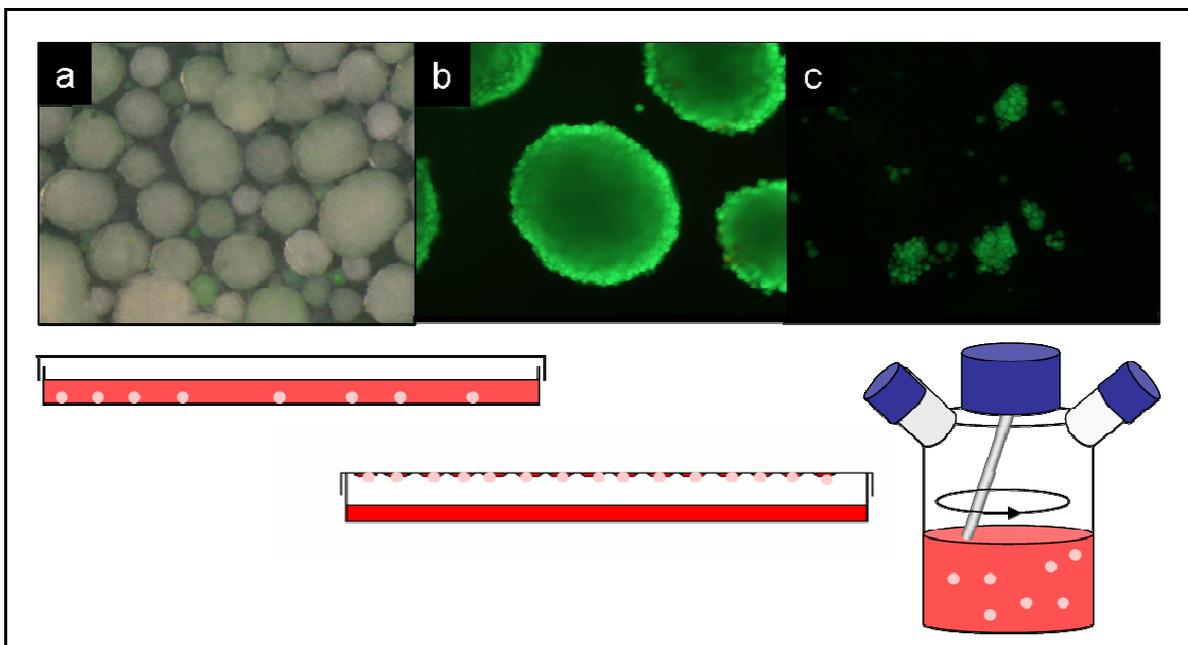
PC-3 Zellen wurden ebenfalls von der DSZM bezogen. Das Kulturmedium bestand zu gleichen Teilen aus Ham's F12 und RPMI 1640 Basismedium. Zu 450ml dieses Basismediums wurden 50ml FBS und 1ml Gentamycin zugegeben. Die Zellen wurden ebenfalls in T25 oder T75 Kulturflaschen kultiviert und auf die gleiche Art wie L929 Zellen passagiert. PC-3 Zellen wurden bis zu einer Passagennummer von etwa 50 verwendet.

N2a Zellen wurden von der ATCC bezogen. Das Kulturmedium setzt sich zusammen aus RPMI 1640 (4,5g/l Glucose, Na-Pyruvat und L-Glutamin) (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) mit 10%FBS (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe). Die Zellen wurden in T25 bzw. T75 Kulturflaschen kultiviert (CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C) und ein bis zwei Mal pro Woche passagiert, indem zuerst das Medium abgenommen wird, 3ml (T75) Trypsin ( 0,5g/l Trypsin, 0,2g/l EDTA, mit Phenolrot, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) dazugegeben wird und die Zellen bis zum vollständigen Ablösen im CO<sub>2</sub>-Inkubator gelassen werden. Die Trypsinierung wird mit der Zugabe von 7ml Kulturmedium gestoppt und 1ml der Suspension in eine neue T75 Kulturflasche mit 10ml Kulturmedium überführt. Differenzierung wird durch Zugabe von Retinsäure (Sigma, Schelldorf) ausgelöst. Dazu wurden 50mg Retinsäure in 16,7ml Me<sub>2</sub>SO gelöst, sterilfiltriert und bis zur Verwendung vor Licht geschützt bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.1.2 Sphäroidherstellung

Sphäroide wurden auf drei verschiedene Weisen hergestellt: „freie“ Sphäroide (FS), „hanging drop“ Sphäroide (HD) (Kelm et al. 2003, Del Duca et al. 2004) und Spinnerflaschen – Sphäroide (SF) (Abbildung 3.1). Für FS wurde eine Zellsuspension der Dichte  $2 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  hergestellt. Die Zellsuspension wurde in eine Petrischale (nicht zellkulturbehandelter Boden) gegeben und im CO<sub>2</sub> Inkubator, sofern nicht anders angegeben, 4 Tage kultiviert. Zur Herstellung der HD Sphäroide wurde zunächst in den Boden einer Petrischale 15ml isotone sterile Lösung

(wahlweise PBS, Zellkulturmedium, Basismedium) pipettiert. Diese dient zur Erhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit, was bei HD besonders wichtig ist. Eine Zellsuspension der Dichte  $2 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  wurde in ca. 30  $20\mu\text{l}$  Tropfen in den Deckel der Petrischale pipettiert. Der Deckel wurde vorsichtig umgedreht und auf den Boden der Petrischale gesetzt. Nach 4 Tagen Kultivierung im  $\text{CO}_2$  Inkubator wurden die Sphäroide geerntet, indem die Tropfen vorsichtig mit Kulturmedium abgespült wurden. Zur Herstellung von SF-Sphäroiden wurde in eine Spinnerflasche (25ml Arbeitsvolumen) 20ml einer Zellsuspension der Dichte  $2 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$  gegeben. Unter Rühren (50rpm) wurden die Zellen so lange kultiviert, bis stabile Sphäroide entstehen. PC-3 Zellen bedürfen dazu ca. 2 Wochen unter 2 x wöchentlichem Mediumwechsel. Dieser wurde folgendermaßen durchgeführt. Zunächst wurde die Flasche vom Magnetrührer genommen und es wurde kurz (ca. 1min) gewartet, bis die Sphäroide abgesunken sind. Danach wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und ebensoviel Frisches dazugegeben.

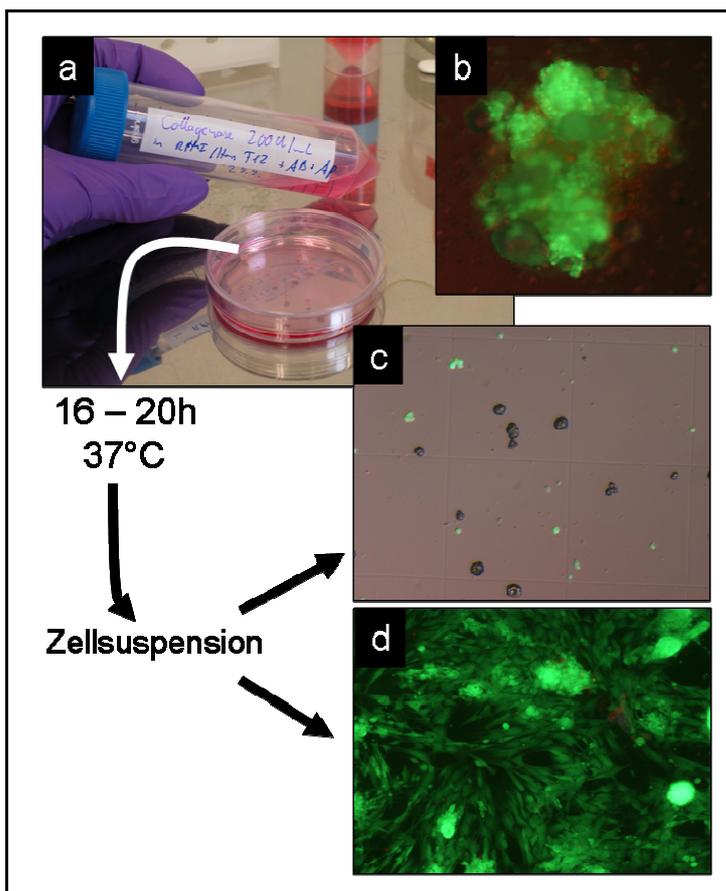


**Abbildung 3.1:** Techniken zur Sphäroidherstellung; die obere Reihe zeigt mikroskopische bzw. fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Sphäroiden, darunter ist jeweils schematisch die Herstellungstechnik dargestellt: a: „freie“ Sphäroide; die Zellen werden in einer nicht-adhäsiven Kulturschale kultiviert und aggregieren selbstständig zu Sphäroiden unterschiedlicher Größe; b: „hanging droplet“ Technik; Zellsuspension wird in den Deckel einer Kulturschale getropft und im hängenden Zustand kultiviert, was Sphäroide von sehr homogener Größe gibt; c: Spinnerflasche; Zellsuspension wird unter konstantem Rühren kultiviert.

Zur Bestimmung der Zahl der Sphäroide in einer FS oder SF-Kultur wurden 4 Proben à  $100\mu\text{l}$  gezogen und in eine 4er Wellplatte gegeben. Unter einem Mikroskop wurden sämtliche Zellaggregate mit mehr als 10 Zellen gezählt. Zur Größenbestimmung wurden die Sphäroide der Probe, entweder im Durchlicht oder Fluoreszenzmodus (z.B. in Kombination mit Lebend-Tot-Färbung), fotografiert. Die Bilder wurden mit ImageJ Software (Freeware) geöffnet und der Umriss des Sphäroids mit der „Freehand selection“ markiert. Nach dem Befehl „Measure“ wird vom Programm unter anderem die Fläche in Pixel angegeben. Diese kann in  $\text{mm}^2$  umgerechnet werden.

### 3.1.3 Isolation primärer Zellen

Humane Tumore (Ovarial- oder Mammakarzinome) wurden nach chirurgischer Entnahme (Universitäts-Frauenklinik Essen) in der Transportlösung Liforlab (Oncoscience AG, Wedel) transportiert. Nach Ankunft im Labor wurde der Tumor inklusive Transportlösung in eine Petrischale überführt. Um ihn in möglichst kleine Stücke zu zerteilen, wurden im ersten Ansatz 2 Skalpelle und eine Pinzette, im zweiten Ansatz ein Gewebe-Chopper (McIlwain Tissue Chopper, The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., UK) verwendet. Die Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das Transportmedium, nach dem Absetzen der Stücke, durch 5ml Kulturmedium (ohne Protein) ersetzt. Nachdem sich die Tumorstücke abermals abgesetzt hatten, wurde das Kulturmedium durch eine Collagenase-Lösung ersetzt, die aus Kulturmedium (ohne Protein) mit 200U/ml (Units) Collagenase Typ III, Gentamycin (0,1mg/ml) und Amphotericin B (0,5µg/ml) bestand. Die Tumorsuspension wurde 16 – 20h unter gelegentlichem Schütteln, bei 37°C in einer Petrischale inkubiert. Nach ca. 16h wurde die Suspension mit einer 1ml Pipette resuspendiert. Wenn sich dabei die noch vorhandenen Tumorstücke nicht vollständig auflösten, wurde die Suspension weiter inkubiert. Je nach Tumorbeschaffenheit kann die Dissoziation zwischen 16 und 28h dauern (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2:** Dissoziation humaner solider Tumore mittels Collagenase. Frische oder aufgetaute Tumorstücke (Lebend-tot-Färbung b) werden 16 – 20h in Collagenase-Lösung inkubiert (a). Nach Entfernen der überschüssigen Enzymlösung wird eine Probe genommen um die Zellzahl zu bestimmen (c) und zur Kultivierung in eine Kulturflasche gegeben (d, Vitalitätsfärbung von Tumorzellen nach über Nacht Kultur).

Aufgetaute Tumorstücke wurden durch zweimaliges Waschen mit Kulturmedium vom Kryome-dium befreit und über Nacht in Kulturmedium bei 37°C inkubiert. Die Dissoziation mit Colla-genase erfolgte danach wie oben beschrieben. Waren alle Gewebestücke aufgelöst, wurde die

Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Nach 1x Waschen in Kulturmedium wurde das Pellet in 1ml Kulturmedium aufgenommen. 4 x 10 $\mu$ l der Probe wurden je 1:1 mit Vitalitätstestlösung gemischt und mittels Neubauerkammer ausgezählt, um die Zellzahl und Vitalität der Zellsuspension zu erhalten. 100 $\mu$ l der Probe wurden zusammen mit 400 $\mu$ l Kulturmedium in eine 4 x 1ml Wellplatte ausgesät und über Nacht kultiviert. Der Rest der Zellsuspension wurde mit 4ml Kulturmedium in eine Kulturflasche (25cm<sup>2</sup> Kulturfläche) gegeben und im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert.

Erythrozyten (RBCs) und Blutplasma wurden aus „Buffy Coats“ gewonnen, die am Krankenhaus Winterberg in Saarbrücken zur Verfügung gestellt wurden. Buffy Coat ist die leukozytenreiche, mittlere Schicht, die nach dem Zentrifugieren von Vollblut zu sehen ist. Nach der Abtrennung von Erythrozyten und Blutplasma bleibt der Buffy Coat als „Abfall“ zurück, wobei daraus für Experimente noch genügend Erythrozyten bzw. Plasma gewonnen werden können. Unter der Sterilbank wurden die beiden Schläuche am Blutbeutel geöffnet und das Blut in ein oder mehrere 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Blut wurde bei 4°C und 4000rpm, 10min lang zentrifugiert. Je nach Bedarf wurde entweder Blutplasma abgenommen und verwendet oder gezielt das Erythrozytenpellet entnommen, zweimal mit isotoner 0,9%iger NaCl – Lösung (Merck, Darmstadt) gewaschen und verwendet.

Primäre embryonale neuronale Vorläuferzellen wurden aus 15 Tage alten Wistar Rattenembryonen gewonnen. Die Muttertiere wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und durch Genickbruch getötet. Nach Öffnen der Bauchhöhle wurden die Embryonen entnommen und in Petrischalen überführt. Umgebende Häute und Plazenta wurden mit Pinzetten entfernt, ebenso die Kopfhaut und Schädeldecke. Die Gehirne wurden entnommen und in steriles, kaltes PBS (mit 1% Penicillin/Streptomycin) überführt. Danach wurden die Gehirne durch ein feinmaschiges Nylonsieb (Porengröße 180 $\mu$ m) passiert und die entstehende Suspension durch Pipettieren durch immer feinere Pasteurpipetten in Zellen vereinzelt. Nach mehrfachem Waschen mit PBS (1-3x, bis der Überstand farblos und klar ist) (300g, 15min, 4°C) wurde eine Zellsuspension in einer Konzentration von 2 x 10<sup>8</sup> Zellen/50ml BME mit 15% FBS hergestellt und in eine Spinnerflasche (125ml Volumen) gegeben. Neben FBS wird BME 2mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 1g/l Glukose zugesetzt. Nach ca. 2h bei 60rpm sollten sich erste Aggregate gebildet haben, so dass die FBS Konzentration durch Zugabe von 50ml BME mit 5% FBS auf 10% gesenkt werden kann. Nach weiteren ca. 24h in Kultur wurde das Volumen durch Zugabe von BME mit 10% FBS auf 125ml erhöht. Täglich wurde die Größe der Sphäroide mittels Objektivmikrometer, Glukose-, Laktat-, Ammonium-, Glutamat- und Glutaminkonzentration, Osmolarität und LDH-Aktivität bestimmt (Details zur Isolation von neuronalen Vorläuferzellen s.h. Sá Santos et al. 2006).

### 3.1.4 Vitalitätstests und Nachweis spezieller Stoffwechsellleistungen

Die FDA/EB Vitalitätstest – Lösung (oder Lebend-Tot-Färbung) bestand aus 5ml proteinfreiem Basismedium (oder auch PBS, HEPES oder 0,9% NaCl-Lösung), der 8 $\mu$ l FDA (Fluoresceindi-acetat, 5mg/ml in Ethanol Stocklösung, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) und 50 $\mu$ l EB (Ethidiumbromid, 1mg/ml in Wasser Stocklösung, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) zugesetzt wurden. Zu testende Zellsuspensionen wurden 1:1 mit der Vitalitätstest – Lösung gemischt und 10 $\mu$ l der Mischung in eine Zählkammer, ein Hämozytometer (Neubauerkammer), pipettiert. Das Auszählen der Zählkammer erfolgte am Mikroskop unter Fluoreszenz- (Tripelbandfilter und ggf. Texas Red – Filter) (TE300 oder SMZ1500, Nikon, Düsseldorf), um die lebenden, grün fluoreszierenden Zellen von den toten, rot fluoreszierenden zu unterscheiden und

---

schwachem Durchlicht, um die Umrisse der Zählkammer zu erkennen. Die Zellzahl/ml errechnet sich wie folgt:

Zellzahl/ml = (Zahl der Zellen aus 4 Feldern)/4 \* 10000 (Kammerfaktor) \* 2 (Verdünnung mit Vitalitätstestlösung)

Vitalität [%] = Zahl der lebenden Zellen/(Zahl der lebenden + der toten Zellen) \*100

Verkapselte Zellsuspensionen wurden in eine 4er Wellplatte pipettiert. Nach Absinken der Kapseln wurde das überstehende Medium durch Vitalitätstestlösung ersetzt. Bei zu starker Hintergrundfluoreszenz wurde die Vitalitätstest – Lösung durch einmaliges Waschen mit PBS oder HEPES entfernt. Die Zahl der lebenden und der toten Zellen pro Kapsel wurde am Mikroskop mit Fluoreszenz- und Durchlicht durch Zählen bestimmt und daraus die Vitalität errechnet (s.o.).

Sollte die Vitalität von Sphäroiden oder Langerhansschen Inseln bestimmt werden, wurde die Sphäroidsuspension in eine 4er Wellplatte gegeben. Sobald sich die Sphäroide abgesetzt haben, wurde das überstehende Medium entfernt und durch Vitalitätstest - Lösung ersetzt. Bei zu starker Hintergrundfluoreszenz wurde die Vitalitätstest – Lösung durch 1 x waschen mit PBS oder HEPES entfernt. Zur Auswertung wurden Fotos von mindestens 8 Sphäroiden einer Probe gemacht. Sofern nicht anders angegeben, wurde dazu ein Tripelbandfilter verwendet. Die Auswertung erfolgte über Bildbearbeitung mit ImageJ (frei im Internet erhältlich) (Details s.h. Ehrhart et al. 2008). Adhärente Zellen wurden vom Kulturmedium befreit und mit 500µl Vitalitätstestlösung versetzt. Nach einer kurzen Inkubationszeit wurde die Lösung abgenommen und durch PBS oder HEPES ersetzt. Die Probe wurde am Fluoreszenzmikroskop fotografiert, wobei von 3 Stellen der Probe je eine Aufnahme mit FITC- und Texas Red-Filter gemacht und mittels Bildbearbeitung mit ImageJ ausgewertet wurde. Dazu wurde das FITC- bzw. das Texas-Red-Bild in schwarz-weiß konvertiert und mit der Funktion „Analyze Particles“ die „Partikel“ bzw. die grün oder rot leuchtenden Zellen gezählt. Die Vitalität ergibt sich wieder wie oben genannt.

Zur Vitalitätsbestimmung mit Trypanblaulösung wurden 20µl der zu bestimmenden Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß gegeben und 2µl 4%ige Trypanblaulösung dazugegeben. 10µl der Zellsuspension wurden in ein Hämozytometer pipettiert und, wie oben erwähnt, ausgezählt. Trypanblau ist, wie Ethidiumbromid, nicht membrangängig und dringt folglich nur in tote/membrangeschädigte Zellen ein und färbt diese blau. Die Zellzahl/ml errechnet sich wie folgt:

Zellzahl/ml = Zahl der Zellen aus 4 Feldern)/4 \* 10000 (Kammerfaktor) \* 1,1 (Verdünnung mit Trypanblaulösung)

die Vitalität:

Vitalität [%] = Zahl der lebenden/(Zahl der lebenden + der toten Zellen) \*100

Zur spezifischen Färbung des Zytoskeletts mit BODIPY® (Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt) wurden adhäre Zellen 2 x mit PBS gewaschen und danach 10min mit 3,7%iger Formaldehydlösung (Applichem, Darmstadt) in PBS fixiert. Die Formaldehydlösung wurde abgenommen, 2-3x mit PBS gewaschen und durch eine 0,1%ige Triton-X-100 (Sigma, Schelldorf) Lösung in PBS ersetzt. Nach 3-5min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen gewaschen. 5µl einer fertigen Fluo-Phallotoxin-Lösung (BODIPY®) wurden mit 200µl PBS verdünnt und auf der Probe 20min inkubiert. Gegebenenfalls wurde vor dem letzten Waschschriff 2µl Ethidiumbromidlösung oder 10µl Hoechstlösung (Molecular Probes/Invitrogen, Darmstadt) zur Kern-

färbung dazugegeben und kurz inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Probe im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Bei Erythrozyten wird der Erfolg der Kryokonservierung über das Ausmaß der Hämolyse bestimmt. Wenn die Zellen zerstört oder beschädigt werden, wird Hämoglobin freigesetzt, das im Überstand spektrophotometrisch nachgewiesen werden kann. Frische oder aufgetaute Erythrozyten wurden in einem Reaktionsgefäß gesammelt und 5min abzentrifugiert. Bei verkapselten Erythrozyten reichten ca. 30s Ruhezeit, damit sich die Kapseln absetzen konnten. Der Überstand wurde abgenommen und gegebenenfalls verdünnt, wenn entweder zu wenig Überstand vorhanden oder die Farbe zu intensiv war (d.h. optische Dichte größer als 2) und je 200µl in 4 Wells einer 96er Wellplatte gegeben. Die 100% Hämolyse Kontrolle wurde hergestellt, indem 3µl Erythrozytenkonzentrat mit 1ml 1%iger Triton X 100 Lösung vermischt und 5min bei 3000rpm zentrifugiert wurden. Je 200µl des Überstandes wurde in 4 Wells gegeben. Die Absorption durch Hämoglobin wurde am Spectra Rainbow Photometer (SLT Labinstruments, Crailsheim) gemessen, bei Messwellenlänge 543nm, Referenz 650nm. Die Hämolyse (H) in % wurde folgendermaßen berechnet:

$$H [\%] = \frac{(E_1 * K_1)}{(E_{100\%} * K_{100\%})} * 100$$

H = Hämolyse

$E_1$  = optische Dichte der Probe

$K_1$  = Verdünnungskoeffizient der Probe

$E_{100\%}$  = optische Dichte bei 100% Hämolyse

$K_{100\%}$  = Verdünnungskoeffizient bei 100% Hämolyse

Bei der Berechnung der Verdünnungskoeffizienten wurde berücksichtigt: Die Verdünnung der (konzentrierten) Erythrozyten in Gefriermedium bzw. bei verkapselten Erythrozyten die Verdünnung der (konzentrierten) Erythrozyten in Alginate und die Verdünnung der Kapseln in Gefriermedium, sowie die eventuelle Verdünnung des Gefriermediums nach dem Auftauen (sofern die optische Dichte des unverdünnten Mediums über 2 war). Es ergaben sich Werte für  $K_1$  zwischen 50 und 5000.

Die Laktatdehydrogenase ist ein Enzym, das im Zytosol der Zelle vorkommt. Bei Beschädigung oder Lysis kommt es zur Freisetzung, so dass Aktivität im Überstand nachgewiesen werden kann. Durch Zugabe von Pyruvat und NADH kommt es bei Anwesenheit der LDH zur Reaktion zu Laktat und NAD<sup>+</sup>, wobei das letztere photometrisch nachgewiesen werden kann. Proben des Überstandes von Neuroaggregaten wurden bei 4°C nicht länger als sieben Tage gelagert. Der Reaktionspuffer setzte sich zusammen aus 81,3mM Tris und 203,3mM NaCl (pH = 7,2). NADH (0,17mg/ml) wurde in Reaktionspuffer frisch zubereitet, ebenso wie eine Lösung aus 9,76mM Pyruvat in Reaktionspuffer. Die Proben wurden an einem Beckman DU-530 Spektrophotometer mit Peltierelement (37°C) in einer Quarzküvette gemessen. Zur Messung wurde zuerst eine Mischung aus 833µl der NADH – Lösung mit 70µl der Probe (Überstand) gemischt und der Absorptionsabfall über 2min bei 340nm bestimmt. Danach wurde 167µl der Pyruvatlösung zugegeben und der Absorptionsabfall über 2min erneut bestimmt (Details s.h. Sá Santos et al. 2005).

Die LDH Aktivität berechnet sich wie folgt:

$$\text{LHD Aktivität [U/ml]} = \left( \frac{\Delta Abs_2}{\Delta t_2} - \frac{\Delta Abs_1}{\Delta t_1} \right) * \frac{V_t}{6,22 * d * V_s}$$

$\Delta Abs_1$  = Absorptionsänderung der ersten Messung

$\Delta Abs_2$  = Absorptionsänderung der zweiten Messung

$\Delta t_1$  bzw.  $\Delta t_2$  = Zeitintervall der ersten, bzw. zweiten Messung

$V_t$  = Gesamtvolumen der Küvette [ml]

$V_s$  = Probenvolumen [ml]

$d$  = optische Distanz [cm]

$U$  =  $\mu\text{mol NADH pro Minute}$

Der Nachweis der Differenzierung der Neuroaggregate wurde über Immunfluoreszenz bestimmt. Dazu wurden die Neuroaggregate, verkapselt oder unverkapselt, entnommen und zweimal mit PBS gewaschen. Fixiert wurden die Proben 1h bei Raumtemperatur mit 4% Paraformaldehyd in PBS. Nach dreimal waschen in PBS wurde die Permeabilisierung 10min lang mit 0,3% Triton X 100 in PBS durchgeführt. Danach wurde wiederum drei Mal mit PBS gewaschen. Zum Abdecken unspezifischer Proteinbindungsstellen wurden die Proben 1h lang in Blockierungslösung, die aus 1% BSA (Bovines Serumalbumin), 0,1% Triton X 100 in PBS bestand, inkubiert. Die primären Antikörper gegen GFAP (Maus, MsXGFAP, Chemicon International), Neurofilament (Kaninchen Anti-Neurofilament Light, NF-L, Chemicon International), Nestin und Synaptophysin wurden 1:200 verdünnt in PBS mit 0,1% Triton X 100 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde stets der Antikörper gegen Neurofilament in Kombination mit entweder Nestin, GFAP oder Synaptophysin verwendet. Nach 3 x waschen wurden die sekundären Antikörper (Alexa Fluor 488, Ziege anti-Maus, 1:200 und Alexa Fluor 594, Ziege anti-Kaninchen, 1:500, Molecular Probes) zugegeben und 1h lang bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die verkapselten oder unverkapselten Aggregate wurden gepickt und auf einem Objektträger platziert. Zwei Deckgläser wurden links und rechts der Probe platziert und dort mit Nagellack fixiert, um als Spacer zu dienen, damit die Probe nicht gequetscht wird. Als Eindeckmittel wurden ein bis zwei Tropfen Prolong Gold antifade (mit DAPI) von Molecular Probes verwendet. Die Proben wurden mit einem weiteren Deckglas abgedeckt. Betrachtet wurden die Proben am Fluoreszenzmikroskop.

### 3.1.5 Elektronenmikroskopie: REM und block-face REM

Für REM-Aufnahmen wurden entweder adhärenente Zellen auf Cellocate bzw. Thermanox (Glas oder Plastikdeckgläser, deren Oberfläche zur Zellkultur geeignet ist) kultiviert oder Sphäroide, die für die Präparation in Zellkultureinsätzen (Micell, 12 $\mu\text{m}$  Porengröße, Millipore, Schwalbach) behandelt wurden. Um die Strukturen der Zellen und Sphäroide zu erhalten und im REM sichtbar zu machen, wurde zunächst eine Fixierung mit Glutaraldehyd und Schwermetallkontrastierung durchgeführt (Katsen et al. 1992, modifiziert 1998). Die Proben wurden dazu 3x mit ca. 500 $\mu\text{l}$  PBS oder HEPES gewaschen und bis zur Präparation (mindestes 2h) in sterilfiltrierter 1,8%iger Glutaraldehydlösung (Plano, Wetzlar) in 0,1M Cacodylatpuffer (Plano, Wetzlar) belassen. Alle Lösungen, die mit der Probe von nun an in Kontakt kamen, wurden zum Partikelabschluss sterilfiltriert. Die Proben wurden 3 x mit 0,15M Cacodylatpuffer gewaschen und 1h in 2% Osmiumtetroxid (Plano, Wetzlar) in 0,15M Cacodylatpuffer unter Lichtausschluss inkubiert. Nach ca. 6x

waschen (bis die Lösung klar ist) mit doppelt destilliertem Wasser (A. bidest.) wurden die Proben 1h in 1%iger Tanninsäure (Plano, Wetzlar) in Aqua bidest. im Dunkeln inkubiert und nochmals ca. 6x mit A. bidest. gewaschen.

Daraufhin wurden die Proben mit 1%iger Uranylacetatlösung (Plano, Wetzlar) 20min im Dunkeln behandelt und abschließend ca. 6x mit A. bidest. gewaschen. Proben, die Alginat enthielten, wurden ebenso behandelt, mit der Ausnahme, dass die Uranylacetat-Kontrastierung entfällt, sämtliche Waschschriffe mit 0,15M Cacodylatpuffer durchgeführt und auch Osmiumtetroxid und Tanninsäure in 0,15M Cacodylatpuffer gelöst wurden. Dies ist notwendig, da Alginatgele osmotisch aktiv sind und in destilliertem Wasser massiv an Volumen zunehmen würden. Zur Entwässerung wurde zunächst eine Ethanolreihe durchgeführt, wobei die Ethanolkonzentration schrittweise von 50% auf 100% erhöht und danach der Ethanol durch 100% Aceton ersetzt wird. Anschließend wurden die Proben mittels kritische-Punkt-Trocknung (CPD) getrocknet, d.h. mit Hilfe von flüssigem CO<sub>2</sub> vom Aceton befreit. Die getrockneten Proben wurden auf REM-Träger aufgeklebt, eventuelle Lücken zwischen Probe und Träger wurden mit Leitsilber überbrückt. Abschließend wurden die Proben mit Kohle und/oder verschiedenen Metallen (Gold, Platin) bedampft (SCD-030, Balzers, Lichtenstein) und konnten so im REM (LEO 435 VP, Carl Zeiss NTS GmbH, Oberkochen) betrachtet werden.

Proben, die für „block-face“-REM präpariert wurden, wurden wie für REM mit Osmiumtetroxid, Tanninsäure und Uranylacetat (bzw. Alginat nur in Osmiumtetroxid und Tanninsäure) kontrastiert. Nach dem letzten Waschschriff wurden die Proben 3x 5min mit 70%igem Aceton gewaschen und es folgt eine Reihe von je 15min 80%igem, 90%igem 95%igem und 4x 100%igem wasserfreiem Aceton. Danach wurden die Proben je 1-1,5h in einer Mischung aus Aceton:Epon 3:1; 1:1 und in 1:3 inkubiert. Epon wurde angesetzt aus 51ml Mischung A (20ml Embed 812 und 31ml DDSA), 37ml Mischung B (20ml Embed 812 und 17ml NMA) und 2,2ml BDMA (alles von Plano, Wetzlar). In reinem Epon werden die Proben zunächst über Nacht bei Raumtemperatur belassen, dann 1h bei 40°C, 1h bei Raumtemperatur und abschließend, nach dem Umfüllen in spezielle Einbettförmchen, 2 Tage bei 60°C im Trockenschrank auspolymerisiert. Nach dem Auskühlen konnten die Blöckchen geschnitten werden und nach Oberflächenpolitur im REM mit „block-face“ Einrichtung betrachtet werden (Katsen-Globa et al. 2004 und 2005).

## 3.2 Kryokonservierung

### 3.2.1 Zubereitung der Kryomedien und deren Zugabe

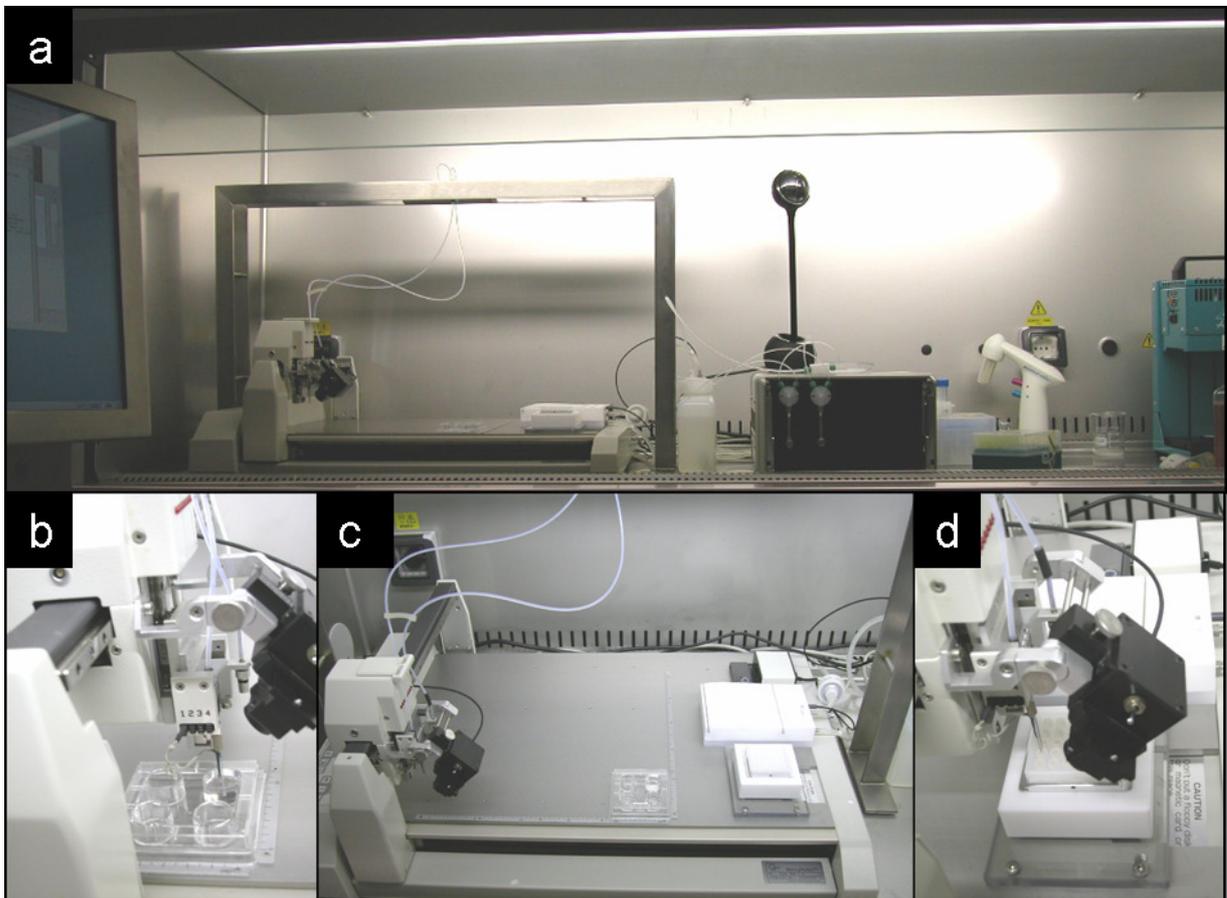
Liforlab (L) ist ein kommerziell erhältliches Medium (Oncoscience, Wedel), das speziell zum Transport von humanen Tumoren bei Raumtemperatur entwickelt wurde. Isotone Trehaloselösung (T) wird aus 5mM Histidin, 5mM KCl und 285mM Trehalose angesetzt und entweder pur verwendet oder für die Kryomedien KT bzw. LT 1:1 mit dem jeweiligen Kulturmedium (K) bzw. Liforlab verdünnt. Das Stärkehydrolysat N-Oil (National Starch, Hamburg) wird entweder in Kulturmedium (KS) oder Liforlab (LS) 5%ig (W/V) eingewogen und zur Sterilisation kurz bis zum Siedepunkt erhitzt. Stärkehydrolysatenthaltige Kryomedien wurden stets frisch angesetzt, da sie im Laufe der Zeit eintrüben, wahrscheinlich aufgrund von Stärkepräzipitation.

Für Kryomedien, die Me<sub>2</sub>SO enthalten, wurde das Kulturmedium in der entsprechenden Menge vorgelegt und mit Me<sub>2</sub>SO versetzt, bevor es zu den Zellen gegeben wurde. Me<sub>2</sub>SO haltige Kryomedien wurden überwiegend mit 5% oder 10% Me<sub>2</sub>SO verwendet. Eine Ausnahme bilden hierbei Zellen, die in Mikro-Kryosubstraten eingefroren wurden. Hier wurden, z.B. 27.5µl für 5%

$\text{Me}_2\text{SO}$  (oder  $22,5\mu\text{l}$  für 10%), Zellsuspension in die Wells pipettiert und  $\text{Me}_2\text{SO}$  am Nanoplotter (GeSim, Dresden) (Abbildung 3.3) zugegeben. Für glyzerinhaltige Kryomedien wurde die entsprechende Mengen Glycerin mit Kulturmedium gemischt und zum Zellpellet zugegeben. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich (Schelldorf) bezogen.

### 3.2.2 Kryokonservierungsprotokolle

Zur Kryokonservierung von Zellsuspensionen wurden die Zellen von der Oberfläche ihres Kulturgefäßes entsprechend dem jeweiligen Zellkulturprotokoll abgelöst und auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Nach dem Abzentrifugieren wurde das Pellet im jeweiligen Kryomedium resuspendiert und auf die Kryogefäße verteilt: 1ml Kryoröhrchen oder  $30 \times 25\mu\text{l}$  Mikro-Kryosubstrat. Sphäroide und Kapseln wurden von den Kulturgefäßen in Zentrifugenröhrchen überführt und 1 x mit Kulturmedium gewaschen bevor das Kryomedium zugegeben wurde.



**Abbildung 3.3:** Nanoplotter zur automatischen Zugabe kleinster  $\text{Me}_2\text{SO}$  Mengen. a: Gesamtübersicht der Anlage inklusive Pumpen; b: Entnahmestelle für  $\text{Me}_2\text{SO}$ ; c: Übersicht über den Präparationstisch inklusive Entnahmestelle, Probenhalter und piezoelektrischer Dosierkopf; d: Zugabe von  $\text{Me}_2\text{SO}$  in eine  $30 \times 25\mu\text{l}$  Mikro-Kryosubstrate.

$\text{Me}_2\text{SO}$  wurde im Mikro-Kryosubstrat, sofern nichts anderes erwähnt ist, stets mit dem Nanoplotter zugegeben. Nach der Zugabe des Kryomediums wurden die Proben min. 30min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert bevor sie mit einem programmierbaren Einfriergerät (Planer, UK) mit  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  auf  $-80^\circ\text{C}$

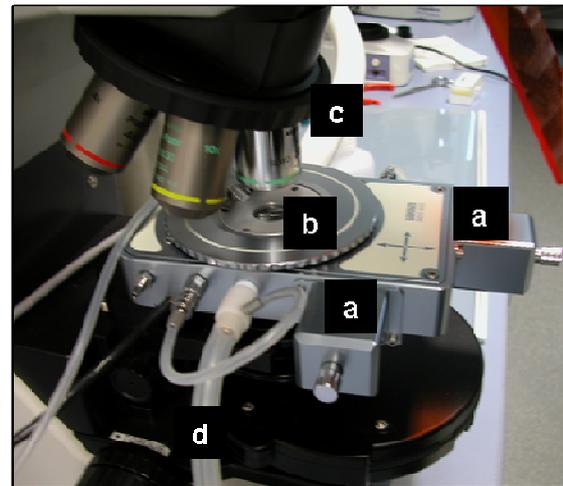
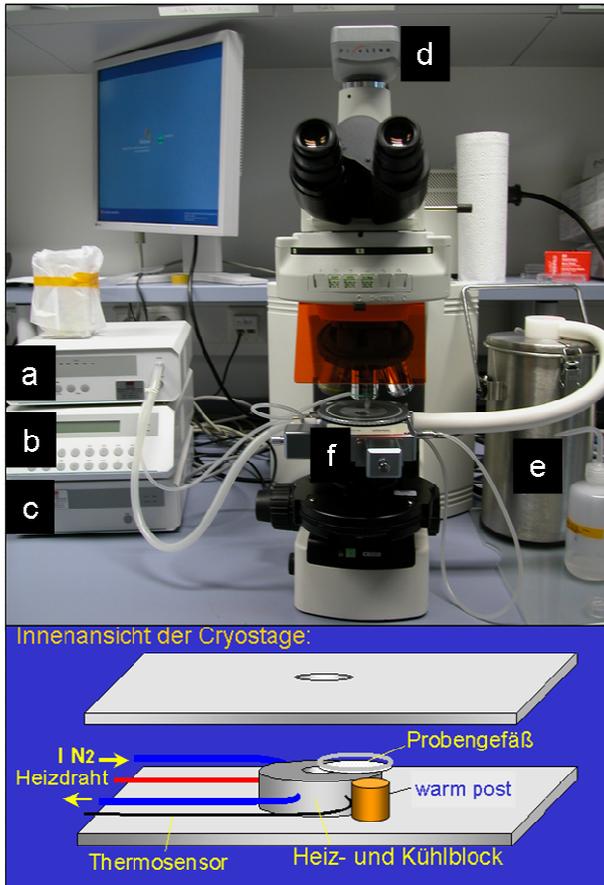
eingefroren und danach in die Gasphase eines Flüssigstickstofflagertanks überführt wurden. Mikro-Kryosubstrate wurden aufgetaut durch 5minütige Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C, 1ml Kryoröhrchen im 37°C Wasserbad. Bei Zellsuspensionen wurden 4 Proben von je 20µl entnommen, 1:1 mit Vitalitätstestlösung gefärbt und die Vitalität, wie oben beschrieben, bestimmt. Sphäroide und Kapseln wurden in einem Well einer 4er Wellplatte gesammelt, mit Vitalitätstestlösung gefärbt, ggf. mit PBS gewaschen, und die Vitalität, wie oben beschrieben, bestimmt.

Zur Kryokonservierung von adhärennten Zellen wurden die Zellen im Kultur-, bzw. Kryogefäß (4er oder 12er Wellplatte) vom Kulturmedium befreit und 1x mit Kulturmedium gewaschen bevor das Kryomedium zugegeben wurde. Die Menge des Kryomediums variiert von 1ml bis ca. 100µl je nach Versuch. Bei Me<sub>2</sub>SO-haltigen Kryomedien wurde die Probe vor dem Einfrieren im Planer 30min bei 4°C inkubiert. Kryokonservierte adhärennte Zellen wurden, je nach Versuchsansatz, entweder im CO<sub>2</sub>-Inkubator aufgetaut, was bei 1ml Kryomedium bis zu 10min dauern kann, oder durch schnelle Zugabe von 1ml 37°C warmen Kulturmedium bei Proben mit sehr wenig überstehendem Kryomedium. Nach dem Auftauen wurde das Kryo-, bzw. Kulturmedium abgenommen und durch Vitalitätstestlösung ersetzt und die Vitalität der Probe, wie oben beschrieben, bestimmt.

Humane Tumore wurden in 5 5ml Röhrchen mit je einem Teilstück Tumor und 5ml Liforlab von der Uniklinik Essen transportiert. Nach Erhalt (stets am Tag nach der Entnahme) wurden die Tumorstücke entweder mit 2 Skalpelln oder in einem anderen Versuchsansatz mit einem Gewebeschopper (125µm Schnitte) zerteilt. Die Stückchen von je einem Teilstück wurden für Frischkontrolle, Kryokonservierung mit 10% Me<sub>2</sub>SO, Liforlab, LT oder LS verwendet. Die Frischkontrolle wurde direkt einer Dissoziation unterzogen (s.h. Kapitel 3.13). Die anderen Proben wurden in Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert und nach 1 x waschen mit Liforlab, bzw. die Me<sub>2</sub>SO-Probe mit Kulturmedium, im Kryomedium aufgenommen. Mit Hilfe einer Pinzette wurden die Tumorstückchen in die Wells eines IBMT-Kryosubstrates verteilt und diese mit Kryomedium aufgefüllt. Me<sub>2</sub>SO wurde mittels Nanoplotter zugegeben und die Probe 30min bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden mittels Planer von 4°C auf -80°C mit 1°C/min eingefroren und in der Gasphase eines Stickstofflagertanks bis zum Auftauen gelagert. Die Tumorstücke wurden durch 5minütige Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. 1-2 Stücke wurden entnommen, mit Vitalitätstestlösung gefärbt und fotografiert. Die restlichen wurden einmal mit Kulturmedium gewaschen und mit 5ml Kulturmedium in eine Petrischale überführt. Nach über Nacht Inkubation im CO<sub>2</sub>-Inkubator wurden die Stücke einer Dissoziation durch Collagenase unterworfen (s.h. Kapitel 3.13). Es wurde die Lebendzellzahl bestimmt, sowie eine Kultivierung der Zellen begonnen.

### 3.2.3 Kryomikroskopie und Hochgeschwindigkeitskryomikroskopie

Zur Kryomikroskopie wird die Cryostage (Cryostage MDBC 600, Linkam Instruments, UK) anstelle des Objektisches im Mikroskop (Eclipse 80i, Nikon, Düsseldorf) eingebaut (Abbildung 3.4). Der Heizblock kann sowohl mit flüssigem Stickstoff gekühlt als auch mit einem elektrischen Heizdraht gewärmt werden. Die Temperatur wird über einen Thermosensor überwacht. Die Steuerung der Einfrier- und Auftauraten erfolgt über das Steuergerät TP94, das mit dem PC verbunden ist. Mit flüssigem Stickstoff versorgt wird die Cryostage aus einem externen Behälter mit Hilfe der Flüssigstickstoffpumpe LNP2. Zur mikroskopischen Beobachtung werden besondere Objektive mit großem Arbeitsabstand und Vergrößerungen von 4x, 10x, 20x und 50x verwendet (20x und 50x sind SLWD-Objektive).



**Abbildung 3.4:** Links oben: Komplettaufbau Kryomikroskop; Als Basis dient ein Mikroskop (Nikon Eclipse 80i) mit Kamera (d) und PC wobei anstelle des Objektives die Cryostage (MDBCS 196) (f) montiert ist. Gesteuert wird die Stage über den PC wobei Temperature Controller TP94 (b) und xy-Motor (c) verwendet werden. Die Flüssigstickstoffpumpe (a) zieht Stickstoff aus dem Vorratsbehälter (e) durch die Cryostage. Rechts oben: Die Cryostage mit Stickstoffzu- (c) und -ableitung (d), xy-Motor (a) und Deckel mit Sichtfenster (b). Links unten: Innenansicht der Cryostage.



**Abbildung 3.5:** Anlage zur Hochgeschwindigkeitskryomikroskopie. Auf das Kryomikroskop, wie in Abbildung 3.4 beschrieben wird eine Hochgeschwindigkeitsvideokamera aufgesetzt. Besonders zu beachten ist dabei die ausreichende Beleuchtung der Probe.

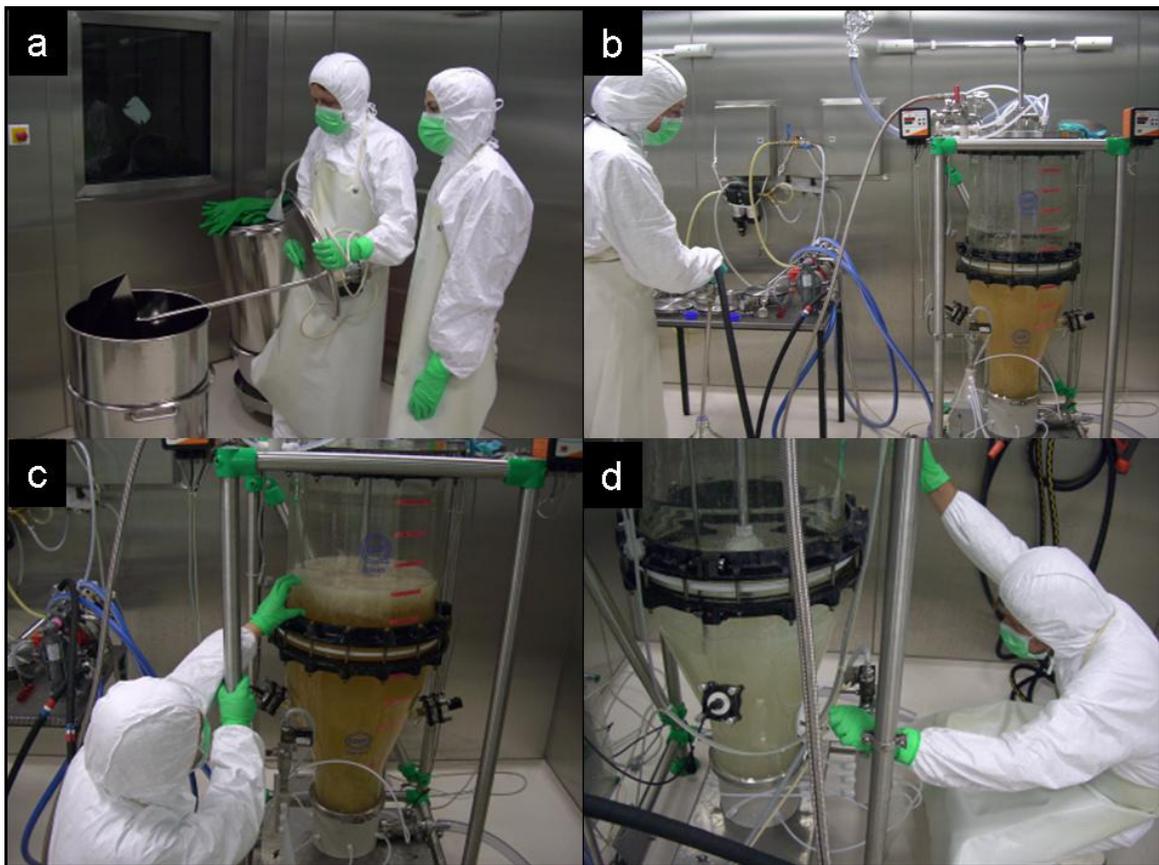
Der Probenträger besteht aus einem Deckglas von 22mm Durchmesser mit einem aufgeklebten Ring, der in den Probenhalter passt. Die Probe (2µl Zellsuspension (Zelldichte  $1 \times 10^6$ /ml oder höher), Zellsphäroide oder reine Lösungen) wird auf den Probenträger pipettiert und mit einem herkömmlichen runden Deckglas (Stärke ca. 150µm) mit einem Durchmesser von 7, 16 oder 22mm abgedeckt wird. Das Verhalten der Probe wird mit Hilfe einer Farbdigitalkamera (Pixel-Link) verfolgt und aufgezeichnet. Am PC können aus den Rohdaten über die Steuersoftware LinkSys32 sowohl Filme als auch Einzelbilder gespeichert werden. Für Hochgeschwindigkeitsvideoaufnahmen wurde anstelle der PixelLink-Kamera die Hochgeschwindigkeitskamera Visario LT400 von Weinberger Vision (Deutschland) eingesetzt (Abbildung 3.5). Aufgezeichnet wurde der Gefriervorgang mittels der zugehörigen Software Visart 2.1. Die Bilderrate konnte von 125 – 4000 Bildern pro Sekunde (fps) eingestellt werden. Üblicherweise wurde eine Geschwindigkeit von 500 oder 1000fps gewählt. Aus den Rohdaten wurden Einzelbilder oder Filme erstellt und zur Auswertung verwendet. Gegebenenfalls wurde Kontrast und Helligkeit der Bilder und Filme nachträglich verstärkt.

### 3.3 Methoden zur Immobilisierung von Zellen mit Alginat

#### 3.3.1 Prozessierung und Reinigung von Alginat

Ausgangsmaterial sind getrocknete, geschnittene und mit Antiseptika behandelte Algenstängel der Arten *Lessonia nigrescens* oder *L. trabeculata*, die an der Küste von Chile geerntet und getrocknet wurden. Zur Extraktion werden die Algenschnitzel zunächst über Nacht mit Ampuwa (Fresenius Kabi AG) gewässert. *L. trabeculata* Rohmaterial wird danach 1h bei 4°C mit 5%iger Salzsäure behandelt (Roth Chemikalien, Karlsruhe), um toxische Proteine zu entfernen oder zu zerstören. Nach dem neutral waschen mit Ampuwa wird eine 50mM EDTA (Roth Chemikalien, Karlsruhe) und 50mM Na-Glukonat (Merck, Darmstadt) enthaltende Extraktionslösung zugegeben und 3 Tage unter Rühren inkubiert. Danach wird noch mal EDTA und Na-Glukonat zugegeben, die Schnitzel in einem Mixer zerkleinert und noch ein drittes Mal EDTA und Na-Glukonat zugegeben. *L. nigrescens* Algenschnitzel werden nach dem Wässern 72h in 70%igem Ethanol (aus 99%igem, mit 1% MEK vergälltem Ethanol von Roth Chemikalien, Karlsruhe, und Ampuwa angesetzt) inkubiert (nach jeweils 24h Wechsel des Ethanols) um organische Pigmente herauszulösen.

Die Extraktion erfolgt bei *L. nigrescens* mit 50mM Diiminosuccinat (Markenname Baypur CX 100 MU von Lanxess, Leverkusen). Nach der Extraktion erfolgen Vor- und Sterilfiltration, bei der ungelöste Algenreste und Mikroorganismen entfernt werden. Danach wird das gelöste Alginat 3x mit Ethanol gefällt und in 0,13M, 0,5M und 0,13M KCl-Lösung (Merck, Darmstadt) wieder gelöst. Nach einem letzten Fällschritt wird Alginat zur Sterilisation in 70%igem Ethanol eingelegt, mit einer Schere in ca. 3-5mm große Stücke geschnitten und steril getrocknet. Vor der Verwendung wird der Protein- und Polyphenolgehalt bestimmt, das Material auf Sterilität und Mitogenität geprüft und die Viskosität mit einem Kugelrollviskosimeter bestimmt was das Labor des Lehrstuhls für Biotechnologie der Universität Würzburg durchgeführt. Die Extraktion wurde sowohl im Labormaßstab (Einwaage 10g Algenschnitzel, Ausbeute 2-4g Alginat) als auch in der auf industrielle Maßstäbe ausgelegten Pilotanlage zur GMP-gerechten Produktion von Alginat (180 – 360g Einwaage, 40 – 100g Ausbeute) (Abbildung 3.6).

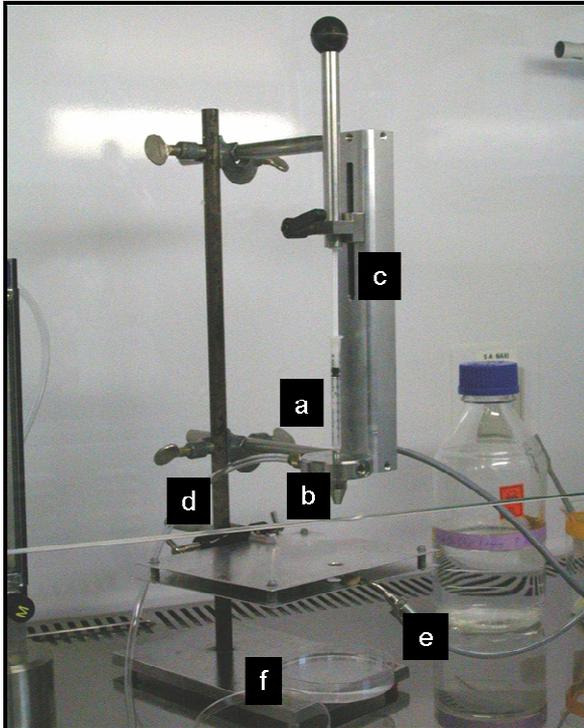


**Abbildung 3.6:** Prototypische Anlage zur GMP konformen Herstellung von Alginat. a: Extraktion mit  $\text{Ca}^{2+}$  bindendem EDTA oder Diiminosuccinat; b: Vorbereitung zur ersten Fällung nach der Sterilfiltration; c: Nach der Sterilfiltration wird das ausgefallene Alginat sichtbar; d: Auflösen des gefällten Alginats in KCl-Lösung. Deutlich zu erkennen ist die Farbveränderung von braun nach weiß.

### 3.3.2 Herstellung massiver Alginatkapseln

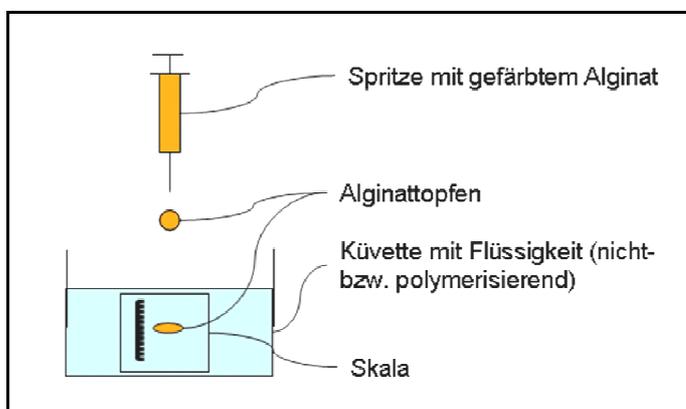
Zur Herstellung der Alginatlösung wurde getrocknetes Alginat von *L. nigrescens* und *L. trabeculata* getrennt in steriler 0,9%iger NaCl – Lösung gelöst. Je nach Ansatz wurde 0,65%, wenn die Crystal Gun verwendet werden soll, oder 0,7% (ohne Crystal Gun) (w/v) Alginat eingesetzt. Sobald das Alginat vollständig gelöst ist wird *L. nigrescens*-Alginat und *L. trabeculata*-Alginat 1:1 gemischt (NT-Alginat) und zur vollständigen Durchmischung ca. 1h in einen Rotationsmischer gestellt. Für die Crystal Gun wurde speziell vorbehandeltes  $\text{BaCl}_2$  Pulver verwendet:  $\text{BaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt) wurde bei  $140^\circ\text{C}$  4h lang getrocknet. Danach wurde es im Mörser zerstoßen und mit 2 Sieben auf die Korngröße zwischen  $80 - 300\mu\text{m}$  gebracht. Zellen aus der Zellkultur wurden abgelöst und zu einem Pellet von  $1 \times 10^6$  Zellen verarbeitet. Sollten Sphäroide verkapselt werden wurden  $\frac{1}{2}$  Petrischale freie Sphäroide oder 3-5 Schalen HD-Sphäroide geerntet und in einem Zentrifugenröhrchen als Pellet gesammelt. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1ml von dem gemischten NT-Alginat resuspendiert. Zur Verkapselung von Erythrozyten wurde  $10 - 50\mu\text{l}$  Erythrozytenpellet mit einer Pipette aufgenommen und unter das Alginat gemischt. Die Alginat-Zellsuspension wurde in eine 1ml Spritze aufgezogen und in die Verkapse-

lungsanlage (Zimmermann et al. 2001) eingespannt (Abbildung 3.7). Pro 1ml Alginat-Zellsuspension wurde 1 Petrischale mit 20ml Polymerisationsbad (20mM BaCl<sub>2</sub>, 5mM Histidin (Sigma, Schelldorf), 215mM NaCl, sterilfiltriert) bereitgestellt.



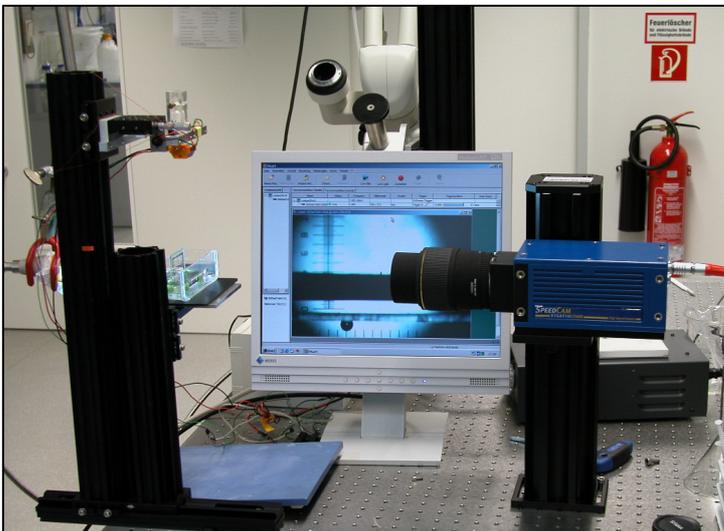
**Abbildung 3.7:** Verkapselungsanlage für Alginat. Die Alginat-Zellsuspension wird in einer 1ml Spritze (a) auf den, mit einer Düse versehenen Block (b) gesetzt. Der Vorschub (c) drückt das Alginat langsam durch die Düse während ein coaxialer Luftstrom (d) für den Tropfenabriss sorgt. Gegebenenfalls werden die Tropfen im Fallen mit BaCl<sub>2</sub> Pulver besprüht (e) (Crystal Gun) bevor sie im Polymerisationsbad eintreffen (f). Die Fallstrecke zwischen Düse und Polymerisationbad beträgt etwa 10cm.

Die Parameter der Verkapselungsanlage waren: Vorschub: 2,00; Luft: 1bar, 2,5 – 3,5/min. Die Crystal Gun wurde mit ½ Laborlöffel BaCl<sub>2</sub> Pulver gefüllt und bei 10l/min Luftdurchfluss bei 2bar betrieben. Sobald die Zellsuspension komplett durch die Anlage gelaufen war wurden die fertigen Kapseln weitere 20min im Polymerisationsbad bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Kapseln in einem 50ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und 3 x mit 10ml 0,9%iger NaCl – Lösung gewaschen. Nach Entnahme einer Probe für die Vitalitätskontrolle (EB/FDA – Lösung) (nicht bei Erythrozyten) wurden die Kapseln in die für die jeweilige Zellart geeignetem Kulturmedium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung über Nacht im CO<sub>2</sub>-Inkubator,



**Abbildung 3.8:** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur Beobachtung des Verhaltens von Alginat beim Eintropfen in verschiedene Versuchslösungen.

bzw. im Kühlschrank bei 4°C bei Erythrozyten, inkubiert. Zur Herstellung von größeren Kapseln zur Untersuchung der Deformationskinetik wurde Alginatlösung je nach Bedarf 0,1 – 0,7%ig in 0,9%iger NaCl mit oder ohne 1% HSA (aus 20%igem Octalbin von Octapharma, Langenfeld) angesetzt und mit Phenolrot in der gewünschten Farbintensität gefärbt. Das Alginat wurde in eine 1ml Spritze aufgezogen und zusammen mit einer Kanüle in einer Halterung befestigt (s.h. Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9). Ein transparenter Behälter, in dem ein Objektivmikrometer (Nikon, Düsseldorf) befestigt wurde und, je nach Versuch, Polymerisationsbad, isotoner NaCl-Lösung oder destilliertem Wasser eingefüllt wurde, wurde 6cm, 13cm oder 27cm unterhalb des Endes der Kanüle aufgestellt. Der Eintropfvorgang wurde mittels Hochgeschwindigkeitsvideo oder – fotografie aufgezeichnet. Zur Hochgeschwindigkeitsfotografie wurde die Anlage, wie sie in Schelenz 2004 beschrieben ist, verwendet. Deformationsdiagramme wurden erstellt, indem eine Videoaufnahme in Einzelbilder zerlegt wurde. Der Durchmesser des Alginattropfens wurde an der horizontal breitesten Stelle gemessen. Aus den Messdaten wurden Durchmesser-Zeit-Diagramme, bzw. Deformationsdiagramme erstellt.



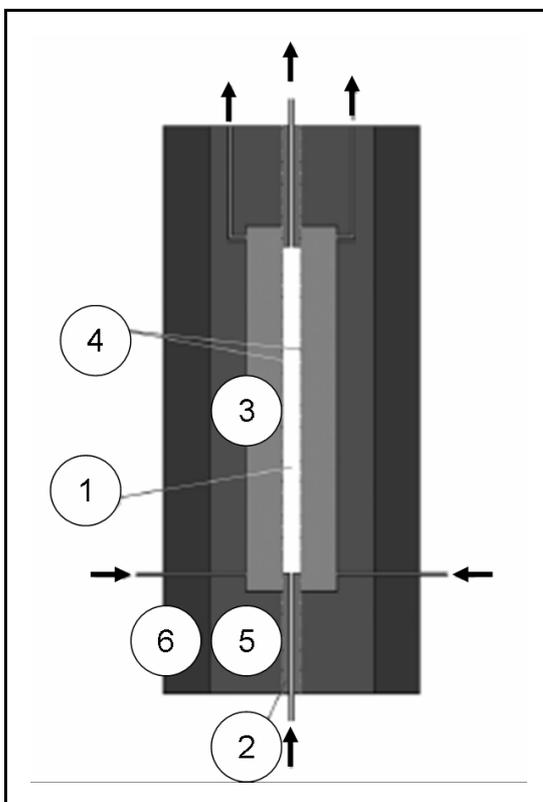
**Abbildung 3.9:** Darstellung der Versuchsanordnung zur Beobachtung des Verhaltens von Alginat beim Eintropfen in verschiedene Versuchslösungen. Links ist die Halterung für die Eintropfkanüle und die Küvette zu sehen, rechts die Hochgeschwindigkeitsvideokamera und dahinter das aktuelle Bild.

### 3.3.3 Herstellung von Alginatsheets

Alginatsheets werden mit Hilfe einer speziellen Gussform hergestellt, die detailliert in Zimmermann et al. 2007 beschrieben ist (Abbildung 3.10). Vor Beginn müssen die Filter und die Keramikschwämme in Polymerisationsbad gelegt werden um mittels Unterdruck (im Exsikkator) die eingeschlossene Luft zu entfernen. Nach dem Zusammenbau der Gussform wird mit einer Spritze luftblasenfrei 0,7%iges Alginat (1:1 Mischung *L. trabeculata*, *L. nigrescens*) in die untere Schlauchöffnung eingefüllt. Für den 1,5mm Spacer wird etwa 9ml, für den 2mm Spacer ca. 12ml Alginatlösung benötigt. Sobald der Meniskus der Alginatlösung im oberen Schlauch zu sehen ist kann durch die zwei unteren Zugänge in der Plastikhalterung Polymerisationsbad eingefüllt werden. Auf die offenen oberen Zugänge werden zwei 20ml Spritzen ohne Kolben aufgesetzt. Wenn die Menisci des Polymerisationsbades in den Spritzen an den oberen Zugängen zu sehen sind kann in die oberen Spritzen je 20ml Polymerisationsbad gegeben werden. Nach 2h oder 15h kann

die Gussform wieder zerlegt werden und das fertige Sheet entnommen werden. Vor der Verwendung muss das Sheet mindestens 1h in destilliertem Wasser quellen. Sollen Zellen auf dem Sheet kultiviert werden entnimmt man das Sheet dem Wasser und legt es in eine trockene Petrischale (9cm Durchmesser), trägt tropfenweise Fibronektinlösung (0,25mg/ml) auf und lässt es mit offenem Deckel in einer Sterilbank 2h antrocknen. Danach wird eine dichte Zellsuspension (ca.  $1 \times 10^6$ /ml) aufgetropft, so dass das Sheet bedeckt ist und lässt diese 2h im CO<sub>2</sub> – Inkubator adhären. Erst danach können 15ml Kulturmedium zugegeben werden.

Zur Strukturierung mittels Photoablation wurden nicht nur Alginatsheets sondern ebenfalls größere, massive Alginatblöcke verwendet. Diese wurden hergestellt, indem 0,5ml 0,7%iges NT-Alginat in ein Zellsieb (Millipore) mit 2µm Porengröße gegeben wurde, das in einer 4er Wellplatte (Nunc) steht. Danach wurde das Well langsam mit ca. 700µl Polymerisationslösung gefüllt, wobei darauf zu achten ist, dass sich keine Luftblase unter dem Zellsieb bildet. Weitere ca. 300µl der Polymerisationslösung wurden von oben in das Zellsieb über das Alginat gegeben. Nach 2h oder 15h kann der Alginatblock entnommen und für Photoablation verwendet werden.



**Abbildung 3.10:** Anlage zur Herstellung von Alginatsheets. In den inneren Hohlraum (1) wird flüssiges Alginat gefüllt. Der Hohlraum wird einerseits begrenzt von einem Silikonspacer (2), der 1,4 oder 2mm dick ist, auf der anderen Seite von 2 Zellulosefiltern (3) die sich an 2 Keramikfritten (4) anschließen, die von Polymerisationslösung getränkt sind. Die Fritten werden von einem Polyacetatrahmen (5) in Position gehalten, der seinerseits von 2 Edelstahlplatten (6) zusammengedrückt wird. Alginat wird von unten eingespritzt um Luftblasenbildung im Sheet zu vermeiden (Abb. aus Zimmermann et al. 2007).

### 3.3.4 Herstellung von Alginatschichten, -spots und -patches

Zum Aufbringen von Alginatschichten auf Oberflächen müssen diese zunächst, wenn nicht schon gegeben (Zellkultur-behandelte Plastikoberflächen, Cellocate, Thermanox), hydrophilisiert werden. Eine Behandlung mit Argon-Plasma hat sich dabei als die einfachste Methode erwiesen. Alternativ können die Oberflächen auch chemisch hydrophilisiert werden, indem die Probenträger zunächst durch je 15min in Aceton, in Ethanol und destilliertem Wasser im Ultraschallbad entfettet werden. Danach lässt man sie 60min im Ultraschallbad in einer 1:9 Mischung aus gesät-

tigter NaOH-Lösung und Ethanol hydrophilisieren. Abschließend werden die Probenräger 30min in destilliertem Wasser, das 1-2-mal gewechselt wird, im Ultraschallbad gereinigt. Für die Kultivierung von Zellen werden die Probenräger entweder autoklaviert oder mit UV-Licht sterilisiert. Damit Alginat auf der Oberflähe haften bleibt ist eine Beschichtung mit Poly-L-Lysin (PLL) (Sigma, Schelldorf) notwendig.

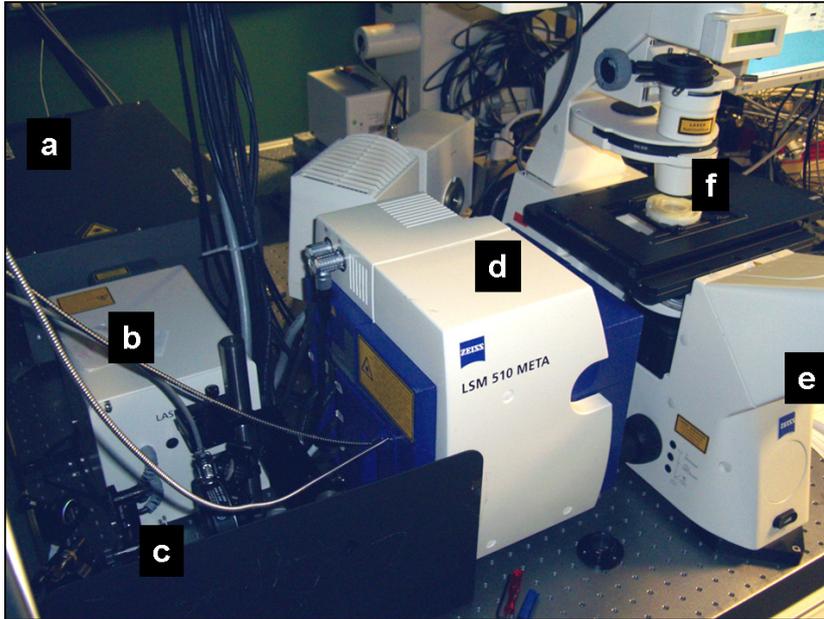
Sollen zunächst Zellen auf der Oberflähe kultiviert werden ist eine Beschichtung mit 1:100 verdünnter Stocklösung (0,01%) PLL angebracht, soll die Alginatbeschichtung direkt aufgetragen werden kann eine höhere Konzentration gewählt werden. Von der PLL Lösung wird soviel aufgetragen, dass die Oberflähe gerade bedeckt ist. Nach 30min bei 37°C wird der Rest der Lösung abgenommen und die Oberflähe 3 x mit gepufferter Lösung gewaschen. Sollen Zellen beschichtet werden, wird Zellsuspension auf die Oberflähe gegeben und mindestens bis zur Anheftung der Zellen im CO<sub>2</sub>-Inkubator kultiviert. Nach Entfernung des Kulturmediums und 3x waschen mit gepufferter Lösung kann Alginat als 0,7%ige Lösung auf die von Pufferlösung befreite, aber noch feuchte Oberflähe (ohne Zellen kann Alginat auch auf eine getrocknete PLL Schicht aufgetragen werden), aufgetropft werden. BaCl<sub>2</sub>-Polymerisationsbad wird nun langsam dazugegeben und 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 x waschen mit gepufferter Lösung kann wieder Kulturmedium dazugegeben werden. Reine Alginatschichten, ohne Zellen können auch getrocknet und rehydriert werden. Zellmonolayer können je nach Sensibilität der Zellen auch direkt mit PLL beschichtet werden.

Zur Beschichtung kleiner Oberflähen, bzw. zur Produktion von Alginatspots von wenigen 100µm Durchmesser, wird der Alginatdispenser eingesetzt. Die Vorgehensweise ist dieselbe wie bei der manuellen Beschichtung mit der Ausnahme dass die Alginattröpfchen vom Dispenser produziert werden. Zur gezielten Ablösung von Zellen, die nicht unter der Alginatschicht liegen, wird Trypsin/EDTA (0,02/0,025%; dieselbe Lösung für Zellkultur) aufgetragen und ca. 2-3min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch vorsichtiges Abspülen können die nicht von Alginat bedeckten Zellen entfernt werden. Sollen Alginatpatches hergestellt werden, lässt man die Trypsinlösung ca. 4-5min inkubieren und spült etwas stärker bis zur vollständigen Ablösung der Zellen und des Alginates.

### 3.3.5 Strukturierung von Alginat

Die Strukturierung von Alginat durch Photoablation wurde an einem kommerziell erhältlichem Laser Scanning Mikroskop von Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Deutschland) (LSM 510 META) durchgeführt (Abbildung 3.11). Als Lichtquelle diente ein Ti:Saphir-Femtosekundenlaser (150fs, 1,3 W bei 800nm) (Mai Tai, Spectra Physics, USA). Der Laser wurde durch ein Ölimmersionsobjektiv (Zeiss EC Plan Neofluor 40x NA 1.3) fokussiert. Alginat ließ sich optimal bei einer Wellenlänge von 740nm und 70% - 90% der maximalen Anregungsenergie strukturieren. Die Alginatprobe wurde auf einem Glasträger befestigt, wobei zur Vermeidung von Austrocknung zusätzlich ein feuchtes Filterpapier in die Probenkammer eingebracht wurde.

Die Strukturierung mittels Partikelstrahl wurde mit dem Sandmaster der Fa. Hasenfratz (Österreich) durchgeführt. Als Partikel wurde Reinigungspulver aus Natriumbikarbonat verwendet (Nr. 0.489.0012, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co).



**Abbildung 3.11:** Anlage zur Strukturierung von Alginat mit Mehrphotoneneffekt. Das Licht des Ti:Saphir-Lasers (a) wird in einem AOM (akkusto-optical Modulator seiner Intensität geregelt (b) und durch das Linsensystem (c) aufgeweitet, bevor es in der Scan-Einheit (d) PC-gesteuert auf die Probe (f), die auf einem Mikroskop aufliegt (e), durch ein Objektiv fokussiert wird.

---

## 4. Resultate

Im ersten Kapitel des Resultatteils soll auf die Entwicklung und Validierung von Immobilisierungstechniken eingegangen werden. Im zweiten Kapitel werden Immobilisierungstechniken speziell zur Optimierung der Kryokonservierung von Zellen eingesetzt und evaluiert.

### 4.1 Entwicklung und Validierung von Immobilisierungstechniken

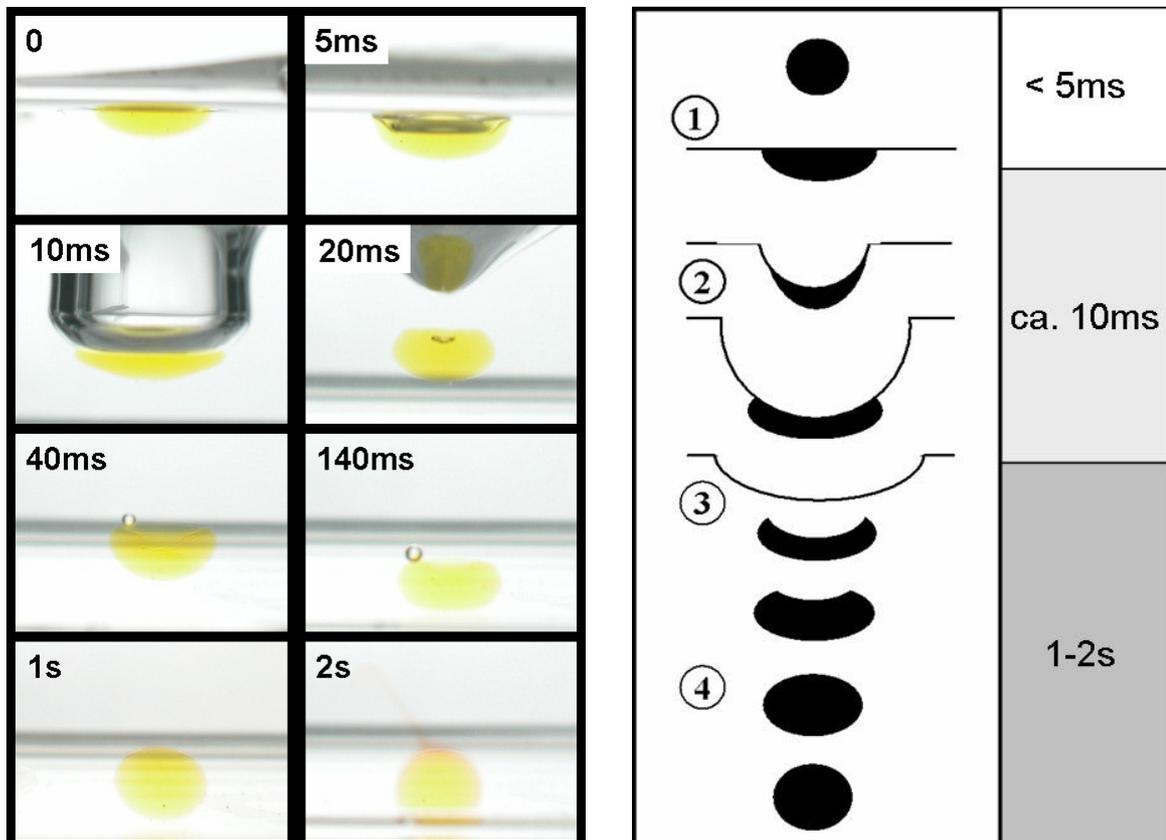
Ziel war es, neue Erkenntnisse über die Kinetik der Kapselentstehung zu gewinnen und diese zur Optimierung der Verkapselung von Langerhansschen Inseln einzusetzen. Basierend auf Hochgeschwindigkeitsaufnahmen konnte ein Auswerteverfahren entwickelt werden das Aufschluss über die Polymerisationskinetik und Deformierbarkeit von Alginat gibt. Einige dieser Erkenntnisse führten schließlich zur Entwicklung der oberflächenbasierten Verkapselung, oder Beschichtung, adhärenter Zellen, wobei die Bioverträglichkeit und Effektivität dieser Beschichtung im Experiment gezeigt werden konnte. Es wurde außerdem erstmals die Verkapselung von neuronalen Vorläuferzellen und Neuroaggregaten durchgeführt und etabliert. Neuronale Zellen sind nicht nur von Bedeutung für die Grundlagenforschung am neuronalen Stoffwechsel sondern auch interessant zur Untersuchung der Pathophysiologie nach Störungen, z.B. Sauerstoffmangel, oder der Wechselwirkung mit Medikamenten.

#### 4.1.1 Untersuchungen zu Vernetzungseigenschaften und Materialeigenschaften

Der Vorgang des Eintropfens läuft sehr schnell ab, zu schnell um auswertbare Aufnahmen aus herkömmlichen Foto- oder Videokameras zu gewinnen. Daher wurde zur Beobachtung und Untersuchung des Eintropfvorganges auf Techniken zur Hochgeschwindigkeitsfotographie bzw. –video zurückgegriffen. Die ersten Versuche zur Untersuchung der Verkapselungskinetik wurden mit der Hochgeschwindigkeitsfotographieanlage durchgeführt die in Schelenz (2003) detailliert beschrieben ist. Eine Spritze mit gefärbtem Alginat wurde über einer Küvette mit der Versuchslösung fixiert und Alginat wurde tropfenweise abgegeben. Der Tropfen fällt dabei durch eine Lichtschranke. Das elektrische Signal der Lichtschranke wird von einem Verzögerer mikrosekundengenau einstellbar verzögert und löst daraufhin einen 15µs kurz eingestellten Blitz aus. Das Bild wird von einer digitalen Fotokamera, die auf lange Belichtungszeit eingestellt ist aufgenommen. Um eine Bildserie eines Vorganges zu erhalten müssen mehrere Bilder in unterschiedlichen Verzögerungsabständen gemacht werden und der Vorgang selbst muss hoch reproduzierbar sein. Die Reproduzierbarkeit ist beispielsweise nicht mehr gegeben, wenn statistisch verteilte Partikel im Alginat sind, und die Bewegung dieser Partikel nachverfolgt werden soll. Aus diesem Grund wurde für diese Versuche eine Hochgeschwindigkeitsvideokamera anstelle der Fotokamera (mit Blitz und Verzögerer) benutzt.

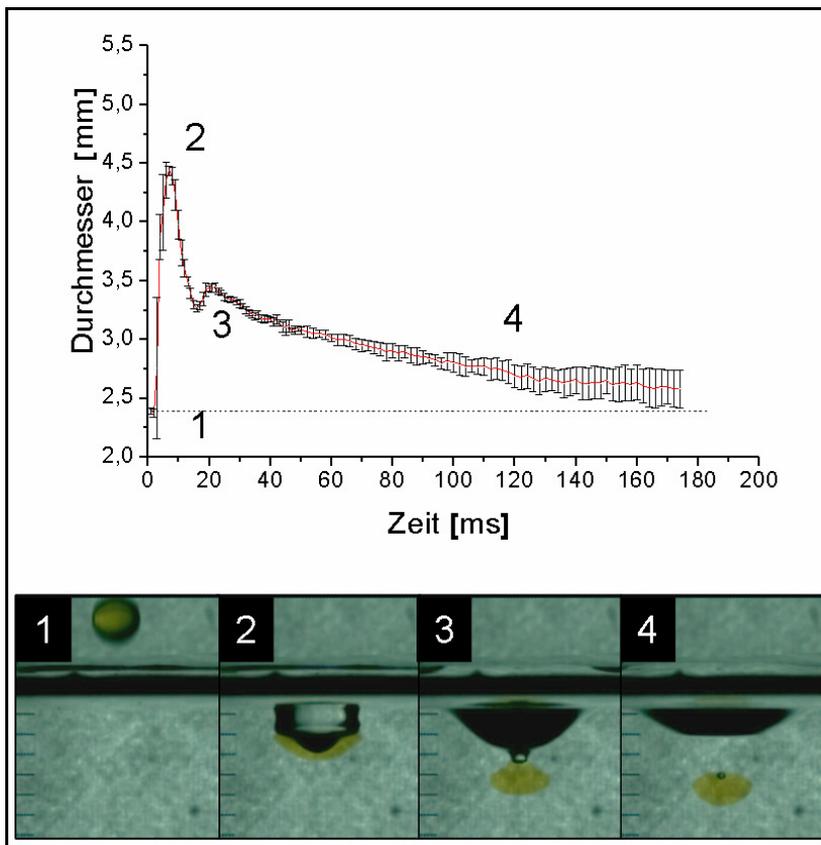
Beobachtet man das Eintreffen des Alginattropfens im Polymerisationsbad von oben kann man die Entstehung eines so genannten Kronentrichters beobachten, der typisch ist für den Einschlag von Tropfen oder Festkörpern in Flüssigkeit oder sogar losen Sand (s.h. Kap. 5). Die Beobachtung von der Seite mit Hilfe der Hochgeschwindigkeitsfotographie zeigt ein komplexes Verhalten des Alginattropfens (s.h. Abbildung 4.1). Es lassen sich vier verschiedene Stadien unterscheiden: Zunächst wird der Tropfen durch das Auftreffen auf die Wasseroberfläche stark deformiert (1. Deformationsphase) und unter Wasser gedrückt (2. Eintauchphase). Nachdem sich der

Alginattropfen von der Wasseroberfläche gelöst hat nimmt er eine, Erythrozyten ähnliche, Form an (3. Erythrozytenphase) und sinkt zu Boden. Dabei, bzw. in den folgenden Sekunden, nimmt der Alginattropfen langsam eine sphärische Form an (4. Schwellphase).



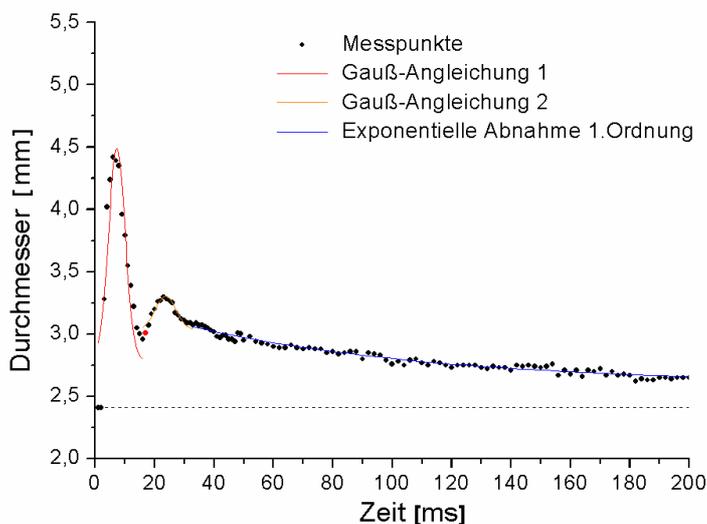
**Abbildung 4.1:** Flüssiges Alginat wird in  $\text{BaCl}_2$ -Polymerisationsbad eingetropft. Links: Hochgeschwindigkeitsfotografien unter Angabe des zeitlichen Abstandes vom ersten Bild ( $t=0$ ). Alginat wurde zur besseren Sichtbarkeit mit Phenolrot gelb gefärbt. Im letzten Bild (2s) sieht man ein leichtes rotes Ausbluten des Farbstoffes. Zu beachten ist, dass jedes Bild einen anderen Alginattropfen darstellt. Beim Einschlag des Alginattropfens auf die Flüssigkeitsoberfläche wird der Tropfen stark deformiert (0 – 5ms) und unter die Wasseroberfläche gedrückt wobei der Alginattropfen an der Flüssigkeitsoberfläche verbleibt und sich erst bei  $t = 20\text{ms}$  davon löst. Beim Absinken hat der Alginattropfen zunächst eine Erythrozyten-ähnliche Form die er im Laufe der nächsten 2s zugunsten einer sphärischen Form verliert. Rechts: schematische Darstellung des Eintropfvorganges; die Nummern indizieren die vier Phasen des Eintropfvorganges (Abb. aus Ehrhart et al. 2005).

Ist die Küvette, bzw. der Füllstand des Polymerisationsbades, flacher als die maximale Eindringtiefe der Luftblase (Abbildung 4.1 bei 10ms) wird der Alginattropfen zu Boden gepresst und viel stärker deformiert. Die folgenden Aufnahmen für die quantitative Untersuchung des Eintropfvorganges wurden ausschließlich mit einer Hochgeschwindigkeitsvideokamera gemacht um Schwankungen der Tropfengröße auszuschließen. Misst man den horizontalen Durchmesser des Alginattropfens an der breitesten Stelle und trägt diesen gegen die Zeit auf, zeigt sich ein charakteristischer Kurvenverlauf (Abbildung 4.2), das Deformationsdiagramm, das aufgrund seiner hohen Spezifität und guten Reproduzierbarkeit auch der charakteristische Fingerabdruck („Fingerprint“) des Alginats genannt wurde. Die Deformationsphase spiegelt sich wieder im Einschlagsmaximum („Impact Peak“), der die maximale Deformation beim Auftreffen des Alginattropfens auf die Wasseroberfläche anzeigt. Am Ablösungsminimum („Detachment Mini-



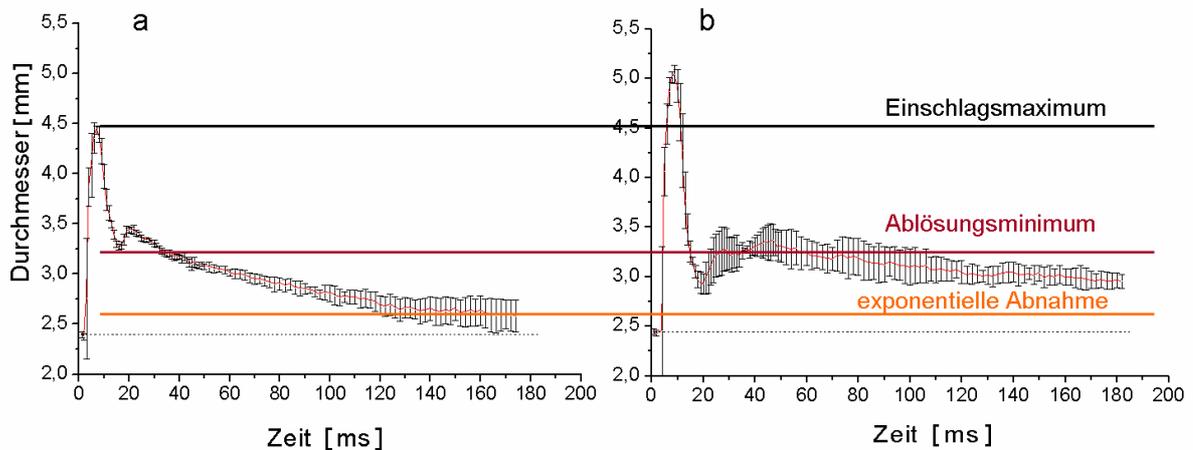
**Abbildung 4.2:** typische Stadien des Eintropfens von Alginat im Deformationsdiagramm: 1: Durchmesser des flüssigen Tropfens vor dem Einschlag; 2: „Impact Peak“ maximale Deformation des Tropfens beim Auftreffen auf die Flüssigkeitsoberfläche; 3: „Detachment Minimum“ Ablösen des Alginats von der Luftblase; 4: „Exponential Decay“ Tropfen rundet sich langsam zur Kugelform ab. ( $n=5$ ) (Abb. verändert aus Zimmermann et al. 2007)

mum“) löst sich der Alginattropfen von der Luftblase, was sich in einer Stauchung des horizontalen Durchmessers äußert. Während der exponentiellen Abnahme des Durchmessers („Exponential Decay“) sinkt der Tropfen zu Boden und nimmt langsam seine sphärische Form an. Dabei geht die Zunahme im Vertikalen zu Lasten des horizontalen Durchmessers wodurch die beständige Abnahme des horizontalen Durchmessers entsteht. In Abbildung 4.2 sind Mittelwert und Standardabweichung aus 3 Messungen aufgetragen. Zu erkennen ist die gute Reproduzierbarkeit der Experimente, die durch Normierung auf den Ausgangsdurchmesser noch betont werden kann.



**Abbildung 4.3:** Interpolation einer Messkurve des charakteristischen Deformationsdiagramms. Verwendet wurde 0,65%iges NT-Alginat, welches aus einer Höhe von 13cm in Polymerisationsbad eintropft. Gut zu erkennen ist, dass die beiden Maxima (Einschlags- und Ablösungsmaximum) ab Gaußsche Funktionen erinnern während die langsame Abnahme des Durchmessers eine exponentielle Abnahme 1. Ordnung darstellt.

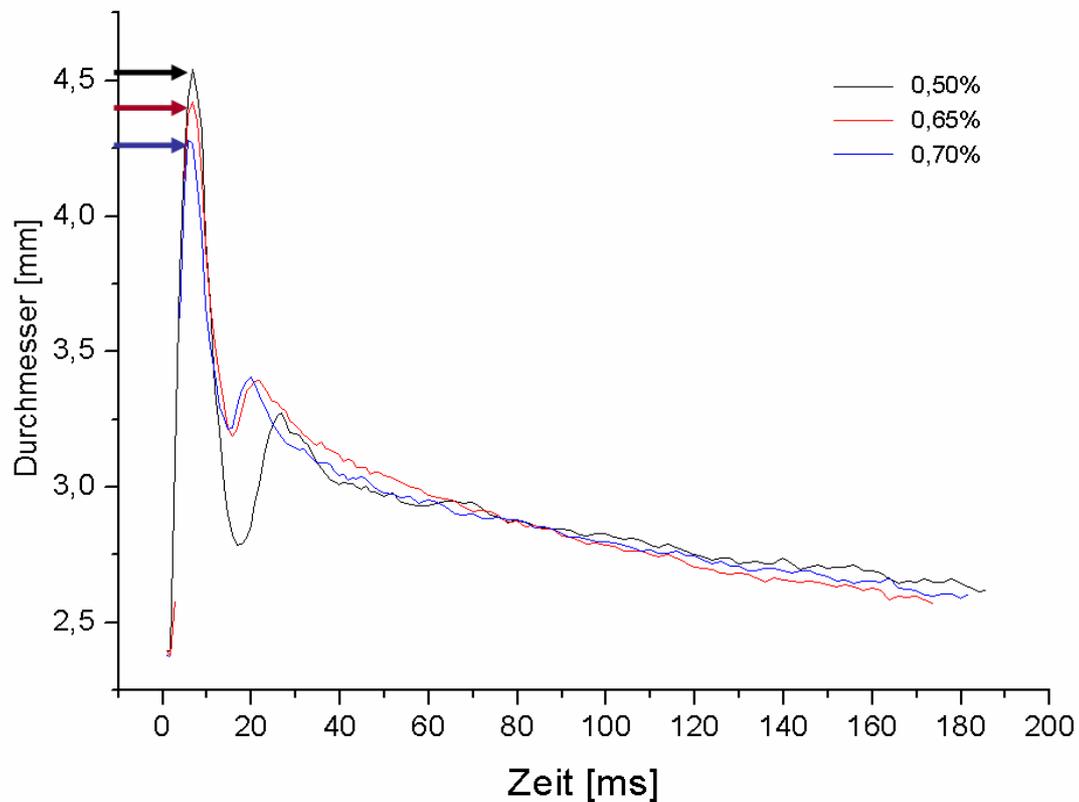
Nachdem also gezeigt wurde, dass die Erfassung der Deformation im Durchmesser/Zeit-Diagramm funktioniert und reproduzierbar ist wurden Versuche unternommen um die Polymerisationskinetik von Alginat zu untersuchen. Zunächst soll der Einfluss der polymerisierenden Ionen untersucht werden. Wird die polymerisierende  $\text{BaCl}_2$  – Lösung gegen nicht-polymerisierende isotope  $\text{NaCl}$ -Lösung getauscht zeigen sich deutliche Unterschiede im Fingerabdruck des Alginats (Abbildung 4.3). Die initiale Deformation („Impact Peak“) fällt im  $\text{NaCl}$ -Bad deutlich größer aus, während das „Detachment Minimum“ kleiner wird. Im  $\text{NaCl}$ -Bad wird der Algintropfen also stärker deformiert. Auch nimmt der Algintropfen im  $\text{NaCl}$ -Bad am Ende keine sphärische Form an sondern sinkt zu Boden und löst sich langsam auf.



**Abbildung 4.4:** Darstellung der Unterschiede im Deformationsdiagramm von Alginat beim Eintropfen in a)  $\text{BaCl}_2$  – Polymerisationsbad und b) isotonen  $\text{NaCl}$ -Lösung. Das Einschlagsmaximum fällt ohne Barium wesentlich höher aus, d.h. die Deformation beim Aufprall ist größer. Das Ablösungs-Minimum wenn sich der Tropfen von der Flüssigkeitsoberfläche ablöst ist kleiner, d.h. auch hier findet eine stärkere Deformation statt als mit Barium im Bad. Der Tropfen im Polymerisationsbad rundet sich im Laufe der nächsten Sekunden zur Kugelform ab während der in der  $\text{NaCl}$ -Lösung zu Boden sinkt und sich auflöst. (n=5)

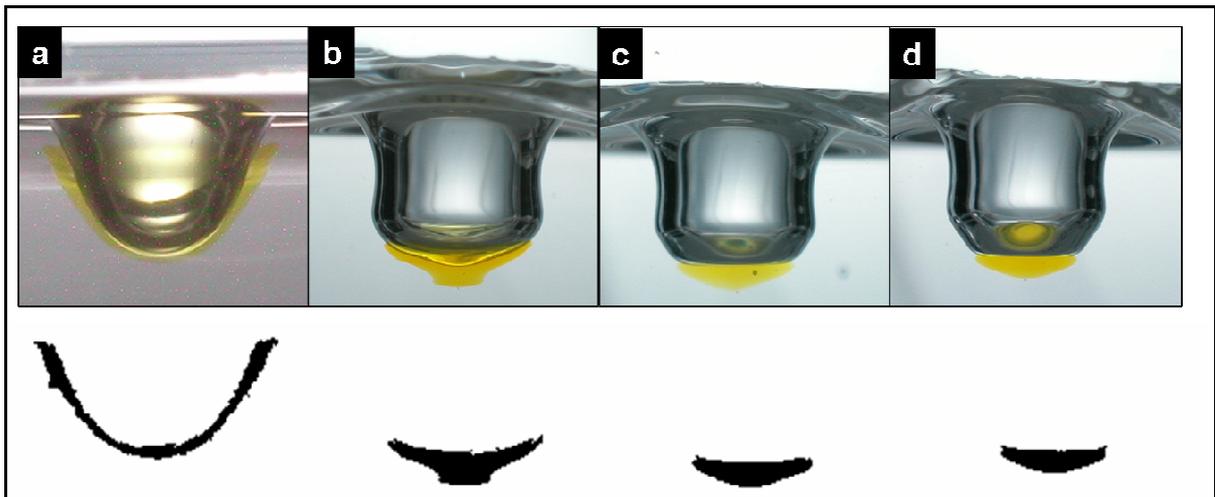
Ausgehend von der theoretischen Überlegung, dass die Viskosität der Lösung das Ausmaß ihrer Deformation beim Einschlag in Flüssigkeiten beeinflusst (Weber-Zahl, s.h. Kap. 5), wurden Versuche mit Alginatlösungen unterschiedlicher Viskosität und mit unterschiedlichen Einschlagsgeschwindigkeiten durchgeführt. Die Viskosität einer Alginatlösung wird unter anderem durch den Alginatanteil bestimmt. Im Experiment wurden Lösungen von 0,3%, 0,5%, 0,65% und 0,7% verwendet. Die 0,3%ige Lösung konnte nicht ausgewertet werden, da sich der Tropfen an der Oberfläche ausbreitete und dort verblieb wo aufgrund des Meniscus der Flüssigkeit keine exakte Messung möglich war.

Abbildung 4.4 zeigt den maximalen horizontalen Durchmesser beim Eintropfvorgang. Die Graphen zeigen den Mittelwert wobei aufgrund der guten Übereinstimmung der einzelnen Messwerte (s.h. auch Abbildung 4.3) auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet wurde. Deutlich zu erkennen ist, dass die maximale Deformation am Einschlagsmaximum umso größer ausfällt, je geringer die Alginatkonzentration, und damit die Viskosität, ist. Bei 0,5%igem Alginat fällt zudem die starke Deformation am Ablösungsminimum auf.



**Abbildung 4.5:** Vergleich der Deformationsdiagramme von Alginatelösungen unterschiedlicher Konzentration beim Eintropfen in Polymerisationsbad. Je höher die Viskosität, desto geringer die Deformation. Die Pfeile markieren die maximale Ausdehnung am Einschlagsmaximum der unterschiedlichen Konzentrationen. Verwendet wurde NT-Alginate (mit L929 Zellen), welches aus einer Höhe von 13cm eingetropt wurde. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Standardabweichungen weggelassen. (n=3)

Die Viskosität einer Alginatelösung wird außer durch die Konzentration vom M- bzw. G-Anteil bestimmt (Mannuronsäure, bzw. Gulluronsäure). *L. nigrescens* Alginate enthält mehr Gulluronsäure, die in helikalen Strukturen organisiert ist, *L. trabeculata* Alginate mehr Mannuronsäure. Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6 zeigen die Deformation von Alginate, das aus unterschiedlichen Quellen stammt. Alginate aus *L. nigrescens* ist viskoser als das aus *L. trabeculata* und deformiert nicht so stark beim Eintreffen in Polymerisationsbad. Die 1:1 Mischung der beiden Alginatearten liegt in der Deformation zwischen den reinen Alginaten

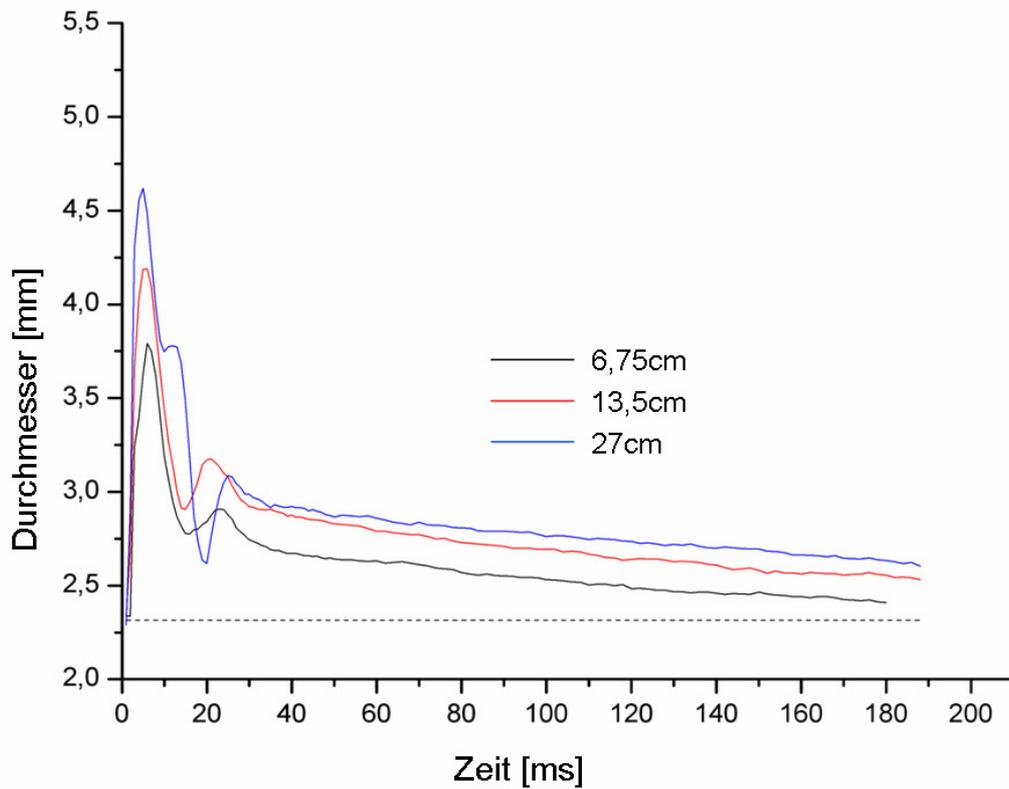


**Abbildung 4.6:** Hochgeschwindigkeitsfotographie von Alginatropfen in Polymerisationsbad am Punkt der maximalen Deformation (Impact Peak). Die Viskosität erhöht sich von links nach rechts; a: 0.1%ige Alginatlösung, b-c: 0.65%ige Alginatlösung von verschiedenen Algenspezies wobei c eine 1:1 Mischung aus a) (*L. trabeculata*) und b) (*L. nigrescens*) ist Die Eintropfhöhe betrug 13cm. (Abb. aus Ehrhart et al. 2005).

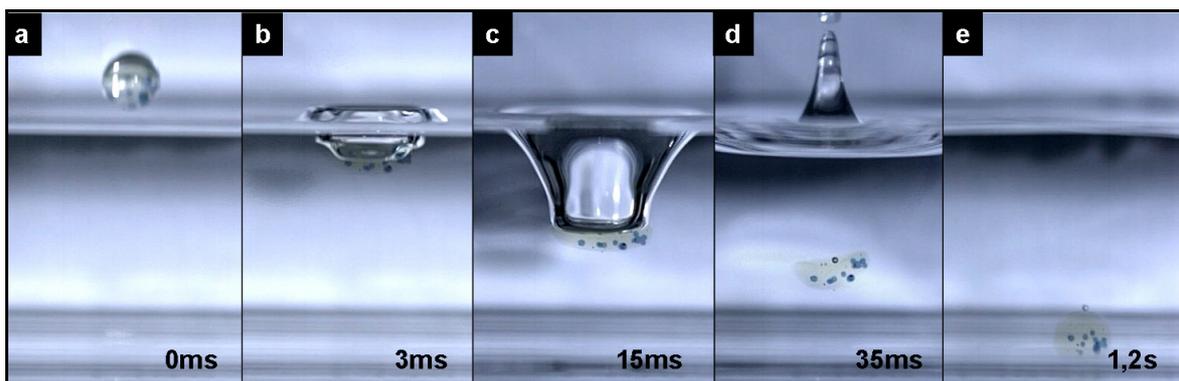
Weiterhin von Bedeutung für das Ausmaß der Deformation der Alginatropfen ist die Einschlagsgeschwindigkeit. Im folgenden Versuch wurde die Eintropfhöhe variiert so dass sich unterschiedliche Geschwindigkeiten ergaben. In Tabelle 4.1. sind die Eintropfhöhen mit der zugehörigen Einschlagsgeschwindigkeit und Weberzahl zusammengefasst. Abbildung 4.7 zeigt die Fingerabdrücke von Alginat (0,65%iges NT-Alginat mit  $0,5 \times 10^6$  L929 Zellen/ml) das aus den unterschiedlichen Höhen in Polymerisationsbad eingetropft wurde. Je höher der Abstand (die Einschlagsgeschwindigkeit) desto größer die Deformation.

**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung der physikalisch relevanten Daten für die Variation der Eintropfhöhen.

Eintropfhöhe	Einschlagsgeschwindigkeit $v = g \sqrt{\frac{2h}{g}}$ [ms <sup>-1</sup> ]	Weberzahl $We = \rho U^2 \frac{D}{\sigma}$ [sm <sup>-1</sup> ]
6,5cm	1,1	31,1
13cm	1,6	44,0
27cm	2,5	69,5

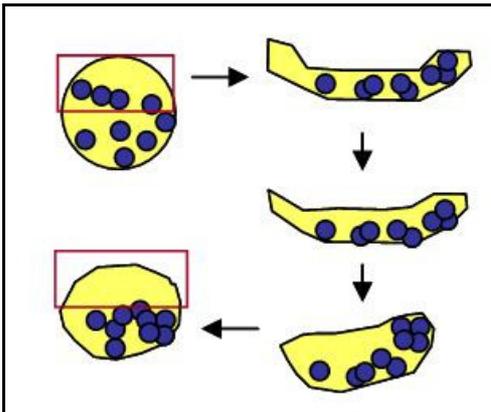


**Abbildung 4.7:** Deformationsdiagramm von 0,65%igem NT – Alginat aus unterschiedlichen Fallhöhen. Dem Alginat waren  $0,5 \times 10^6$  L929 Zellen/ml zugemischt. (n=3)



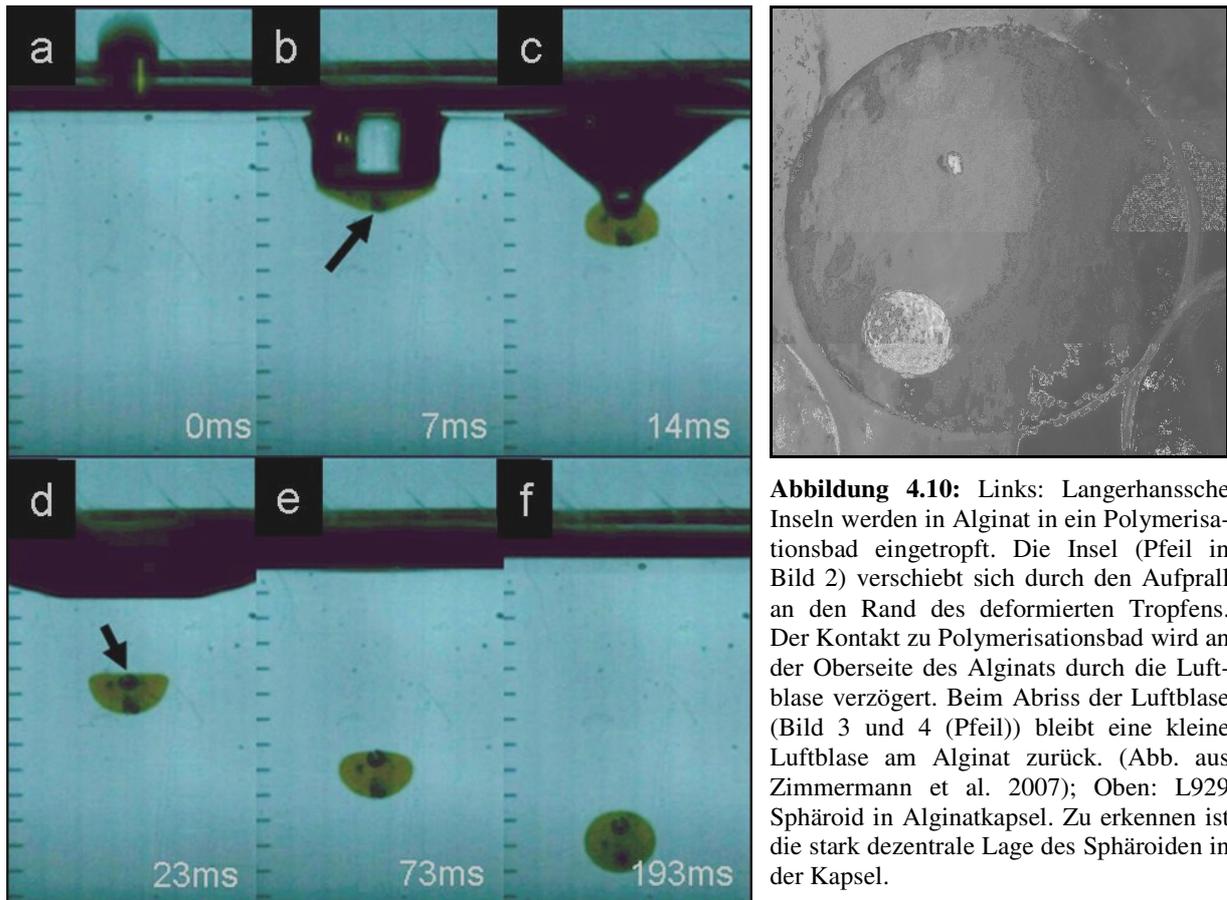
**Abbildung 4.8:** Eintropfen von (gelb gefärbtem) Alginat in Polymerisationsbad. Das flüssige Alginat wurde mit blau gefärbten Bariumalginatkapseln, die mittels Verkapselungsanlage hergestellt wurden, versetzt. Die Kapseln bewegen sich innerhalb des Alginattropfens während der Deformationsphase aber bleiben auf ihrer Position während der folgenden Phasen (Abb. aus Ehrhart et al. 2005).

In der Anwendung finden reine, massive Alginatkapseln lediglich als Testsysteme für die Reinheit des Alginats Gebrauch (z.B. Langzeitstabilität und Fibroseentwicklung im Tiermodell). Die biomedizinische Anwendung von Alginatkapseln wird durch den Einschluss von Zellen oder kleinen Gewebestücken gegeben wobei die Alginatkapsel als dreidimensionale Kultivierungsmatrix und Schutz vor äußeren Einflüssen, z.B. Immunsystem, dient. Um die Dynamik bei der Einschlussimmobilisierung zu untersuchen wurde ein Testsystem im größeren, sichtbaren Maßstab verwendet. Reine Alginatkapseln (ca. 300-500µm Durchmesser), die mit Hilfe der Verkapselungsanlage hergestellt, mit Alcianblau gefärbt wurden dienten dabei als Modellsystem. Die Partikel wurden mit gelb gefärbter Alginatlösung gemischt bevor sie, unter Beobachtung durch die Hochgeschwindigkeitsvideokamera, in Polymerisationsbad getropft wurden. Abbildung 4.8 zeigt ausgewählte Momente des Eintropfvorganges. Deutlich zu erkennen sind die blauen Alginatkugeln, die sich während der Deformation in der Kapsel verschieben, am unteren Rand anordnen und auch während des Schwellvorganges in dieser Position verbleiben. In Abbildung 4.9 sind nochmals separat die Alginatpartikel dargestellt. Gut zu erkennen ist die Verschiebung der Partikel in die untere Hälfte der großen Alginatkapsel. Um diese Verdrängung der eingeschlossenen Partikel an den Rand der Kapsel zu vermeiden wurden erste Versuche unternommen eine alternative, deformationsfreie Methode der Kapselproduktion zu finden (s.h. Ausblick Kapitel 5).



**Abbildung 4.9:** Separate, schematische Darstellung des deformeden flüssigen Alginats (gelb) aus Abbildung 4.8 mit den eingeschlossenen Alginatpartikeln (blau). Deutlich zu erkennen ist, dass die Partikel, die zu Beginn zufällig in der Kugel verteilt waren zum Ende in der unteren Hälfte (rot markiert) der Kugel versammelt sind.

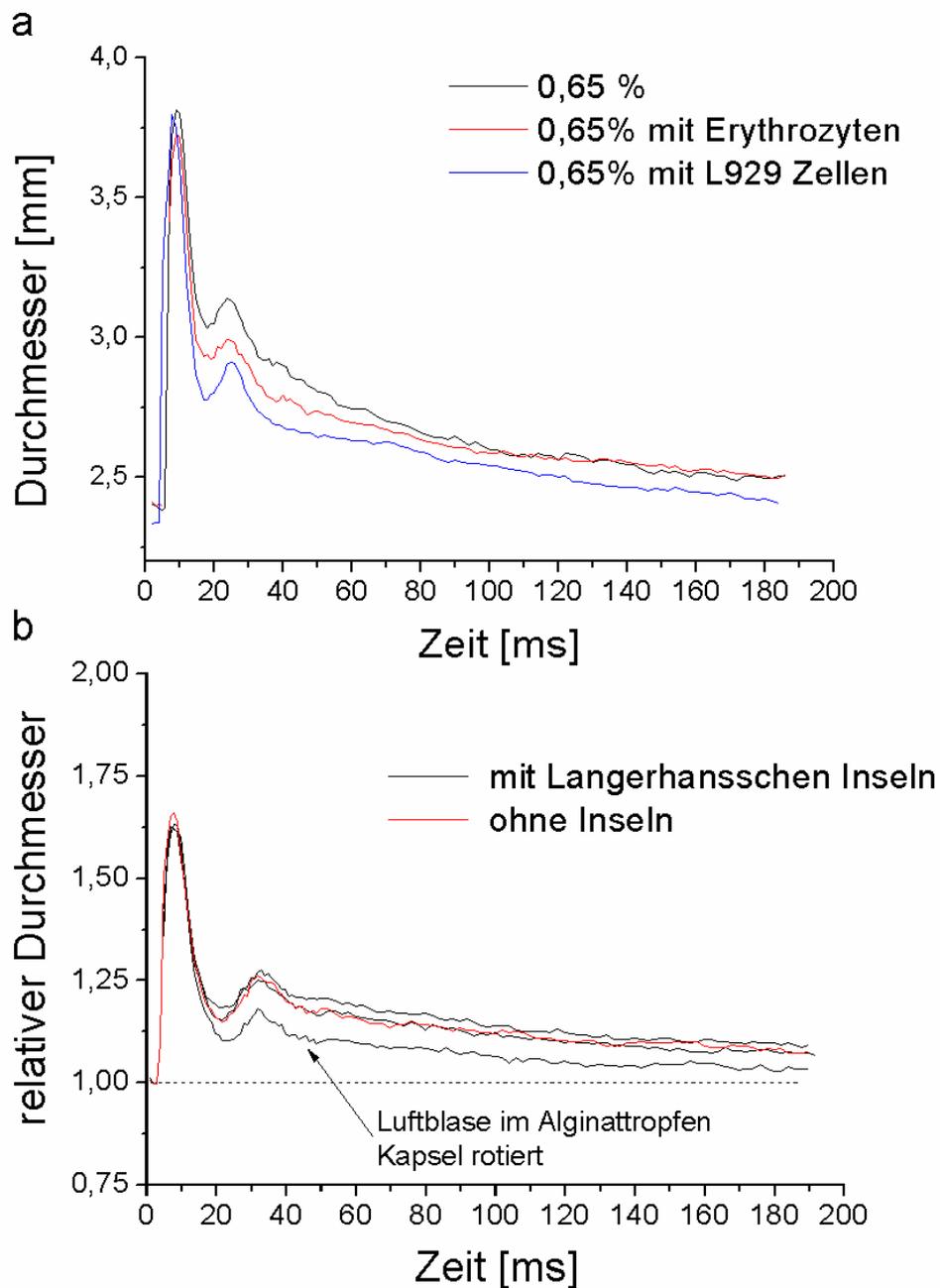
Im Folgenden wird das Eintropfen von Alginat mit Langerhansschen Inseln (aus der Ratte) gezeigt (Abbildung 4.10 links). Auch hier werden die Inseln (Festkörper im flüssigen Alginat) am Rand der Kapsel „gefangen“. Dasselbe Phänomen ist bereits von den Kapseln bekannt, die durch die Verkapselungsanlage entstehen (s.h. Abbildung 4.10 oben).



**Abbildung 4.10:** Links: Langerhanssche Inseln werden in Alginat in ein Polymerisationsbad eingetropft. Die Insel (Pfeil in Bild 2) verschiebt sich durch den Aufprall an den Rand des deformierten Tropfens. Der Kontakt zu Polymerisationsbad wird an der Oberseite des Alginats durch die Luftblase verzögert. Beim Abriss der Luftblase (Bild 3 und 4 (Pfeil)) bleibt eine kleine Luftblase am Alginat zurück. (Abb. aus Zimmermann et al. 2007); Oben: L929 Sphäroid in Alginatkapsel. Zu erkennen ist die stark dezentrale Lage des Sphäroids in der Kapsel.

Auf das Einschlagsmaximum einer Alginatlösung scheinen eingeschlossene, feste Partikel jedoch keine, oder wenige, Auswirkungen zu haben. Abbildung 4.11 (b) zeigt die Messwerte dreier Tropfen mit eingeschlossenen Langerhansschen Inseln und einen, aus derselben Lösung stammenden, ohne Insel. Der Tropfen, der den einzigen, deutlich abweichenden Graphen stellt, hatte zusätzlich eine Luftblase eingeschlossen und rotierte während der Aufnahme. Werden kleinere, aber mehr Partikel, wie z.B. Zellen, zum Alginat gemischt zeigte sich eine leichte Erhöhung der Deformationsfähigkeit am Einschlagsmaximum und am Ablösungsminimum (Abbildung 4.11 a).

Die stärkere Deformierung könnte jedoch ebenfalls einer reduzierten Viskosität zugeschrieben werden, da das Zellpellet stets noch Flüssigkeit enthält bevor die Alginatlösung zugegeben wird. Die Einschlagsmaxima unterscheiden sich kaum, während die Ablösungsminima stärker unterscheiden als in Abbildung 4.5 (unterschiedliche Viskositäten) könnte ein Einfluss der Partikel am Ablösungsminimum vorliegen.



**Abbildung 4.11:** Deformationsdiagramme von einzelnen Alginattropfen mit eingeschlossenen Zellen bzw. Langerhansschen Inseln. a: viele kleine Partikel (Zellen) reduzieren leicht die Deformation beim Aufprall auf die Flüssigkeitsoberfläche („impact peak“) scheinen aber das Ausmaß der Deformation am „detachment minimum“ zu erhöhen. Verdünnungseffekte durch das Zumischen von Zellpellets können nicht ausgeschlossen werden; b: Es wurden aus derselben Alginatlösung, die Langerhanssche Inseln enthält vier Tropfen abgegeben wobei in drei Tropfen Inseln waren, in einem befanden sich keine. Da Verdünnungseffekte ausgeschlossen werden können lässt sich schließen, dass offensichtlich größere Partikel keinen Einfluss auf das Deformationsverhalten haben. Eine starke Abweichung im „Fingerprint“ lässt sich auf eine eingeschlossene Luftblase zurückführen. (a: n=3)

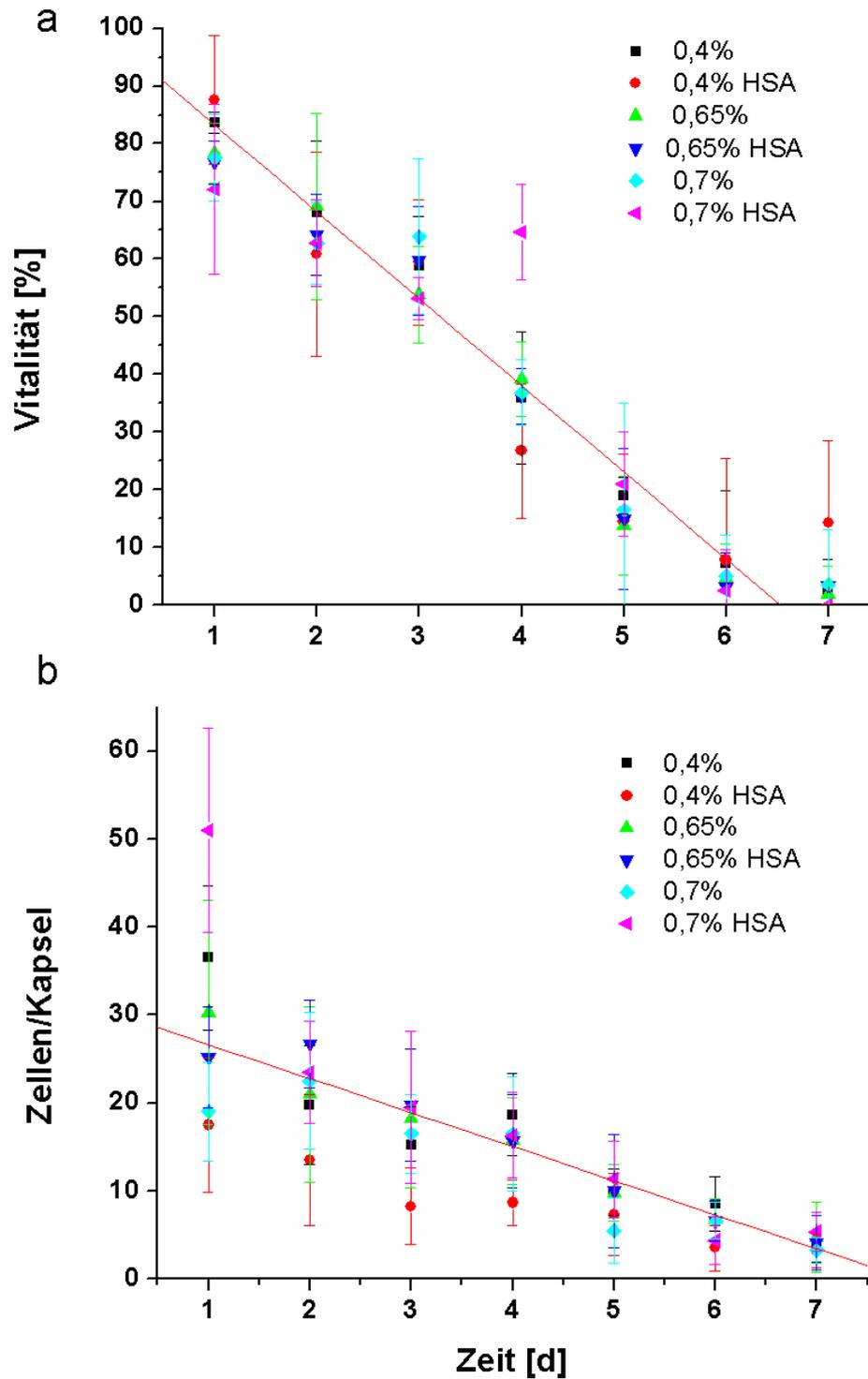
#### 4.1.2 Wachstum und Differenzierung von Neuronalen Zellen in einer Alginkapsel

Neuronale Vorläuferzellen werden für unterschiedliche Forschungen verwendet wie z.B. für grundlegende Studien über die Gehirnentwicklung, Reaktion auf Medikamente oder Erkrankungen. Diese Zellen bilden in Kultur (Oberflächenkultur) ein Netzwerk an Verbindungen aus über die sie kommunizieren. In Suspensionskultur (Spinnerflasche) verklumpen die Zellen rasch und bilden so genannte Neuroaggregate. Neuronale Zellen sind dafür bekannt, dass sie Apoptose einleiten wenn sie ohne die Möglichkeit Zell-Zellkontakt herzustellen kultiviert werden (z.B. durch zu geringe Zellkonzentration). Ob dies auch in einer Alginkapsel gegeben ist soll im Versuch geklärt werden. Im Versuch wurde eine Suspension dieser Zellen in Alginate verkapselt und über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet.



**Abbildung 4.12:** Alginkapseln (weißer Pfeil) mit eingeschlossenen primären neuronalen Vorläuferzellen (schwarzer Pfeil). Die Zellen wurden unmittelbar nach der Isolation aus 15 Tage alten Rattenembryonen mit 0,65% Alginate verkapselt und über Nacht kultiviert.

Die Zellen wurden aus embryonalen Ratten (15d alt) gewonnen und direkt nach der Isolierung verkapselt (Abbildung 4.12). Da die optimalen Verkapselungsparameter für diese Zellen noch nicht bekannt sind wurde versuchsweise mit 0,4%igem Alginate, was sehr weiche Kapseln ergibt und bei der Kryokonservierung vorteilhaft ist (s.h. Kapitel 4.2.2), 0,65%igem mit Crystal Gun Behandlung (optimale Kapselparameter für Langerhanssche Inseln) und 0,7%igem Alginate verkapselt. Zudem wurden dieselben Konzentrationen mit 1% HSA versetzt getestet. Das Ergebnis war jedoch stets dasselbe: die Zellen starben innerhalb weniger Tage ab (Abbildung 4.13), was nicht nur am Rückgang der Vitalität (FDA/EB – Färbung) sondern auch an der Abnahme der Zellzahl pro Kapsel festzustellen war. In einem zweiten Versuch wurde die Zellzahl um den Faktor 10 erhöht um eine höhere Zelldichte und eventuell eine höhere Konzentration löslicher Kommunikationsfaktoren zu erhalten. Eine verkapselte Zellsuspension mit  $1 \times 10^7$  Zellen/ml Alginate wurde unter denselben Bedingungen kultiviert mit jedoch gleichem Ergebnis: die Zellen starben innerhalb weniger Tage ab. Für den Tod der Einzelzellen kommen als Ursache sowohl fehlende Zell-Zellkontakte als auch Mangel an Nährstoffen und löslichen Kommunikationsfaktoren in Frage.

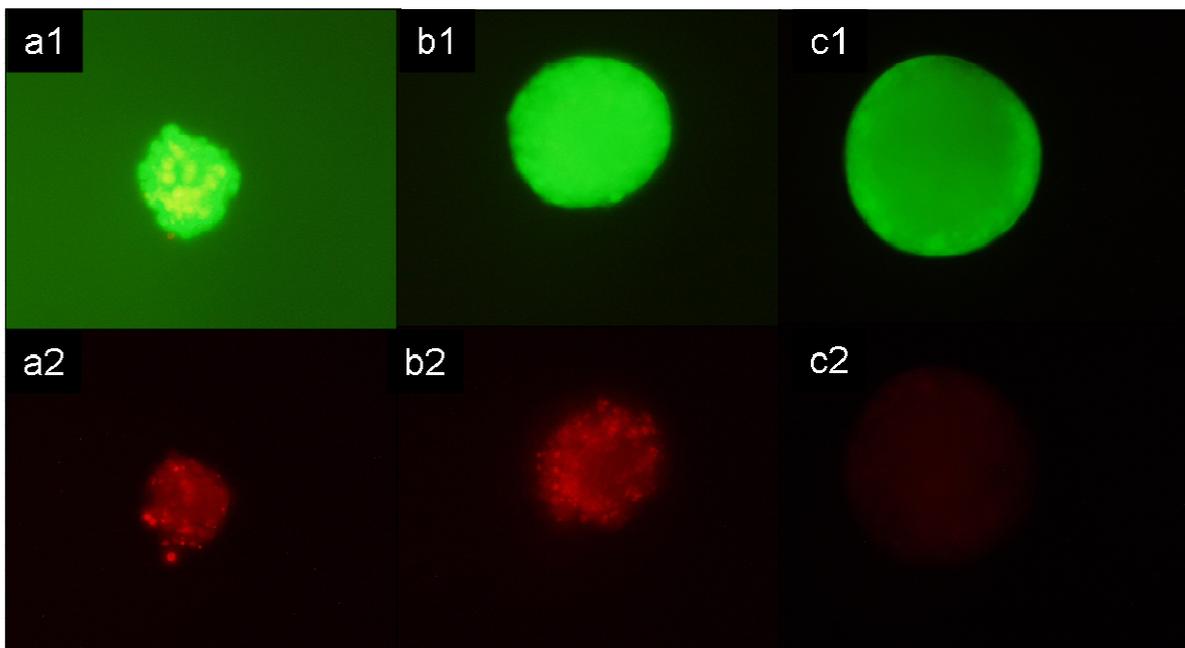


**Abbildung 4.13:** a: Vitalität von primären, neuronalen Vorläuferzellen in einer Alginatkapsel ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml Alginat) über die Dauer von 7 Tagen; b: absolute Zahl der Zellen pro Kapsel (lebend und tot). Deutlich zu erkennen ist die starke Abnahme in Vitalität und Zellzahl über die Kultivierungsdauer, die unabhängig von Alginatkonzentration und HSA-Zusatz stattfindet. Dargestellt ist jeweils die lineare Trendlinie für 0,4%iges Alginat. (n=8)

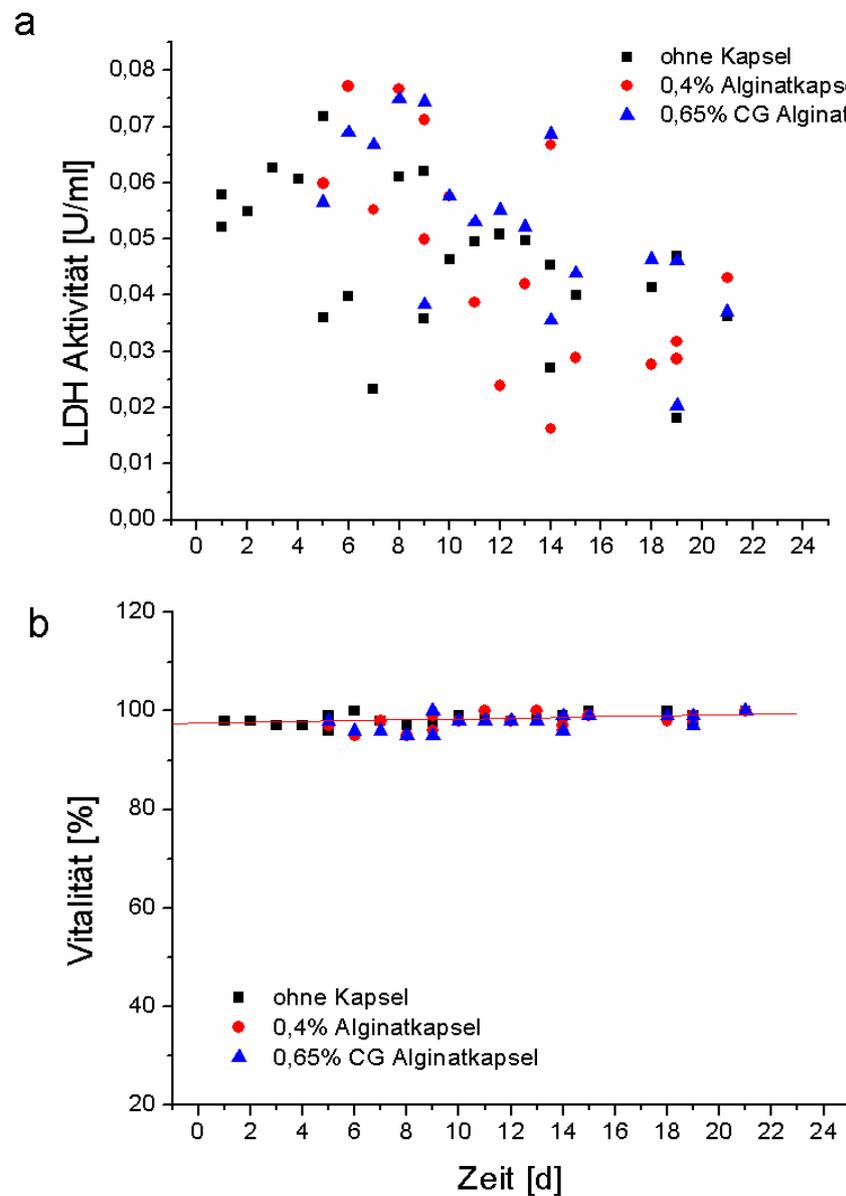
In einem weiteren Versuch wurden daher Neuroaggregate in Alginat verkapselt, die untereinander starke Zell-Zellkontakte ausbilden. Neuroaggregate bilden sich, wenn man neuronale Vorläuferzellen in einer Spinnerflasche kultiviert durch Verklumpung der Zellen. Am Tag 5 nach der Isolierung sind die Neuroaggregate stabil genug um den Verkapselungsprozess zu überstehen.

Es wurden je 1/3 der entstandenen Aggregate mit 0,4%igem Alginat (weiche Kapseln) und mit 0,65%igem Alginat und Crystal Gun Behandlung (harte Kapseln) verkapselt und neben der unverkapselten Kontrollgruppe in je einer separaten Spinnerflasche 16 Tage kultiviert. Jeden Tag wurden Proben gezogen um Kapsel und Aggregatdurchmesser, Vitalität und Metabolitenkonzentration zu bestimmen. In einer ersten breit angelegten Testreihe (nicht gezeigte Daten) wurde bereits nachgewiesen dass der Zusatz von 1% HSA weder die Vitalität der Aggregate beeinflusst noch Auswirkungen auf die Stabilität der Kapseln hat, ebenso wie die Alginatkonzentration. Die Auswahl der Parameter beschränkte sich in diesem daher auf weiche (0,4%iges) und harte (0,65% mit CG-Behandlung) Alginatkapseln.

Es zeigte sich, dass sich Neuroaggregate, erstens, den Verkapselungsprozess mit hoher Vitalität überleben und, zweitens, im Gegensatz zu Einzelzellen, in Alginatkapseln kultivieren lassen. Die Lebend-Tot-Färbung mit FDA und EB zeigte eine durchgehend hohe Vitalität der Aggregate (Abbildung 4.14), die durch den LDH – Assay (Laktat-Dehydrogenase - Assay) verifiziert wurde. Unmittelbar vor und nach der Verkapselung konnten tote Zellen nachgewiesen werden (rote Punkte in Abbildung 4.14 untere Reihe), die Zahl der toten Zellen nahm jedoch über den Beobachtungszeitraum ab. 6 Tage nach der Verkapselung und später konnten, auf mikroskopische Weise, keine toten Zellen mehr identifiziert werden.



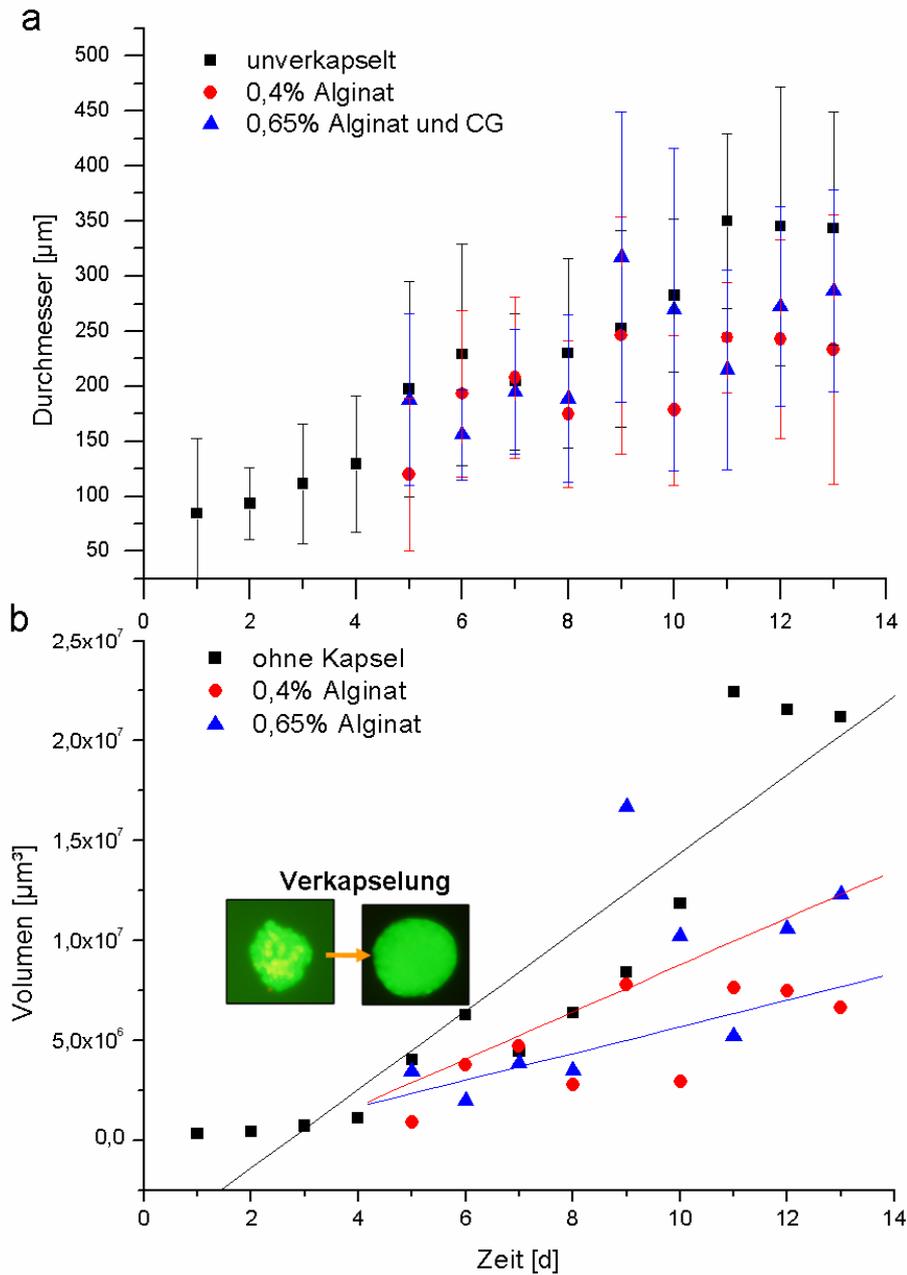
**Abbildung 4.14:** Lebend-Tot-Färbung von Neuroaggregaten; obere Reihe: FITC Filter, untere Reihe: Tex Red Filter; a: ein Aggregat unmittelbar vor der Verkapselung wobei neben der roten, flächigen Fluoreszenz, die als unspezifische Fluoreszenz interpretiert wird einzelne tote Zellen zu sehen sind die als deutlich abgegrenzte rote Punkte zu erkennen sind; b: unmittelbar nach der Verkapselung; c: schließlich 6 Tage nach der Verkapselung. Bis auf eine leichte rote unspezifische Fluoreszenz sind kaum noch tote Zellen zu erkennen. Eine konstant hohe grüne Fluoreszenzintensität zeigt den aktiven Stoffwechsel lebender Zellen an.



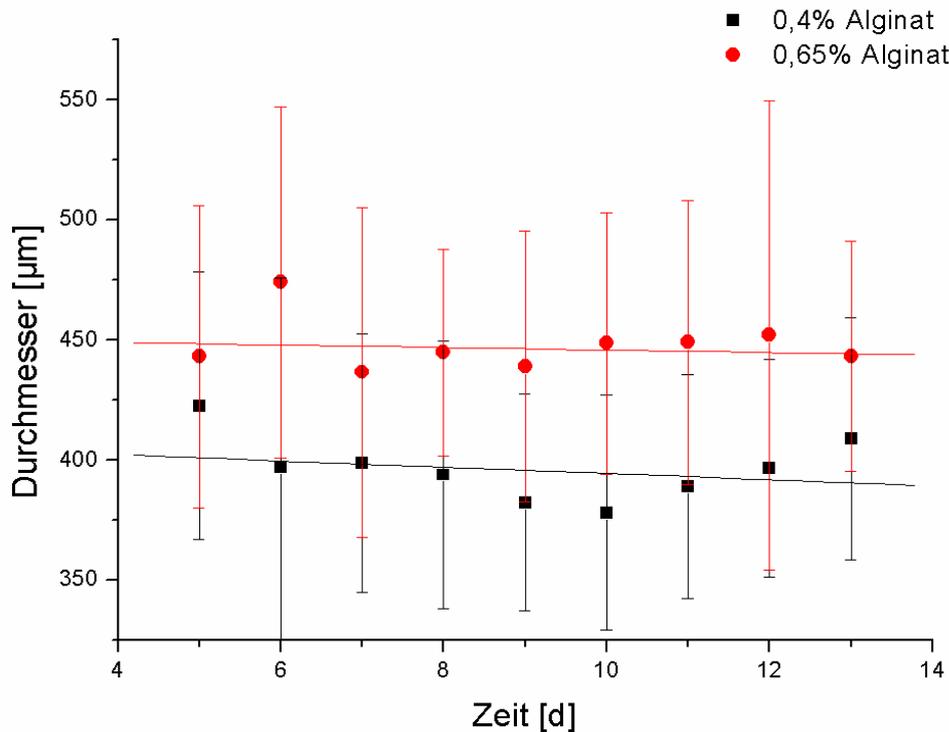
**Abbildung 4.15:** Aktivität der LDH im Überstand von verkapselten und unverkapselten Neuroaggregaten; Am Tag 0 fand die Isolierung statt, am Tag 1 wurde Kulturmediumvolumen von 100ml auf 125ml erhöht. Teilweise Medienwechsel erfolgten an den Tagen 5, 9 und 13. a) LDH Aktivität in U/ml; b) anhand der Zelldichte und LDH Aktivität errechnete Vitalität; Deutlich zu erkennen ist eine konstant hohe Vitalität der Aggregate sowohl verkapselt als auch unverkapselt. In b) ist der lineare Trend der Probe ohne Kapsel eingezeichnet.

Zum Kontrolle der Vitalfärbung wurde parallel ein LDH-Assay durchgeführt. LDH ist ein zytosolisches Enzym, das bei Beschädigung oder Lysis der Zellen in den Überstand gelangt und dort nachgewiesen werden kann (Abbildung 4.15 a). Ist die Zahl der Zellen bekannt kann die Zahl der toten Zellen, bzw. die Vitalität, bestimmt werden (Abbildung 4.15 b). Deutlich zu erkennen ist, dass die Aktivität des Enzyms über die Kultivierungsdauer konstant abnimmt. Durch Verrech-

nung der Enzymaktivität mit der bekannten Zellzahl zeigt sich dass die Zellen überwiegend vital sind (95% - 100%) was mit der Vitalitätsfärbung übereinstimmt.



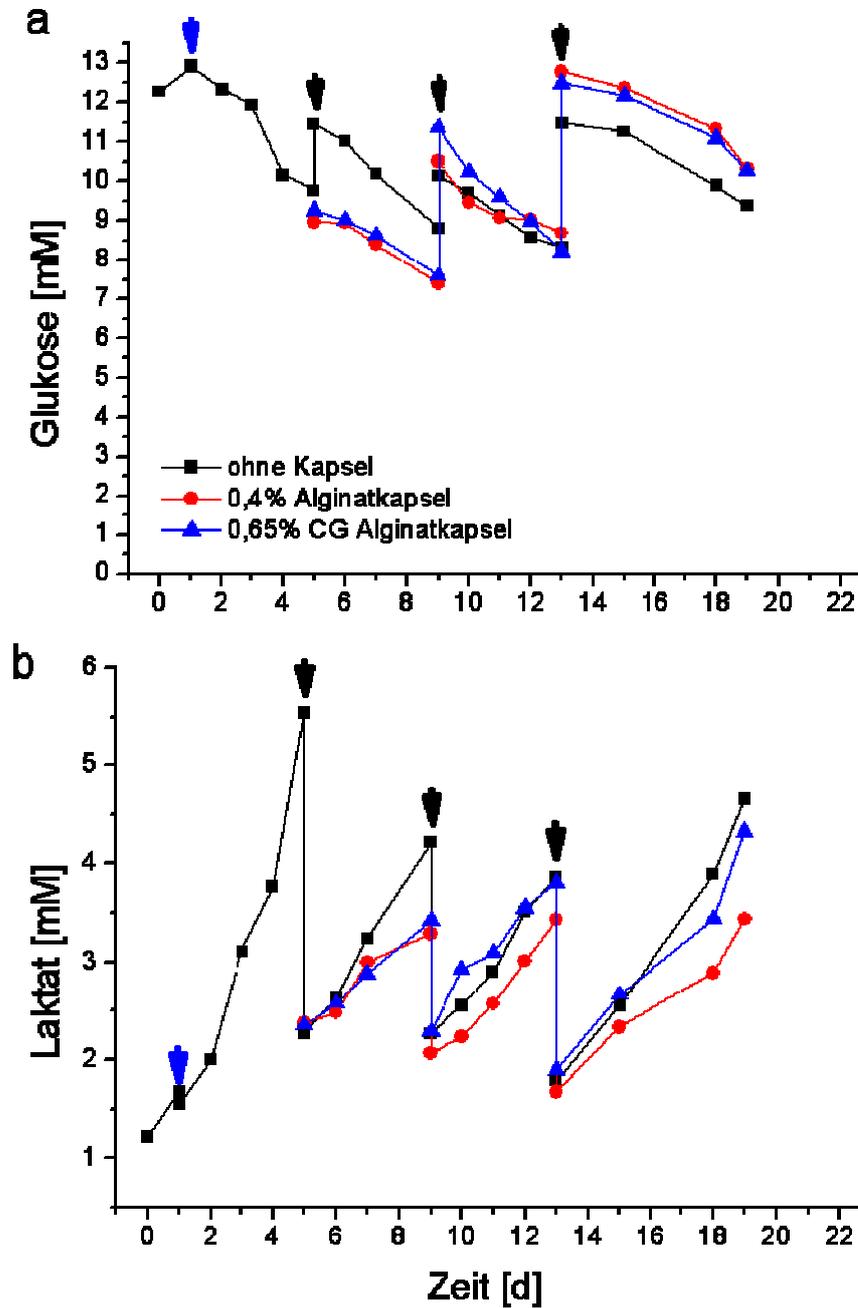
**Abbildung 4.16:** a: Durchschnittliche Größe (Durchmesser in  $\mu\text{m}$ ) von Neuroaggregaten in einer Alginatkapsel im Laufe von 13 Tagen Kultur. Am Tag 0 wurden die Zellen isoliert und in einer Spinnerflasche kultiviert. Am Tag 5 wurden die entstandenen Neuroaggregat mit unterschiedlichen Protokollen (0,4%iges Alginat ohne, bzw. 0,65%iges Alginat mit Crystal Gun) verkapselt. b: Aus dem Durchmesser errechnetes Aggregatvolumen in  $\mu\text{m}^3$ . Dargestellt sind die linearen Trendlinien zu den Daten. Dargestellt sind zusätzlich typische fluoreszenzmikroskopische Bilder von Neuroaggregaten. ( $n > 15$ )



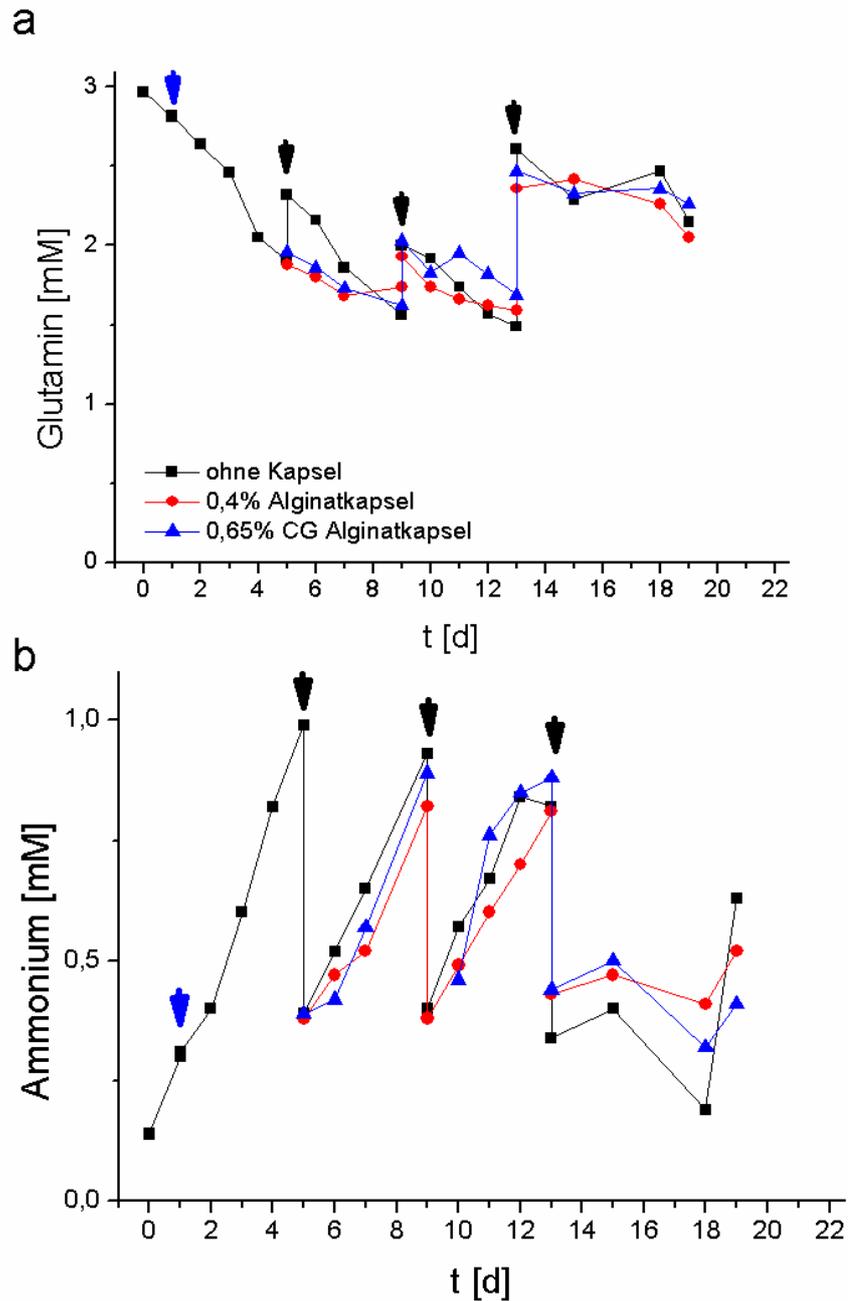
**Abbildung 4.17:** Kapseldurchmesser verkapselter Neuroaggregate bleibt konstant bei etwa 400µm bei 0,4%igem Alginat und 450µm bei 0,65%; d.h. die Kapselstabilität wird über die Kultivierungsdauer von 8 Tagen nicht durch Schwell- oder Schrumpfvorgänge beeinträchtigt. Dargestellt ebenfalls die linearen Trendlinien. ( $n > 15$ )

Die durchschnittliche Größe der Aggregate erhöht sich im Laufe von 10 Tagen von ca. 150µm auf ca. 275µm (Abbildung 4.16). Zu beobachten war ebenfalls, dass die Größenzunahme der unverkapselten Aggregate etwas stärker ausfiel als die der unverkapselten. In Abbildung 4.16 b wurde zur besseren Ersichtlichkeit der Größenzunahme das Aggregatvolumen aus dem durchschnittlichen Durchmesser berechnet. Die Kapselgröße blieb während dessen konstant (Abbildung 4.17). Die unterschiedliche Größe der aus unterschiedlichen Alginatkonzentrationen hergestellten Kapseln lässt sich auf geringfügige Unterschiede der Parametereinstellung bei der Herstellung der Kapseln zurückführen.

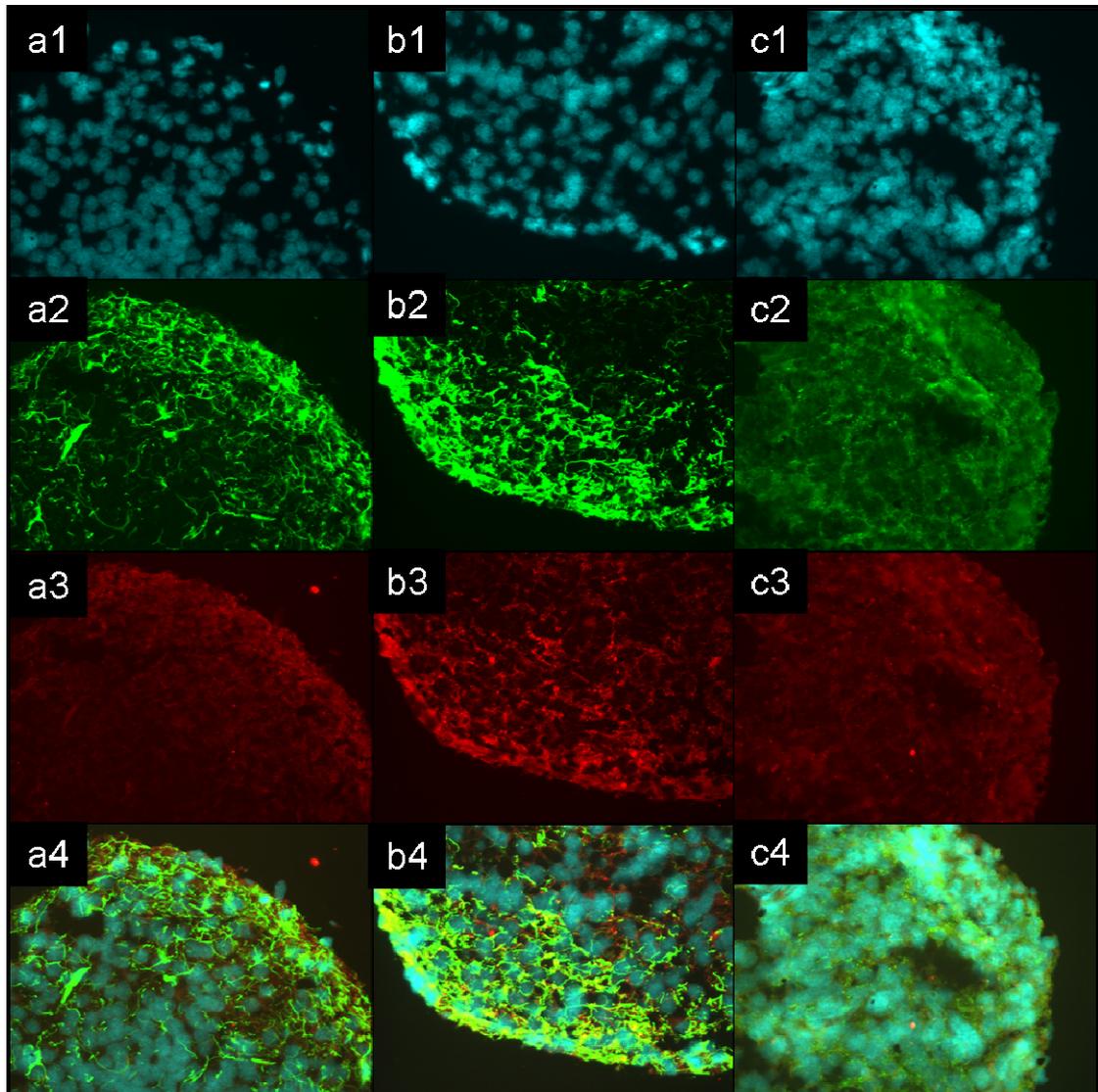
Über die Stoffwechselaktivität der Zellen gibt der Verbrauch von Nährstoffen, bzw. die Abgabe von Abfallstoffen, Aufschluss. Der konstante Verbrauch von Glukose (Abbildung 4.18 a) und die Produktion von Laktat (Abbildung 4.18 b) zeigen einen aktiven Stoffwechsel der neuronalen Zellen sowohl in der Kapsel als auch ohne Kapsel an. Der Verbrauch von ca. 0,5mM Glukose bzw. Produktion von weniger als 1mM Laktat pro Tag spricht für einen überwiegend aeroben Stoffwechsel, d.h. die Zellen erleiden keinen Mangel an Sauerstoff oder Nährstoffen. Der jeden dritten bis vierten Tag erfolgte Medienwechsel kann an einem schnellen Anstieg der Glukosekonzentration, bzw. Abfall der Laktatkonzentration nachvollzogen werden (Abbildung 4.18). Neuronale Zellen haben weiterhin die Besonderheit, dass sie in hohem Maße Glutamin verbrauchen und zu Glutamat und Ammonium spalten, die spezifisch im Überstand des Kulturmediums nachgewiesen wurden (Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.18:** Stoffwechsel in verkapselten und unverkapselten Neuroaggregaten über 19 Tage in Spinnerflaskenkultur. Am Tag 0 fand die Isolierung statt, am Tag 1 wurde Kulturmediumvolumen von 100ml auf 125ml erhöht (blauer Pfeil), teilweise Medienwechsel erfolgten an den Tagen 5, 9 und 13 (schwarze Pfeile). a: Glukosekonzentration; b: Laktatkonzentration im Kulturmedium. Deutlich zu erkennen ist ein konstanter Glukoseverbrauch von ca. 0,5mM/Tag und eine Laktatproduktion von ca. 1mM/Tag. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Messpunkte miteinander verbunden. (n=1)



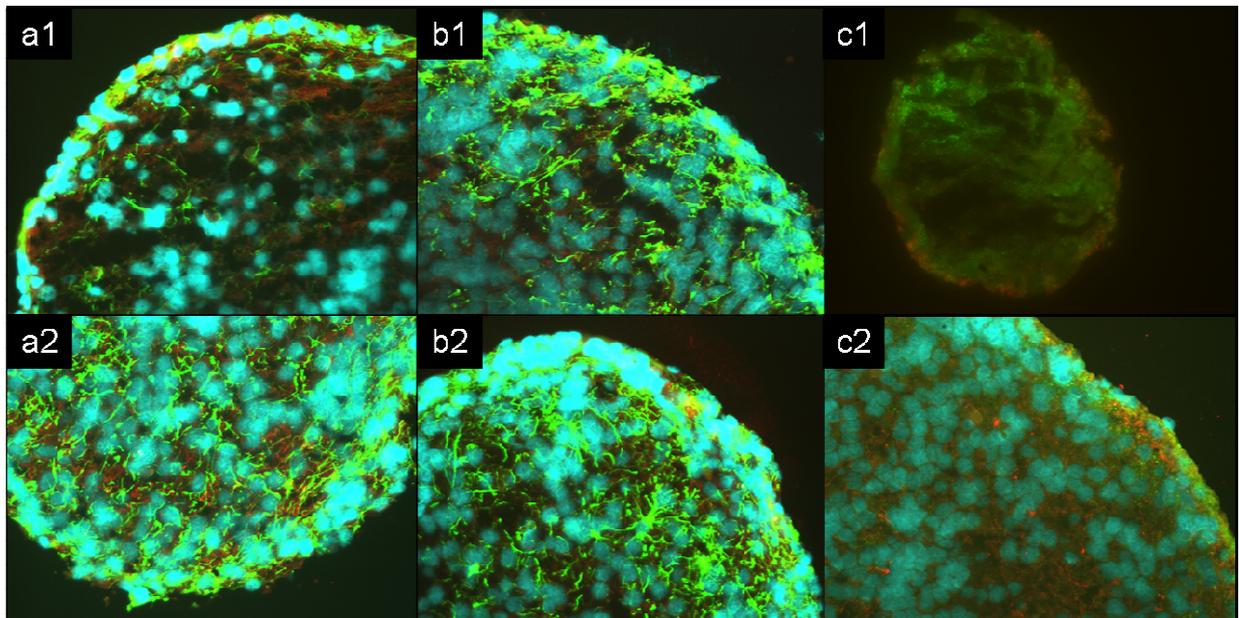
**Abbildung 4.19:** Spezifische Stoffwechselleistungen in verkapselten und unverkapselten Neuroaggregaten; Am Tag 0 fand die Isolierung statt, am Tag 1 wurde das Kulturmediumvolumen von 100ml auf 125ml erhöht (blauer Pfeil). Teilweise Medienwechsel erfolgten an den Tagen 5, 9 und 13 (schwarze Pfeile). a: Glutaminkonzentration; b: Ammoniumkonzentration; Neuronale Zellen verbrauchen Glutamin und geben Ammonium und Glutamat ab. Sowohl verkapselte als auch unverkapselte verbrauchen und produzieren im gleichen Maß Glutamin bzw. Ammonium. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Messpunkte miteinander verbunden. (n=1)



**Abbildung 4.20:** Unverkapselte Neuroaggregate (Kontrolle) am Tag 15 der Kultur. Kernfärbung wurde stets mit DAPI (blau) durchgeführt (1. Reihe) und Immunfärbung mit Anti-Neurofilament (rot) (3. Reihe). Spezieller Nachweis von entweder Nestin (neuronale Vorläuferzellen) (a), GFAP (Astrozyten) (b) oder Synaptophysin (Synapsen) (c) wurde in grün markiert (2. Reihe). Die 4. Reihe stellt die übereinander gelegten Farbkanäle dar.

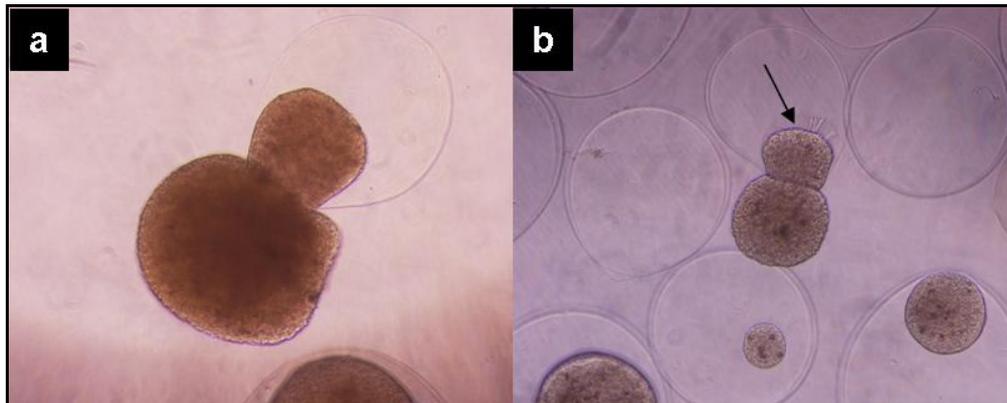
Nestin ist ein Marker für neuronale Vorläuferzellen (bzw. allgemeiner Marker für undifferenzierte Zellen) der ebenso wie Neurofilament von Anfang der Kultur bis zum Ende in allen Proben nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von GFAP, ein Marker für Astrozyten, zeigte ab Tag 9 erste positive Ergebnisse, deren Intensität bis Tag 15 Tagen in allen Proben, der unverkapselten Kontrolle (Abbildung 4.20) sowie mit 0,4% igem und 0,65%igem Alginat verkapselten Neurosphären zunahm (Abbildung 4.21). Der erste Nachweis von funktionalen Neuronen, nach-

gewiesen durch Synaptophysin, erfolgte am Tag 13, wobei das Signal am Tag 15 stärker wurde und zwar ebenfalls in allen Proben. Auch die Verteilung und Häufigkeit der Immunfluoreszenz waren in verkapselten und nicht verkapselten Proben ungefähr gleich, was den Schluss zulässt, dass die Alginatverkapselung die Differenzierung von Neuroaggregaten nicht beeinflusst.



**Abbildung 4.21:** Neuroaggregate verkapselt am Tag 15 der Kultur. Kernfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Immunfärbung wurde mit Neurofilament (rot) und wahlweise in grün Nestin (neuronalen Vorläuferzellen) (a), GFAP (Astrozyten) (b) oder Synaptophysin (funktionale Neuronen); obere Reihe: 0,4%ige Alginatkapsel; untere Reihe: 0,65%ige Alginatkapsel; dargestellt sind übereinander gelegte Bilder der Aufnahmen von einzelnen Farbkanälen.

Zu Beginn des Versuches lagen alle beobachteten Aggregate in Kapseln vor. Ab Tag 6 war zu beobachten, dass einzelne Neuroaggregate aus den Alginatkapseln entkamen indem sie aus den Kapseln „schlüpfen“ (Abbildung 4.22). Bis zum Ende des Kultivierungsversuches kamen auf 10 Aggregate ca. 2-3 „freie“ Aggregate. Die Ursache könnte in der dezentralen Lage einzelner Aggregate liegen, die einseitig von einer zu dünnen Alginatschicht umgeben waren (z.B. Abbildung 4.22 b unten rechts). Die Alginatschicht könnte im Laufe der Kultivierung beschädigt werden (Rührgerät der Spinnerflasche) oder brüchig werden und zuerst einzelnen Zellen und schließlich dem ganzen Aggregat weichen. Um das Entweichen der Sphäroide zu verhindern sollte die Zentralisierung der Aggregate in den Kapseln erreicht werden.



**Abbildung 4.22:** Neuroaggregate am Tag 6 (a) bzw. Tag 7 (b) nach der Verkapselung. Deutlich zu erkennen in Bild B ist, dass das Neuroaggregat einen Hohlraum (Pfeil) zurücklässt indem es aus der Alginkapsel entkommt.

#### 4.1.3 Herstellung und Manipulation von Alginat-Zellkonstrukten

Neben der Verkapselung von Zellen und Geweben in einer dreidimensionalen Alginkapsel ist die Verkapselung von adhären Zellen auf Oberflächen interessant. Die physische Trennung einzelner adhären Zellen oder Zellkolonien voneinander oder von bestimmten Faktoren im Medium kann zurzeit nicht ohne massive Beeinträchtigung der Zellen durchgeführt werden. Daher soll in diesem Kapitel zunächst die Entwicklung einer Methode zur *in situ*-Beschichtung von Zellen mit Alginatehydrogel vorgestellt werden. Im Folgenden wird zunächst das Protokoll zur Erstellung von Alginate-schichten beschrieben, das die besten Ergebnisse in Bezug auf Stabilität der Alginate-schicht und Vitalität der Zellen zeigte.

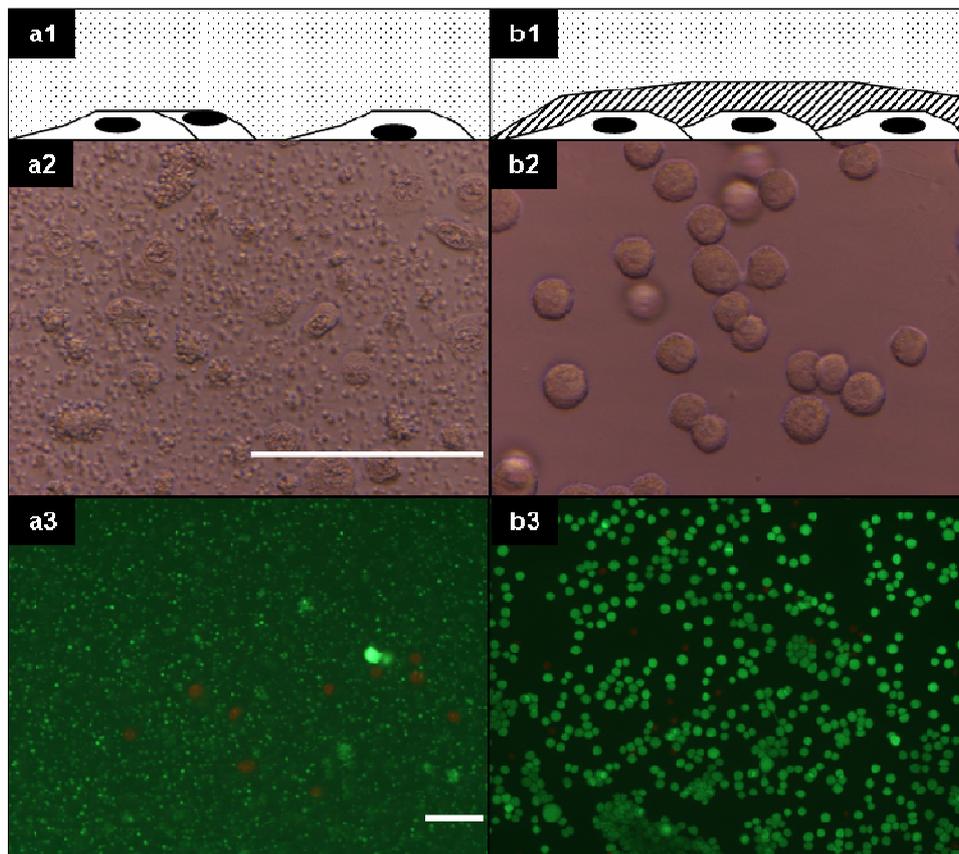
Zur Herstellung von Alginateoberflächen musste zunächst eine geeignete Oberfläche geschaffen werden, die sowohl Zelladhäsion und -ausbreitung als auch Alginatehaftung gewährleistet. Alginate ist ein Polyanion, so dass sich eine Oberflächenbeschichtung mit Polykationen anbietet die für eine, auf elektrostatischer Wechselwirkung beruhende, Haftung sorgt. Optimale Zell- und Alginatehaftung konnten bei einer Poly-L-Lysin (PLL) - Beschichtung mit 0,001%iger Lösung erreicht werden, wobei es unerheblich ist ob Poly-L- oder Poly-D-Lysin verwendet wird. Bei zu geringer Konzentration haftete Alginate nicht während bei zu hoher die Zellen zwar „kleben“ blieben, sich aber nicht auf der Oberfläche ausbreiteten. In Tabelle 4.2 ist die Versuchsreihe zusammengestellt. Höhere Konzentrationen als die „optimale“ 1:100 Verdünnung können verwendet werden wenn die Zellen bereits auf der Oberfläche adhären sind.

L929, PC-3, MEF, CEpan3b und N2a Zellen zeigten sich gegenüber PLL in den verwendeten Konzentrationen von 1:10 – 1:100 als unempfindlich. Nach der Inkubation mit PLL wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen um ungebundene PLL-Reste zu entfernen. Um Alginate aufzutragen wurde zunächst sämtliche überstehende Flüssigkeit entfernt. Daraufhin wurde zügig, um Austrocknung zu vermeiden, 0,7%ige Alginate-lösung aufgetropft und durch vorsichtiges Schütteln der Probe auf der Oberfläche verteilt. Polymerisierende  $\text{BaCl}_2$ -Lösung wurde langsam vom Rand der Kulturschale zugegeben und 10 – 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten um ungebundenes  $\text{Ba}^{2+}$  zu entfernen können die Zellen wieder mit Kulturmedium bedeckt und kultiviert werden. Diese Methode eignet sich zur Beschichtung großer Flächen mit Alginate (im Bereich von wenigen  $\text{cm}^2$ ).

Um die Funktionalität der Alginatbeschichtung zu testen wurden Lysisversuche mit humanem Blutserum durchgeführt. Dazu wurden adhärenente Zellen nach Protokoll mit Alginat beschichtet und humanem Blutserum 20min, 40min oder 60min ausgesetzt. Es zeigte sich, dass beschichtete Zellen stets die Serum-Behandlung überlebten während nicht beschichtete Zellen in den meisten Fällen lysiert wurden (Abbildung 4.23).

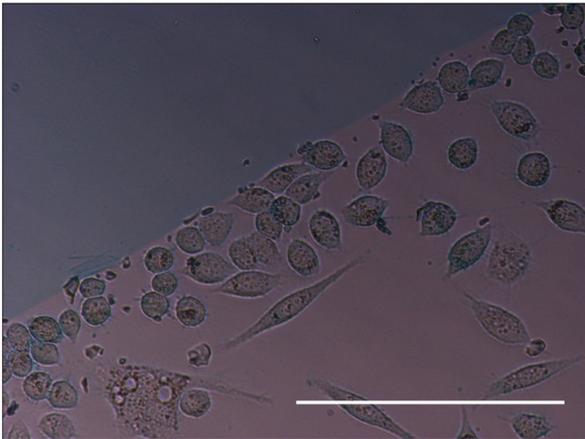
**Tabelle 4.2:** Untersuchung zur Haftung von L929 Zellen und Alginat auf Poly-L-Lysin beschichteten Oberflächen

Poly-L-Lysin Verdünnung einer 0,1%igen Stammlösung	1:5	1:10	1:50	1:100	1:500
Alginatadhäsion	+	+	+	+	-
Zellausbreitung	-	-	-	+	+



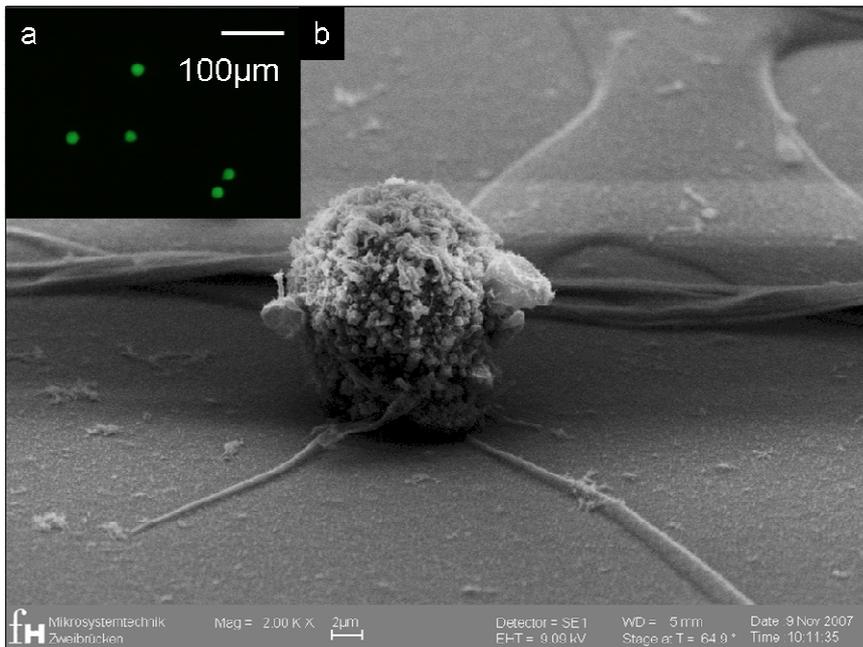
**Abbildung 4.23:** L929 auf PLL beschichteten Cellocates nach 40min Inkubation mit Blutplasma; Die erste Reihe zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: a: unbeschichtete Zellen; b: beschichtete Zellen. 2. Reihe: Hoffmann-Kontrast Aufnahme; 3. Reihe: Vitalfärbung (FDA / EB), Fluoreszenzaufnahme, Tripelbandfilter; Deutlich zu erkennen ist die Zellyse in Bild a2 (Zellfragmentierung) und a3 (lebend – tot Färbung zeigt nur eine einzige lebende Zelle) während in b2 und b3 fast ausschließlich intakte Zellen bzw. FDA positive Zellen zu sehen sind. Die weißen Balken entsprechen 100µm.

Die Dauer bis zur Lysis war stark unterschiedlich, ebenso kam es in Einzelfällen (ca. 2 von 10 Ansätzen) vor, dass weder beschichtete noch unbeschichtete Zellen nach 60min Inkubation Anzeichen von Lysis zeigten. Eine Mischung aus dem Plasma von 5 Spendern zeigte stets lysierende Wirkung. Osmolarität und pH-Wert wurden parallel überwacht um auszuschließen, dass Schwankungen für die Zelllysis verantwortlich sein könnten. Die Osmolarität blieb während der Versuchsdauer konstant (ca. 320mOsmol). Der pH-Wert stieg gegen Ende der Versuchsdauer von 7 auf 8 an. Dieser pH Anstieg kann möglicherweise durch Abgabe von im Plasma gelöstem CO<sub>2</sub> erklärt werden, da das Plasma von venösem Blut stammt.

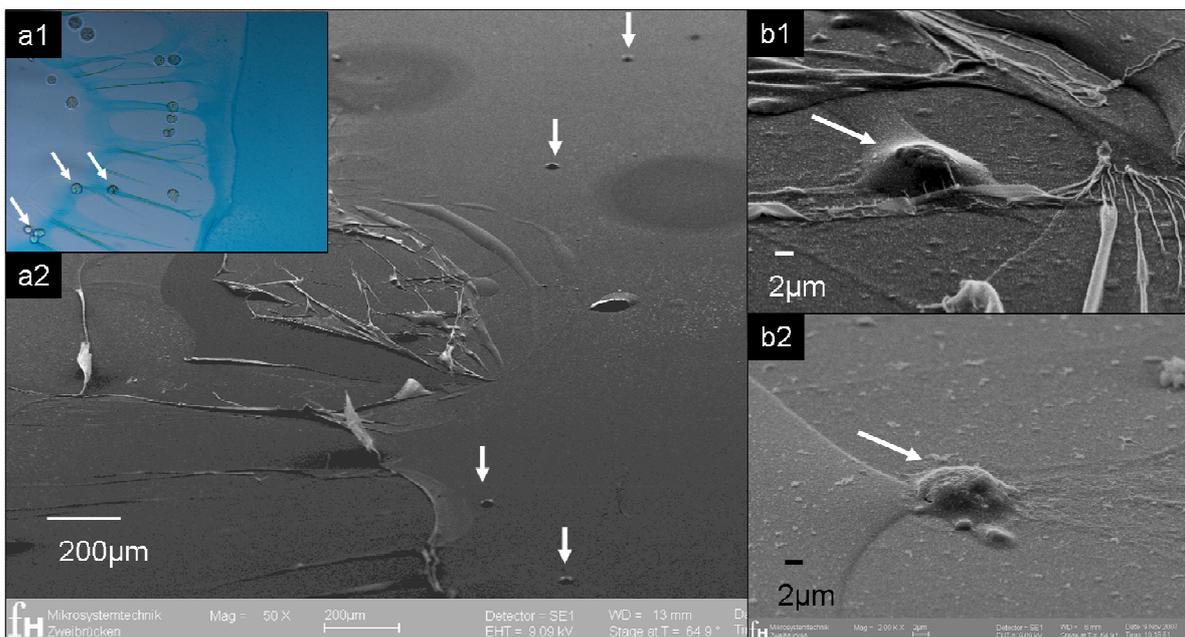


**Abbildung 4.24:** PC-3 Zellen neben einer Alginatschicht (blau). Obwohl die Zellen erst nach der Auftragung des Alginats zugegeben wurden haften sie sich nicht auf dem Alginat sondern bevorzugt daneben an. Native Alginatschichten hemmen die Zelladhäsion. Der weiße Balken entspricht 100µm.

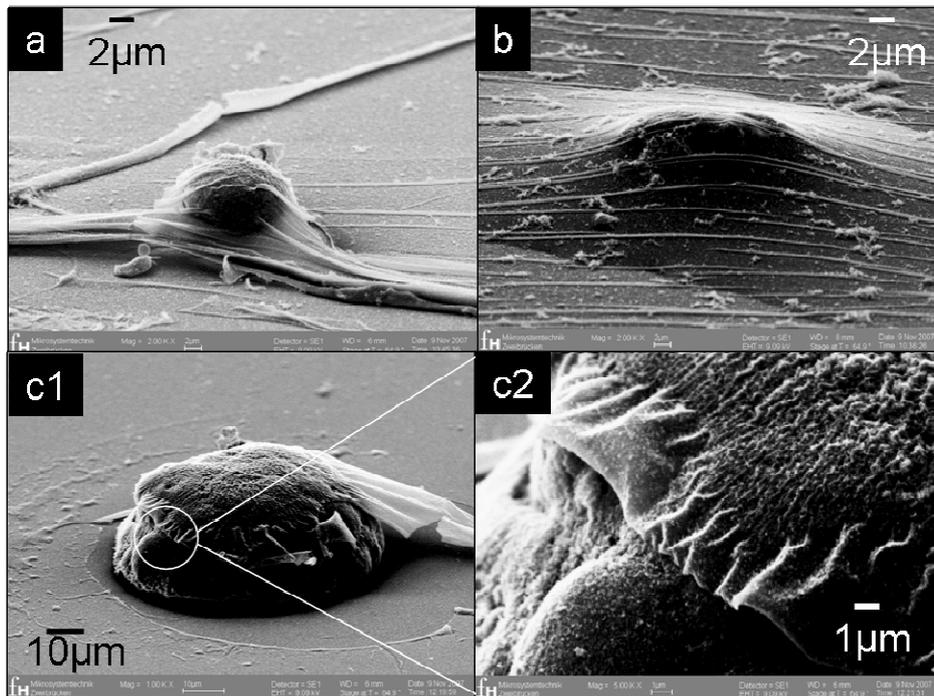
Native Alginatschichten hemmen die Adhäsion von Zellen wie in Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25 deutlich zu erkennen ist (in Übereinstimmung mit Zimmermann et al. 2007, Oberfläche vorn Alginatsheets). Zuerst wurde ein Teil der Kulturplatte mit Alginat beschichtet (blaue Schicht) und danach PC-3 Zellen zugegeben. Nach Übernachtskultur zeigte sich, dass die Zellen sich überwiegend neben dem Alginat angesiedelt hatten. Wenige, einzelne Zellen hatten sich auf der Alginatschicht angeheftet, jedoch nicht ausgebreitet (Abbildung 4.25). Die Grenze der Alginatschicht ist durch die Alcianblaufärbung und die klare Grenze der Zellbesiedelung definiert. Die Zellen sind vital, wie eine Vitalitätsfärbung zeigte (Abbildung 4.25). Möglicherweise durch Synerese des Alginats bei der Polymerisation ergaben sich oft Alginatschichten mit „fransigen“ Rändern (Abbildung 4.26). Behandelt man eine Alginatschicht erneut mit PLL können darauf Zellen angesiedelt und diese erneut mit Alginat beschichtet werden. Da die Schichten sehr dünn sind kann die Oberflächenstruktur der Zellen im REM durch die Schicht erkannt werden was die Identifizierung von einzelnen Zellen unter Alginatschichten erleichtert (Abbildung 4.26). Die manuelle Beschichtung lässt wenig Kontrolle über die Schichtdicke zu so dass sehr dünne (Abbildung 4.27 a) oder eher dicke (Abbildung 4.27 b) Alginatschichten entstehen können.



**Abbildung 4.25:** REM-Aufnahme einer PC-3 Zelle auf einer Alginate beschichteten Oberfläche. Die Zelle ist vital, wie an der vorausgehenden Vitalitätsfärbung (a) und den intakten Mikrovilli (b) zu erkennen ist, aber nicht auf der Oberfläche ausgebreitet. Native Alginateoberflächen von UHV-CG Alginaten hemmen Adhäsion von Zellen (s.h. auch Zimmermann et al. 2007).



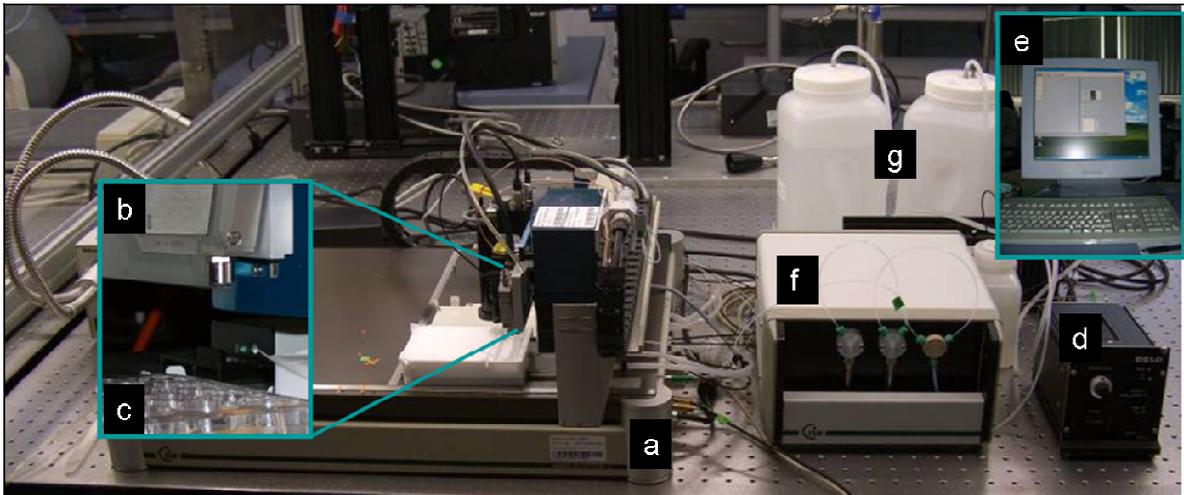
**Abbildung 4.26:** PC-3 Zellen zwischen zwei Alginatschichten. Zellen wurden auf Poly-L-Lysin behandelte Oberfläche ausgesät und mit einer weiteren Alginatschicht bedeckt. Deutlich zu erkennen ist in a2 die fransige Struktur der Alginatgrenzfläche, die auch im Lichtmikroskop mit Alcianblaufärbung zu sehen ist (a1), und einige, von Alginat bedeckte, Zellen (weiße Pfeile), von denen einige stärker vergrößert in b1 und b2 dargestellt sind. Ebenfalls zu erkennen ist in a2 in der Mitte eine beginnende Ablösung der oberen Alginatschicht.



**Abbildung 4.27:** PC-3 Zellen zwischen zwei Alginatschichten. Zellen wurden auf Poly-L-Lysin behandelte Oberfläche ausgesät und mit einer weiteren Alginatschicht bedeckt. Alginatschichten neigen an den Rändern zur Ablösung (a) und können unterschiedlicher Dicke sein. In a und b sind eine sehr dünne und eine dickere Alginatschicht über einer Zelle dargestellt. Ob Alginatschichten in Flüssigkeit reißen können wie in c1 und c2 dargestellt oder dies ein Präparationsartefakt ist, konnte nicht geklärt werden. Auch die Dicke der Alginatschicht, die sich nach Präparation und Trocknung auf  $< 1\mu\text{m}$  beläuft, bedarf noch der Prüfung ebenso das Vorkommen paralleler linienartiger Strukturen wie in (b).

Weitere Artefakte entstehen durch beginnende Ablösung von Alginatschichten die durch, z.B. starke Strömungen beim pipettieren entstehen können (Abbildung 4.27 a2 Mitte). Ob Alginatschichten auch im hydrierten Zustand reißen, wie in Abbildung 4.27 c1 und c2 gezeigt, oder dies ein Präparationsartefakt ist konnte bisher nicht geklärt werden. Auch die Messung der Schichtdicke aus den REM-Abbildungen die (im dehydrierten Zustand) unter  $1\mu\text{m}$  betragen kann, muss kritisch hinterfragt werden. In Abbildung 4.27 b sind ausgeprägte regelmäßige Linien zu sehen. Ähnliche Strukturen werden in geringerer Anzahl und Regelmäßigkeit öfter vorgefunden. Es könnte sich dabei um Falten oder lokale Verdickungen in der Alginatschicht handeln, die durch die Synerese bei der Polymerisation entstehen. Da diese Strukturen bisher nicht in AFM-Messungen vorgefunden wurden könnte es sich allerdings auch um ein Trocknungsartefakt handeln.

Die Dispensierung von Alginat zum Zweck der Beschichtung adhärenter Zellen auf Oberflächen ist mit einer Pipette (z.B. Eppendorf) möglich, aber die Schichtdicke lässt sich nur schwer einstellen. Zum exakten Dispensieren kleinster Alginattropfen ( $\mu\text{l}$ - bis  $\text{nL}$ -Bereich) wurde daher in Zusammenarbeit mit der GeSim der piezoelektrische Alginatdispenser entwickelt. Das Grundgerüst bildet ein PC-gesteuerter Nanoplotter (2.1), während der Dispensorkopf von DELO® bezogen wurde (Abbildung 4.28). Der Dispensorkopf ist druckluftunterstützt, geeignet für hochviskose Flüssigkeiten, leicht zu reinigen und zu sterilisieren.



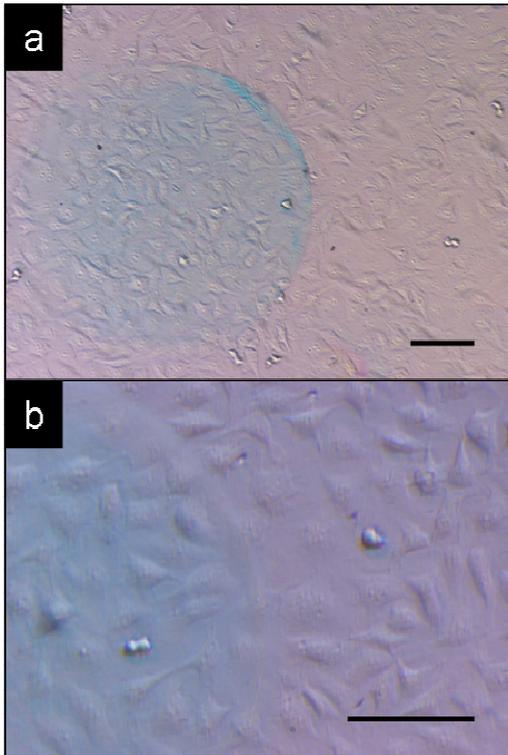
**Abbildung 4.28:** Alginatdispenser. Grundgerüst bildet der Nanoplotter 2.1 (GeSIM) (a), ausgestattet mit einem piezoelektrischen Dosierkopf von DELO (b), der über der Probe, hier einer Multiwellplatte (c), positioniert wird. Zum Dosieren hoch viskoser Flüssigkeiten wird der Dosierkopf von Druckluft unterstützt (d). Für Wasch- und Spülschritte sowie für die Anwendung einer piezoelektrischen Pipette wird der Diluter (f) benötigt sowie Vorrats- und Abfallflaschen für Wasser (g). Der Alginatdispenser ist PC-gesteuert (e).

Erste Versuche an fixierten Zellen belegten eine gute Dispensierbarkeit von Alginat im Bereich von 20 – 240nl, was eine Spotgröße von ca. 100 – 500 $\mu$ m ergab (Tabelle 4.3 und Abbildung 4.29). Ebenso zeigte sich, dass die PLL-Beschichtung auch für das automatisiert dispensierte Alginat geeignet ist. Eine häufige Beobachtung war, dass beim Dispensieren einzelner Tropfen neben einem „Hauptspot“ einer oder mehrere, wesentlich kleinere Satellitenspots entstanden. Bei den ersten Versuchen an lebenden L929 Zellen wurde jedoch schnell offenbar, dass es mit dem Alginatdispenser auch möglich ist, Zellen gezielt zu töten oder abzulösen und so genannte „splash erosion“ durchzuführen. Durch eine Anpassung der Geräteparameter, vor allem die Regulation von Druck und Spannung am piezoelektrischen Dispensierkopf, konnte die Aufprallgeschwindigkeit dermaßen gedrosselt werden, dass selbst empfindliche Zellmonolayer nicht beschädigt wurden.

**Tabelle 4.3:** Durchschnittliche Tropfengröße abhängig von Oberflächenmaterial und Abstand \*

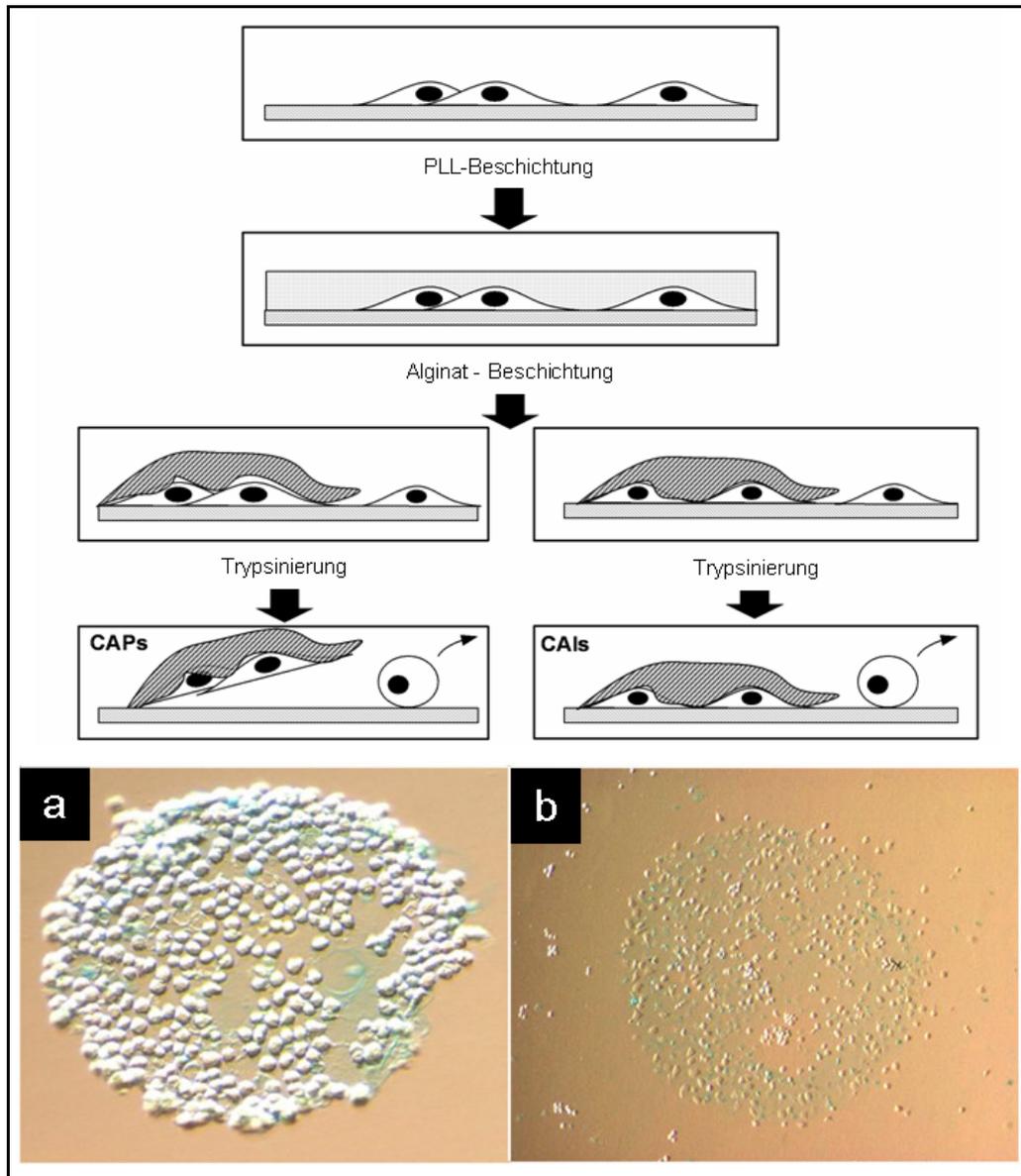
Abstand [mm]	Polystyren [mm <sup>2</sup> ]	Glas [mm <sup>2</sup> ]	Poly-L-Lysin [mm <sup>2</sup> ]
5	0.03 $\pm$ 0.01	0.90 $\pm$ 0.25	2.26 $\pm$ 0.24
7	0.03 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.32	1.55 $\pm$ 0.40
15	0.01 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.16	0.89 $\pm$ 0.23

\*Tabelle aus Gepp et al. 2008



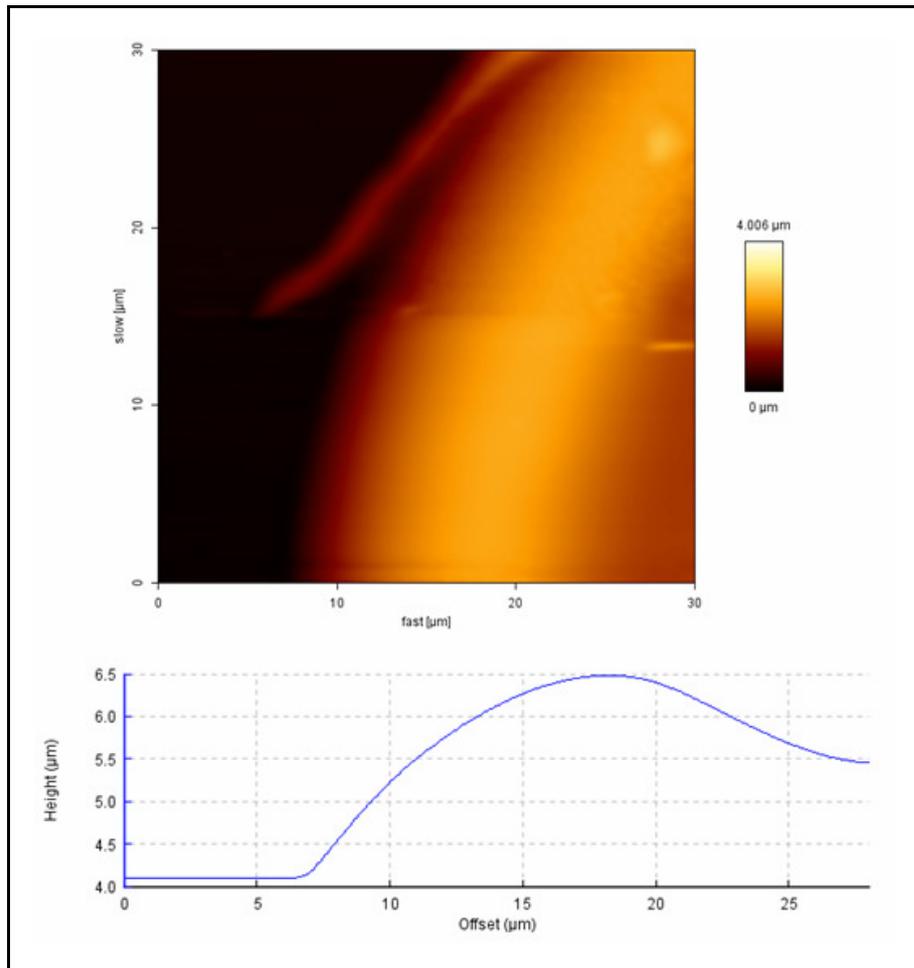
**Abbildung 4.29:** Mit dem Nanoplotter applizierte Alginattropfen auf fixierte L929 Zellen in unterschiedlichen Vergrößerungen. Alginat wurde zur besseren Sichtbarkeit mit Alcianblau gefärbt. Der schwarze Balken entspricht 100 $\mu$ m.

Nachdem es nun möglich ist, adhärente Zellen mit Alginat zu beschichten, stellte sich die Frage, wie weit sich das Alginat präparativ wieder entfernen lässt. Zunächst wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die behandelten Zellen mit der auch zum enzymatischen Ablösen von Zellen verwendeten Mischung aus Trypsin und EDTA inkubiert wurden. Es zeigte sich, dass Bariumalginat weitgehend stabil bleibt, jedoch ließen sich je nach Behandlung die Alginatspots oder die unbeschichteten Zellen um die Spots selektiv ablösen. Nach kurzer Inkubationszeit (ca. 2min) können durch sanftes Abspülen die den Alginatspot umgebenden Zellen abgelöst werden während der Spot mit den darunter liegenden Zellen verbleibt. Durch längere Inkubationszeiten (ca. 5min) und stärkeres Abspülen konnten sowohl Einzelzellen als auch Alginatspots abgelöst werden, wobei die Zellen unter dem Spot am Alginat haften blieben (Abbildung 4.30). Das selektive Ablösen von nicht-beschichteten Zellen stellt eine nützliche Methode dar, um räumlich definierte Kokulturen zu schaffen. Ebenso können mit der Ablösung von adhären Zellen, die ihre räumliche Verteilung durch Haftung am Alginatspot behalten, zelluläre Strukturen übertragen werden. Anwendung könnte diese Technik z.B. in der Übertragung von vordefinierten neuronalen Netzwerken von Kulturoberflächen auf elektronische Bauteile genutzt werden.



**Abbildung 4.30:** Oben: Schematische Darstellung der Technik von zellulärer Strukturbildung und -übertragung mit Alginatspots. Nach Aufbringen von Alginatspots auf adhärenente Zellen wird Trypsin/EDTA zugegeben. Durch Dauer der Inkubation und Spülintensität kann der Alginatspot, zusammen mit den darunter liegenden Zellen, entweder abgelöst werden oder auf der Oberfläche verbleiben, während lediglich die umliegenden, nicht von Alginat bedeckten Zellen abgelöst werden. a: komplett abgelöster Alginatspot mit anhaftenden Zellen (ein so genannter CAP (Zell - Alginat - Patch)); b: am Substrat haftender Alginatspot, ein CAI (Zell - Alginat - Insel), wobei umliegende Zellen großteils abgelöst wurden (Abb. verändert aus Gepp et al. 2007).

Die räumliche Struktur von Alginatspots wurde mit AFM und CLSM – Techniken untersucht. Diese Techniken haben den Vorteil, dass Alginat nicht präpariert und getrocknet werden muss, was zu Artefakten führen kann. Aus den AFM Messdaten zeigte sich, dass die Alginatspots eine überwiegend klar definierte räumliche Begrenzung aufweisen (Abbildung 4.31) während an einigen Stellen an der Spotgrenze ein immer flacher werdendes „Auslaufen“ des Spots zu beobachten war.

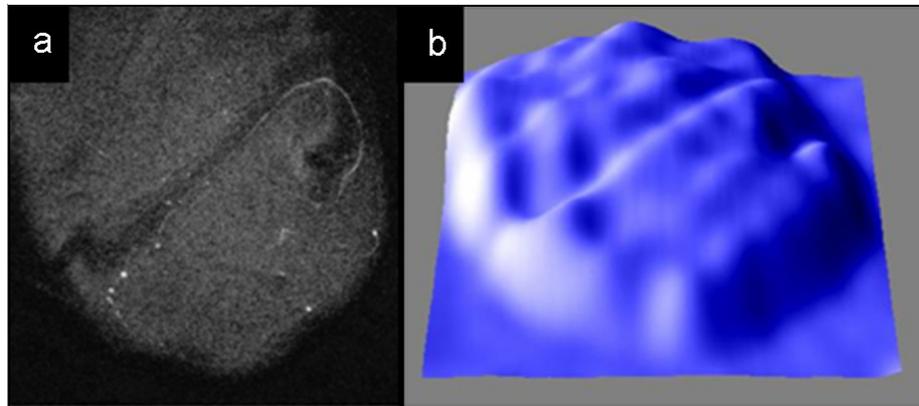


**Abbildung 4.31:** Untersuchungen der räumlichen Struktur von Alginatspots mittels Rasterkraftmikroskopie. Deutlich zu erkennen ist ein höherer Randbereich, der in einen etwas flacheren Innenbereich übergeht. Aufgrund des Offsets von  $4\mu\text{m}$  kann eine Höhe des Alginatspots von  $2,5\mu\text{m}$  bzw.  $1,5\mu\text{m}$  angegeben werden (AFM Aufnahme Felix Wählich).

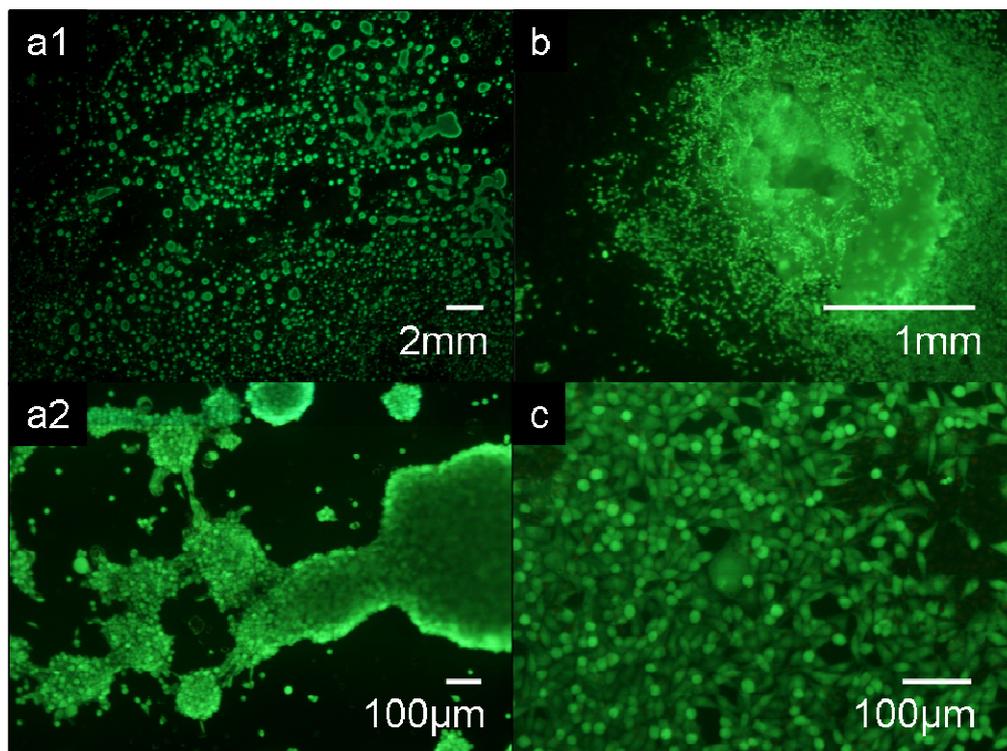
Eine vollständige Abbildung des Spots war mittels AFM-Technik nicht möglich, da die Spots zu groß (bzw. die Höhenunterschiede zu groß) für das AFM waren. Durch die Messung an den Randbereichen der Alginatspots lässt sich die Höhe von ca.  $2\mu\text{m}$  abschätzen, was in etwa den elektronenmikroskopisch ermittelten Schichtdicken entspricht. Eine vollständige Abbildung eines Satellitenspots konnte mittels CLSM erstellt werden. Dazu wurden dem Alginat fluoreszierende Nanopartikel zugemischt und die räumliche Struktur aus den Schnittbildern errechnet (Abbildung 4.32).

Natives Alginat hemmt zwar die Adhäsion von Zellen (Abbildung 4.33 a), lässt sich aber durch verschiedene Methoden so modifizieren, dass Zellen adhären. Bereits bekannt ist die Behandlung mit Fibronectin oder die Ankopplung von Peptiden an Alginat (Rowley et al. 1999). In Versuchen zeigte sich, dass ebenso die Aufrauung der Oberfläche, z.B. durch einen Partikelstrahl (Abbildung 4.33 c), zur verbesserten Adhäsion von Zellen führt. Als Partikel wurde im Versuch Reinigungspulver für die Zahnmedizin (auf Natriumhydrogenkarbonat-Basis) verwendet. Die Oberfläche von Alginatsheets konnte damit großflächig behandelt werden (ca.  $5 \times$

10cm), was die Adhäsion im Vergleich zum unbehandelten Sheet stark verbessert. Ebenso konnten durch den Partikelstrahl Löcher in Alginatsheets eingebracht werden, deren Lumen zur Adhäsion von Zellen gut geeignet war (Abbildung 4.33 b).

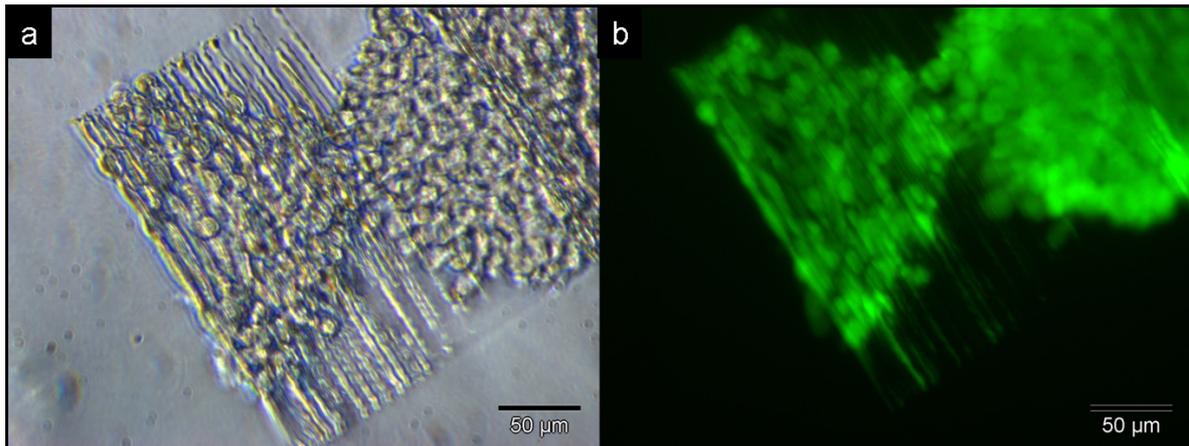


**Abbildung 4.32:** Untersuchungen der räumlichen Struktur von Alginatspots mittels CLSM. Gezeigt wird ein kleiner Satellitenspot. Dem Alginat wurden fluoreszierende Nanopartikel beigemischt und aus den einzelnen z-Schnitten (a) eine 3D Konfiguration (b) errechnet (CLSM Aufnahme Daniel Dörr).

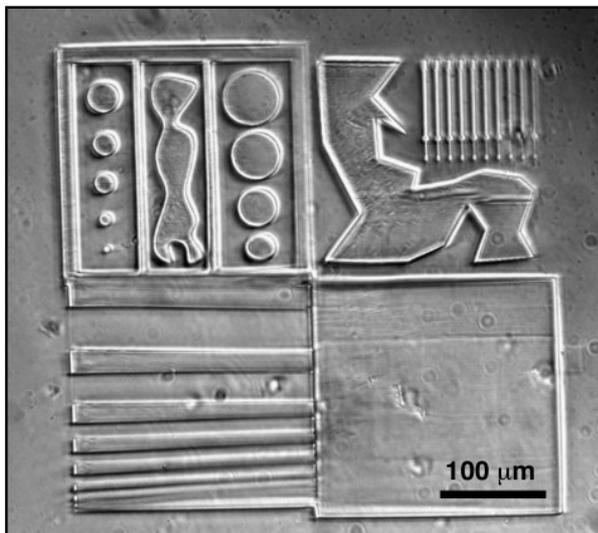


**Abbildung 4.33:** a1 und a2: Unbehandelte Kontrolle, L929 Zellen wurden auf nativer Alginatoberfläche (Sheet) ausgesät und über Nacht kultiviert. b: Ein, durch Partikelstrahl verursachtes, Loch im Alginatsheet bietet L929 Zellen gute Anheftungsmöglichkeiten; c: Durch Partikelstrahl gleichmäßig aufgeraute Oberfläche, die gleichmäßig mit Zellen bewachsen ist (11,25x Vergrößerung).

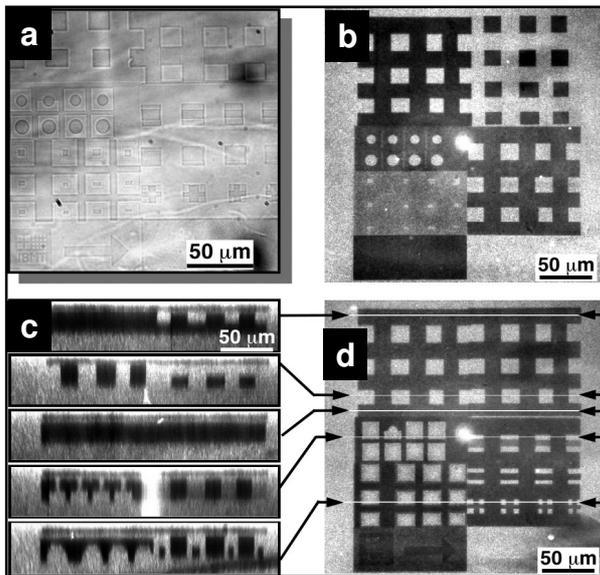
Eine Methode, die besonders exakte Strukturen und gute Zellverträglichkeit aufweist, ist die Photoablation durch Multi-Photonen-Absorption. Es zeigte sich, dass Alginatsheets auf diese Weise mit Oberflächenstrukturen versehen werden können, die Anheftungsmöglichkeiten für Zellen bieten. Im Versuch zeigte sich, dass sich Zellen bevorzugt auf der Struktur anhaften und ihre Filopodien in Richtung der Linien ausstrecken (Abbildung 4.34). Die Form der Strukturen ist frei programmierbar und offen für vielfältige Anwendungen in der Zellkulturtechnik, wie Abbildung 4.35 zeigt.



**Abbildung 4.34:** Zellen haften sehr schlecht auf nativer Alginatoberfläche. Die linienartige Strukturierung mittels Photoablation schafft die notwendige Rauigkeit. a: Zellen auf strukturierter Oberfläche (Phasenkontrastaufnahme); b: Dieselbe Stelle nach FDA/EB Färbung (Fluoreszenzmikroskopieaufnahme). Die intensiv grüne Fluoreszenz spricht für lebende Zellen.

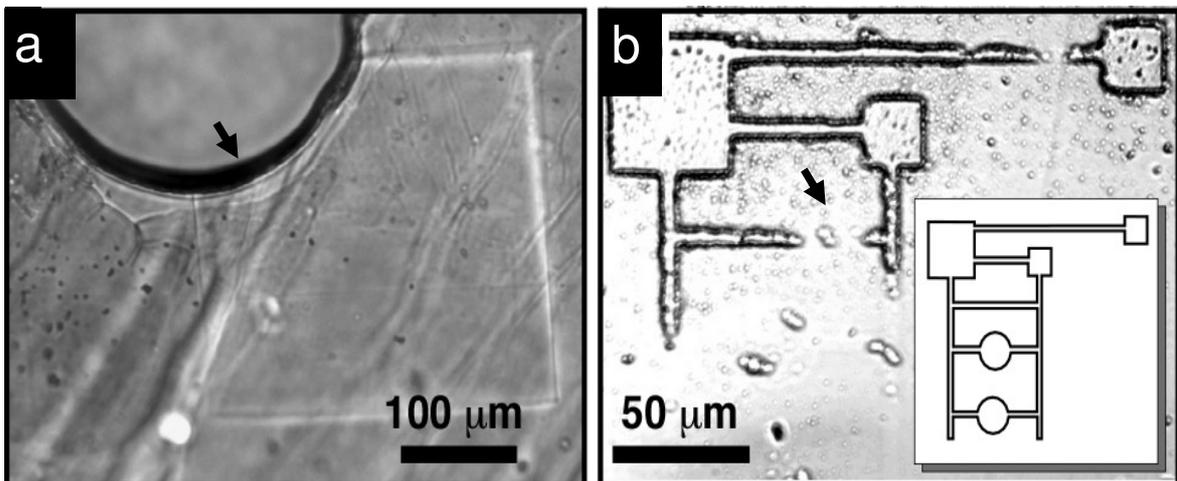


**Abbildung 4.35:** Alginat Sheet, dessen Oberfläche durch Photoablation strukturiert wurde. Die Form der Struktur ist frei programmierbar. (Abb. aus Ehrhart et al. 2007)



**Abbildung 4.36:** 3D Strukturierung in einem Alginatevolumen. a) zeigt einen lichtmikroskopischen Überblick über die Struktur. b)-d) wurden mittels LSM (laser-scanning microscopy) aufgenommen, wobei lichtbrechendes Material (Alginate) hell, heraus gelöste Hohlräume schwarz erscheinen. (Abb. aus Ehrhart et al. 2007)

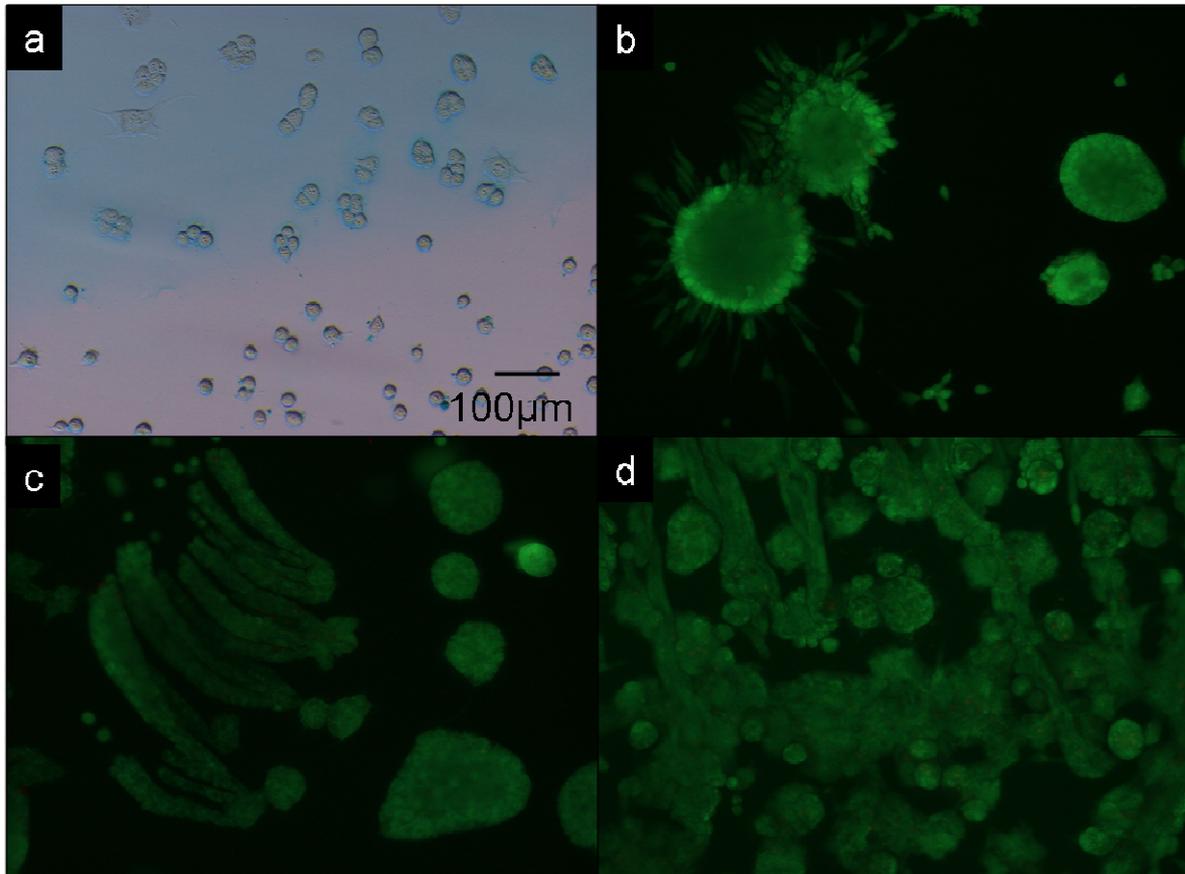
Mittels Photoablation können nicht nur oberflächige Strukturen in Alginate geschaffen werden, sondern auch innerhalb eines Alginatevolumens. Hohlräume unterschiedlicher Größe und Form können in einer Dimension von ca. 10µm in Alginate „gebrannt“ werden (Abbildung 4.36). Die Wahl der Intensität des Lasers spielt eine entscheidende Rolle bei der Exaktheit der Strukturen. Zu hohe Intensität führt zu lokalen Verbrennungen des Materials, d.h. es wird zuviel Alginate entfernt, während zu niedrige Intensität eine geringere strukturierende Wirkung hat, die das geplante Muster unvollständig lässt. Beide Effekte mindern die Exaktheit der Struktur (Abbildung 4.37).



**Abbildung 4.37:** Fehlerquellen beim Strukturieren: a) zu hohe Intensität führt zu Verbrennungen (schwarzer „Ring“, markiert von einem Pfeil), b) zu niedrige Intensität führt zu unvollständigen Strukturen (Pfeil: Unterbrechung in der Struktur). Das kleine Bild zeigt die geplante Struktur. (Abb. aus Ehrhart et al. 2007)

#### 4.1.4 Untersuchungen an Zellen auf bzw. unter Alginatschichten

Nachdem die grundlegenden Techniken und Methoden zur Verkapselung adhärenter Zellen erstellt und deren Vitalität unmittelbar nach der Verkapselung gewährleistet wurden, soll im folgenden Kapitel das Wachstum und Verhalten von Zellen unter Alginatschichten näher untersucht werden.

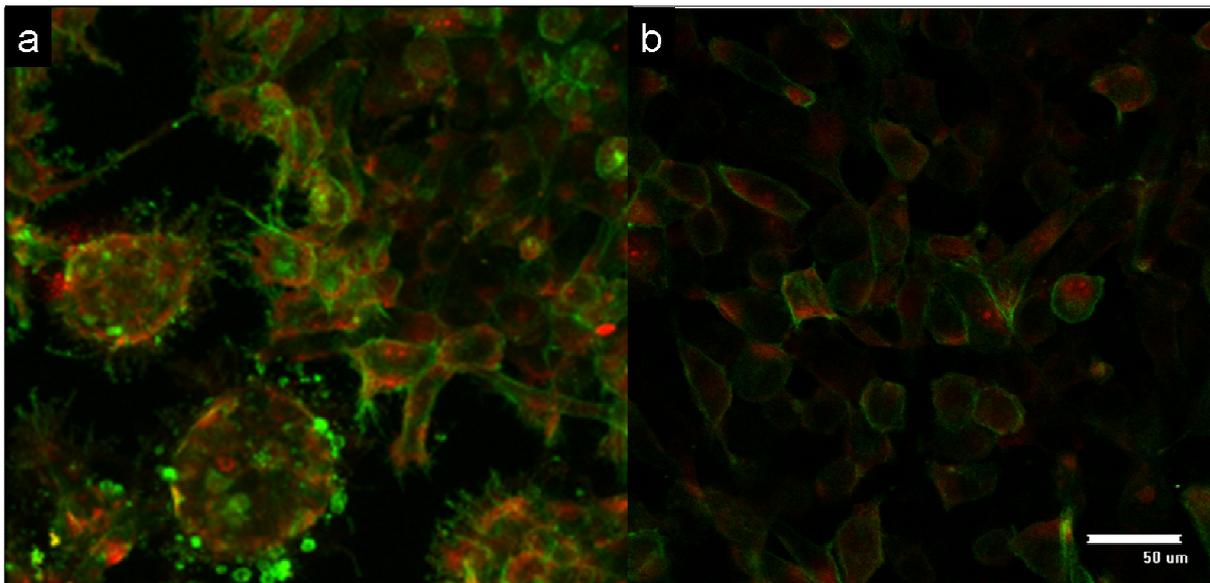


**Abbildung 4.38:** Koloniebildung von L929 Zellen unter einer Alginatschicht. a: Tag 1 Alcianblaufärbung nach der Beschichtung; es ist bereits zu erkennen, dass sich Zellen, die sich geteilt haben, nicht voneinander trennen. b-d: Vitalitätstest (Fluoreszenz) Tag 7 nach der Beschichtung; Die Zellen bilden bei hoher Vitalität runde (b), längliche (c) oder, bei sehr hoher Dichte, gemischte (d) Kolonien.

L929 Zellen wurden in geringer Dichte auf PLL beschichteter Zellkulturoberfläche ausgesät, mit Alginat beschichtet und kultiviert. Bereits am folgenden Tag war zu erkennen, dass sich Zellen nach der Mitose nicht trennen, sondern nebeneinander verbleiben (Abbildung 4.38 a). In Langzeitinkubationsversuchen zeigte sich durch Zeitrafferaufnahmen sogar, dass die zwei aus der Mitose hervorgehenden Zellen exakt denselben Platz einnehmen, wie die einzelne Zelle zuvor (Gepp et al. eingereicht 2008). Die Alginatschicht hat also eine stark migrationseinschränkende Wirkung. Nach 7 Tagen Kultivierung haben sich deutlich abgegrenzte Kolonien in unterschiedlichen Formen gebildet, die entweder rund, länglich oder eine Mischform darstellen. Angenommen wird, da das Wachstum von L929 Zellen nicht kontaktinhibiert ist, dass die Zellen im Laufe

der Zeit das Alginat nach und nach verdrängen. Möglicherweise wird dies durch eine leichte Aufweichung des Alginats im Kulturmedium unterstützt.

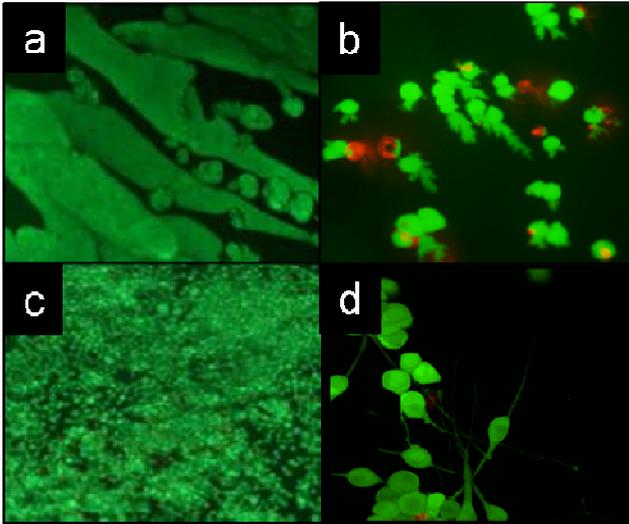
Eine Zytoskelettfärbung mit BODYPY® (und eine Kernfärbung mit Ethidiumbromid zur Lokalisation der Zellen) wurde durchgeführt, um eine mögliche Veränderung des Zytoskeletts der Zellen zu untersuchen. Das fertige Präparat wurde im CLSM betrachtet und fotografiert. In Abbildung 4.39 ist deutlich zu erkennen, wie die Zellen unter der Alginatschicht Kolonien bilden. Besonders auffällig ist die Bildung feiner Auswüchse aus den gleichmäßig rund erscheinenden Kolonien, ebenso wie die runden, vesikelartigen Akkumulationen von Zytoskelett am Rande der Kolonien. Möglicherweise deutet dies auf feine Spalten und Ritzen in der Alginatschicht hin.



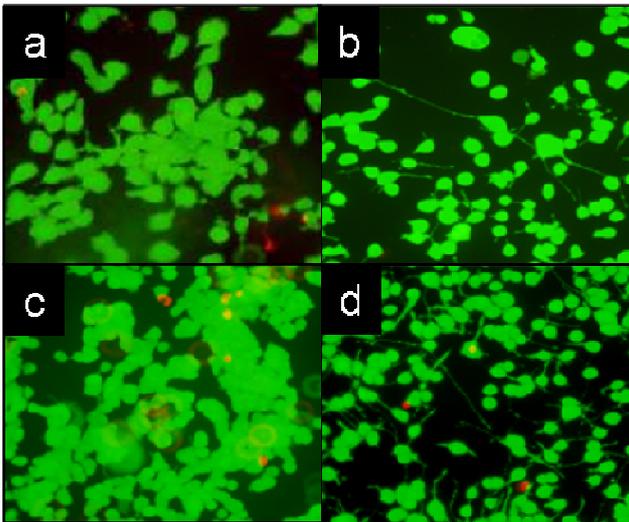
**Abbildung 4.39:** L929 Zellen nach 7d Kultur a) unter Alginat (Pipettenauftragung) und b) außerhalb der Alginatschicht. Die Zytoskelettfärbung wurde mit BODYPY® und Kernfärbung mit Ethidiumbromid-Homodimer durchgeführt und am CLSM betrachtet. Deutlich zu erkennen ist die Koloniebildung unter dem Alginat, während die Zellen außerhalb des Alginats homogen verteilt sind und sich flächig auf der Kulturoberfläche angeheftet haben.

Die migrationseinschränkende Wirkung der Alginatschicht konnte auch an N2a – Zellen beobachtet werden. Nach 7 Tagen Kultivierung (ohne Zugabe von Retinsäure) konnte ebenfalls Koloniebildung beobachtet werden (Abbildung 4.40). Die Zugabe von Retinsäure bewirkt eine Differenzierung von N2a Zellen in Richtung Neuronen. Die Zellen stellen die Zellteilung ein, bilden im Laufe von 7 Tagen Neuriten aus und exprimieren Neurofilament. Unter einer Alginatschicht konnte zwar nur eine schwache Ausbildung von Neuriten beobachtet werden und auch der Nachweis von Neurofilament über Immunfärbung war negativ (die Ursache könnte auch durch die Antikörper blockierende Wirkung der Alginatschicht bedingt sein), aber es kam eindeutig zur Hemmung der Mitose (Abbildung 4.40 b und d). Die Zellen zeigten nach der Beschichtung mit Alginat sowohl nach 1 Tag als auch nach 7 Tagen in Kultur hohe Vitalität (Malpique et al. eingereicht 2008).

Ebenfalls gute Kultivierungserfolge wurden erzielt, wenn die N2a Zellen nicht auf einer PLL-Schicht, sondern auf Matrigel kultiviert wurden (Abbildung 4.41). Die Kultivierung auf Matrigel ist im Zusammenhang mit der Kryokonservierung von adhärenenten Zellen von Bedeutung (s.h. auch Kapitel 4.2.3).



**Abbildung 4.40:** N2a Zellen kultiviert auf einer PLL-beschichteten Oberfläche unter Alginate, wobei bei a und b die Alginatzugabe am Tag 1 bei c und d am Tag 7 erfolgte. In den Proben b und d wurde durch Zugabe von Retinsäure Differenzierung ausgelöst.

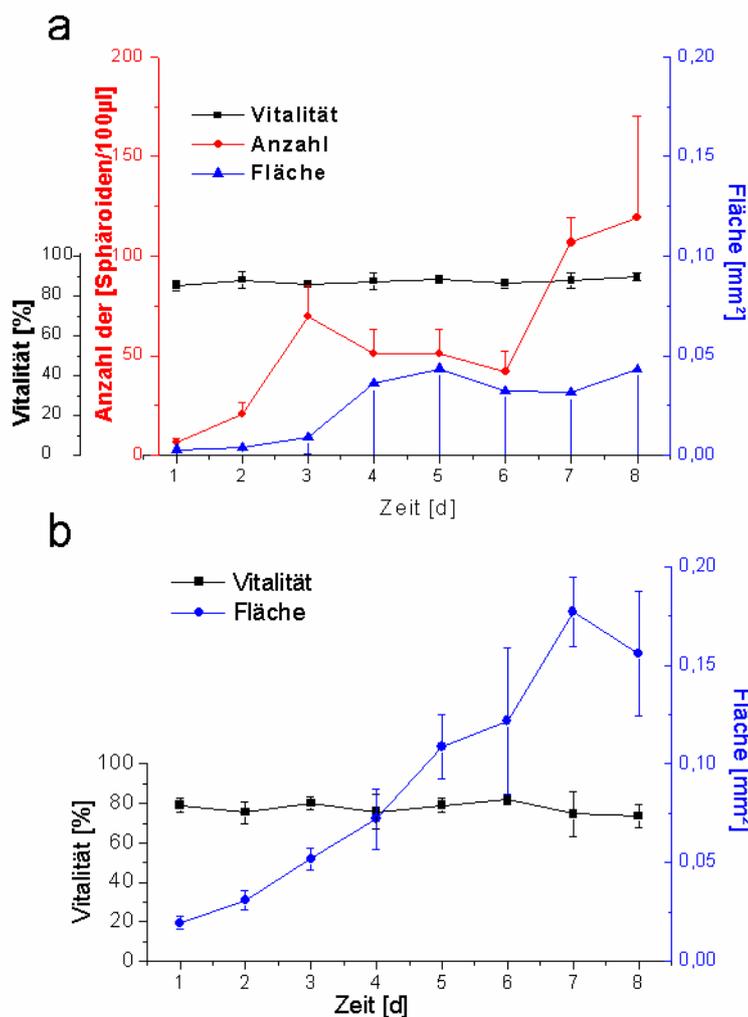


**Abbildung 4.41:** N2a Zellen kultiviert auf einer Matrigel beschichteten Oberfläche unter Alginate, wobei bei a und b die Alginatzugabe am Tag 1, bei c und d die Alginatzugabe am Tag 7 erfolgte. In den Proben b und d wurde die Differenzierung durch Retinsäure ausgelöst. (Abbildungen teilweise entnommen aus Malpique et al. 2008)

## 4.2 Immobilisierung in der Kryobiologie

Ziel war es, neue Erkenntnisse zur Kryokonservierung multizellulärer Systeme, vor allem medizinisch interessante Gewebe (Tumor, Langerhanssche Inseln) und mit Hydrogelmatrizen immobilisierte Zellen (3D Kapsel und 2D Beschichtung), zu gewinnen und diese zur Optimierung der Kryokonservierungstechniken und -protokolle einzusetzen. Zunächst wurde die Entwicklung von Gewebemodellen, Sphäroiden, untersucht und diese im direkten Vergleich zu Einzelzellen systematisch unterschiedlichen Kryokonservierungsprotokollen unterzogen. Ebenso systematisch wurden verkapselte Systeme untersucht und es wurden bedeutende Unterschiede und Gemeinsamkeiten in der Kryotoleranz abhängig von der Kulturform gefunden und experimentell belegt.

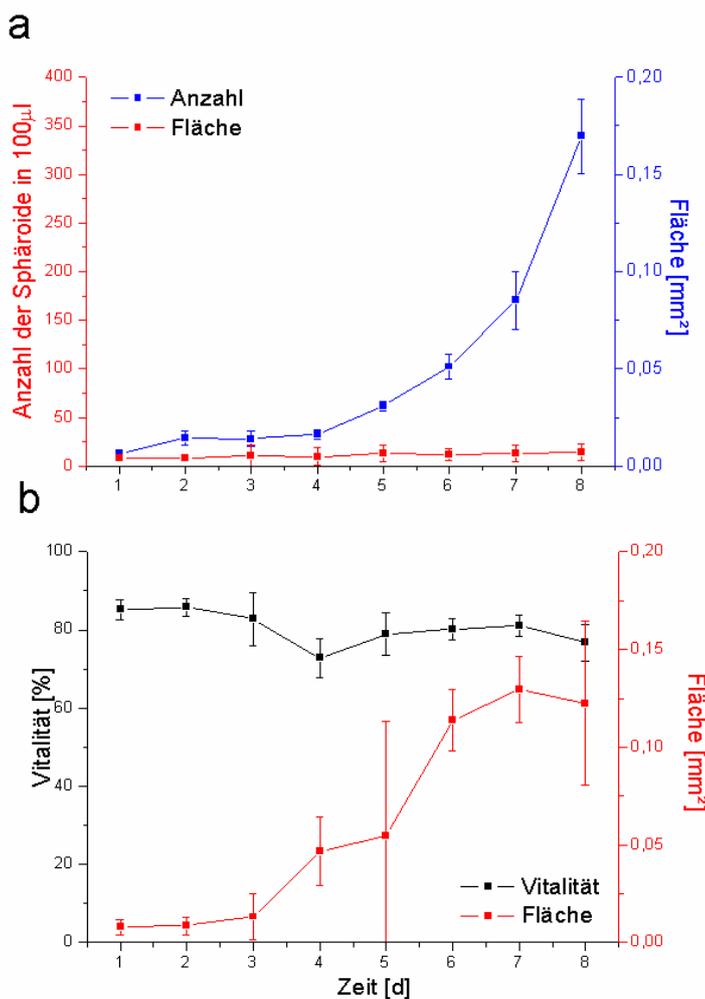
### 4.2.1 Kryokonservierung humaner Tumore für diagnostische Zwecke



**Abbildung 4.42:** Bestimmung von Vitalität (Vitalfärbung), Anzahl (Zahl der Sphäroide/100µl) und Fläche (Bildbearbeitung) von L929 Sphäroiden (Ansatz mit  $1 \times 10^4$  Zellen/ml); a: FS; b: HD. (Abb. aus Ehrhart et al. 2008) (n=3)

Um die Entwicklung von Sphäroiden zu untersuchen wurden, typische Parameter wie Vitalität, Sphäroidzahl und –größe bestimmt, wobei die Anzahl bei „hanging drop“ Sphäroiden (HD) aufgrund der Herstellungsmethode stets gleich bleibt und daher nicht dargestellt wird. In 3 unabhängigen Experimenten zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen. Die Unterschiede lagen in den Größenordnungen von Größe und Anzahl der Sphäroide, jedoch nicht in der Tendenz zur Größen- bzw. Anzahlzunahme. Daher werden graphisch nur die Ergebnisse eines Experiments dargestellt.

Die Vitalität von L929 Sphäroiden, die als freie Sphäroide (FS) oder „hanging drop“ (HD) in einer Petrischale angesetzt werden, blieb über den Versuchszeitraum von 8 Tagen konstant hoch (Abbildung 4.42). Ebenso konnte eine stetige Zunahme der Sphäroidgröße festgestellt werden, die bei den HD konstant bis Tag 7 zunimmt und an Tag 8 leicht zurückgeht, während die Größe der FS zwar mittelwertig konstant bleibt, aber die Tendenz hin zur Entstehung sehr großer und sehr kleiner Sphäroiden geht, was an der Zunahme der Standardabweichung zu erkennen ist. Bei FS ist ab dem ersten Tag die Entstehung von Sphäroiden zu beobachten. Das starke Schwanken in der Anzahl der FS über den Versuchszeitraum lässt sich auf zwei Effekte zurückführen: das Verschmelzen von kleinen Sphäroiden zu Großen (bzw. das bei Zeitrafferaufnahmen im In-

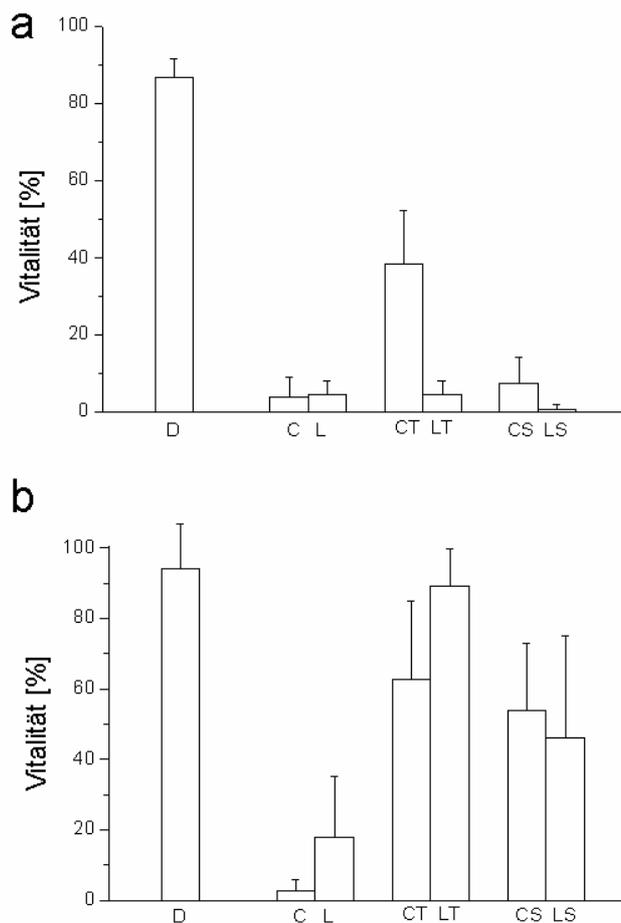


**Abbildung 4.43:** Bestimmung von Vitalität (Vitalfärbung) Anzahl (Zahl der Sphäroide/100µl) und Fläche (Bildbearbeitung) von PC-3 Sphäroiden (Ansatz aus  $1 \times 10^4$  Zellen/ml); a: FS; b: HD (n=3)

kubationsmikroskop beobachtete „Schlucken“ von kleinen Sphäroiden durch große) und das parallele Neuentstehen von kleinen Sphäroiden aus Einzelzellen.

Die Vitalität von PC-3 Sphäroiden (Abbildung 4.43) lag bei den FS ebenfalls konstant um die 80%, so dass sie nicht graphisch dargestellt wurde. Ähnlich wie bei L929 Sphäroiden nimmt die Anzahl der Sphäroide über den Versuchszeitraum kontinuierlich zu, wobei weniger Schwankungen beobachtet wurden und die FS insgesamt sehr klein geblieben sind. Die HD dagegen zeigen eine stärkere Größenzunahme. Nachdem die Wachstumscharakteristiken untersucht wurden, wurde als Zeitraum für optimales Wachstum und Vitalität der Zeitraum zwischen 3-5 Tagen nach dem Start der Kultur festgelegt. Sphäroide für die Kryokonservierung wurden in diesem Zeitraum geerntet.

Zunächst soll jedoch die Kryokonservierung von L929 Zellsuspensionen untersucht werden. L929 Zellsuspension wurde mit verschiedenen Kryomedien entweder im miniaturisierten Substrat oder im 1ml Kryoröhrchen eingefroren. Die Vitalität wurde unmittelbar nach dem Auftauen durch lebend-tot – Färbung bestimmt (FDA/EB). Kryokonservierung von L929 Zellsuspension war in einem Medium aus 5% Me<sub>2</sub>SO und 95% Kulturmedium (10% FBS) in miniaturisierten Mikro-Kryosubstraten am erfolgreichsten (94,3% ±12,5%) (Abbildung 4.44 und Tabelle 4.4). Vergleichbare Vitalitäten (89,1% ±10,7%) ließen sich mit einer Mischung aus Liforlab und Tre-



**Abbildung 4.44:** L929 Zellsuspension: Vitalität nach Einfrieren in verschiedenen Kryomedien (D = Kulturmedium mit 5% Me<sub>2</sub>SO; C = Kulturmedium; L = Liforlab; T = Trehalose; S = Stärkehydrolysat); a: 1ml Kryoröhrchen; b: IBMT-Kryosubstrat (n=3)

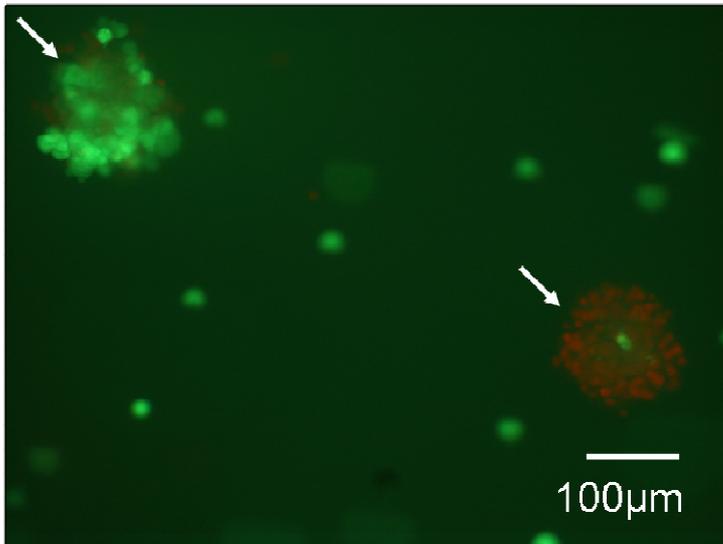
halose erreichen, aber nur im miniaturisierten Kryosubstrat. Im 1ml Kryoröhrchen konnte lediglich mit Kulturmedium und Trehalose eine Vitalität von über 10% erreicht werden ( $38,3\% \pm 13,9\%$ ), während im miniaturisierten Substrat nur mit Kulturmedium allein sehr schlechte Vitalitäten erzielt (Abbildung 4.44) wurden.

L929 Sphäroide unterscheiden sich als multizelluläre Systeme deutlich von Zellsuspensionen, was sich in der Kryokonservierbarkeit mit unterschiedlichen Kryomedien niederschlägt. Die besten Ergebnisse in Bezug auf die Vitalität der L929 – Sphäroide wurden durch Verwendung von Liforlab mit 5%igem Zusatz von Stärkehydrolysat (SHP) als Gefriermedium und miniaturisierten Kryosubstraten als Einfriergefäß erzielt:  $70\% \pm 26\%$  (Tabelle 4.5, Abbildung 4.46 und Abbildung 4.47). Eine ebenfalls gute Vitalität nach dem Auftauen lieferte eine 1:1 Mischung aus Liforlab und Trehalose (Lösung) ( $65\% \pm 29\%$ ) in miniaturisierten Kryosubstraten und Kulturmedium mit 5% Me<sub>2</sub>SO in miniaturisierten Kryosubstraten ( $61\% \pm 25\%$ ) oder 1ml Röhrchen ( $70\% \pm 19\%$ ). Reine Liforlab – Lösung erwies sich als mäßig gutes Kryoprotektivum mit einer Vitalität von  $44\% \pm 35\%$  (miniaturisiertes Kryosubstrat) bzw.  $24\% \pm 22\%$  (1ml Röhrchen) an L929 Sphäroiden. Auffällig war ebenso, dass sich als Trägerlösung für Kryoprotektiva wie Trehalose oder SHP Liforlab als deutlich besser geeignet zeigte als das Standard L929 – Kulturmedium.

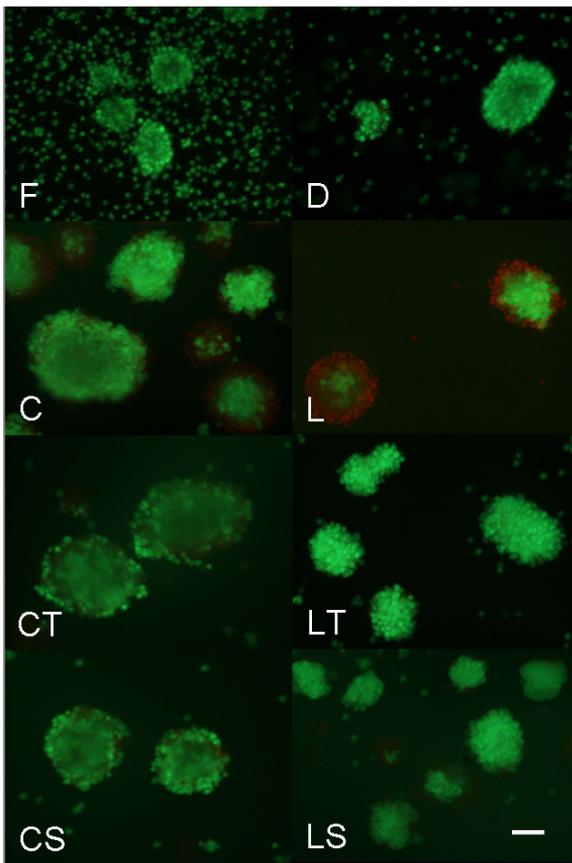
**Tabelle 4.4:** Vitalität von L929 Zellsuspension nach dem Einfrieren in verschiedenen Kryomedien und – gefäßen (n=3)

	Mikro – Kryosubstrat [%]	1ml Kryoröhrchen [%]
<b>D</b>	94,3 ± 12,5	86,8 ± 5,0
<b>C</b>	2,1 ± 3,1	3,5 ± 4,8
<b>L</b>	17,9 17,2	4,6 ± 3,6
<b>CT</b>	62,6 ± 22,3	38,3 ± 13,9
<b>LT</b>	89,1 ± 10,7	4,6 ± 3,6
<b>CS</b>	48,6 ± 22,1	7,2 ± 6,5
<b>LS</b>	46,2 ± 28,9	0,8 ± 1,4

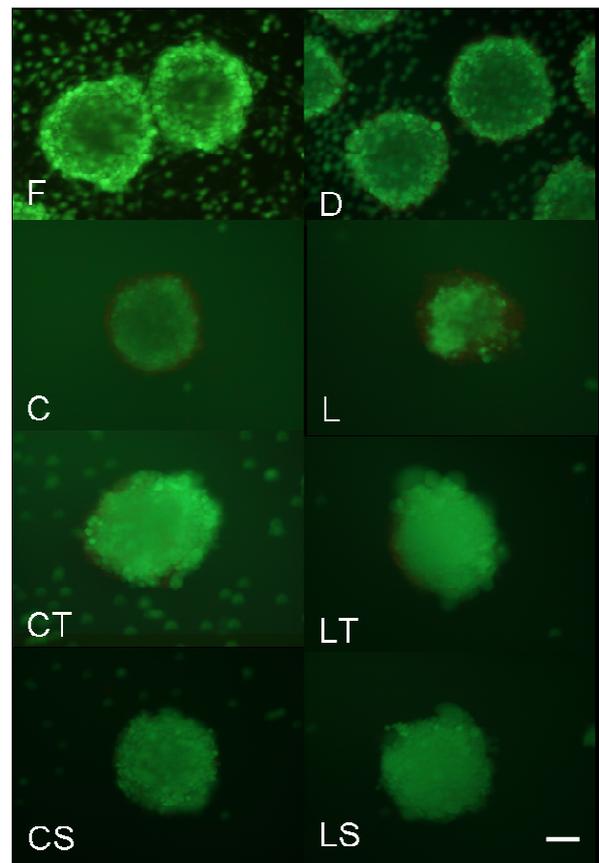
Die hohen Standardabweichungen von bis zu 29% erklären sich zum einen durch die unterschiedlichen Ausgangsbedingungen vor dem Einfrieren, die durch unkontrollierbare Kultivierungsbedingungen beeinflusst gewesen sein könnte. Es lassen sich beispielsweise deutlich „bessere“ und „schlechtere“ Chargen unterscheiden. Es kam vor, dass in einem Versuch (z.B. L929 Sphäroide Versuch Nr. 13) Sphäroide in Kulturmedium mit Vitalitäten von 39% bis 85% überlebten und allgemein hohe Vitalitäten zeigten, während in anderen (L929 Sphäroide Versuch Nr. 4) Vitalitäten von 0% - 1,5% in LS (und generell in allen Kulturmedien niedrige Vitalitäten) bestimmt wurden. Auch zwischen den einzelnen Sphäroiden einer einzigen Probe gab es starke Unterschiede (s.h. Abbildung 4.45).



**Abbildung 4.45:** „freie“ Sphäroide, eingefroren in Kulturmedium mit Trehalose (Versuch Nr. 13), Vitalfärbung mit FDA und EB (lebend = grün, tot = rot) Gezeigt werden 2 Sphäroide (weiße Pfeile) und einige Einzelzellen. Obwohl diese beiden Sphäroide sehr stark unterschiedlich vital sind stammen, sie aus derselben Probe.



**Abbildung 4.46:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von frischen und aufgetauten L929 FS, gefärbt mit FDA und EB (grün = lebend, rot = tot); der weiße Balken entspricht 100μm. (Abb. aus Ehrhart et al. 2008)



**Abbildung 4.47:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von frischen und aufgetauten L929 HD, gefärbt mit FDA und EB (grün = lebend, rot = tot); der weiße Balken entspricht 100μm.

**Tabelle 4.5:** Vitalität frischer und aufgetauter L929 Sphäroide im Vergleich (n= 3 – 13)

	<b>FS Mikro- Kryosubstrate [%]</b>	<b>FS 1ml Kryoröh- rchen [%]</b>	<b>HD Mikro- Kryosubstrate [%]</b>	<b>HD 1ml Kryoröh- rchen [%]</b>
<b>F</b>	84 ± 5		84 ± 4	
<b>D</b>	64 ± 24	80 ± 8	57 ± 27	55 ± 21
<b>C</b>	31 ± 29	32 ± 34	20 ± 29	20 ± 29
<b>L</b>	46 ± 37	13 ± 17	40 ± 29	38 ± 20
<b>CT</b>	55 ± 38	38 ± 36	33 ± 34	32 ± 25
<b>LT</b>	61 ± 32	60 ± 32	75 15	66 ± 15
<b>CS</b>	52 ± 30	68 ± 20	34 ± 48	41 ± 30
<b>LS</b>	70 ± 26	53 ± 39	69 ± 26	77 ± 9

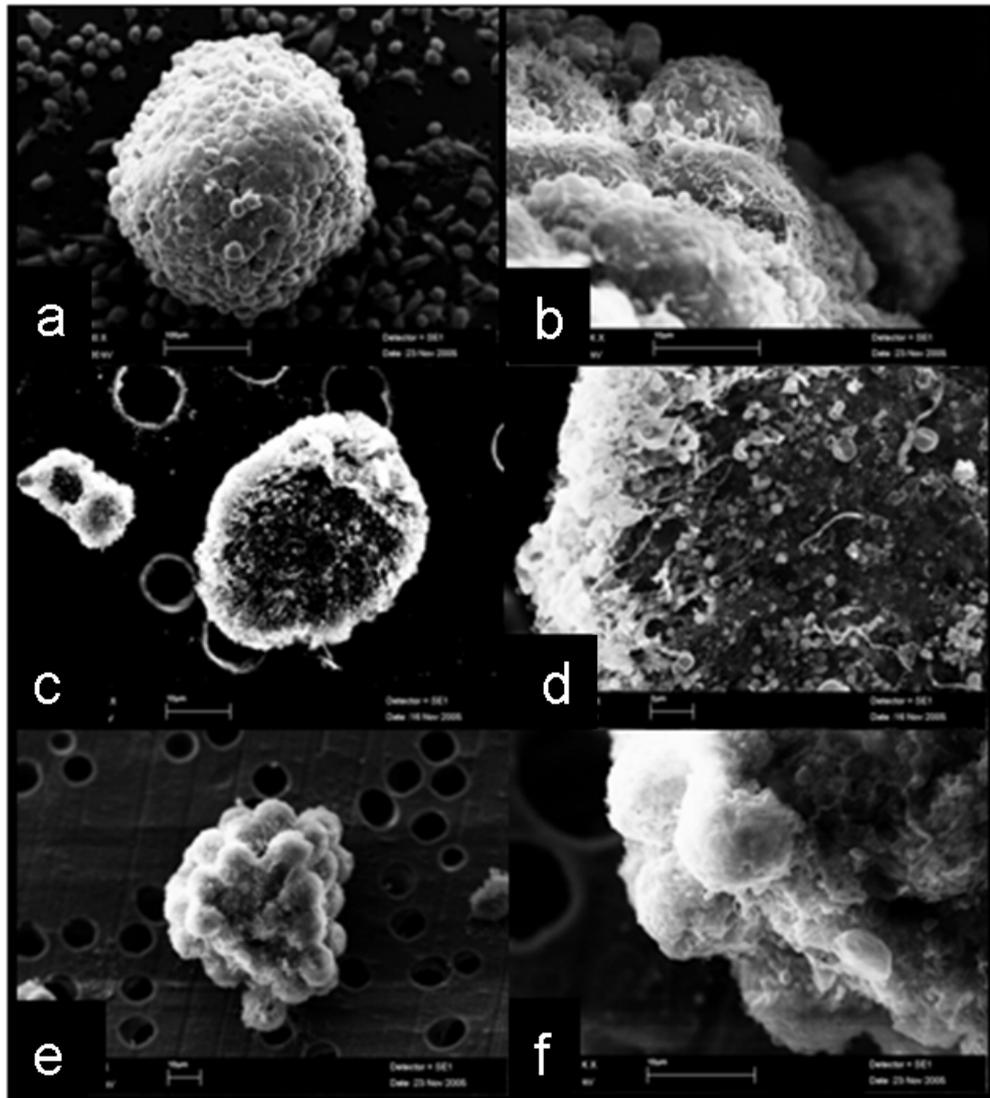
Im Gegensatz zu L929 Zellsuspensionen besteht für Sphäroide, als multizelluläre Systeme, nicht nur die Gefahr des Zelltods, sondern auch die des Verlusts der strukturellen Integrität durch Fragmentierung. Die Fragmentierung der Sphäroide wird am REM untersucht. In REM Aufnahmen (Abbildung 4.48) lassen sich ebenfalls Aussagen über die Vitalität der Sphäroide machen, indem der Zustand der Zellmembran (Mikrovilli-Besatz, vesikuläre Ausstülpungen) und Zell-Zell Kontakte betrachtet wird. Dies dient zur Gegenkontrolle der Vitalitätsfärbung.

Frische HD sind in Form und Abmessungen gleichartig. Die Zell – Zell – Kontakte sind sehr dicht und die Oberfläche ist mit Mikrovilli bedeckt (Abbildung 4.48 a und b). Frische FS sind in Form und Abmessung unterschiedlich, was durch ihre weniger kontrollierte Herstellung zu erwarten ist. Sie zeigen im Gegensatz zu den HD weniger dichte Kontakte zwischen den Zellen. An einigen Stellen auf der Oberfläche hat Ablösung der Zellen stattgefunden, doch die Oberfläche ist mit Mikrovilli bedeckt, was auf einen guten Zustand der Zellen hinweist.

Nach der Kryokonservierung der FS in Kulturmedium mit 5% Me<sub>2</sub>SO, ist die Integrität der Sphäroide gut erhalten. Die Oberfläche hat sich teilweise geglättet, d.h. die Mikrovilli sind verschwunden, was auf Schwankungen im osmotischen Gleichgewicht verursachte Schädigung des Zytoskeletts zurückzuführen ist. In Liforlab eingefrorene Sphäroide zeigen deutliche Änderungen in der Struktur der Oberfläche (z.B. „Löcher“) und dem Zusammenhalt der Zellen in den Sphäroiden. FS, in Liforlab mit Trehalose eingefroren, zeigen eine leicht veränderte äußere Form, glatte Oberfläche, die frei von Mikrovilli ist, mit partieller Schädigung und Ablösung der Zellen. Einzelne Sphäroide sind allerdings vollkommen intakt geblieben. Beim Vitalitätstest zeigten Sphäroide in Liforlab mit 5% SHP eingefroren die besten Ergebnisse. Dies lässt sich auch durch die REM – Aufnahmen bestätigen. Die Sphäroide zeigen insgesamt sehr gut erhaltene Integrität und Oberfläche in Bezug auf Mikrovilli - Besatz und Zusammenhalt der Zellen (Abbildung 4.48 e und f).

Bei in Kulturmedium eingefrorenen Sphäroiden zeigt sich größenabhängig unterschiedliches Verhalten: die kleinen Sphäroide (ca. 30 µm) haben Integrität und Oberflächen - Merkmale weitgehend beibehalten, während die großen offensichtlich zerfallen sind. Nach dem Einfrieren in Kulturmedium mit Trehalose sind ebenfalls die größeren Sphäroide teilweise fragmentiert. Am Rand sieht man beginnende Ablösung von Zellen, die allein allerdings keine große Schädigung darstellt. Die Mikrovilli auf der Oberfläche sind nach dem Einfrieren noch gut sichtbar.

Nach der Kryokonservierung in Kulturmedium mit 5% SHP in 1ml Röhrchen ist die Integrität der Sphäroide zerstört. Es zeigen sich viele Vesikel auf der Oberfläche, die auf beginnende Apoptose hindeuten können. Nach der Kryokonservierung in Mikro-Kryosubstraten dagegen ist die Integrität und der Mikrovilli - Besatz der Sphäroide gut erhaltenen. Nach dem Auftauen von FS, die in IBMT - Substraten in Trehaloselösung eingefroren waren, ist eine massive Schädigung der Form und Oberfläche zu erkennen.

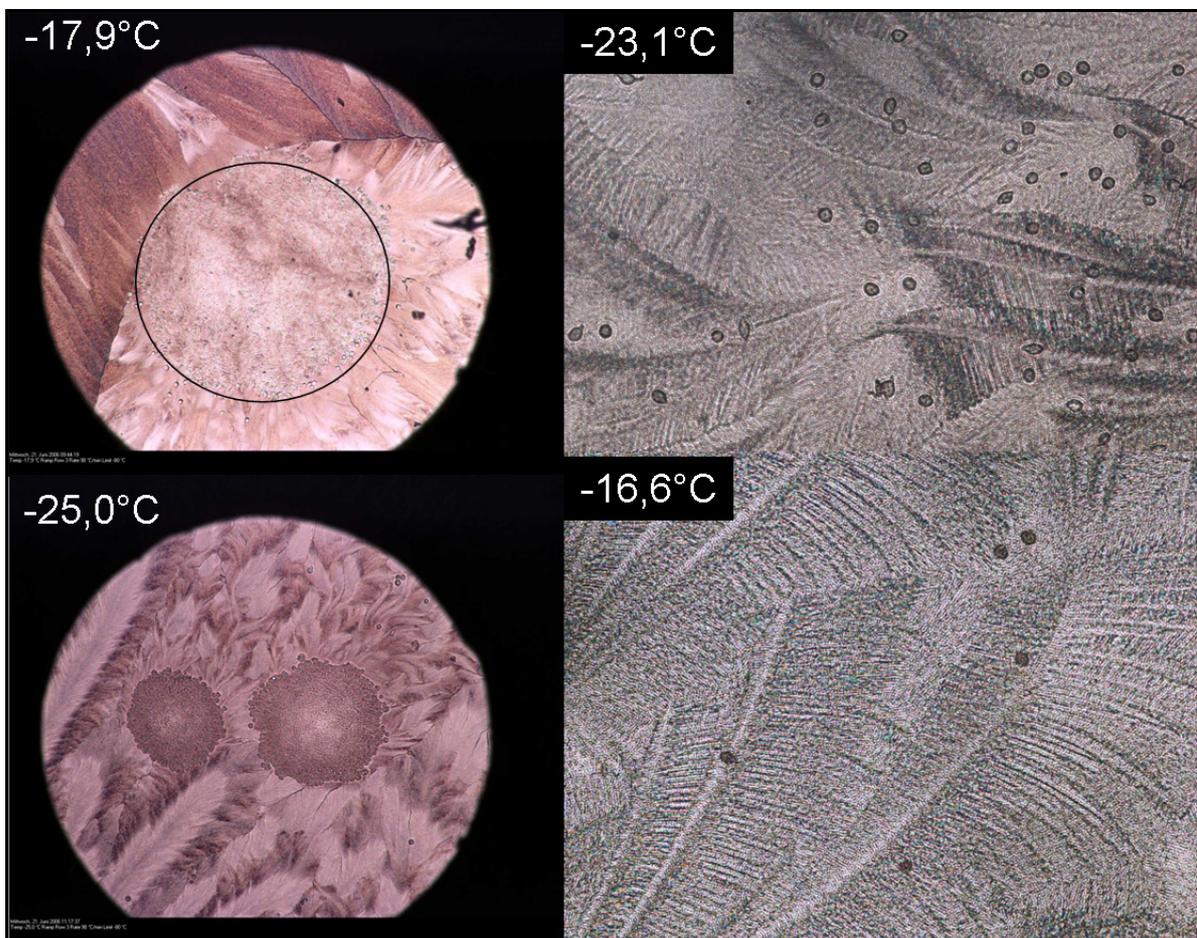


**Abbildung 4.48:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen frischer und kryokonservierter L929 Sphäroide: A und B: frische HD - Sphäroide A: vollständiger Sphäroid, B: Sphäroidoberfläche; C, D, E und F: Sphäroide nach der Kryokonservierung, C und D: Kulturmedium (schlechtestes Kryomedium im Versuch) E und F: Liferlab mit Stärkehydrolysat (bestes Kryomedium im Versuch) (Abb. aus Ehrhart et al. 2008)

Auf die Frage, warum Sphäroide so deutlich unterschiedliche Vitalitäten im Vergleich zu Zellsuspension und im Vergleich einzelner Versuche zeigen, wurde das Einfrieren am Kryomikroskop untersucht, um neue Erkenntnisse zur Eisbildung und dem Eiswachstum zu gewinnen.

Da der Gefrierprozess sehr schnell vonstatten geht, zu schnell für gewöhnliche Foto- oder Videokameras, wurde am Kryomikroskop eine Hochgeschwindigkeitskamera installiert. Nach entsprechenden Modifikationen an der Beleuchtung der Probe (die Belichtungszeit der Hochgeschwindigkeitskamera beträgt bei 1000 Bildern pro Sekunde (fps) etwa 1ms) konnte der Kristallisationsprozess aufgezeichnet werden.

Es zeigte sich, dass multizelluläre Systeme die Struktur des gefrierenden Wasser in ihrer Umgebung verändern, wie an Abbildung 4.49 deutlich zu erkennen ist. Im oberen Bild kam die Eisfront von links oben, im unteren von links unten. Gleichzeitig wird das Fortschreiten der Eisfront im Sphäroiden nicht verlangsamt, wie es z.B. bei Alginatkapseln der Fall ist (s.h. Abbildung 4.59). Einzelzellen bewirken, wie in Abbildung 4.49 rechts zu sehen ist, keine Veränderung in der Eiskristallstruktur.



**Abbildung 4.49:** Kryomikroskopische Aufnahmen von zwei (links) gefrorenen L929 HD – Sphäroiden (4x Vergrößerung, Quetschpräparate) und zwei Chargen L929 Einzelzellen (rechts) an der Gefrieretemperatur, die jeweils links oben im Bild angegeben ist. Deutlich zu erkennen ist, wie die dendritische Struktur von Eis, durch die Sphäroide „gebrochen“ wird, während sich keine Strukturveränderung, zumindest keine sichtbare, im Eis bei Einzelzellen ergibt. Eingefroren wurden die Zellen bzw. Sphäroide in Kulturmedium mit 5% Me<sub>2</sub>SO.

Im Folgenden soll nun auf PC-3 Zellen eingegangen werden, die ebenfalls adhärent wachsen und eine ähnliche Morphologie wie L929 besitzen, aber humane Prostatakarzinomzellen sind. PC-3 Zellen überleben zu  $96\% \pm 4,3\%$  die Kryokonservierung, wenn sie mit 5% Me<sub>2</sub>SO in Kulturmedium und in einem 1ml Kryoröhrchen eingefroren werden (s.h. Tabelle 4.6). Mit 74% bzw. 73% schneiden 5% Me<sub>2</sub>SO (oder Kulturmedium und Trehalose im miniaturisierten Substrat) etwa gleich hoch ab.

**Tabelle 4.6:** PC-3 Zellsuspension: Vitalität nach Einfrieren in verschiedenen Kryomedien. (n=3)

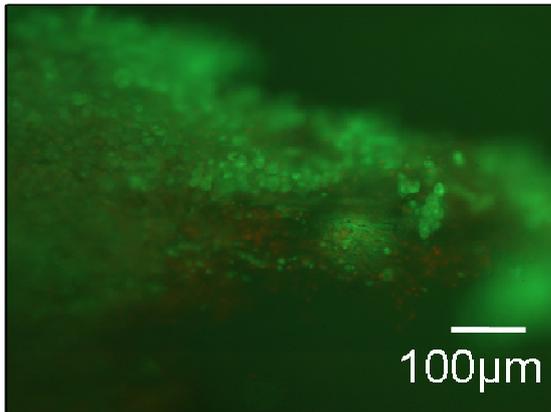
	Mikro – Kryosubstrat [%]	1ml Kryoröhrchen [%]
<b>D</b>	74,2 ± 30,0	96,3 ± 4,3
<b>C</b>	27,2 ± 12,6	11,7 ± 11,7
<b>L</b>	25,5 ± 25,3	23,8 ± 27,7
<b>CT</b>	73,4 ± 14,2	67,4 ± 10,0
<b>LT</b>	70,4 ± 20,6	45,2 ± 22,8
<b>CS</b>	43,0 ± 19,4	57,1 ± 13,9
<b>LS</b>	47,1 ± 18,7	20,3 ± 22,5

PC-3 Sphäroide wurden in der Spinnerflasche kultiviert, da HD und FS – Techniken keine mechanisch stabilen sphärischen Sphäroide ergab. Im Gegensatz zu L929 – Sphäroiden wurden bei PC-3 Sphäroiden (Tabelle 4.7) die besten Ergebnisse in der Vitalität durch die Kryokonservierung in Kulturmedium mit 5% SHP und in Kulturmedium mit 5% Me<sub>2</sub>SO, jeweils in 1ml Röhrchen, erreicht. Liforlab mit 5% SHP, das beste Kryoprotektivum bei L929 - Sphäroiden, erreichte bei PC-3 Sphäroiden  $70\% \pm 21\%$  in 1ml Röhrchen und  $47\% \pm 15\%$  in miniaturisierten Kryosubstraten.

**Tabelle 4.7:** Vitalität frischer und aufgetauter PC-3 SF - Sphäroide (n=3)

	Mikro – Kryosubstrate [%]	1ml Kryoröhrchen [%]
<b>F</b>	84 ± 10	
<b>D</b>	40 ± 20	84 ± 12
<b>C</b>	47 ± 35	61 ± 29
<b>L</b>	40 ± 18	10 ± 12
<b>CT</b>	62 ± 31	61 ± 34
<b>LT</b>	49 ± 27	51 ± 41
<b>CS</b>	67 ± 19	85 ± 11
<b>LS</b>	47 ± 15	70 ± 21

L929 und PC-3 Sphäroide sollten als Modellsysteme zur Evaluierung unterschiedlicher Kryoprotokolle im Hinblick auf verbesserte Kryokonservierung medizinisch relevanter Gewebe dienen. Die Verwendung von Modellsystemen soll den Verbrauch des wertvollen primären Materials begrenzen, jedoch ist es notwendig, die Kryoprotokolle auch am Primärmaterial zu testen. Verwendet wurden humane, solide Karzinomproben aus dem Ovar und der Mamma, die von der Universitäts-Frauenklinik Essen zur Verfügung gestellt wurden. Die Proben wurden in Liforlab transportiert und ca. 1 Tag nach der Entnahme verarbeitet.



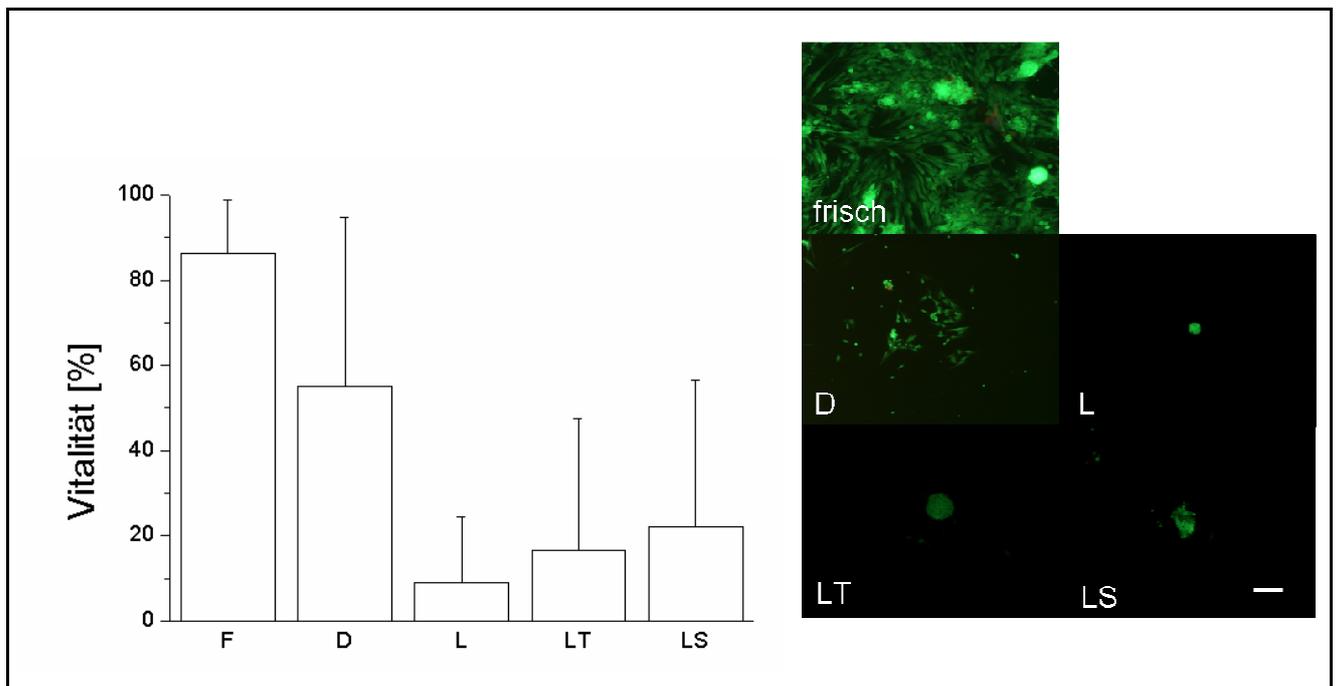
**Abbildung 4.50:** FDA/EB Färbung an einer 125 $\mu\text{m}$  dicken Scheibe eines humanen Ovarialkarzinoms. Zu erkennen ist die inhomogene Verteilung der Zellen und die teilweise großen Abstände zwischen den Zellen.

Bei der Kryokonservierung humaner solider Tumorstücke (1 x 1mm Fläche und ca. 150 $\mu\text{m}$  dick) musste auf eine andere Auswertungsmethode zurückgegriffen werden, da die Tumorstücke zu groß für die Bildbearbeitungsmethode waren und auch der Abstand der Zellen im Gewebe stark unterschiedlich war (Abbildung 4.50). Aus Tumorgewebe wird zu diagnostischen Zwecken oft eine Zellkultur angelegt, anhand derer z.B. Zytostatikaresistenzen untersucht werden. Daher fiel die Entscheidung zugunsten der erfolgreich etablierten Zellkultur als Erfolgsnachweis für Tumorgewebe.

Nach dem Auftauen wurden die Tumorstücke enzymatisch dissoziiert und die Zahl der lebenden und toten Zellen bestimmt. Die Vitalität stellt die Zahl der lebenden Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl (Lebende + Tote) in der Probe dar. Allerdings ist davon auszugehen, dass sich zumindest ein Teil der Zellen, die durch das Einfrieren bzw. Auftauen der Probe getöteten wurden, bereits komplett aufgelöst haben, denn zwischen dem Auftauen und dem Vitalitätstest der Zellsuspension vergehen ca. 40-48h. Aussagekräftiger dürfte daher die absolute Zahl der lebenden Zellen in der Probe nach der Dissoziation, die Überlebensrate, sein. Die Vitalität und Lebendzellzahl nach der Kryokonservierung variierten sehr stark je nach Tumor. Insgesamt am besten zeigte sich ein 10%iger  $\text{Me}_2\text{SO}$  – Zusatz zu Kulturmedium sowohl in der Vitalität (55,1%  $\pm$  40%) als auch Überlebensrate (25,8%  $\pm$  27%). Liforlab mit 5%igem N1 – Zusatz brachte nach  $\text{Me}_2\text{SO}$  die höchste Vitalität (s.h. Abbildung 5.1), während Liforlab mit Trehalose mit 16,6%  $\pm$  31% etwas weniger, aber mehr als reines Liforlab mit 9,1%  $\pm$  15%, Vitalität brachte.

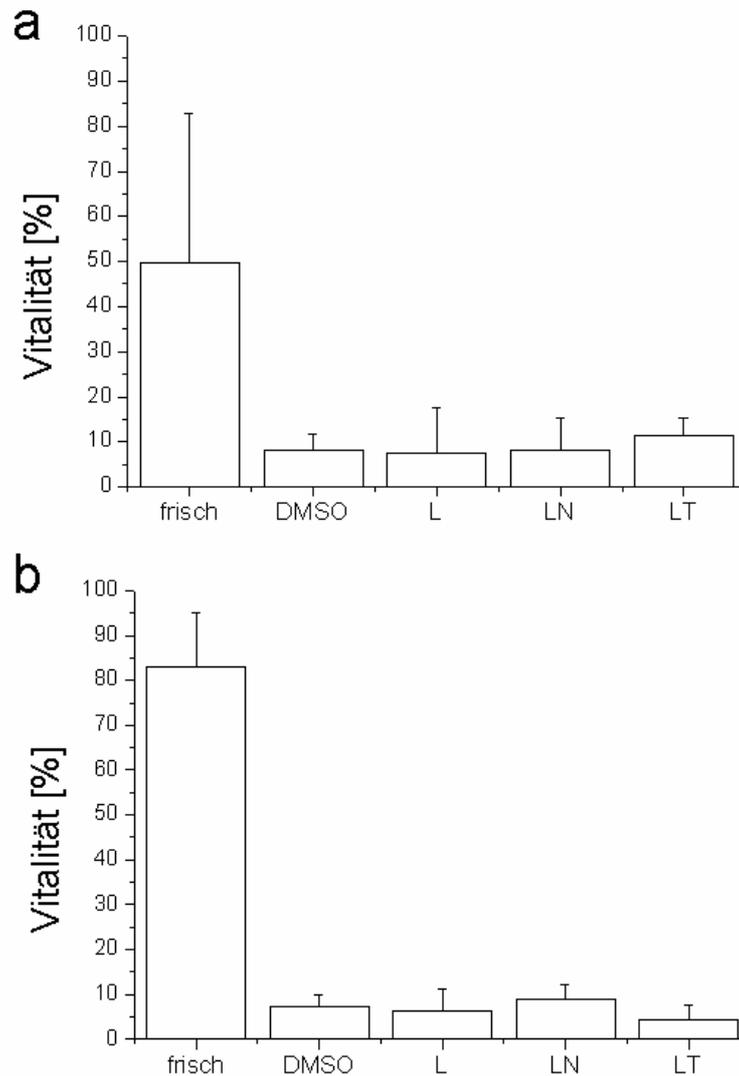
Der Kultivierungserfolg aus aufgetauten und kontrollweise frischen Tumorgewebeproben wurde anhand einer Kultivierung über 24 oder 48h auf Cellocates getestet. Als erfolgreiche Kultivierung wurde betrachtet, wenn sich hinreichend viele Zellen an die Oberfläche angeheftet hatten. Der Erfolg der Kryokonservierung von Tumoren ist sehr stark von Art und Zustand des Tumors abhängig. Beispielsweise konnten bei den Tumoren 5 und 8 nach der Kryokonservierung in fast allen Gefriermedien adhärenente Zellen vorgefunden werden, während bei den Tumoren Nr. 6 und 4 unabhängig vom Gefriermedium nur einzelne Zellen wuchsen. „Einzelne“ Zellen bedeutet, dass in der gesamten Probe weniger als 10 adhärenente Zellen gefunden wurden. Nach der Dissozi-

ierung des frischen Tumorstückes konnte stets ein Anwachsen der Tumorzellen in ausreichender Menge zum Start einer Kultur beobachtet werden (Abbildung 4.51). Nach der Kryokonservierung in 10% Me<sub>2</sub>SO in Kulturmedium konnten in 5 von 7 Fällen adhärente Zellen vorgefunden werden. Der Erfolg der auf Liforlab basierenden Gefriermedien variierte stark je nach Tumor. Insgesamt zeigte sich jedoch Liforlab mit Zusatz von 5% SHP besser als mit Trehalose und dieses wiederum besser als reines Liforlab.



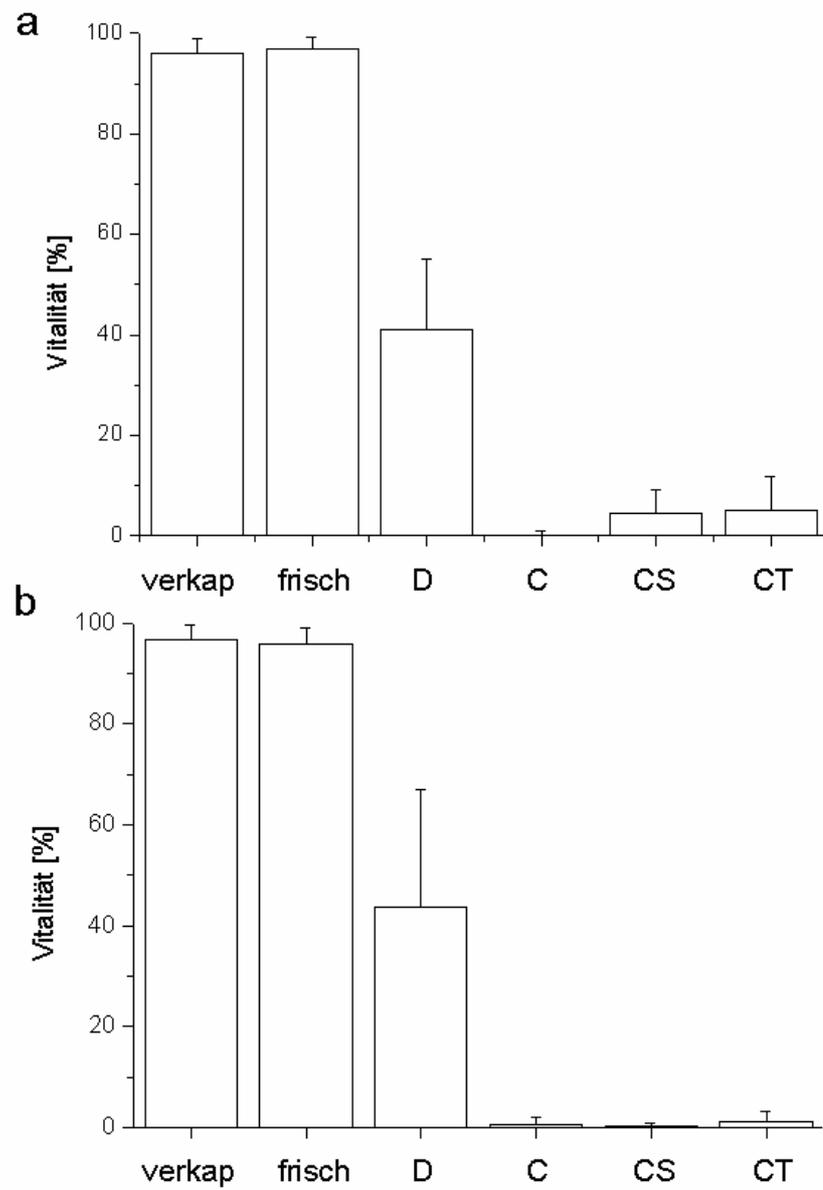
**Abbildung 4.51:** Links: Vitalität von primären humanen Karzinomzellen, die aus frischen und aufgetauten Tumorstücken (Ovarial- und Mammakarzinom) isoliert wurden; Rechts: Fluoreszenzaufnahmen der Zellen nach über Nacht Kultivierung auf Cellocates (FDA/EB – Färbung). Der weiße Balken entspricht 100µm. (n=8)

Insgesamt zeigten sich also deutliche Unterschiede in der Vitalität nach dem Auftauen zwischen Tumor und Modellsystem. Auch wenn die Proben nicht direkt miteinander vergleichbar sind, wegen der unterschiedlichen Auswertungsmethode, lässt sich sagen, dass das Tumorgewebe Me<sub>2</sub>SO mit deutlichem Abstand höhere Vitalitäten liefert als alle extrazellulären CPAs. Umgekehrt führten extrazelluläre CPAs bei Sphäroiden zu deutlich höheren Kryokonservierungserfolgen als Me<sub>2</sub>SO. Als Ursache für diese Unterschiede kommen nun entweder die unterschiedliche strukturelle Anordnung (Gewebe – Sphäroid) oder zellspezifische Unterschiede (Zytoskelett, hydraulische Leitfähigkeit) in Frage. Um dies zu klären, wurden aus Ovarial- und Mammakarzinom isolierten Tumorzellen Sphäroide kultiviert. Beide Techniken, FS und HD, zeigten sich dabei erfolgreich (Abbildung 4.52), während für einen Ansatz in der Spinnerflasche zu wenig Zellen vorhanden waren.



**Abbildung 4.52:** Vitalität von Sphäroiden aus Mammakarzinomzellen, frisch und aufgetaut nach dem Einfrieren mit diversen Kryomedien; a: HD-Sphäroide; b: freie Sphäroide; bzw. aus Ovarialkarzinomzellen, c: HD-Sphäroide; d: freie Sphäroide (n = 1)

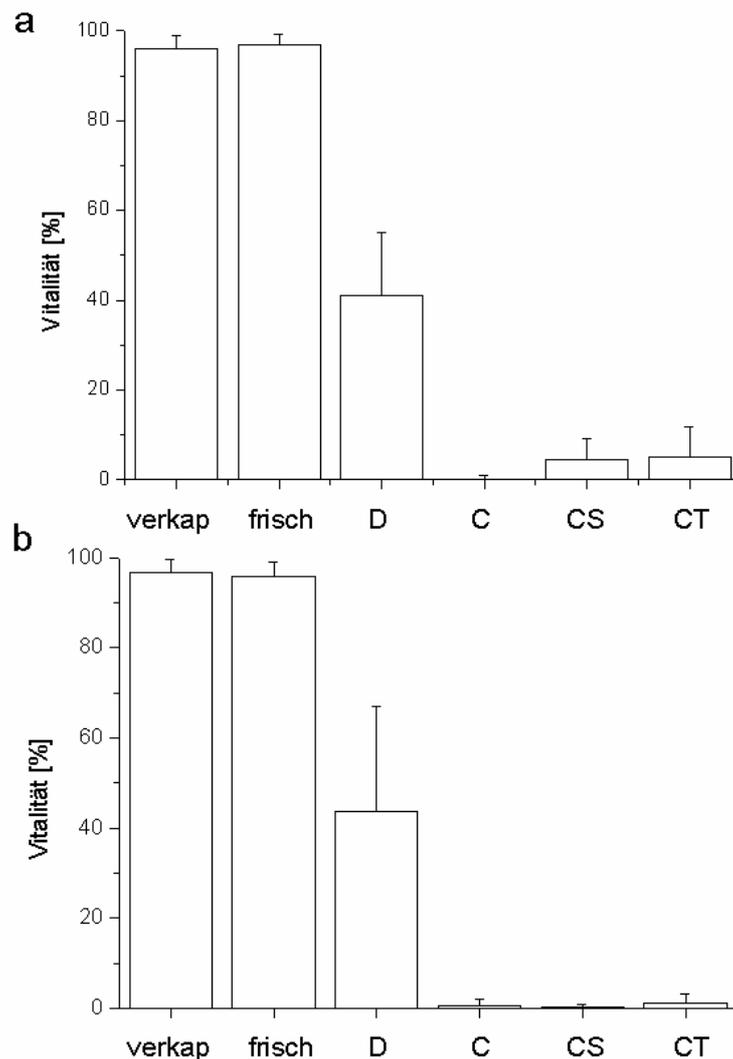
In einem ersten Versuch wurden die Tumorsphäroide kryokonserviert und die Vitalität der frischen und aufgetauten Sphäroide über die grüne bzw. rote Fluoreszenzintensität nach der Färbung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Tumorsphäroide mit den gegebenen Kryomedien und -protokollen insgesamt relativ schlechte Vitalitäten (5% - 15%) nach dem Auftauen besitzen. Eine Ausnahme bilden lediglich Sphäroide aus Ovarialkarzinomgewebe nach der Kryokonservierung in 10% Me<sub>2</sub>SO, die 25% bzw. 40% Vitalität besaßen. Ein nicht-repräsentativer Versuch mit der Kryokonservierung von Tumorzellen (Zellsuspension) zeigte ähnliche Ergebnisse. In 10% Me<sub>2</sub>SO überlebten die Zellen mit hoher Vitalität, während die extrazellulären CPAs keinen Erfolg brachten.



**Abbildung 4.53:** Vitalität von Sphäroiden aus Ovarialkarzinomzellen, frisch und aufgetaut nach dem Einfrieren mit diversen Kryomedien; a: HD-Sphäroide; b: freie Sphäroide (n = 1)

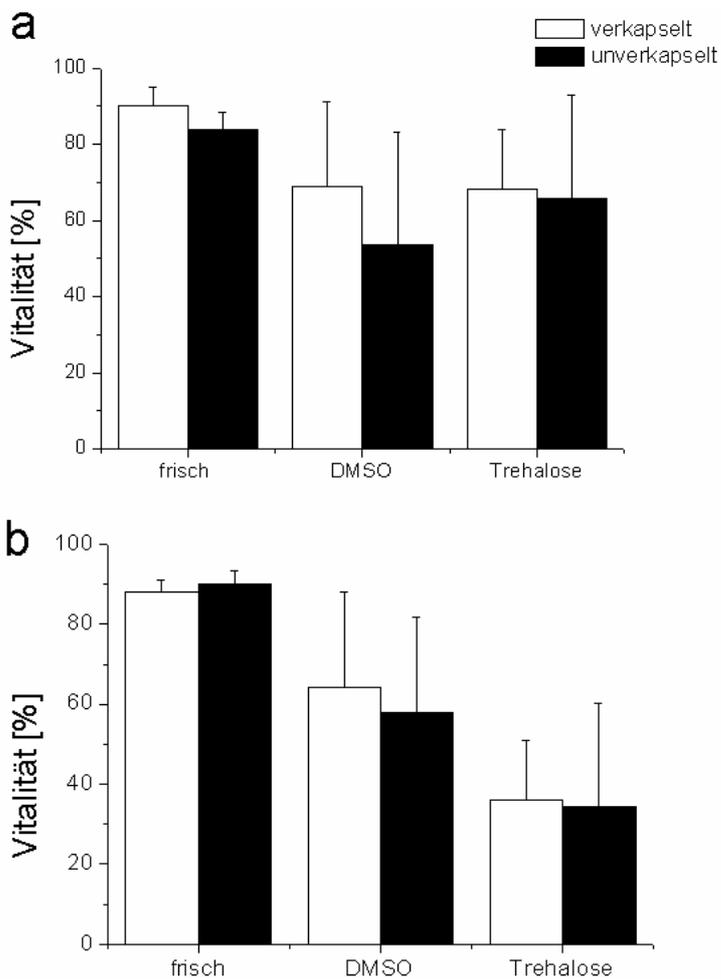
#### 4.2.2 Untersuchungen zur Kryokonservierung von verkapselten Zellen und Zellsystemen für therapeutische Zwecke

Nach der vergleichenden Untersuchung von Zellen ohne Kontakt zu Zellen mit Zell-Zellkontakten, soll nun im Folgenden der Einfluss einer zellfreien extrazellulären Matrix auf den Kryokonservierungserfolg untersucht werden. Zu Beginn werden Einzelzellen der etablierten Zelllinien L929 und PC-3 in einer Alginatkapsel kryokonserviert und mit Zellen ohne Kapsel bzw. mit verkapselten Sphäroiden verglichen.



**Abbildung 4.53:** Vitalität verkapselter L929-Zellen; a: (n=3) oder b: PC-3 Zellen (n=2). Die Vitalität wurde nach der Verkapselung bestimmt (verkap), nach Übernachtskultur vor dem Einfrieren in Mikro-Kryosubstraten (frisch) sowie nach dem Auftauen. Verwendet wurden unterschiedliche Kryom Medien: D = Kulturmedium mit 5% Me<sub>2</sub>SO, C = Kulturmedium, CS = Kulturmedium mit 5% SHP, CT = Kulturmedium mit Trehalose. Deutlich zu sehen ist der massive Vitalitätsverlust der Zellen in der Kapsel im Vergleich zu unverkapselten Zellen.

Zunächst wurden Zellen der etablierten Linien L929 und PC-3 verkapselt und in unterschiedlichen Kryomedien eingefroren. Die Zellsuspension in Alginate dient als Modellsystem für z.B. Gewebe mit stark ausgeprägter extrazellulärer Matrix. Dabei stellte sich heraus, dass die Alginatematrix den Kryokonservierungserfolg drastisch einschränkt (Abbildung 4.53). Sowohl bei verkapselten L929 (a) als auch PC-3 Zellen (b) lag die Vitalität bei der Verwendung von 5% Me<sub>2</sub>SO als Kryomedium (Mikro-Kryosubstrat) bei lediglich 40%, während die Vitalität bei unverkapselten Zellen bei 95% (L929) (Abbildung 4.44) bzw. 75% (PC-3) (Tabelle 4.6) liegt. Sämtliche alternativen CPA (Trehalose, SHP) lagen unter 5% Vitalität. Unverkapselte L929 Zellen lassen sich dagegen mit 150mM Trehalose mit bis zu 89% Vitalität kryokonservieren, während mit SHP bis zu 49% erreicht werden.



**Abbildung 4.54:** L929 Sphäroide eingefroren in 5% Me<sub>2</sub>SO oder Trehalose, verkapselt oder unverkapselt; a: über Nacht Inkubation in Kulturmedium; b: in Kulturmedium mit Trehalose. (n=3)

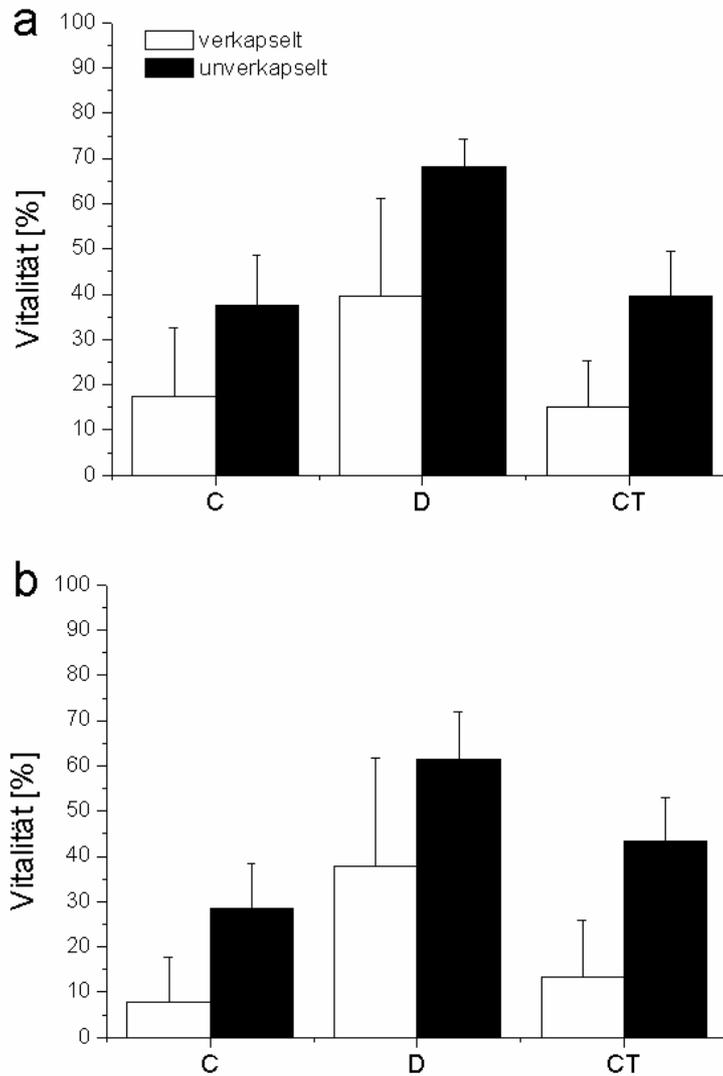
In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, inwiefern sich die Alginatematrix auch auf Sphäroide derselben Zellart auswirkt. L929 Sphäroide wurden verkapselt und über Nacht entweder in Kulturmedium oder in Kulturmedium mit Trehalose (KT) kultiviert. Die Vorinkubation mit Trehalose sollte dazu dienen, die Kapseln und Zellen mit Trehalose zu beladen, da die Diffusionsstrecken in der Kapsel relativ weit sind. Dabei zeigte sich, dass die Kultivierung in trehalosehaltigem Kulturmedium keine Auswirkungen auf die Vitalität der frischen Sphäroide hat

(Abbildung 4.54). Eine leicht erhöhte Vitalität nach der Kryokonservierung zeigten verkapselte Sphäroide im Gegensatz zu unverkapselten, wobei die Inkubation in trehalosehaltigem Kulturmedium schwach negative Auswirkungen auf die Vitalität nach dem Auftauen hatte, unabhängig, ob die Sphäroide in Me<sub>2</sub>SO oder Trehalose kryokonserviert wurden.

**Tabelle 4.8:** L929 Sphäroide eingefroren in Me<sub>2</sub>SO oder Trehalose, verkapselt oder unverkapselt, nach über Nacht Inkubation in Kulturmedium; bzw. in Kulturmedium mit Trehalose (T)

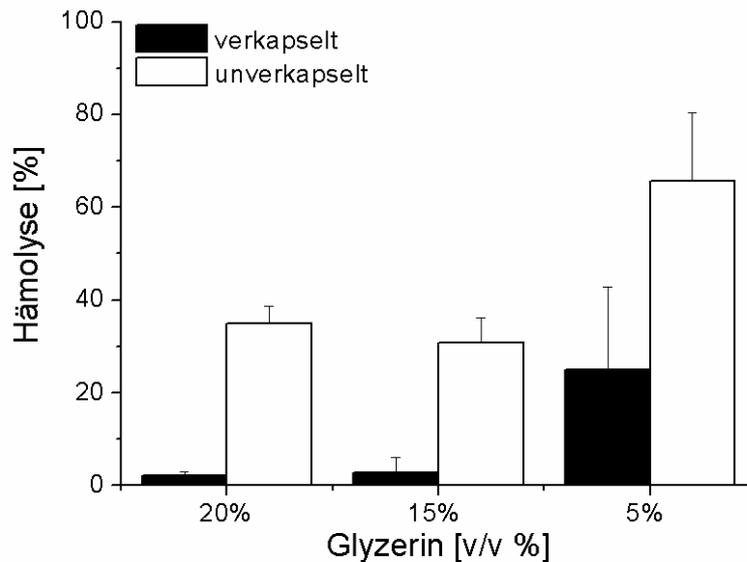
	Vitalität verkapselte Sphäroide [%]	Vitalität nicht- verkapselte Sphäroide [%]
frisch	90,07 ± 4,89	84,02 ± 4,31
frisch-T	88,16 ± 3,01	89,99 ± 3,48
Me <sub>2</sub> SO	68,94 ± 22,32	53,55 ± 29,57
T- Me <sub>2</sub> SO	64,31 ± 23,81	57,85 ± 24,01
T	68,27 ± 15,75	65,65 ± 27,14
T-T	36,05 ± 14,94	34,55 ± 25,55

Während die Verkapselung L929 Sphäroiden eine leicht erhöhte Vitalität nach dem Auftauen beschert, zeigten Versuche mit PC-3 Sphäroiden, die in einer Spinnerflasche kultiviert wurden, das Gegenteil. Die verkapselten PC-3 Sphäroide zeigten eine konstant schlechtere Vitalität nach dem Auftauen (Abbildung 4.55).

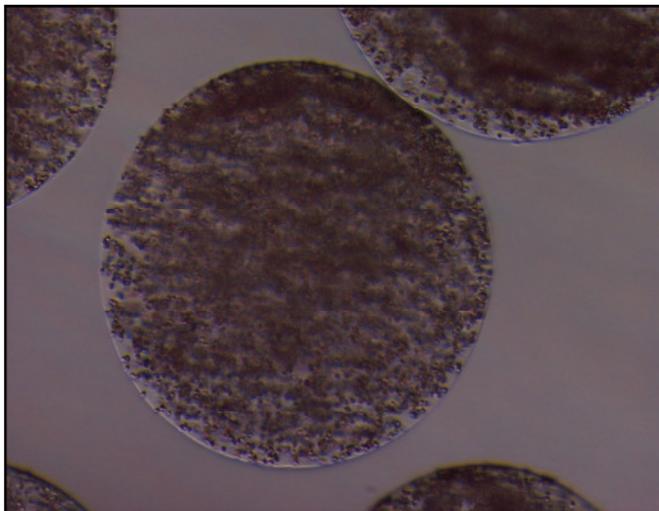


**Abbildung 4.55:** Kryokonservierung verkapselter und nicht verkapselter PC-3 Sphäroide. Deutlich zu erkennen ist die konstant niedrigere Vitalität bei verkapselten Sphäroiden, unabhängig vom Gefriermedium. a: Mikro-Kryosubstrate; b: 1ml Kryoröhrchen. (n=3)

Aus den bisherigen Versuchen zeigte sich also, dass der Effekt einer Alginatkapsel auf den Kryokonservierungserfolg von Zelltyp zu Zelltyp sehr unterschiedlich sein kann. Bereits bekannt ist, dass Langerhanssche Inseln in Alginatkapseln ca. 10% höhere Vitalität nach der Kryokonservierung aufweisen (Katsen-Globa et al. 2007). Humane Erythrozyten können in einer Alginatkapsel dazu dienen, die Sauerstoffversorgung anderer, koverkapselter Zellen oder Gewebe zu verbessern. Die Kryokonservierbarkeit verkapselter Erythrozyten soll im Folgenden untersucht werden.



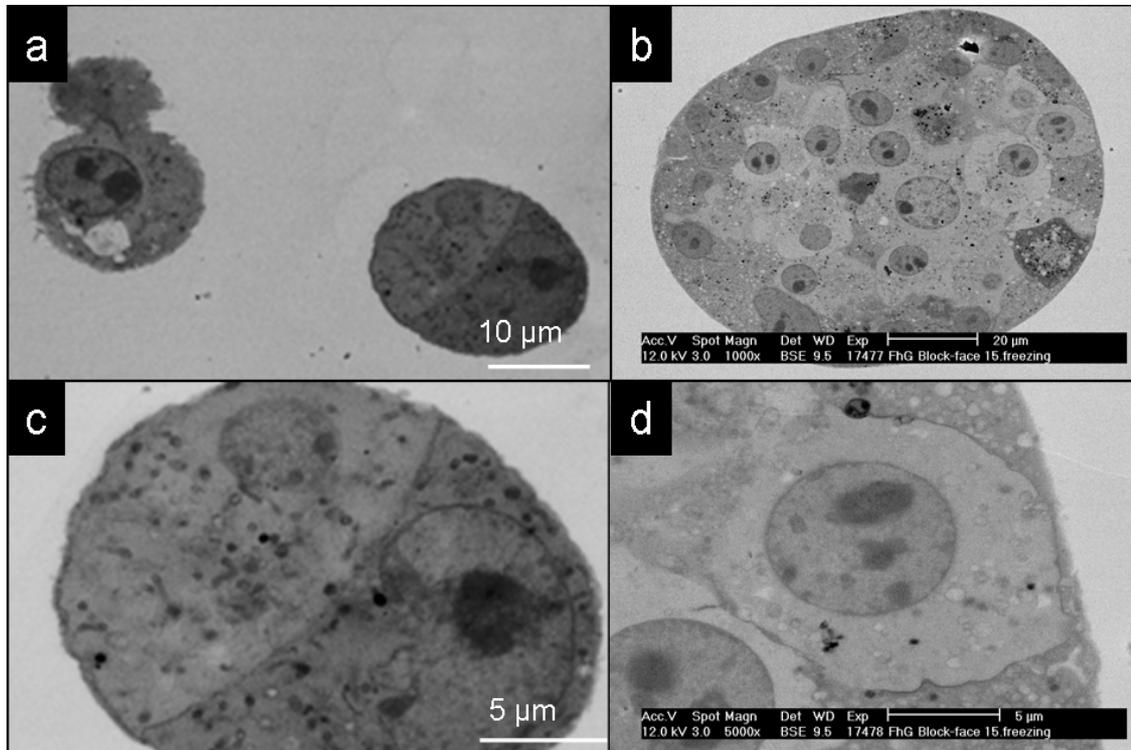
**Abbildung 4.56:** Hämolyse verkapselter und unverkapselter Erythrozyten nach der Kryokonservierung mit Glycerinhaltigem Kryomedium. (n=3)



**Abbildung 4.57:** In Alginat verkapselte humane Erythrozyten

In Vorversuchen (Katsen-Globa A. et al., Posterbeitrag 2006) zeigte sich, dass Glycerin als Kryoprotektivum für humane Erythrozyten besser geeignet ist als  $\text{Me}_2\text{SO}$ . Humane Erythrozyten wurden aus Buffy Coat gewonnen, verkapselt und in Kulturmedium mit einem Glycerinanteil von 5%, 10% oder 20% kryokonserviert. Es wurde 0,65%iges NT-Alginat (CG) verwendet und die

Kapseln wurden in Mikro-Kryosubstraten mit Goldbeschichtung kryokonserviert<sup>3</sup>. Im Experiment zeigte sich, dass die Verkapselung die Hämolyse bei der Kryokonservierung deutlich reduziert, im Vergleich zu unverkapselten Erythrozyten (Abbildung 4.56).

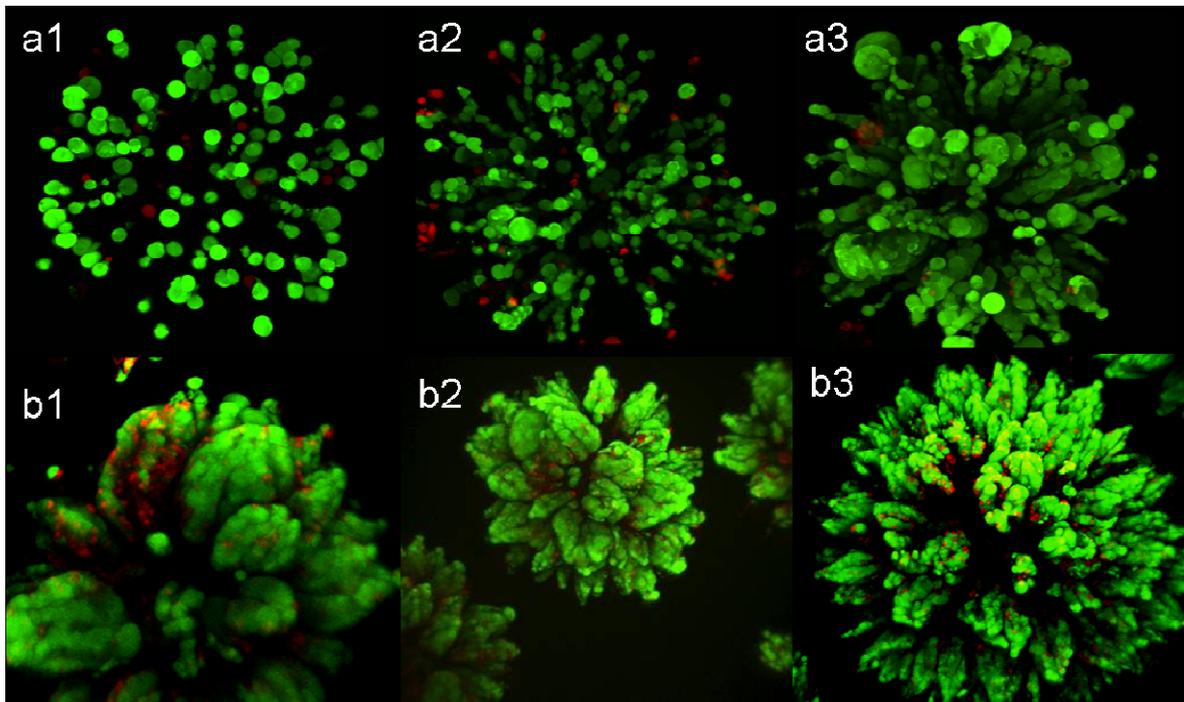


**Abbildung 4.58:** N2a Zellen in einer Alginatkapsel; a und c wurden am 1. Tag nach der Verkapselung fixiert, b und d 7 Tage nach der Verkapselung. In a und c sind einzelne, bzw. Gruppen von 2 oder 3 Zellen zu erkennen, während nach 7 Tagen in Kultur ganze Sphäroide bzw. Kolonien entstanden sind. Die Alginatkapsel verhindert Migration der Zellen.

N2a Zellen sind Neuroblastomazellen, die oftmals als Modellsysteme für neuronale Zellen verwendet werden. N2a Zellen können durch Zugabe von Retinsäure Neurofilament exprimieren und Neuriten ausbilden, womit ihre Funktionalität leicht zu zeigen ist. Zu Kryokonservierung verkapselter N2a Zellen wurden zunächst die Verkapselungsbedingungen optimiert. Es wurden unterschiedliche Alginatkonzentrationen (0,4% und 0,7%), Crystal Gun Behandlung und Inkubationszeiten im Polymerisationsbad getestet. Die Vitalität der Zellen wurde nach der Verkapselung, vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen bestimmt. Als Optimal erwies sich die Verwendung von 0,4%igem Alginat mit oder ohne Crystal Gun, sowie eine 20minütige Inkubationsdauer. Abbildung 4.58 zeigt Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von N2a Zellen in einer Alginatkapsel. Die Alginatkapsel selbst ist nicht sichtbar, da sich Alginat nur sehr schwer kontrastieren lässt. In Kapseln, die am ersten Tag nach der Herstellung fixiert wurden, sind deutlich einzelne bzw. zwei dicht nebeneinander liegende Zellen zu erkennen. Nach 7 Tagen in Kultur haben sich ganze Zellkolonien gebildet, die ca. 100µm im Durchmesser messen.

<sup>3</sup> Frühere Experimente zeigten, dass Erythrozyten auf HDPE Oberflächen lysieren. Daher wurden die Mikro-kryosubstrate vorher mit Gold besputtert.

Mit 0,4%igem Alginat ließen sich sowohl frisch verkapselte (Abbildung 4.59 obere Reihe) als auch 7 Tage (Abbildung 4.59 untere Reihe) kultivierte N2a Zellen mit hoher Vitalität kryokonservieren. Deutlich zu erkennen in (a3) ist, dass die Proliferation der Zellen 3 Tage nach dem Auftauen bereits wieder eingesetzt hat.

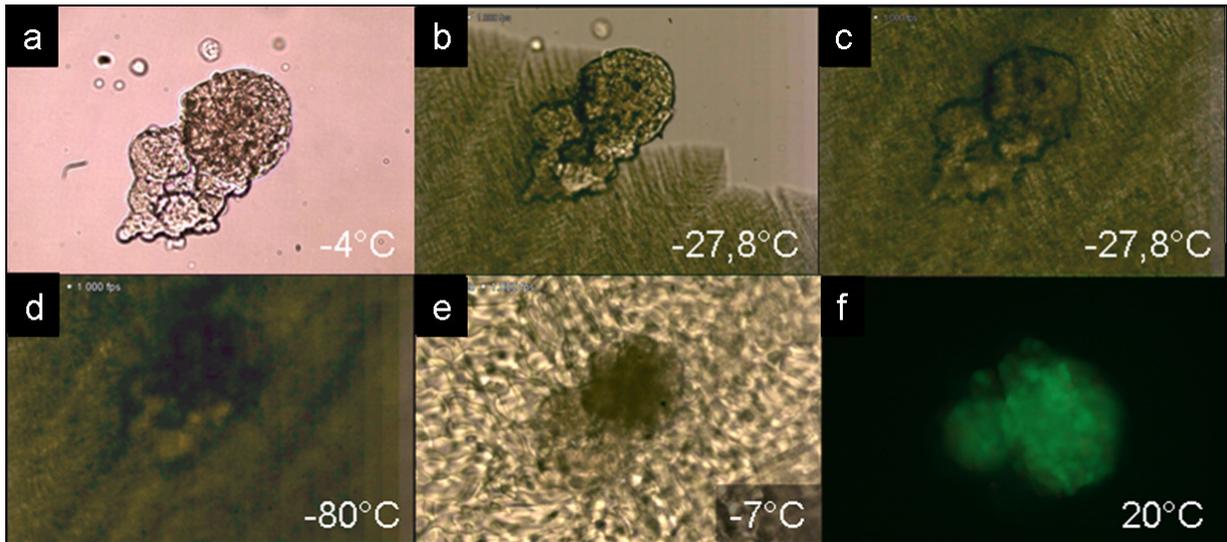


**Abbildung 4.59:** Kryokonservierung verkapselter N2a Zellen; in der oberen Reihe (a) erfolgte die Kryokonservierung am Tag nach der Verkapselung, in der unteren Reihe (b) erfolgte die Kryokonservierung 7 Tage nach der Verkapselung; a1/b1: vor dem Einfrieren; a2/b2: unmittelbar nach dem Auftauen; a3/b3: 3 Tage nach dem Auftauen.

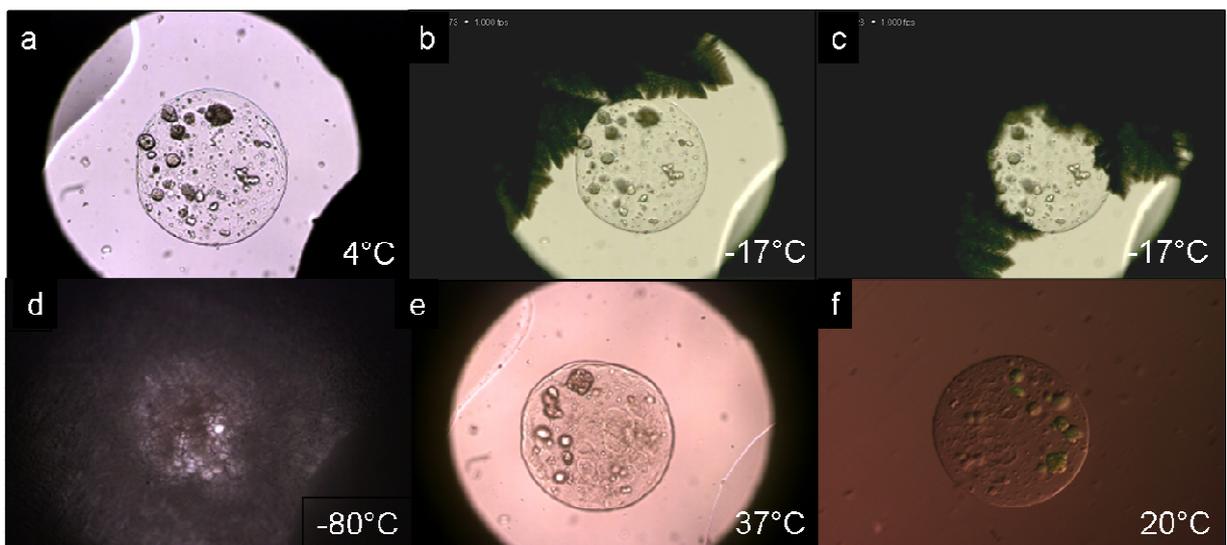
Es zeigte sich also, dass die Alginatkapsel den Kryokonservierungserfolg eingeschlossener Zellen und multizellulärer Systeme stark unterschiedlich beeinflusst. Um die unterschiedlichen Auswirkungen von Alginatkapseln auf den Kryokonservierungserfolg zu verstehen, wurde der Gefrierprozess verkapselter und unverkapselter Zellen mit dem, bereits erwähnten, Hochgeschwindigkeitskryomikroskop untersucht. Langerhanssche Inseln wurden zur Kryokonservierung vorbereitet, indem 7% Me<sub>2</sub>SO bei 4°C mittels Nanoplotter zugegeben wurden, was zurzeit das optimale Protokoll zur Kryokonservierung Langerhansscher Inseln ist. Nach 30min Inkubationsdauer bei 4°C wurde 1 Insel mit ca. 2µl Flüssigkeit entnommen und in den Probenhalter des Kryomikroskops eingesetzt. Das Eiskristallwachstum am Zeitpunkt des Gefrierens wurde mittels Hochgeschwindigkeitsvideokamera festgehalten. Weitere Aufnahmen wurden bei 4°C vor dem Einfrieren, sowie bei -80°C und beim Auftauen (-7°C) durch Kamerawechsel gemacht. Nach dem vollständigen Auftauen wurde das Kryomedium durch Vitalitätstestlösung ersetzt und die Vitalität mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme bestimmt.

Deutlich zu erkennen in Abbildung 4.60 b, c und d ist, dass das Kristallwachstum zunächst im extrazellulären Bereich stattfindet, während die intrazelluläre Eisbildung in der Insel erst später stattfindet. Verkapselte Langerhanssche Inseln kommen, wie ein weiterer Versuch zeigte, relativ lange (mehrere 100ms) nicht in Kontakt mit extrazellulärem Eis: die Eisfront wächst zuerst um die Alginatkapsel herum und ob in der Kapsel Eis entsteht, konnte im Versuch

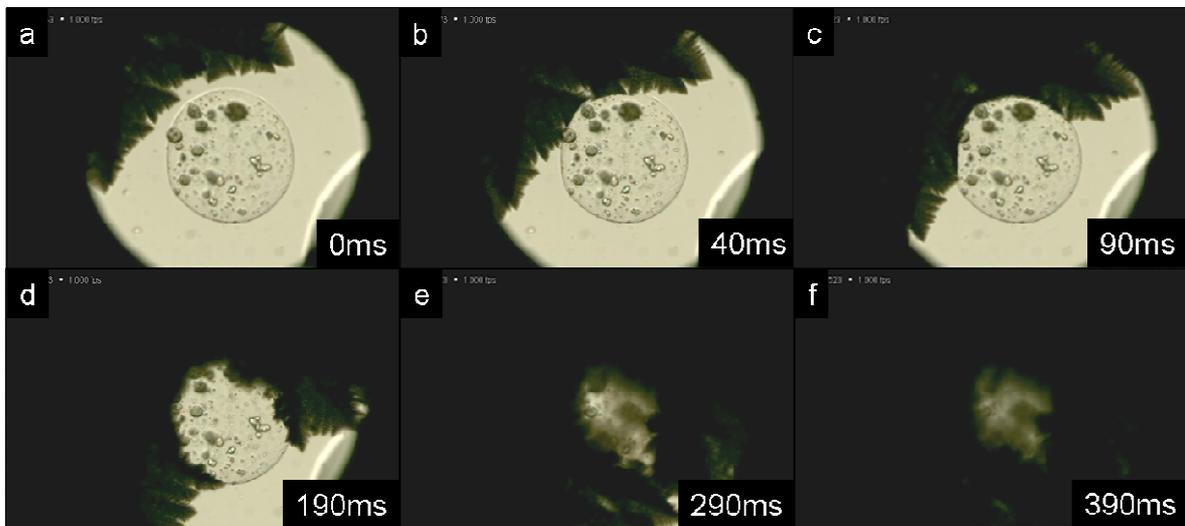
nicht eindeutig gezeigt werden. In Abbildung 4.61 ist die Kapsel bei  $-80^{\circ}\text{C}$  noch als helle Stelle, d.h. weniger lichtstreuende Eiskristalle, zu erkennen. In zwei weiteren Versuchen konnte die Kapsel bei  $-80^{\circ}\text{C}$  nicht gefunden werden. Die Art, Größe und Verteilung der Eiskristalle in der Kapsel könnte z.B. durch Gefriersubstitution der gefrorenen Proben und anschließenden Untersuchung im TEM geklärt werden. Deutlich zu sehen ist ebenfalls, dass das Eiswachstum durch die Alginatkapsel deutlich gebremst wird (Abbildung 4.62)



**Abbildung 4.60:** Kryokonservierung einer Langerhansschen Insel (Ratte) mit 7% Me<sub>2</sub>SO. a: vor dem Einfrieren, b und c: Hochgeschwindigkeitsaufnahmen vom Gefrieren der Insel im Kryomikroskop, d: bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , e: beim Auftauen (Umkristallisation kurz vor dem Schmelzpunkt), f: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der FDA/EB Färbung nach der Kryokonservierung (Abbildung aus Zimmermann et al. 2007).



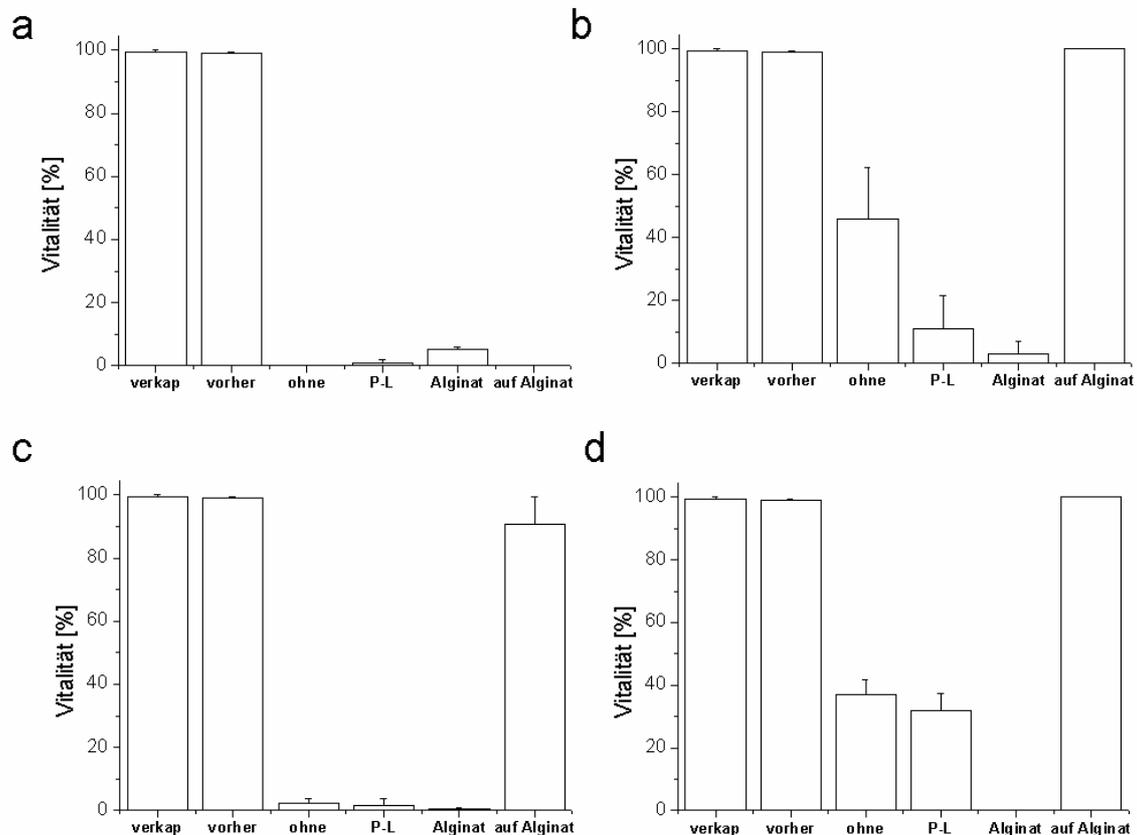
**Abbildung 4.61:** Kryokonservierung einer Langerhansschen Insel (Ratte) mit 7% Me<sub>2</sub>SO. a: vor dem Einfrieren, b und c: Hochgeschwindigkeitsaufnahmen vom Gefrieren der Insel im Kryomikroskop, d: bei  $-80^{\circ}\text{C}$ , e: beim Auftauen (Umkristallisation kurz vor dem Schmelzpunkt), f: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der FDA/EB Färbung nach der Kryokonservierung.



**Abbildung 4.62:** Hochgeschwindigkeitsaufnahme der Kristallisationsfront an verkapselten Langerhansschen Inseln. Deutlich zu erkennen ist die Ausbreitung der Eisfront in 1 und 2, die an der Alginatkapsel gestoppt bzw. verzögert wird während das Wachstum seitlich der Kapsel mit unverminderter Geschwindigkeit weitergeht. (Abbildung aus Ehrhart et al. 2008, Bioforum (im Druck))

### 4.2.3 Kryokonservierung von Alginat-Zell-Systemen für Anwendungen im tissue engineering

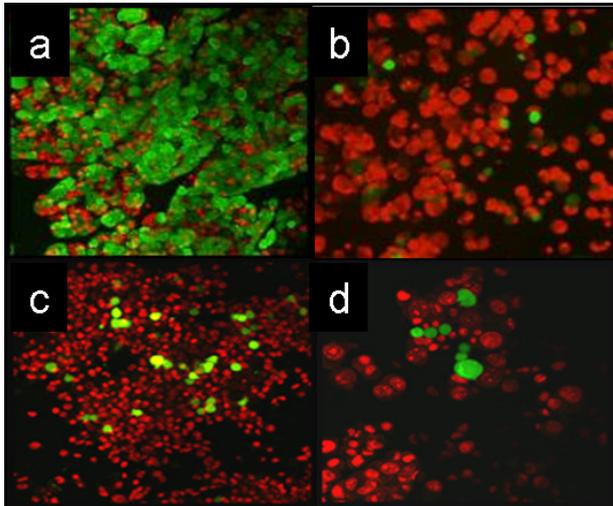
Im vorangegangenen Kapitel wurde eine Methode zur Beschichtung von adhären Zellen entwickelt. Für Anwendungen im tissue-engineering oder als lebende Zell-Assays ist es interessant, diese mittels Kryokonservierung haltbar zu machen. In einem ersten Ansatz wurden L929 Zellen auf unterschiedlich behandelten Oberflächen kultiviert und kryokonserviert: unbehandelte Plastikoberfläche (zur Zellkultur geeignet), PLL mit und ohne Alginatbeschichtung (Zellen auf PLL aber unter Alginat) und Alginat (Zellen auf Alginat). Die Vitalität wurde unmittelbar nach der Alginatbeschichtung, vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen bestimmt. Nach der Beschichtung bzw. vor dem Einfrieren zeigten alle Proben eine sehr hohe Vitalität. Nach dem Auftauen zeigte sich, dass Zellen, die auf Alginat angesiedelt waren, eine überraschend hohe Vitalität aufwiesen (Abbildung 4.63). Eine mäßig hohe Vitalität von ca. 35 - 40% wurde bei unbeschichteten bzw. PLL beschichteten Oberflächen vorgefunden, sofern 5%  $\text{Me}_2\text{SO}$  im Kryomedium verwendet wurde. Ohne Kryoprotektivum war die Vitalität nach dem Auftauen erwartungsgemäß niedrig (unter 5%). Offensichtlich fördert die Alginatbeschichtung der Oberfläche das Überleben der darauf adhären Zellen, während eine Alginatschicht auf den Zellen eher negative Folgen hat.



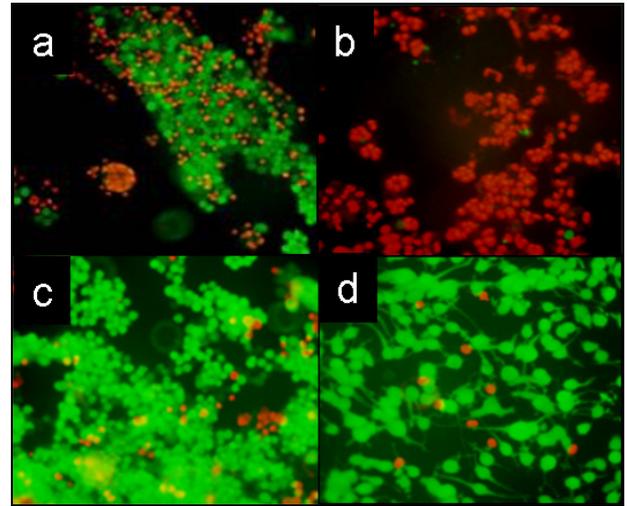
**Abbildung 4.63:** Vitalität von L929 Zellen auf unterschiedlichen Oberflächen nach der Verkapselfung (nur bei beschichteten Proben) (verkap), vor und nach der Kryokonservierung auf unterschiedlichen Oberflächen: ohne jede Beschichtung auf zellkulturgeeigneter Plastikoberfläche, auf PLL beschichteter Fläche, auf PLL unter Alginat und auf einer Alginatschicht. 1: Kulturmedium; 2: Kulturmedium + 5% Me<sub>2</sub>SO; 3: Kulturmedium mit Trehalose; 4: Kulturmedium +5% Me<sub>2</sub>SO und Trehalose (n=1)

N2a Zellen, die auf PLL beschichteten Oberflächen 7 Tage kultiviert und ohne Alginatbeschichtung eingefroren wurden (Kulturmedium mit 10% Me<sub>2</sub>SO), hatten eine sehr geringe Vitalität nach dem Auftauen und waren zudem größtenteils von der Oberfläche abgelöst. Durch Alginatbeschichtung konnten die Zellen auf der Oberfläche zwar festgehalten werden und gelegentlich wurde eine geringfügig höhere Vitalität erreicht, die jedoch nicht reproduzierbar war. Dabei war es davon unabhängig, ob die Zellen differenziert waren oder nicht oder ob Alginat am Tag vor der Kryokonservierung zugegeben wurde oder 7 Tage vorher (Abbildung 4.64). Wurden die Zellen nicht auf PLL, sondern auf Matrigel kultiviert und dann eingefroren zeigten sich ebenfalls Vitalitäten von etwa 3%. Zellen auf Matrigel, die erst am Tag vor der Kryokonservierung mit einer Alginatschicht versehen wurden (die zur Fixierung notwendige PLL-Beschichtung wurde ebenfalls kurz vorher aufgetragen), zeigte sich eine sehr hohe Vitalität nach dem Auftauen, sowohl bei differenzierten als auch undifferenzierten Zellen ( $63 \pm 6\%$ ) (Abbildung 4.65 c und d). Die hohe Vitalität wurde sowohl durch höhere Vitalität der Zellen als auch durch geringeren, bzw. keinen, Verlust durch Ablösung bedingt. Am Tag nach dem Auftauen zeigte sich ein Rückgang der Zellvitalität auf ca. 50%, jedoch wurde nach 3 Tagen Kultivierung eine Erholung der Kultur auf 90% der initialen Zellzahl erreicht. Wurde die Alginatbeschichtung am ersten Tag durchgeführt, die Zellen also 4 Tage unter Alginat kultiviert bevor sie eingefroren wurden, war

nach dem Auftauen eine sehr geringe Vitalität zu beobachten (Abbildung 4.65 a und b). Folglich ergeben sich optimale Kryokonservierungsbedingungen von adhärennten (N2a) Zellen, wenn sie auf Matrigel kultiviert und vor der Kryokonservierung mit Alginat beschichtet werden. Weiterführende Untersuchungen mit anderen Kryomedien (z.B. CryoStor) bestätigten diese Ergebnisse (Malpique et al. (eingereicht 2008)).



**Abbildung 4.64:** Kryokonservierte Proben von adhärennten N2a Zellen auf PLL Oberfläche unter Alginat; a und b: Alginatzugabe am Tag 1; c und d: Alginatzugabe am Tag 7; b und d: Differenzierung durch Retinsäure. Fluoreszenz-Lebend-Tot Färbung mit EB und FDA. (Abbildungen teilweise aus Malpique et al. (eingereicht 2008))



**Abbildung 4.65:** Kryokonservierte Proben von adhärennte N2a Zellen auf Matrigel Oberfläche unter Alginat; a und b: Alginatzugabe am Tag 1; c und d: Alginatzugabe am Tag 7; b und d: Differenzierung durch Retinsäure. Fluoreszenz-Lebend-Tot Färbung mit EB und FDA. (Abbildungen teilweise aus Malpique et al. (eingereicht 2008))

## 5. Diskussion

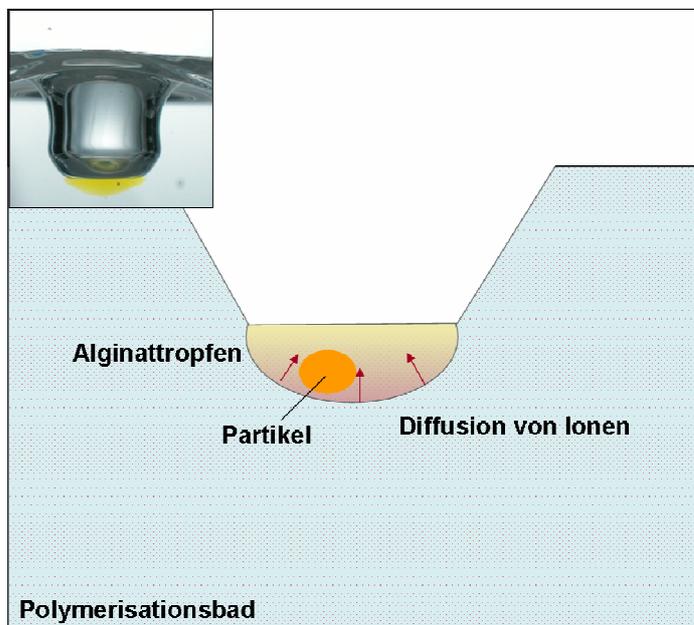
Das Ausmaß der Deformation, die ein Tropfen erfährt, der in eine Flüssigkeit eintropft, wird generell von folgenden Faktoren bestimmt: Tropfendurchmesser ( $D$ ), Viskosität ( $\mu$ ) und Dichte ( $\rho$ ) der Lösung, Einschlagsgeschwindigkeit ( $U$ ) (d.h. Erdbeschleunigung ( $g$ ) und Fallstrecke) und Oberflächenspannung der Flüssigkeit ( $\sigma$ ) (außerdem von der Art des umgebenden Gases (Xu et al. 2005), was in dieser Versuchsanordnung vernachlässigbar ist). Aus diesen Faktoren wurden verschiedene, nach den Autoren benannte Kennzahlen definiert, z.B. die Reynoldszahl (die sich ergibt aus:  $DU\rho/\mu$ ), Froudezahl ( $U/(gD)$ ) oder die, aussagekräftigste, Weberzahl ( $\rho U^2 D/\sigma$ ). Beispielsweise kann anhand der Kennzahlen vorhergesagt werden, ob ein Tropfen beim Einschlag koalesziert oder zerspritzt (Rein 1996). Bei niedrigen Weberzahlen (niedrige Fallgeschwindigkeit) koaleszieren einschlagende Wassertropfen. Ab einer kritischen Weberzahl kommt es zur Jetbildung, der sich bei weiterer Erhöhung von kurz und breit zu hoch und dünn verändert, wobei der Zerfall des Jets in einen oder mehrere sekundäre Tropfen beobachtet werden kann.

Im Falle von Alginat (sh. Kapitel 4.1.1) wurden überwiegend Jets ohne Zerfall in Sekundärtropfen beobachtet. Speziell bei Alginat konnten zusätzlich die Art der Flüssigkeit in der Küvette (polymerisierend oder nicht-polymerisierend) und Anteil an Guluron- bzw. Mannuronsäure als Faktoren zur Deformation definiert werden. Weitere Aussagen, die mittels Deformationsdiagrammen gewonnen werden können, beziehen sich speziell auf die Zumischung von Partikeln zum flüssigen Alginat. Im Versuch wurden kernhaltige (L929), kernlose (humane Erythrozyten) und Gewebe (Langerhanssche Inseln) verwendet. Bei den Langerhansschen Inseln zeigte sich, dass das Vorhandensein einer Insel im Alginat keinen Unterschied im Deformationsdiagramm aufweist. In dieser Versuchsanordnung können zudem Verdünnungseffekte ausgeschlossen werden, da für Tropfen ohne und mit Inseln dieselbe Mischung verwendet wurde. Bei der Übertragung von Zellpellets kann es zu einer Zumischung von ca. 50  $\mu$ l Flüssigkeit kommen, was bei 1ml Alginat zu einer Konzentrationsreduktion von 5% führt. 0,65%iges Alginat wäre somit auf ca. 0,62% verdünnt. Die geringen Abweichungen beim Einschlagsmaximum könnten somit auf Verdünnungseffekte zurückzuführen sein. Die größeren Abweichungen am Ablösungsminimum und dem Entspannungsmaximum unterscheiden sich deutlich von denen der reduzierten Viskosität, so dass hier ein Einfluss der eingeschlossenen Partikel zugrunde liegen könnte.

### Dezentralisierung eingeschlossener Partikel – eine Folge von einseitiger Polymerisation?

Betrachtet man vergleichsweise die Deformation des Alginats in polymerisierender und nicht-polymerisierender Lösung zeigen sich deutliche Unterschiede. Wie in Abbildung 4.4 zu erkennen ist, ist eine Veränderung bereits in den ersten 3-5ms, am Einschlagsmaximum zu sehen. Die Deformation fällt in nicht-polymerisierender Lösung stärker aus als in polymerisierender Lösung. Eine bereits beginnende Polymerisation oder auch bereits das Eindringen und die Anlagerung von  $Ba^{2+}$  - Ionen in das Alginat könnte sehr früh die Viskosität erhöhen. Berechnungen der Diffusionsstrecke legen nahe, dass ein Eindringen von  $Ba^{2+}$  - Ionen und daher die Polymerisation mit Alginat bereits in den ersten Millisekunden möglich ist. Die Ursache für den Unterschied zwischen stark G- bzw. stark M-haltigem Alginat liegt entweder an der unterschiedlichen Viskosität (stark G-haltiges Alginat ist viskoser als stark M-haltiges) oder an der schnelleren und intensiveren Vernetzung von GGG-Blöcken mit  $Ba^{2+}$ . GGG-Blöcke bilden eine helikale Struktur mit exponierten Bindungsstellen für zweiwertige Kationen (Grant et al. 1973, Simpson et al. 2004).

Die einseitige Positionierung von eingeschlossenen Partikeln in Alginatkapseln ist eine häufige Beobachtung und ein großes Problem bei der immunisolierten Transplantation, da eine sehr dünne Alginatschicht sehr verletzungsanfällig und daher ein Risiko für die verkapselten Zellen (z.B. Langerhanssche Inseln) ist. Eine einseitige Häufung von  $\text{BaSO}_4$  Kristallen in mittels Verkapselungsanlage hergestellten Alginatkapseln wurde bereits beobachtet und auf inhomogene Polymerisationsprozesse zurückgeführt, die nun mittels Hochgeschwindigkeitsfotografie bzw. -video erklärbar sind (Wolf et al. 2005). Beobachtungen von im Alginattropfen eingeschlossenen Partikeln legen nahe, dass die Partikel durch den Einschlag an die untere Grenze des Alginats gedrückt werden und dort verbleiben. Möglich ist, ob sie durch die beginnende Polymerisation dort festgehalten werden. Auf der anderen Seite des Tropfens ist für die ersten 15-20ms kein Polymerisationsbad, sondern Luft, so dass die Diffusion von  $\text{Ba}^{2+}$  und damit die Polymerisation nur von der unteren Seite aus einsetzen kann. Wie das unterschiedliche Deformationsmaximum bei polymerisierender und nicht-polymerisierender Flüssigkeit zeigt, kommt es bereits in den ersten Millisekunden zu einer Veränderung, so dass das „Festhalten“ des Partikels auf der unteren Seite durch erhöhte Viskosität oder stattgefundenene Gelierung erklärbar sein könnte (Abbildung 5.1).



**Abbildung 5.1:** Einseitige Polymerisation als mögliche Ursache von inhomogener Partikelverteilung.

Zur Lösung dieses Problems bietet sich an, den Alginattropfen einer geringeren Deformation auszusetzen. Im Modellsystem lässt sich dies z.B. durch Kombination von geringer Einschlagsgeschwindigkeit (Fallhöhe) und hoher Viskosität des Alginats erreichen, wobei die Grenzen dieser Parameter für die biomedizinische Anwendung schnell erreicht sind. Ultrahoch viskoses Alginat lässt sich ab Konzentrationen von ca. 1% nicht mehr homogen lösen. Zudem wird die Nährstoffversorgung der Zellen durch das zu dichte Alginatnetzwerk behindert (Schneider et al. 2003). Optimal für die Verkapselung Langerhansscher Inseln ist eine Alginatkonzentration von 0,7% oder 0,65%, eine Mischung aus 65% Guluronsäure und 35% Mannuronsäure (NT-Alginat), mit „Crystal Gun“ – Behandlung, so dass einer Erhöhung der Viskosität Grenzen gesetzt sind. Um Alginattropfen von in hinreichend kleiner Größe (ca. 200 – 800 $\mu\text{m}$ ) herzustellen, bedarf es der Verkapselungsanlage, die mittels koaxialen Luftstroms nicht nur den Tropfenabriss besorgt, sondern die Tropfen dabei auch stark beschleunigt. Eine Fallstrecke ist daher eher notwendig um die Tropfen über den Luftwiderstand abzubremesen. Ein Luftstrom aus der Gegenrichtung, der den

Alginattropfen stärker abbremst, wäre eine Möglichkeit die Einschlagsgeschwindigkeit zu reduzieren. Alternativ bietet sich die Verkapselung im Chip an, wie in ersten Versuchen in Abbildung 5.4 dargestellt.

#### Deformationsdiagramme - Grenzen und Möglichkeiten der Anwendung

Das Eintropfen von Alginat in ein Polymerisationsbad stellt einen Sonderfall in der Impact-Forschung dar. Im Gegensatz zu den gut erforschten Systemen von Flüssigkeit auf Festkörper (Engel 1955, Kang und Lee 2000, beide zitiert in Manzello et al. 2002), in Flüssigkeit (beginnend bei Worthingtons Study of Splashes 1918, Manzello et al. 2002), Flüssigkeit auf feuchte (Mutchler und Hansen 1970) oder trockene Oberflächen (Xu et al. 2005), ist kein System beschrieben, das, erstens, speziell auf das Verhalten des Tropfens eingeht und zweitens, eine Veränderung der Viskosität beim Eintropfen berücksichtigt. Betrachtet man das Verhalten des Polymerisationsbades, bildet sich beim Eintropfen des Alginats ein „Kronentrichter“, der typisch ist für den Einschlag von Tropfen oder Festkörpern in Flüssigkeiten oder auch in losem Sand (Lohse et al. 2004). Auch die Form des Einschlagstrichters und der beim Kollaps des Trichters nach oben abgehende Wasserstrahl („Rayleigh jet“), sind nicht untypisch. Betrachtet man jedoch den (eingefärbten) Alginattropfen, zeigt dieser ein sehr differenziertes Verhalten, das mangels Literaturvorgabe zunächst in vier gut unterscheidbare Phasen eingeteilt wurde: 1. Deformationsphase, 2. Eintauchphase, 3. Erythrozytenphase und 4. Schwellphase.

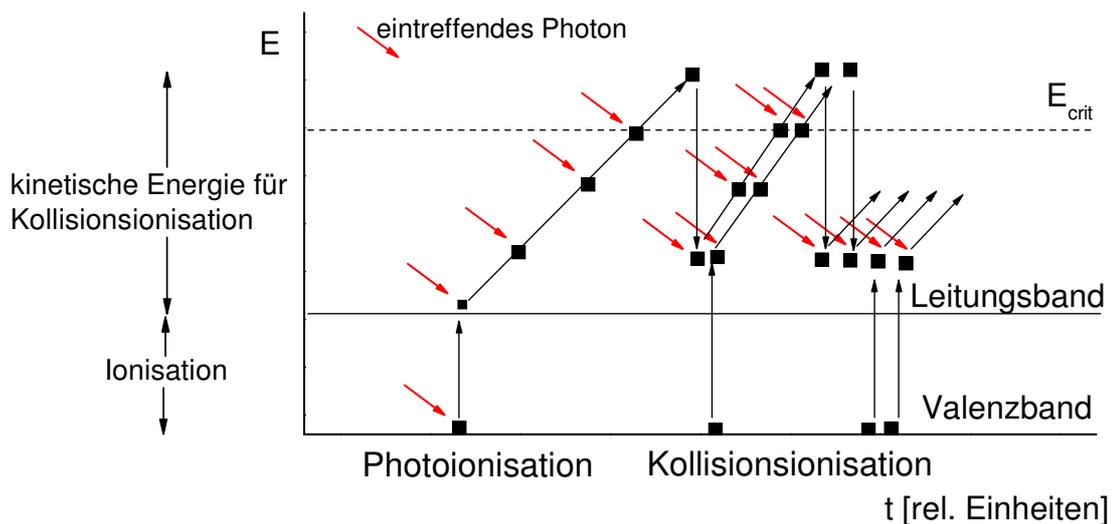
Weitere Experimente wurden unter Verwendung der Hochgeschwindigkeitsvideokamera durchgeführt, die es im Gegensatz zur zuerst verwendeten Hochgeschwindigkeitsfotographie erlaubt, ein und denselben Alginattropfen über den gesamten Vorgang zu beobachten. Dabei zeigte sich, dass die Auftragung von Durchmesser *versus* Zeit eine präzisere Methode als der qualitative Vergleich der einzelnen Phasen ist, um feine Unterschiede im Deformationsverhalten des Alginats zu erkennen. Nachteilig an der Methode ist die Abhängigkeit von den eingehenden Bildern. Gerade an der Wasser-Luft-Grenzfläche lässt sich durch optische Effekte die Breite des Alginattropfens nur schwer ausmessen. Zudem ist eine Färbung des Alginats notwendig, um es optisch von der Flüssigkeit zu unterscheiden, was unbekannte Folgen auf die Deformationseigenschaften hat. Die Verwendung des Modellsystems (Tropfpipette) statt der Verkapselungsanlage war experimentell notwendig, da die bei der Verkapselungsanlage entstehenden Tropfen zu klein sind und nicht tief genug eintauchen, um in der optisch schwer auflösbaren Wasser-Luft Grenzfläche vermessen werden zu können. Durch den Sprüheffekt der Verkapselungsanlage lässt sich die Position, an der die Tropfen einschlagen, nicht bestimmen, so dass ein zufälliges Eintropfen in der aufgrund der geringen Größe stark begrenzten Fokusebene abgewartet werden muss. Rheometer können zwar ebenfalls Auskunft über die Viskosität des Alginates geben, die Dynamik der Polymerisation in kleinen Tropfen kann jedoch nicht erfasst werden.

Die mathematische Angleichung ist für die Auswertung von Vorteil. Sie erlaubt beispielsweise die Erfassung des tatsächlichen Deformationsmaximums, wenn die Messpunkte, bzw. die aufgezeichneten Bilder, nicht exakt das Maximum erfassen. Der entstehende Graph erinnert an eine Gaußfunktion, die nach einigen, schnell abschwächenden Oszillationen in eine exponentielle Annäherung an einen Grenzwert übergeht (sh. Abbildung 4.3).

### Partikelstrahl und Photoablation – neue Methoden zur Modifikation von Alginat

Native Alginatoberflächen wirken hemmend auf Zelladhäsion, da sie zum einen eine polyanionische Oberfläche besitzen, die die ebenfalls mit polyanionischen Zuckerketten umgebene Glykokalyx von Zellen abstößt und zum anderen sehr glatt ist. Alginat kann jedoch auf vielfältige Weise manipuliert werden. Aus der Literatur bekannt sind zahlreiche Modifikationen, wie z.B. die Ankopplung von kurzen Peptiden zur Verbesserung der Zelladhäsion. Einige spezielle Peptide werden bei der Adhäsion bestimmter Zelltypen bevorzugt, z.B. RGD-Peptid bei Präosteoblasten (Hsiong et al. 2004). Auch die Zumischung von ECM-Molekülen zeigt eine Verbesserung der Adhäsion von z.B. Chondrozyten in eine 3D Umgebung. Die adhäsionsfördernde Wirkung einer Partikelstrahlbehandlung, z.B. „Crystal Gun“ mit  $\text{BaCl}_2$ , die zusätzlich durch die eingebrachten  $\text{Ba}^{2+}$ -Ionen die Oberfläche stärker vernetzt oder die Behandlung mit Fibronektin wurde 2007 von Zimmermann et al. 2007 gezeigt. In dieser Arbeit wurde zusätzlich ein wirkungsvolles Verfahren, das mechanisches Aufrauen mit einem Sandstrahl, demonstriert. Zusätzlich lässt sich Alginat gezielt durchlöchern (z.B. durch eine Kanüle (Zimmermann et al. 2007), Sandstrahl oder Laser), was für den Volumentransport durch Alginatschichten, -sheets und massive Alginatblöcke von Vorteil ist und zudem, da sich die Innenseite der Kanäle mit Zellen besiedeln lässt, eine Art Vaskularisierung (ähnlich Zell-ausgekleideten Blutgefäßen) durchführen lässt.

Andere Scaffolds, wie z.B. von Zellen befreite Kollagenstrukturen tierischen Ursprungs (Linke et al. 2007), sind zwar feiner und „natürlicher“ strukturiert, tragen jedoch stets das Risiko immunologischer Abstoßung, Übertragung von Krankheiten und allergischer Reaktionen. Ein weiterer Vorteil der Anwendung von Partikelstrahl auf Alginat ist die einfache, wenig geräteintensive Handhabung, die sich zudem durch Kombination mit entsprechenden PC-Gesteuerten XYZ-Steppern mit wenig Aufwand automatisieren ließe, so dass präzise, wiederholbare Strukturen geschaffen werden können. Nachteilig wirkt sich die Notwendigkeit des unbedingten Zu-



**Abbildung 5.2:** Energie / Zeit-Diagramm der Entstehung eines reaktiven Plasmas durch Photoionisation, die durch Multiphotonenabsorption ausgelöst und durch Kollisionenionisation verstärkt wurde (modifiziert nach Vogel et al. 2005).

gangs des Partikelstrahls aus. Ohne „Öffnung“ in der Alginatoberfläche können keine internen Strukturen geschaffen werden.

Zur Schaffung interner Strukturen in Alginat bietet sich die Photoablation durch Multiphotonen-Absorption an, die jedoch sehr geräteaufwändig ist. Zunächst soll jedoch auf das Prinzip des Multiphotoneneffekts eingegangen werden. Multiphotonmikroskopie (MPM) wurde erstmals von Denk et al. (1990) beschrieben und wird inzwischen hauptsächlich in der Fluoreszenzmikroskopie von Physiologie, Morphologie und Zell-Zell-Interaktionen von intakten Geweben oder lebenden Tieren genutzt (Zipfel et al. 2003). Das Prinzip und gleichzeitig der Vorteil der MPM ist, dass zur Anregung der Fluoreszenz nicht ein Photon, sondern 2 Photonen mit jeweils der halben Energie (oder 3, oder mehr, mit jeweils  $1/3$  bzw.  $1/n$  der Energie) eingesetzt werden. Notwendig für den Mehr-Photonen Effekt ist eine hohe Photonendichte, die durch starke Fokussierung des Lasers und Verwendung von Laserpulsen erreicht wird. Femtosekundenlaser sind daher bei der MPM weit verbreitet. Trotz starker Fokussierung und Pulse ist MPM in der Summe schonender für Gewebe, da weit größere Wellenlängen verwendet werden können als bei der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie. Außerdem ist die Reichweite größer, da längerwelliges Licht (rot – infrarot-Bereich) tiefer in Gewebe eindringt. Durch die für den Effekt notwendige starke, exakte Fokussierung tritt der Mehr-Photonen – Effekt nur in einem dreidimensional stark eingegrenzten Bereich auf, was die Auflösung der MPM stark verbessert.

Bei hoher Photonendichte kann ein weiterer Effekt auftreten, die Photoionisation (Abbildung 5.2). Durch Aufnahme der Energien von mehreren Photonen werden Elektronen vom Atom gelöst und über das kritische Energieniveau gehoben, sofern kein stabiler Zwischenzustand existiert, von dem eine „strahlende“ Energieabgabe in Form von Licht möglich wäre (Abbildung 5.2 Photoionisation). Bei der Kollision dieser Elektronen mit normal-energetischen Elektronen (z.B. von Wasser) wird ein Teil dieser Energie übertragen, so dass das Elektron vom Atom gelöst wird (Abbildung 5.2 Kollisionsionisation). Durch weitere Aufnahme von Photonen werden diese Elektronen weiterhin angeregt, bis sie ab der kritischen Energie wiederum in der Lage sind, weitere Elektronen loszuschlagen. Durch diese Kettenreaktion entsteht eine „Wolke“ freier Elektronen, ein Plasma.

Die Auswirkungen von Plasma auf organische Materie können in zwei Klassen eingeteilt werden. Zum einen entstehen reaktive Sauerstoffarten (z.B.  $\text{OH}^*$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), die mit organischen Molekülen reagieren und diese zerstören oder verändern können, zum anderen können die reaktiven Elektronen des Plasmas von organischen Molekülen aufgenommen werden und deren Bindungen durch das Einbringen von Vibrationsenergie zerstören. Durch Aufnahme von Elektronen können Einzel- oder Doppelstrangbrüche in der DNA ausgelöst werden (Boudaiffa et al. 2000, Gohlke und Illenberger 2002, Huels et al. 2003; alle zitiert in Vogel et al. 2005). In Alginat könnten daher ebenfalls durch Aufnahme der Elektronen Kettenbrüche induziert werden. Die kurzkettingen Alginatreste würden in Lösung gehen und durch Abspülen der Probe entfernt werden.

Thermische Effekte durch Photo- und Kollisionsionisation sind ebenfalls bekannt und spielen bei der Mehrphotonenablation eine Rolle. Pro Puls wird ca.  $1 \text{ J/cm}^3$  übertragen (800nm, 100fs, 80MHz), was bei mindestens 1ms Dauer eine Temperaturerhöhung von  $1\text{-}10^\circ\text{C}$  im Fokus (Radius  $1\mu\text{m}$ ) verursachen kann. Im Umkreis von  $5\mu\text{m}$  reduziert sich die Temperaturerhöhung um den Faktor 10. Es wird jedoch angenommen, dass die physiologisch-chemischen Auswirkungen des reaktiven Elektronenplasmas größere Bedeutung haben als die Temperaturerhöhung (Vogel et al. 2005).

Durch die Photoablation durch Mehrphotoneneffekt können also Alginat mit präzisen Oberflächenstrukturen versehen werden und es können ausgedehnte, interne Hohlräume mit Verbindungen oder Trennwänden untereinander geschaffen werden. Lediglich zum Einbringen oder zur Entnahme von Zellen, z.B. durch eine Kanüle, ist ein Zugang notwendig. Eine photoablatierte

Oberfläche bietet sich, wie die Versuche zeigten, ohne weitere Modifikation als Kultursubstrat für Zellen an. Photoablatierte Alginatsubstrate bieten sich daher als Alternative oder in Kombination zur etablierten „moulding“ Technik an, um Alginatformen für unterschiedliche Anwendungen zu schaffen.

#### Zellverträgliche 2D Verkapselung – neue Techniken zur Kokultivierung von Zellen

Alginatschichten können, wie in dieser Arbeit gezeigt, manuell, z.B. tropfenweise mit einer Pipette, aufgetragen werden, wenn flächige Beschichtungen gewünscht ist. Zur gezielten Verkapselung einzelner Zellen oder Zellgruppen ist das mit einer Pipette berührungsfrei übertragbare Alginatvolumen zu groß. Aufgrund der Oberflächenspannung einer Flüssigkeit lassen sich keine beliebig kleinen Tropfen herstellen, jedoch ist es mit piezoelektrischen Systemen (z.B. Tintenstrahldrucker) möglich, Tropfen im Nano- bis Picoliterbereich zu generieren. Die meisten dieser kommerziell erhältlichen Systeme zeigen jedoch starke Einschränkungen, wenn es um viskose Lösungen ( $<100 \text{ mPa s}$ ) geht. Zur Dispensierung kleinster Alginatvolumen wurde daher in Zusammenarbeit mit der Fa. GeSim ein piezoelektrischer Alginatdispenser entwickelt, mit dem es möglich war, Alginattropfen mit einem Volumen im pico- bis Nanoliter Bereich zu dosieren, was auf der Oberfläche einen Spot von einigen  $0,01 \text{ mm}^2 - 2 \text{ mm}^2$  verursachte. Ein Problem dieser Dispensiertechnik ist das unkontrollierte Auftreten so genannter Satellitentropfen. Das sind kleinere Tropfen, die sich vom Haupttropfen während des Dispensierens ablösen. Größe und der Ort, an dem sie auf die Oberfläche auftreten können, nicht kontrolliert werden. Zurzeit ist das Minimum an dispensierfähigem Volumen erreicht. Um die Spotgröße weiter zu reduzieren, könnte die Lochblende verkleinert werden sowie Alginatlösungen geringerer Viskosität eingesetzt werden. Hierbei müsste jedoch getestet werden, ob die verringerte Viskosität die gleichen Eigenschaften in der Zellkultur aufweist.

Wie effektiv bereits sehr dünne Alginatschichten wirken, zeigte der Komplement-Lysistest, der auch in der Immunologie zu Untersuchungen an eukaryotischen Blutparasiten (z.B. Trypanosomen) angewandt wird. Das Komplementsystem dient, als Teil des humoralen Immunsystems, zur Abwehr körperfremder Zellen und bewirkt letztendlich die Lyse fremder Zellen durch Ausbildung des Membranangriffskomplexes, der eine Pore von ca.  $100 \text{ \AA}$  bildet. Aktiviert wird das Komplementsystem entweder durch bakterielle Oberflächen (Lektin abhängiger Weg, alternativer Weg) oder Antikörper (klassischer Weg). Da die Lyse der beschichteten Zellen unterbleibt, wird durch die Alginatschicht entweder die Opsonisierung durch Antikörper verhindert oder die Kaskadenentwicklung, die zur Ausbildung des Membranangriffskomplexes führt, unterbrochen (z.B. indem ein großes Protein nicht durch die Alginatschicht durchgelassen wird). Im Versuch war zu beobachten, dass bei ca. drei von zehn Experimenten (Serum von zehn unterschiedlichen Spendern) keine Lysis, weder bei beschichteten noch unbeschichteten Zellen, eintrat. Zudem variierte die Zeit bis zur Lysis der unbeschichteten Zellen zwischen 20min und 60min. Diese Unterschiede können jedoch auf unterschiedliche Aktivität des Komplementsystems der einzelnen Spender zurückgeführt werden, da eine Mischung aus dem Serum von fünf Spendern stets nach spätestens 40min zur Lysis der unbeschichteten Zellen führte. Der Komplement-Lysistest bietet sich somit an, die Effektivität einer Immunisationsbeschichtung durch Alginat oder andere Hydrogele zu charakterisieren.

Während also bestimmte Proteine durch die Alginatschicht abgeblockt werden, können  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , lebenswichtige Nährstoffe und Insulin offensichtlich passieren, da zahlreiche Zellen (L929, N2a, PC-3, Langerhanssche Inseln, Nebenschilddrüsengewebe) in Alginatkapseln oder unter Alginatschichten überleben. Auffällig ist die Koloniebildung von Zellen (L929, PC-3 und N2a) unter Alginat, die auf die starke Bindung von Alginat an die Kulturoberfläche und die damit

einhergehende migrationshemmende Wirkung zurückzuführen ist. Langzeitvideoüberwachung von kultivierten L929 Zellen zeigten direkt, dass die Bewegung der Filopodien unter Alginat eingeschränkt wird und auch die Zellen nach der Mitose nicht auseinanderweichen (Gepp et al. 2008). Die Alginatbeschichtung bietet sich damit als Kulturtechnik zur Schaffung von begrenzten Kulturräumen oder auch zur kontaktlosen Kokultivierung von Zellen an, die auch *in situ* aufgetragen werden kann. Ein Vorteil dieser Technik besteht außerdem darin, dass Alginatschichten selektiv auf die dorsale Seite der Zellen aufgetragen werden können, was als drug-delivery System für adhärente Zellen interessant wäre (Lehr 2000). Die angereicherte Alginatschicht bewirkt eine hochselektive Wirkstoffzufuhr von der ventralen Zellseite sowie ortsspezifisch in einer Zellkultur. Bisherige Techniken zur Schaffung von Kultursubstraten mit einer Struktur adhäsionsfördernder bzw. speziell der Adhäsionshemmenden Areale sind mit Bedingungen der Zellkultur nicht vereinbar und müssen daher vor der Applikation von Zellen durchgeführt werden. Parylene C beispielsweise ist ein in der Biotechnologie häufig verwendeter, stark hydrophober, inerte und biokompatibler Werkstoff. Dieser wird jedoch im Vakuum aus der Gasphase abgeschieden und kann daher nicht auf eine lebende Zellkultur angewandt werden.

#### Neue Anwendung von Alginatkapseln - Kultursubstrat für neuronale Vorläuferzellen

Alginatkapseln werden vielfach bereits als Kultur- und Immobilisierungssubstrate für die Biotechnologie und biomedizinische Forschung eingesetzt (Steinert et al. 2003, Ponce et al. 2006). Neuronale Vorläuferzellen aus der Ratte gelten als Modellsysteme zur Untersuchung von biochemischen und biophysikalischen Vorgängen im Gehirn von Säugetieren. Nicht nur für die pharmazeutische, sondern auch für die entwicklungsbiologische Forschung, sind neuronale Zellen und Neuroaggregate von Interesse. In eine Alginatkapsel eingeschlossen sterben neuronale Vorläuferzellen innerhalb weniger Tage ab. Neuronen und neuronale Vorläuferzellen werden üblicherweise auf polykationischen Oberflächen (PLL) kultiviert und sterben innerhalb kurzer Zeit ab, wenn diese nicht gegeben ist. Ein Versuch, durch Zumischung von ECM-Molekülen eine verbesserte Adhäsionsmöglichkeit zu bieten, konnte die Vitalität der Zellen in der Kapsel nicht erhalten (R. Malpique, unveröffentlichte Daten).

Von neuronalen Zellen ist weiterhin bekannt, dass sie in Kultur funktionale Netzwerke bilden, wobei der Zell-Zellkontakt essentiell ist und die Induktion von Apoptose verhindert. Werden einzelne neuronale Zellen (neuronale Vorläuferzellen oder Neuronen) in Alginatkapseln eingeschlossen, können keine Kontakte ausgebildet werden, da die Alginatmatrix Zellmigration und Ausbildung von Neuriten verhindert, bzw. stark reduziert (sh. Abbildung 4.40b und 4.41b). Es war somit kein überraschendes Ergebnis, dass die Zellen innerhalb weniger Tage abstarben. Auch eine Erhöhung der Zellzahl um den Faktor 10 konnte das, vermutlich apoptosebedingte, Absterben der Neuronen nicht verhindern<sup>4</sup>. Aus der Kultivierung von adhärennten Zellen unter Alginat ist bekannt, dass auch sehr dünne Alginatschichten (ca. 2µm durch Rasterkraftmikroskopie bestimmt: Abbildung 4.27) die Migration von Zellen bereits begrenzen, so dass weitere Erhöhungen der Zelldichte vermutlich das Problem nicht lösen werden. Eine Möglichkeit die Kultur von einzelnen Neuronen durchzuführen, wäre z.B. über Photoablation gezielt Verbindungen zwischen den einzelnen verkapselten Zellen zu schaffen, so dass nicht nur der lebensnotwendige

---

<sup>4</sup> Im Experiment wurde zwar kein Apoptosetest durchgeführt aber da Neuroaggregate, die aus denselben Zellen bestehen, 15 Tage Kultivierung in Kapseln mit hoher Vitalität überleben, liegt die Vermutung nahe, dass die Einzelzellen eher Apoptose induzieren als durch Nekrose, z.B: wegen schlechter Nährstoffversorgung oder Alginatunverträglichkeit in der Kapsel absterben.

Zell-Zellkontakt hergestellt, sondern auch definierte dreidimensionale neuronale Netzwerke geschaffen werden können. Die Annäherungsgrenze an lebende Zellen, ohne diese zu schädigen, liegt bei ca. 100nm (Versuche an Augengewebe, Angabe aus Erfahrung von Daniel Dörr). Weitere Versuche könnten zeigen, ob diese Wandstärke für den Durchbruch von Zellen bzw. Dendriten oder Filopodien ausreichend ist oder die Technik weiter verbessert werden muss.

Neuroaggregate, im Gegensatz zu Einzelzellen, ließen sich in Alginatkapseln sehr gut kultivieren. Wie die Ergebnisse zeigten, konnte eine hohe Vitalität der Aggregate nach 19 Tagen, davon 14 Tage in einer Alginatkapsel, beibehalten werden, was nicht nur durch positive Vitalitätsfärbung, sondern auch durch geringe LDH Aktivität im Kulturmedium nachgewiesen wurde. Der Stoffwechsel sowohl der verkapselten als auch der nicht-verkapselten Aggregate liegt im aeroben Bereich. Glutaminverbrauch bzw. Ammoniumproduktion sind nahezu identisch mit der unverkapselten Kontrolle und auch die Entwicklung von neuronalen Vorläuferzellen (Nestin-positiv) zu Astrozyten (GFLP-positiv) und Neuronen (Neurofilament- und Synaptophysin-positiv) läuft im selben Umfang im selben Zeitraum ab. D.h. im Gegensatz zu z.B. C3H10T1/2 Zellen (multipotente mesenchymale Zellen) ließ sich kein Einfluss der 3D Umgebung auf das Ausmaß oder Geschwindigkeit der Entwicklung ablesen (Weber et al. 2002, Steinert et al. 2003).

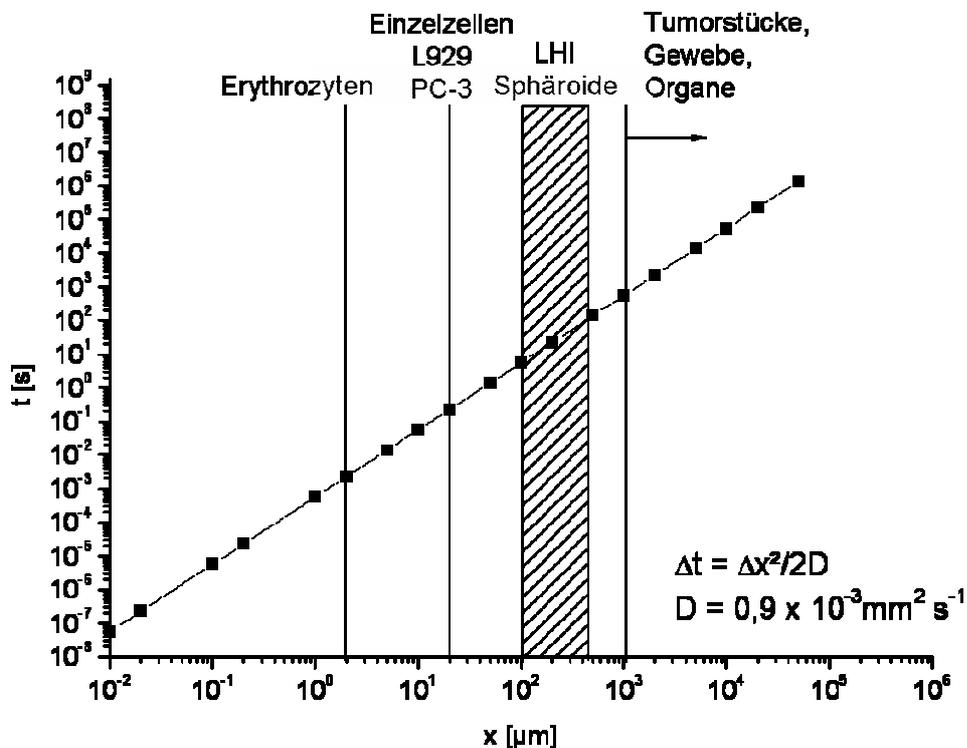
Der einzige Unterschied lag in der etwas geringeren Volumenzunahme der verkapselten Aggregate im Versuchszeitraum. Dieser kann entweder auf niedrigere Mitoserate und damit niedrigere Zellzahl zurückgeführt werden, wobei dagegen der anähernd gleiche Glukoseverbrauch spricht, oder eine geringer ausgeprägte räumliche Umgestaltung der Aggregate. Neuroaggregate entwickeln im Laufe der Zeit eine „Schale“ aus sehr dichten Zellschichten und einen weniger dichten Innenraum. Ob bzw. in welchem Umfang diese Entwicklung bei verkapselten Neuroaggregaten stattfindet, könnte in weiteren Versuchen z.B. durch Untersuchung von Querschnitten (z.B. Kryoschnitte und Immunhistochemie, Ultradünnschnitte und TEM) überprüft werden.

Die Verkapselung von Neuroaggregaten bietet dennoch den unmittelbaren Vorteil, dass bei der Kultur in der Spinnerflasche ein breiteres Spektrum von Rotationsgeschwindigkeiten angewandt werden könnte. Die Rotationsgeschwindigkeit beeinflusst direkt die Größe der Aggregate (je schneller desto kleiner) und parallel den Sauerstoffeintrag. Eine Entkopplung dieser Folgen kann durch Verkapselung der Aggregate erreicht werden. Zerstörerische Scherkräfte bei hohen Rührgeschwindigkeiten können durch die Alginatkapsel abgefangen werden und Agglomeration von Neuroaggregaten bei geringen Rotationsgeschwindigkeiten, z.B. zur Simulation von Hypoxie, verhindert werden. Die Verkapselung bietet damit neue Möglichkeiten zur Forschung an Neuroaggregaten.

#### Kryokonservierung von 3D Systemen - sind extrazelluläre CPAs besonders effektiv?

Während eine Vielzahl von Zellen auf einfache Weise mit hoher Vitalität nach dem Auftauen kryokonserviert werden kann, gibt es bisher nur wenige Protokolle für effiziente Kryokonservierung von multizellulären Systemen. Kryoprotokolle, die erfolgreich an Zellsuspensionen getestet wurden, sind in den meisten Fällen weniger bzw. überhaupt nicht auf Gewebe oder gewebeähnliche Strukturen wie Sphäroiden anwendbar. Auch umgekehrt sind, wie im Versuch gezeigt, Protokolle, die Sphäroide effektiv vor Schäden bei der Kryokonservierung schützen, weniger effektiv für Zellsuspensionen. Im Gegensatz zu Zellsuspensionen muss bei der Kryokonservierung von multizellulären Systemen (und bei adhärennten Zellen) besonders auf die extrazelluläre Eisbildung geachtet werden. Extrazelluläre Eisbildung zerstört Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakte auf eine Weise, die auch die Vitalität der Zellen beeinflusst (Karlsson und Toner 1996).

Längere Inkubationszeiten zur homogenen Verteilung des CPAs sind zwar notwendig, spielen jedoch (für  $\text{Me}_2\text{SO}$ ) eine untergeordnete Rolle. Nach Berechnung der Diffusionsgeschwindigkeit zeigt sich, dass sowohl Zellen als auch Sphäroide der verwendeten Größenordnung innerhalb der 30min Inkubationsdauer eine gleichmäßige Konzentration aufweisen sollten, vorausgesetzt,  $\text{Me}_2\text{SO}$  verteilt sich in Sphäroiden ähnlich schnell wie in Wasser (Abbildung 5.3). Dies ist anzunehmen, da Sphäroide und Zellen sehr klein sind und die Membran kein Hindernis für die Diffusion von  $\text{Me}_2\text{SO}$  ist. Der Gewebedruck kann jedoch die maximale  $\text{Me}_2\text{SO}$  Konzentration im Gewebe auf bis zu 69% der Außenkonzentration reduzieren (Elmoazzen et al. 2005). Auch die hohen Konzentrationen von Salzen und anderen gelösten Stoffen, die durch den Entzug des Wassers durch Eisbildung aufkonzentriert werden, verursachen generell in biologischen Zellen Schäden durch die so genannten „Solution Effects“ (Lovelock 1953, Mazur et al. 1972) und kritischen Volumenverlust (Meryman 1970, Steponkus et al. 1983). Die Vitalität und der Kultivierungserfolg von adhärennten Zellen nach der Kryokonservierung waren stets geringer als die der korres-



**Abbildung 5.3:** Diffusion von  $\text{Me}_2\text{SO}$  in Wasser. Angenommen wird eine Temperatur von  $20^\circ\text{C}$  und, dass Zellen oder Gewebe keine Verlangsamung der Diffusionsgeschwindigkeit verursachen. Als Linien bzw. Bereiche sind die Dimensionen von bestimmten, in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Gewebe markiert.

pondierenden Zellsuspensionen (Ohno 1994, Hetzel et al. 1973). Eine Schädigung der Zellen durch osmotische Schwankungen bei der Zugabe der Kryoprotektive muss ebenfalls berücksichtigt werden. Während extrazelluläre Kryomedia isoton zugegeben wurden bedeutete die Zugabe von Kulturmedium mit 10%  $\text{Me}_2\text{SO}$  einen Anstieg der Osmolarität von ca. 300mOsmol auf etwa 1800mOsmol. Nach Chen et al. 2007 reagieren Einzelzellen darauf mit einer Volumenreduktion

um 30% innerhalb 10s wobei das Originalvolumen nach ca. 2min wieder hergestellt wird im Gegensatz zu konzentrierter PBS-Lösung. Auch L929 Sphäroide, die, unter mikroskopischer Beobachtung, mit 10% Me<sub>2</sub>SO inkubiert wurden, zeigten unmittelbar nach der Zugabe des Me<sub>2</sub>SOs eine Volumenabnahme um ca. 30% (Daten nicht gezeigt) die sich jedoch schnell (innerhalb weniger Minuten) wieder an das ursprüngliche Volumen annäherte.

Nach der Zwei-Faktor-Hypothese (1972) bzw. der Idee des „equilibrium freezing“ (1990) von Mazur muss ein Gleichgewicht zwischen Stoff- und Wärmetransfer eingehalten werden. Das bedeutet, dass die Abkühlung weder zu langsam vonstatten gehen darf, damit nicht zuviel Wasser abgegeben wird und auch nicht zu schnell, damit die Zelle genug Wasser abgibt um intrazelluläre Eisbildung zu vermeiden (s.h. auch Farrant 1977). Die hydraulische Leitfähigkeit von Sphäroiden ist, wie Korniski et al. 1999 an Hepatozyten gezeigt haben, niedriger als in einzelnen Zellen. Die überlebenswichtige partielle Dehydrierung der Zellen kann demnach nicht oder nicht im notwendigen Ausmaß stattfinden. Zu schwache Dehydrierung und damit stärkere intrazelluläre Eisbildung könnte die geringere Vitalität von Sphäroiden im Vergleich zu Einzelzellen von bestimmten intrazellulären Kryomedien wie z.B. Me<sub>2</sub>SO erklären. Diese Kryomedien dringen in die Zellen ein und ersetzen Wasser, während extrazelluläre CPAs (Trehalose, SHP) den Zellen kolloidosmotisch Wasser entziehen, was die Anfälligkeit für intrazelluläre Eisbildung senkt. Für die Ursachen für intrazelluläre Eisbildung (intracellular ice formation: IIF) wurden von Muldrew und McGann (1990) folgende Hypothesen zusammengefasst:

1. Die Unterkühlung des Zytoplasmas führt spätestens an der homogenen Nukleationstemperatur von -40°C zur spontanen Entstehung von Eiskristallen (tierische Zellen besitzen keine Nukleationskeime im Zytoplasma (Rasmussen et al. 1975), also homogene Nukleation).
2. Extrazelluläre Eiskristalle, die durch Wasser gefüllte Kanäle in die Zelle gelangen, führen zum Gefrieren des Zytoplasmas (Mazur 1977).
3. Die Permeabilisierung der Membran durch transiente, elektrische Felder, die bei der Ladungstrennung beim Gefrieren von elektrolythaltigen Lösungen entstehen, lässt das Eindringen von extrazellulärem Eis zu (Steponkus et al. 1985).
4. 1994 wurde von Muldrew und McGann eine weitere Hypothese vorgeschlagen und mathematisch belegt: der Membrandurchbruch aufgrund von osmotisch induziertem Wasserdurchfluss.<sup>5</sup>

Trehalose ist ein extrazellulär wirkendes Kryoprotektivum, das speziell Membranen und Makromoleküle (sofern vorhanden) vor Schäden durch Wasserentzug schützt und damit 2 von 4 hypothetischen Eisbildungsmechanismen verhindert bzw. verzögert. Trehalose senkt die hydraulische Leitfähigkeit der Membran (wahrscheinlich durch „Quervernetzung“ von Membranlipiden, Anchordoguy et al. 1987) und erhöht, wie die meisten Zucker, stark die Viskosität der Lösung bei der Gefrierkonzentration (Konzentration wird durch Wasserentzug erhöht und gleichzeitig die Temperatur gesenkt), was zu kleineren Eiskristallen, verbesserter Vitrifikation und verlangsamtem Wasserentzug aus den Zellen führt. Im Gegensatz zu den häufig verwendeten Stärkederivaten (z.B. HES, Hydroxyethylstärke) werden die Stärkehydrolysate bisher kaum (Myhrvold 1979 an Erythrozyten) als Kryoprotektiva verwendet. Für diese Experimente wurde N-Oil ® verwendet, das nicht nur biokompatibel ist sondern eine der höchsten, bei Mono-, Di- und Polysacchariden vorkommenden, Glasübergangstemperaturen besitzt (Levine und Slade, 1987). Stärkederivate müssen vor Verwendung üblicherweise über die so genannte Gelatinisierungstemperatur (hier

---

<sup>5</sup> Außerdem gibt es erste Belege für die Entstehung von Eis in der dünnen Flüssigkeitsschicht unter adhärenen Zellen, welches möglicherweise die Entstehung intrazellulären Eises fördert (Stott, 2006).

ca. 60°C) erhitzt werden, um Stärkegranula aufzubrechen und die einzelnen Stärkemoleküle erst löslich zu machen, was zu einer viskosen Lösung führt. Beim Abkühlen verfestigt sich die Lösung zu einer gummiartigen Masse, je nach Kühlgeschwindigkeit mit oder ohne Eisbildung, und kann direkt in den glasartigen Zustand übergehen (Tananuwong und Reid 2004).

SHP führte im Experiment zu einer stark erhöhten Vitalität von Sphäroiden, während der kryoprotektive Effekt auf einzelne Zellen eher gering ausfiel. Diese Ergebnisse legen nahe, dass extrazelluläre Kryoprotektiva, die die Osmolarität und die Viskosität während dem Gefrieren erhöhen, langsam agierende osmotische Systeme wie Sphäroide besser schützen als intrazelluläre Kryoprotektiva. Alternativ könnten langsamere Kühlraten zu stärkerer, positiver Dehydrierung bei der Kryokonservierung von Sphäroiden führen, wobei dies noch experimentell bestätigt werden muss. Versuche von Taylor und Pegg (1983) zeigten beispielsweise, dass Muskelgewebe besser überlebt bei langsameren Kühlraten von etwa 0,3°C/min als bei schnelleren (2°C/min). Daraus lässt sich schließen, dass es für Gewebe ebenso eine optimale Kühlrate gibt, wobei diese niedriger ist als bei Einzelzellen und durch Kryoprotektiva modifiziert werden kann (Mazur 1972).

Zur Bestimmung der Vitalität von multizellulären Systemen nach der Kryokonservierung gibt es keine einheitliche, standardisierte Methode, was aber auch durch die Vielfalt der kryokonservierten Gewebe bedingt ist. Oft wird nach der Kryokonservierung (und davor für die Frisch-Kontrolle) das Gewebe oder der Sphäroid in Einzelzellen aufgelöst und die Vitalität der Zellsuspension bestimmt (z.B. Pasquinelli et al. 2006). Parallel zur Dissoziierung werden oftmals am intakten Gewebe weitere immunhistochemische Untersuchungen zu Quantifizierung bestimmter Zellen, elektronenmikroskopische Untersuchungen (z.B. TEM, oder auch Freeze substitution zur Lokalisierung von Eiskristallen) oder eine HE-Färbung zur Evaluierung von Strukturschäden durchgeführt. Nichtsdestotrotz hat die Dissoziierung in einzelne Zellen mehrere Nachteile: Bei der enzymatischen oder mechanischen Zerstörung der extrazellulären Matrix und/oder der Zell-Zellkontakte werden Zellen beschädigt bzw. bereits tote Zellen oft vollends zerstört und nicht mehr zur Vitalitätsbestimmung erfasst. Des Weiteren ist die Dissoziierung zeitaufwändig, so dass die Vitalität unmittelbar nach dem Auftauen nicht erfasst werden kann. Zerstörungsfreie Vitalitätsbestimmung wurde z.B. anhand morphologischer Merkmale beurteilt oder durch zellspezifische Stoffwechsellleistungen (Insulinproduktion bei Langerhansschen Inseln, Albuminproduktion und Umwandlung von Ammonium in Harnstoff bei Hepatozyten). Für Langerhanssche Inseln hat sich z.B. parallel zur morphologischen Beurteilung (mit oder ohne Dithizone – Färbung) die Stimulierbarkeit durch Glukose und das Ausmaß der Insulinproduktion als zuverlässigster Index für die Vitalitäts- bzw. Funktionalitätsbestimmung etabliert (Jutte et al. 1987, Li et al. 2002, Maruyama et al. 2004). Die Fluoreszenzfärbung mit FDA und Ethidiumbromid hat bereits gute Übereinstimmung mit den ermittelten Stimulationsindices gezeigt (Zimmermann et al. 2005).

In einer Probe von Sphäroiden, häufiger bei L929, selten bei PC-3, wurden Sphäroide von sehr unterschiedlicher Vitalität gefunden, bisweilen vollkommen vitale neben vollkommen Toten. Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, dass PC-3 Zellen Gap Junctions ausbilden, L929 nicht. Die fortschreitende Eisbildung ist limitiert durch die Verfügbarkeit von Wasser, die Zellmembran ist z.B. eine wirksame Barriere, solange keine Verbindungen (z.B. Kanäle oder Gap Junctions) oder Brüche vorhanden sind (Acker et al. 2001), jedoch lässt sie Diffusion von Wasser aus dem Zytoplasma zu. Für einen Sphäroiden kann homogenes Gefrieren für das Überleben der einzelnen Zellen notwendig sein. Gefrorene oder gefrierende Zellen im Zellverband entziehen durch ihr hochkonzentriertes Zytoplasma den noch ungefrorenen Zellen Wasser. Dies kann zur letalen Dehydrierung führen.

Außerdem kann die Beschaffenheit des Kryogefäßes die Vitalität beeinträchtigen z.B. mit mehr oder weniger homogener Wärmeableitung. In großen Volumina, wie die 1ml Kryoröhrchen,

kann Wärme weniger schnell und weniger homogen abgeleitet werden wie in kleineren 25µl Gefäßen, wobei aber Sphäroide mit starken Vitalitätsunterschieden in beiden Kryogefäßen beobachtet wurden. Die Vitalität der Sphäroide war jedoch in den miniaturisierten Substraten mindestens gleich hoch, eher höher als in den 1ml Kryoröhrchen (Ausnahme PC-3 Sphäroide).

#### Grenzen der Aussagefähigkeit von Modellsystemen - zellspezifische Kryotoleranz als Kriterium?

Die Anwendung der mit dem Modellsystem optimierten Kryoprotokolle auf Tumorstücke (ca. 150µm dick und ca. 1 x 1mm Fläche) zeigte jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Nach dem Auftauen wurde die Vitalität der Tumorstücke nicht über direkte Vitalfärbung und Bildauswertung bestimmt, da die Stücke sowie der Abstand zwischen den enthaltenen Zellen zu groß waren. Stattdessen wurde eine enzymatische Dissoziation des Gewebes durchgeführt und die Zahl der vitalen und toten Zellen via Hämozytometer bestimmt. Dabei zeigte sich, dass allein die Kryokonservierung mit Me<sub>2</sub>SO eine Vitalität über 50% sowie einen sichtlichen Erfolg bei der Kultivierung der aufgetauten Zellen hatte. Die Kryomedien, die im Modellsystem die größten Erfolge hatten, zeigten sehr schlechte Vitalitäten und kaum Erfolg bei der Kulturretablierung am medizinisch interessanten Tumorgewebe. Aus der Literatur ist wenig bekannt über die erfolgreiche Kryokonservierung von Tumorgewebe. Beispielsweise können Untersuchungen an der RNA von eingefrorenen Tumorgeweben gemacht werden, die bis zu drei Mal hintereinander eingefroren und aufgetaut wurden (Jochumsen et al. 2007). Tumorzellen und -gewebe wird überwiegend zum Zweck der Ermittlung der letalen Unterkühlung/Eisbildung eingefroren, was zur Kryochirurgie angewandt wird (Jacob et al. 1985). Gesundes Ovarialgewebe lässt sich, unter Erhalt der Fähigkeit Oozyten zu produzieren, kryokonservieren z.B. um die Fertilität nach einer Chemotherapie wiederherzustellen (Isachenko et al. 2007, Gandolfi et al. 2006, Donnez et al. 2004, Radford et al. 2001).

Die starken Unterschiede zwischen dem Modellsystem und Tumor lassen sich entweder auf die Struktur (Art und Masse der ECM, Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakt) oder auf zelluläre Unterschiede zurückführen. Um die Relevanz der Strukturunterschiede zu evaluieren, wurden aus frisch isolierten Tumorzellen Sphäroide kultiviert und entsprechend kryokonserviert. Dabei zeigte sich, dass die (schlechte) Vitalität nach dem Auftauen eher dem des Tumorgewebes entsprach und nicht dem des Modellsystems. Diese Experimente zeigen demnach deutlich die Grenzen von Modellsystemen. Die unterschiedliche Reaktion von unterschiedlichen Zellen auf dasselbe Kryoprotokoll zeigt, dass die Ursache in der unterschiedlichen Art der Zellen liegt die man allgemein als zellspezifische Kryotoleranz bezeichnen könnte. Die zellspezifische Kryotoleranz beinhaltet demnach zelltypische Faktoren, die die Reaktion der Zelle auf Kryokonservierung ausmachen. Hydraulische Leitfähigkeit der Membran, Zahl und Art der Zell-Zellverbindungen, Größe der Zelle, osmotisch aktives Volumen, Energiezustand, Organisation des Zytoskeletts, Membranschmelzpunkt und Zellzyklus spielen dabei eine Rolle. Für die weitere Entwicklung des Modellsystems sollte daher auf primäre Tumorzellen zurückgegriffen werden, wobei jedoch die Kultivierung als Sphäroide zu empfehlen ist, um strukturelle Unterschiede auszuschließen.

#### Einfluss der Alginatkapsel auf den Kryokonservierungserfolg

Verkapselung mit Alginat wird in der Kryokonservierung und Lyophilisierung von pflanzlichen Zellen oder Bakterien (Sakai et al. 2007, Flachslund et al. 2006) erfolgreich eingesetzt, wobei oft auf die Verwendung hochkonzentrierter Medien in Zusammenhang mit Vitrifikationsprotokollen

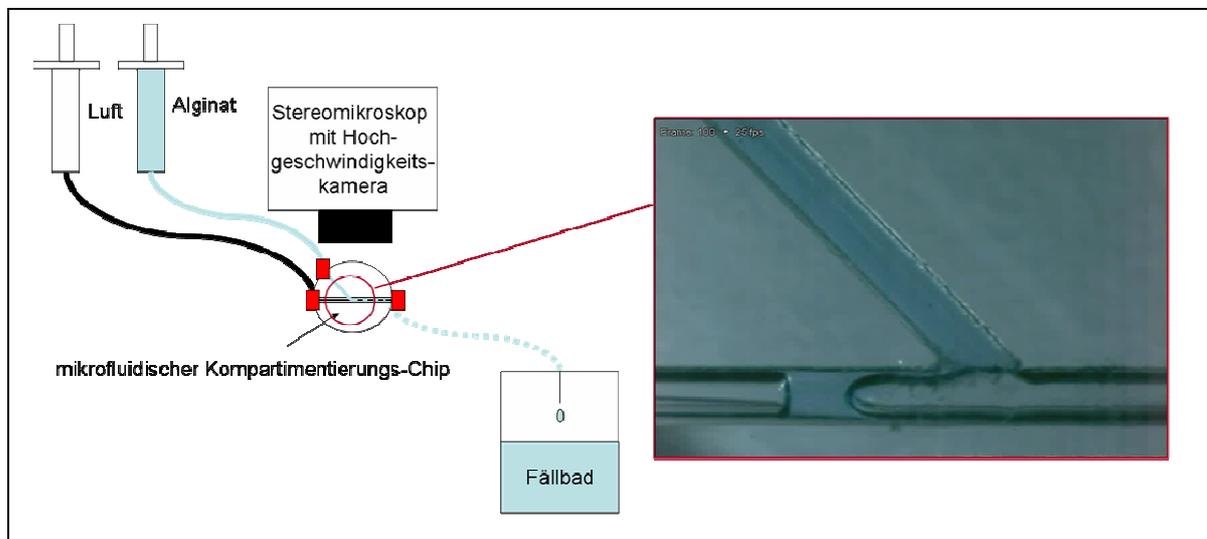
zurückgegriffen wird. Die Wirkung der Alginatkapsel wird dabei durch osmotische Stabilisierung von pflanzlichen Zellen erklärt. Auch kryokonservierte, verkapselte tierische Zellen wurden erfolgreich als controlled drug release und -producer – Systeme eingesetzt (z.B. Endostatin produzierende HEK Zellen, Stensvaag et al. 2004). Bereits bekannt ist auch die Verkapselung von Langerhansschen Inseln, die ein Plus von ca. 10% Vitalität nach dem Auftauen bewirkt (A. Katsen-Globa et al. 2007). Experimente mit Erythrozyten zeigten ebenfalls viel versprechende Ergebnisse. Die Verkapselung von L929 Sphäroiden verbesserte die Vitalität nach dem Auftauen nicht signifikant, während sie PC-3 Sphäroiden stark schadet. Bei N2a Zellen zeigte sich dass, weiches 0,4%iges Alginat (ohne Crystal Gun – Behandlung) deutlich höhere Vitalitäten der eingeschlossenen Zellen bewirkt als festes Alginat (0,65% mit Crystal Gun).

Der Anteil von gebundenem Wasser innerhalb der Alginatkapsel wird durch den Alginateil sowie durch die Festigkeit (Crystal Gun – Behandlung) bestimmt. Eine höhere Alginatkonzentration bewirkt, wie die stärkere, homogenere Vernetzung von Alginat, einen höheren Anteil gebundenen Wassers. Für N2a Zellen und möglicherweise auch für andere Zellmodelle scheint also eine gewisse Notwendigkeit von ungebundenem Wasser für das Überleben der Kryokonservierung notwendig zu sein. Die Bildung von extrazellulärem Eis, und daraus folgend die Erhöhung der Osmolarität, die Zellen Wasser entzieht und deren Gefrierpunkt senkt, wird direkt durch die Verfügbarkeit von ungebundenem Wasser beeinflusst. Eine weitere Möglichkeit, wie die Alginatkapsel den Kryokonservierungserfolg von Zellen beeinflussen könnte, wäre über die Kristallisationsgeschwindigkeit von Eis. In den Hochgeschwindigkeitsaufnahmen der Eisbildung um eine Alginatkapsel konnte gezeigt werden, dass die Alginatkapsel das Eiswachstum bremst (sh. Abbildung 4.62). Wird die Kristallisationsgeschwindigkeit von der Verfügbarkeit des Wassers in der Alginatmatrix reduziert, steigt die Konzentration gelöster Stoffe langsamer an. Eine wasserbindende Matrix würde also praktisch ähnlich wirken wie eine niedrigere Kühlrate und dementsprechend auf unterschiedliche Zellarten unterschiedliche Auswirkungen haben, wie im vorigen Abschnitt bereits erwähnt wurde. Weitere Versuche könnten den Anteil des gebundenen Wassers (mittels NMR/MRI) in den Kapseln untersuchen und einen Zusammenhang zwischen dem Anteil freien Wassers, der Kühlrate und dem Kryokonservierungserfolg erstellen. Neue kryoprotektive Medien könnten im Hinblick auf ihren Wasserbindungserfolg im Voraus evaluiert und eingesetzt werden.

Experimente zeigten, dass Alginat Migration von Zellen, sowohl in einer Kapsel als auch unter Alginatschichten effektiv hemmt (Gepp et al. 2007 und 2008, Zimmermann et al. 2007). Die Mitose von L929 dagegen wird unter der Alginatschicht nicht gehemmt. Auch die Ablösung von Zellen während der Kryokonservierung wird verhindert, sowohl die kälteinduzierte (in Übereinstimmung mit Hagedorn et al., nicht publizierte Daten) als auch die gefrierbedingte (durch extrazelluläre Eisbildung). Eine Erklärung wäre, dass Alginat, wie Kollagen, Wasser bindet und damit weniger extrazelluläre Eisbildung, also keine größeren Eiskristalle, erlaubt. Zwar ist anzunehmen, dass Alginat als „weiche“ Oberfläche thermomechanischen Stress während der Kryokonservierung reduziert (beispielsweise ist weiches (0,4%iges) Alginat für Kryokonservierung von N2a Zellen in 3D Kapsel besser geeignet als festes (0,65%, Crystal Gun)), jedoch ist die Alginatschicht zur erfolgreichen Kryokonservierung adhärenter Zellen allein (mit Kryoprotektivum) nicht ausreichend. Erst eine Oberflächenbeschichtung mit ECM-Molekülen (Matrigel®) in Kombination mit Alginat zeigte gute Kryokonservierungserfolge. Weitere Versuche in der Kryokonservierung adhärenter Zellen könnten z.B. die Wirksamkeit von Alginat-Zell-Alginat Konstrukten untersuchen, da in diesem System auf die Verwendung von ECM verzichtet werden könnte. ECM ist für die medizinische Anwendung aufgrund seines Gehalts an tierischem Protein problematisch.

### Ausblick

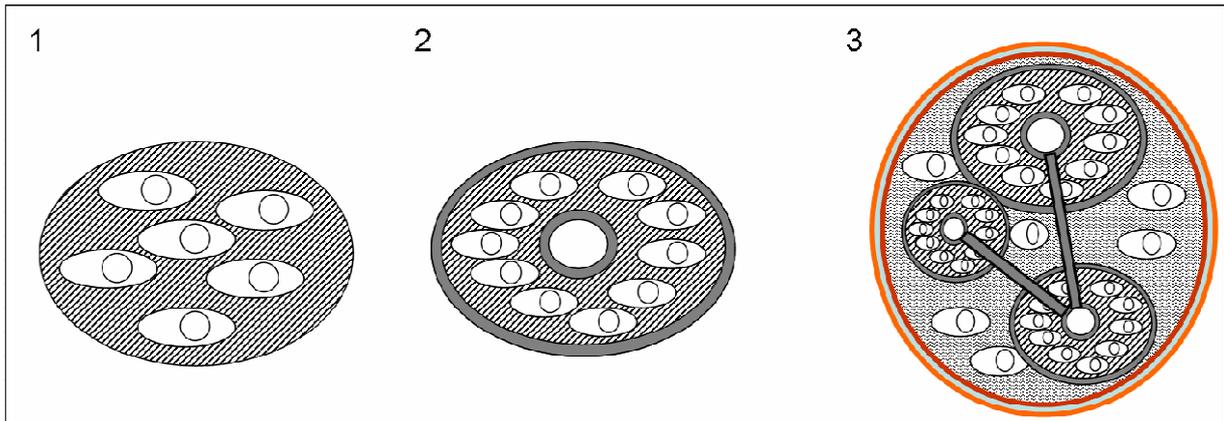
Zur verbesserten Zentrierung der Kapseln und zur Vermeidung von mechanischem Stress bei der Kompartimentierung und Polymerisation wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Analytentechnik (iba) ein mikrofluidikbasiertes Verkapselungssystem entwickelt, das die Probleme beim Eintropfverfahren umgehen soll. Dabei wird Alginat-Zellsuspension von einer Spritzenpumpe über einen Teflonschlauch in einen Chip geleitet und dort mittels definierten Lufteintrags in kleine Kompartimente zerlegt (Abbildung 4.9). Erste Versuche zeigten dabei, dass die Kompartimentierung von Alginat prinzipiell möglich ist, jedoch die Kompressibilität der Luft zu starken Druckschwankungen führt, die die Kompartimente im Schlauch zerstören. Weitere Versuche mit einer hydrophoben, zellverträglichen Flüssigkeit zur Kompartimentierung von Alginat anstelle von Luft (z.B. Fluordecalin) sind geplant. Im Gegensatz zu Köstner et al. (2008) ist ein Verfahren mit nur 2 Kanälen (sh. Abb. 5.4) angedacht.



**Abbildung 5.4:** Kompartimentierungsexperiment an einer neuartigen mikrofluidik-basierten Verkapselungsanlage. Die Kompartimentierung erfolgt in einem Kompartimentierungschip, schonend unter Eintrag von Luft in einen kontinuierlichen Alginatstrom. Alginat wurde zur besseren Sichtbarkeit blau eingefärbt. Die Polymerisation der Alginatkompartimente wurde in diesem Experiment über Eintropfen in Polymerisationslösung gemacht, soll aber, um mechanischen Stress zu vermeiden, zukünftig im Schlauch über semipermeable Membranen (z.B. Dialyseschläuche) durchgeführt werden.

Die Techniken und Methoden zur Realisierung von Zell-Matrix Konstrukten und deren Kryokonservierung wurden in dieser Arbeit so weit entwickelt, dass der Schwerpunkt der weiteren Forschung auf die Anwendung am Zell- bzw. Organmodell gesetzt werden könnte. Bereits im Tierversuch angewandt wird zurzeit die immunisierte Transplantation von Langerhansschen Inseln, jedoch können prinzipiell sämtliche endokrinen Gewebe in Alginat verkapselt werden, die entweder klein genug sind ( $> \text{ca. } 500\mu\text{m}$ ) oder in Einzelzellen zerlegt werden können, ohne ihre Funktionalität zu verlieren (Hepatozyten). Alginatkapseln können nicht nur mit verschiedenen Zellen „gefüllt“ sein, sondern auch, nach Modifikation der Oberfläche, von anderen Zellen umwachsen werden, während die Photoablation eine Methode zur Schaffung von spezifischen Kanälen und Hohlräumen bietet. Zudem bietet die 2D-Verkapselung nicht nur die Möglichkeit adhärenente Zellen mit einer schützenden Alginatschicht zu versehen, mittels mehrfacher abwechselnder PLL-Alginat-Beschichtung sind mehrschichtige planare, bis hin zu 3D-Konstrukten (3D-

Plotting), durch abwechselnde automatische Dispensierung von Zellen (Calvert 2007) und Matrix möglich. Mittels der in dieser Arbeit entwickelten Techniken bieten sich somit viele Möglichkeiten zur Konstruktion funktioneller Implantate und Modellsysteme. Die Kombination von unterschiedlichsten Zellen (Stammzellen, primäre und Zelllinien) mit einer Vielfalt von ECM (Kollagen, Laminin, Hyaluronsäure), natürlichen (Alginat, Zellulose) und artifiziellen (Parylene C) Molekülen mit ihren spezifischen Strukturierungs- und Modifikationsmöglichkeiten erweitert den Horizont zur Konstruktion von Modellsystemen und künstlichen Geweben (Abbildung 5.5).



**Abbildung 5.5:** Schematische Darstellung zur Konstruktion von Modellsystemen für 1: Gewebe bzw. Gewebeteile; Gewebe bestehen aus einer oder wenigen verschiedene Zellen auf einer Basallamina oder umgeben von extrazellulärer Matrix; 2: Organe bestehen aus mehreren verschiedene Zellen, umgeben von ECM in spezieller Anordnung (z.B. Endothel, Glomeruli, Muskelfasern), dazwischen flüssigkeitsgefüllte Lumina (Blutgefäße/Lymphgefäße) umgeben von Abschlussgewebe. Organe bilden eine funktionale Einheit; 3: Multiorgansysteme: mehrere verschiedene Organe in spezieller Anordnung umgeben von mehrschichtigem Abschlussgewebe, dazwischen zieht sich System von flüssigkeitsgefüllten Lumina und zelldurchsetzter ECM.

---

## 6. Zusammenfassung

Wissenschaftliches Ziel dieser Arbeit war es, Untersuchungen zur Einschlussimmobilisierung und Kryokonservierbarkeit von immobilisierten Zellen und multizellulären Systemen medizinisch relevanter Zellen durchzuführen, neue Erkenntnisse über die grundlegenden Probleme zu gewinnen und durch Umsetzung in optimierte Methoden und Protokolle zu verbessern. Es wurden teilweise etablierte Verfahren der Verkapselungstechnologie mit Alginaten, Kryobiotechnologie und Methoden aus der allgemeinen Zellkultur angewandt aber auch neue Methoden zur Verkapselung oder Beschichtung adhärenter Zellen, Strukturierung von Alginat mittels Photoablation und Untersuchung der Kapselentstehung und der Eisbildung im Kryomikroskop mittels Hochgeschwindigkeitsvideo entwickelt. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit stellen neue Informationen über die Kinetik der Kapselentstehung und über die Kryokonservierung multizellulärer Systeme dar, die aus der Entwicklung neuer Methoden und Techniken resultieren. Die Beschichtung von Zellen bietet zudem eine neue Möglichkeit, diese im adhärenen Zustand mit hohem Erfolg zu kryokonservieren und eröffnet neue Wege im tissue engineering.

### Abstract

The scientific aim of this thesis was to investigate embedding immobilization and cryopreservation of immobilized cells and multicellular systems of medically interesting cells, to find new informations about the basic problems and to improve it by finding and evaluating new techniques and protocols. The methods used in this thesis are partly established techniques of encapsulation with alginates, cryopreservation of animal and human cells, and general methods of cell culture and, additionally, new methods are developed for encapsulation or covering of adherent cells, structuring of alginate surfaces and volumes via particle beam or photo ablation. Furthermore, new investigation techniques of encapsulation and freezing kinetics based on high speed video analysis were established. So, the most important results of this thesis are new informations about kinetics of alginate capsule formation and cryopreservation of multicellular systems which resulted from the development of new methods and techniques. The covering of cells with alginate gives additionally a possibility to cryopreserve them in adherent state with high success and opens new pathways of tissue engineering.

---

## 7. Literaturverzeichnis

- [1] J.P. Acker, L.E. McGann; Cell-cell contact affects membrane integrity after intracellular freezing. *Cryobiology* 40/1 (2000) 54-63.
- [2] J.P. Acker, J.A. Elliott, L.E. McGann; Intercellular ice propagation: Experimental evidence for ice growth through membrane pores. *Biophys J* 81/3 (2001) 1389-1397.
- [3] D.R. Ackerman; Damage to human spermatozoa during storage at warming temperatures. *Int J Fertil* 13/3 (1968) 220-225.
- [4] S. Adler, C. Pellizzer, M. Paparella, T. Hartung, S. Bremer; The effects of solvents on embryonic stem cell differentiation. *Toxicol In Vitro* 20/3 (2006) 265-271.
- [5] T.J. Anchordoguy, A.S. Rudolph, J.F. Carpenter, J.H. Crowe; Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24/4 (1987) 324-331.
- [6] E.A. Bateson, A.L. Busza, D.E. Pegg, M.J. Taylor; Permeation of rabbit common carotid arteries with dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 31/4 (1994) 393-397.
- [7] A. Baudot, L. Alger, P. Boutron; Glass-forming tendency in the system water-dimethyl sulfoxide. *Cryobiology* 40/2 (2000) 151-158.
- [8] G.M. Beattie, J.H. Crowe, A.D. Lopez, V. Girulli, C. Ricordi, A. Hayek; Trehalose: A cryoprotectant that enhances recovery and preserves function of human pancreatic islets after long-term storage. *Diabetes* 46/3 (1997) 519-523.
- [9] A. Bielanski; Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapour phase of liquid nitrogen in dry shippers. *Cryobiology* 50/2 (2005) 206-210.
- [10] A. Bielanski, H. Bergeron, P.C. Lau, J. Devenish; Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 46/2 (2003) 146-152.
- [11] J.C. Bischof, B. Rubinsky; Large ice crystals in the nucleus of rapidly frozen liver cells. *Cryobiology* 30/6 (1993) 597-603.
- [12] I. Braccini, S. Pérez; Molecular basis of Ca<sup>2+</sup>-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules* 2/4 (2001) 1089-1096.
- [13] H. I. Chen, C.D. Tsai, H.T. Wang, S.M. Hwang; Cryovial with partial membrane sealing can prevent liquid nitrogen penetration in submerged storage. *Cryobiology* 53/2 (2006) 283-287.
- [14] H.H. Chen, J.J.P. Purtteman, S. Heimfeld, A. Folch, D. Gao; Development of a microfluidic device for determination of cell osmotic behavior and membrane transport properties. *Cryobiology* 55/3 (2007) 200-209.
- [15] P. Calvert; Printing Cells. *Science* 318/5848 (2007) 208-209.
- [16] J.F. Carpenter, T.N. Hanssen; Antifreeze protein modulates cell survival during cryopreservation: Mediation through influence on ice crystal growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89/19 (1992) 8953-8957.
- [17] S.C. Chang, J.A. Rowley, G. Tobias, N.G. Genes, A.K. Roy, D.J. Mooney; Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res* 55/4 (2001) 503-511.
- [18] G.N. Clarke; Sperm cryopreservation: Is there a significant risk of cross-contamination? *Hum Reprod* 14/12 (1999) 2941-2943.
- [19] J.H. Crowe, L.M. Crowe, D. Chapman; Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* 223/4637 (1984) 701-703.
- [20] J.H. Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe; The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60 (1998) 73-103.
- [21] J.H. Crowe, L.M. Crowe; Preservation of mammalian cells – learning nature's tricks; *Nat Biotechnol* 18/2 (2000) 145-146.
- [22] D. Del Duca, T. Werbowetski, R.F. Del Maestro; Spheroid preparation from hanging drops: Characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol* 67/3 (2004) 295-303.

- 
- [23] W. Denk, J. Strickler, W. Web; Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248 (1990) 73-76.
- [24] P. de Vos, M.M Faas, B. Strand, R. Calafiore; Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets. *Biomaterials* 27/32 (2006) 5603-5617.
- [25] P. de Vos, B. de Haan, G.H.J. Wolters, R. van Schilfgaarde; Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. *Transplantation* 62/7 (1996) 888-892.
- [26] P. de Vos, B.J. de Haan, G.H.J. Wolters, J.H. Strubbe, R. Van Schilfgaarde; Improved biocompatibility but limited graft survival after purification of alginate for microencapsulation of pancreatic islets. *Diabetologia* 40/3 (1997) 262-270.
- [27] P. de Vos, R. Van Schilfgaarde; Biocompatibility issues. In W.M Kühtreiber, R.P. Lanza, W.L. Chick; *Cell encapsulation technology and therapeutics*. Birkhäuser Boston, Cambridge (USA) 1999.
- [28] K.R. Diller, E.G. Cravalho; A cryomicroscope for the study of freezing and thawing processes in biological cells. *Cryobiology* 7/4 (1971) 191-199.
- [29] K.R. Diller; Quantitative low temperature optical microscopy of biological systems. *J Microsc* 126/1 (1982) 9-28.
- [30] K.R. Diller; Engineering-based contributions in cryobiology. *Cryobiology* 34/4 (1997) 304-314.
- [31] S. Dinara, K. Sengoku, K. Tamate, M. Horikawa, M. Ishikawa; Effects of supplementation with free radical scavengers on the survival and fertilization rates of mouse cryopreserved oocytes. *Hum Reprod* 16/9 (2001) 1976-1981.
- [32] J. Donnez, M.M. Dolmans, D. Demylle, P. Jadoul, C. Pirard, J. Squifflet, B. Martinez-Madrid, A. van Langendonck; Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364/9443 (2004) 1405-1410.
- [33] J.G. Duman, D.W. Wu, L. Xu; Adaptions of insects to subzero temperatures. *Q Rev Biol* 66/4 (1991) 387-410.
- [34] F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, R. Reuss, P.J. Feilen, S. Schelenz, V.L. Sukhorukov, U. Zimmermann, M.M. Weber, H. Zimmermann; Barium - Alginate Microcapsule Formation for Regenerative Medicine Validated by High Speed Video. *Biomedizinische Technik* 50/2 (2005) 1571-1572.
- [35] H.Y. Elmoazzen, J.A. Elliott, L.E. McGann; Cryoprotectant equilibration in tissues. *Cryobiology* 51/1 (2005) 85-91.
- [36] A. Eroglu, M.J. Russo, R. Bieganski, A. Fowler, S. Cheley, H. Bayley, M. Toner; Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat Biotechnol* 18/2 (2000) 163-167.
- [37] A. Eroglu, M. Toner, T.L. Toth; Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. *Fertil Steril* 77/1 (2002) 152-158.
- [38] A. Eroglu, J.A. Lawitts, M. Toner, T.L. Toth; Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology* 46/2 (2003) 121-134.
- [39] G.M. Fahy, D.R. MacFarlane, C.A. Angell, H.T. Meryman; Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21 (1984) 407-426.
- [40] G.M. Fahy; The relevance of cryoprotectant „toxicity“ to cryobiology. *Cryobiology* 32/1 (1986) 1-13.
- [41] Y. Fang, S. Al-Assaf, G.O. Phillips, K. Nishinari, T. Funami, P.A. Williams, L. Li; Multiple steps and critical behaviours of the binding of calcium to alginate. *J Phys Chem B* 111/10 (2007) 2456-2462.
- [42] J. Farrant; Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinylpyrrolidone and glycerol during freezing? *Nature* 222/5199 (1969) 1175-1176.
- [43] J. Farrant; Water transport and cell survival in cryobiological procedures. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278/959 (1977) 191-205.

- 
- [44] E. Flachsland, G. Terada, A. Scocci, H. Rey, L. Mroginski, F. Engelmann; Cryopreservation of seeds and in vitro-cultured protocorms of *Oncidium bifolium sims*. (Orchidaceae) by encapsulation-dehydration. *Cryo Letters* 27/4 (2006) 235-242.
- [45] N.H. Fletcher, *The Chemical Physics of Ice*. Cambridge University Press, London 1970.
- [46] D. Fountain, M. Ralston, N. Higgins, J.B. Gorlin, L. Uhl, C. Wheeler, J.H. Antin, W.H. Churchill, R.J. Benjamin; Liquid nitrogen freezers: A potential source of microbial contamination of hematopoietic stem cell components. *Transfusion* 37/6 (1997) 585-591.
- [47] G.T. Franzesi, B. Ni, Y. Linq, A. Khademhosseini; A controlled-release strategy for the generation of cross-linked hydrogel microstructures. *J Am Chem Soc* 128/47 (2006) 15064-15065
- [48] A. Galmes, A. Gutiérrez, A. Sampol, M. Canaro, M. Morey, J. Iglesias, N. Matamoros, M.A. Duran, A. Novo, M.D. Bea, P. Galán, J. Balansat, J. Martínez, J. Bargay, J. Besalduch; Long-term hematological reconstitution and clinical evaluation of autologous peripheral blood stem cell transplantation after cryopreservation of cells with 5% and 10% dimethylsulfoxide at -80°C in a mechanical freezer. *Haematologica* 92/7 (2007) 986-989.
- [49] F. Gandolfi, A. Paffoni, E-P. Brambilla, S. Sonetti, T.A.L. Brevini, G. Ragni; Efficiency of equilibrium cooling vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: Comparative analysis between human and animal models. *Fertil Steril* 85/1 (2006) 1150-1156.
- [50] V.I. Gordeliy, M.A. Kiselev, P. Lesieur, A.V. Pole, J. Teixeira; Liquid membrane structure and interactions in dimethyl sulfoxide/water mixtures. *Biophys J* 75/5 (1998) 2243-2351.
- [51] G.T. Grant, E.R. Morris, D.A. Rees, P.J.C. Smith, D. Thom; Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters* 32/1 (1973) 195-198.
- [52] V.L. Grishchenko, V.A. Moiseev, A.V. Zinchenko; The dielectric breakdown of membranes during cryopreservation of biological objects. *Dokl Akad Nauk SSSR* 308/1 (1989) 215-217.
- [53] N. Guo, I. Puhlev, D.R. Brown, J. Mansbridge, F. Levine; Trehalose confers desiccation tolerance on human cells. *Nat Biotechnol* 18/2 (2000) 168-171.
- [54] C. Haase, G. Klöck, A. Schlosser, U. Zimmermann, M. Rothmund; Parathyroid allotransplantation without immunosuppression. *Lancet* 350/9087 (1996) 1296-1297.
- [55] B. Han, J.C. Bischof; Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology* 48/1 (2004) 8-21.
- [56] A.E. Hawkins, M.A. Zuckerman, M. Briggs, R.J. Gilson, A.H. Goldstone, N.S. Brink, R.S. Tedder; Hepatitis B nucleotide sequence analysis: Linking an outbreak of acute hepatitis B to contamination of a cryopreservation tank. *J Virol Methods* 60/1 (1996) 81-88.
- [57] F.W. Hetzel, J. Kruuv, L.E. McGann, H.E. Frey; Exposure of mammalian cells to physical damage: Effect of the state of adhesion on colony-forming potential. *Cryobiology* 10/3 (1973) 206-211.
- [58] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler; RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24/24 (2003) 4385-4415.
- [59] J.P. Hindmarsh, D.I. Wilson, M.L. Johns; Measuring self-diffusion in super-cooled liquid droplets with pulsed gradient spin echo (PGSE) techniques. *Coll Surf A Physiochem Eng Aspects* 234 (2004) 129-134.
- [60] P.V. Hobbs, *Ice Physics*. Clarendon Press, Oxford 1974.
- [61] S.X. Hsiong, P. Carampin, H.J. Kong, K.Y. Lee, D.J. Mooney; Differentiation stage alters matrix control of stem cells. *J Biomed Mater Res A* 85/1 (2008) 145-156.
- [62] V. Isachenko, E. Isachenko, J. Reinsberg, M. Montag, K. van der Ven, C. Dorn, B. Roesing, H. van der Ven; Cryopreservation of human ovarian tissue: Comparison of rapid and conventional freezing. *Cryobiology* 55/3 (2007) 261-268.
- [63] G. Jacob, M.N. Kurzer, B.J. Fuller; An assessment of tumor cell viability after in vitro freezing. *Cryobiology* 22/5 (1985) 417-426.

- 
- [64] K.M. Jochumsen, Q. Tan, J. Dahlgaard, T.A. Kruse, O. Mogensen; RNA quality and gene expression analysis of ovarian tumor tissue undergoing repeated thaw-freezing. *Exp Mol Pathol* 82/1 (2007) 95-102.
- [65] N.H.P.M. Jutte, P. Heyse, H.G. Jansen, G.J. Bruining G.H. Zeilmaker; Vitrification of human islet of Langerhans. *Cryobiology* 24/5 (1987) 403-411.
- [66] J.O.M. Karlsson, E.G. Cravalho, M. Toner; Intracellular ice formation: Causes and consequences. *Cryo-Letters* 14 (1993) 323-334.
- [67] I.I. Katkov, M.S. Kim, R. Bajpai, Y.S. Altman, M. Mercola, J.F. Loring, A.V. Terskikh, E.Y. Snyder, F. Levine; Cryopreservation by slow cooling with DMSO diminished production of Oct-4 pluripotency marker in human embryonic stem cells. *Cryobiology* 53/2 (2006) 194-205.
- [68] A. Katsen-Globa, R. Malpique, F. Ehrhart, P.M. Alves, H. Zimmermann; Cryopreservation of Caco-2 human colon cancer cells in Fraunhofer micro-cryosubstrates: SEM and block-face SEM for study of cell differentiation after thawing. *Paul-Scherrer Institut PSI Proceedings* 05-01 (2005) 193.
- [69] A. Katsen-Globa, S. Pflüger, M. Zwanzig, S. Fiedler, S. Howitz, H. Zimmermann; Cell cryopreservation on nanostructured surfaces: Block-face scanning electron microscopic method for studying of the cell- substrate interface. *Proceedings of Focus on Microscopy, Jena* (2005) 212.
- [70] A.D. Katsen, N.A. Tregubova, V.V. Andrushkevich, Yu.A. Rovensky; Identification and study of the same cell in monolayer culture by different methods of light microscopy, scanning and transmission electron microscopy. Application for cryodamaged cells. *Scanning* 14 (1992) 225-230.
- [71] A.D. Katsen, B. Vollmar, P. Mestres-Ventura, M.D. Menger; Cell surface and nuclear changes during TNF-induced apoptosis in WEHI-164 murine fibrosarcoma cells. A correlative light-, scanning-, and transmission electron microscopical study. *Virchows Arch* 433 (1998) 75-83.
- [72] J.M. Kelm, N.E. Timmins, C.J. Brown, M. Fussenegger, L.K. Nielsen; Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 83/2 (2003) 173-180.
- [73] W.L. Kerr, D.S. Reid; Temperature dependency of the viscosity of sugar and maltodextrin solutions in co-existence with ice. *Lebensm Wiss u Technol* 27 (1994) 225-231.
- [74] B. Korniski, T.B. Darr, A. Hubel; Subzero Osmotic characteristics of intact and disaggregated hepatocyte spheroids. *Cryobiology* 38/4 (1999) 339-352.
- [75] S. Köstner, F.E. Angilè, H. Duan, J.J. Agresti, A. Wintner, C. Schmitz, A.C. Rowat, C.A. Merten, D. Pisignano, A.D. Griffiths, D.A. Weitz; Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab Chip* 8/7 (2008) 1110-1115.
- [76] J. Landry, J.P. Freyer, R.M. Sutherland; A model for the growth of multicellular spheroids. *Cell Tissue Kinet* 15/6 (1982) 585-594.
- [77] C.S.D. Lee, J.P. Gleghorn, N.W. Choi, M. Cabodi, A.D. Stroock, L.J. Bonassar; Integration of layered chondrocyte-seeded alginate hydrogel scaffolds. *Biomaterials* 28/19 (2007) 2987-2993.
- [78] C.M. Lehr; Lectin-mediated drug delivery: The second generation of bioadhesives. *J Control Release* 65/1-2 (2000) 19-29.
- [79] S.B. Leslie, S.A. Teter, L.M. Crowe, J.H. Crowe; Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1192/1 (1994) 7-13.
- [80] H. Levine, L. Slade; Water as a plasticizer: Physico-chemical aspects of low moisture polymeric systems. In F. Franks; *Water Science Reviews Vol III*, Cambridge Univ. Press, Cambridge 1987.
- [81] B.G. Li, T.C. Hua, H.D. Zhang, Y.F. Wang, G.X. Wang; Cryopreservation and xenotransplantation studies of microencapsulated rat pancreatic islets. *Cryo Letters* 23 (2002) 47-54.

- 
- [82] F. Lim, A.M. Sun; Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210/4472 (1980) 908-910.
- [83] K. Linke, J. Schanz, J. Hansmann, T. Walles, H. Brunner, H. Mertsching; Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research. *Tissue Eng* 13/11 (2007) 2699-2707.
- [84] D. Lohse, R. Bergmann, R. Mikkelsen, C. Zeilstra, D. van der Meer, M. Versluis, K. van der Weele, M. van der Hoef, H. Kuipers; Impact on soft sand: Void collapse and jet formation. *Phys Rev Lett* 93/19 (2004) 198003.
- [85] J.E. Lovelock; The hemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 10/3 (1953) 414-426.
- [86] J.E. Lovelock; The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta* 11/1 (1953) 28-36.
- [87] B.J. Luyet, R. Hodapp; Revival of frog spermatozoa vitrified in liquid air. *Proc Soc Exp Biol NY* 39 (1938) 433-434.
- [88] B.J. Luyet; Phase transition encountered in the rapid freezing of aqueous solutions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 125 (1955) 502-521.
- [89] B.J. Luyet, J. Tanner, G. Rapatz; X-ray diffraction study of the structure of rapidly frozen gelatin solutions. *Biodynamica* 9 (1962) 21-46.
- [90] E. Maltini, M. Anese; Evaluation of viscosities of amorphous phases in partially frozen systems by WLF kinetics and glass transition temperatures. *Food Res International* 28 (1995) 367-372.
- [91] B. Manz, M. Hillgärtner, H. Zimmermann, D. Zimmermann, F. Volke, U. Zimmermann; Cross-linking properties of alginate gels determined by using advanced NMR imaging and Cu(2+) as contrast agent. *Eur Biophys J* 33/1 (2004) 50-58.
- [92] S.L. Manzello, J.C. Yang; An experimental study of a water droplet impinging upon a liquid surface. *Exp Fluids* 32/5 (2002) 580-589.
- [93] A. Martinsen, G. Skjak, O. Smidsrod; Alginate as immobilization material: I. Correlation between chemical and physical properties of alginate beads. *Biotechnol Bioeng* 33 (1989) 79-89.
- [94] M. Maruyama, T. Kenmochi, K. Sakamoto, S. Arita, C. Iwashita, H. Kashiwabara; Simplified method for cryopreservation of islets using hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide as cryoprotectants. *Transplant P* 36 (2004) 1133-1134.
- [95] P. Mazur; Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. *J Gen Physiol* 47 (1963) 347-369.
- [96] P. Mazur; The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 14/3 (1977) 251-272.
- [97] P. Mazur; Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophys* 17/1 (1990) 53-92.
- [98] P. Mazur, I. Katkov, N. Katkova, J.K. Critser; The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology* 40/3 (2000) 187-209.
- [99] P. Mazur, S.P. Leibo, E.H.Y. Chu; A two-factor hypothesis of freezing injury: Evidence from chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 71/2 (1972) 345-355.
- [100] H.T. Meryman; Preservation of living cells. *Fed. Proc* 22 (1963) 81-89.
- [101] H.T. Meryman; Absence of unfrozen freezable water in rapidly frozen red cells. *Cryobiology* 7/4 (1970) 252-255.
- [102] G.J. Morris, M. Goodrich, E. Acton, F. Fonseca; The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: Effects on cryopreservation. *Cryobiology* 52/2 (2006) 323-334.
- [103] K. Muldrew, L.E. McGann; Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J* 57/3 (1990) 535-532.

- 
- [104] K. Muldrew, L.E. McGann; The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys J* 66/2 (1994) 532-541.
- [105] K. Muldrew, L.E. McGann; Cryobiology – A Short Course. <http://www.ucalgary.ca/~kmuldrew/cryocourse/courseoutline.html> (1997) (Version vom 15.01.2008).
- [106] S.S.N. Murthy; Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol. *Cryobiology* 36/2 (1998) 84-96.
- [107] H. Mussauer, V.L. Sukhorukov, U. Zimmermann; Trehalose improves survival of electro-transfected mammalian cells. *Cytometry* 45 (2001) 161-169.
- [108] C.K. Mutchler, L.M. Hanssen; Splash of a waterdrop at terminal velocity. *Science* 169/3952 (1970) 1311-1312.
- [109] V. Myhrvold; Cryopreservation of sheep red blood cells – 2. Purified polyvinylpyrrolidone and hydrolyzed starch as protective agents. *Acta vet scand* 20 (1979) 531–536.
- [110] T. Nei; Mechanism of the haemolysis of erythrocyte by freezing with special reference to freezing at near zero temperatures. In *The frozen cell, a Ciba Foundation Symposium*. Churchill Livingstone, London 1970.
- [111] H. Newton, J. Fisher, J.R. Arnold, D.E. Pegg, M.J. Faddy, R.G. Gosden. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 13/2 (1998) 376-380.
- [112] O. Oudar; Spheroids: relation between tumor and endothelial cells. *Crit Rev Oncol Hematol* 36/2-3 (2000) 99-106.
- [113] T. Ohno; A simple method for in situ freezing of anchorage dependant cells. In A. Doyle, J.B. Griffiths and D.G. Newell; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures*. Wiley, Chichester 1994.
- [114] G. Pasquinelli, L. Foroni, M. Buzzi, P.L. Tazzari, C. Vaselli, M. Mirelli, M. Gargiulo, R. Conte, A. Stella; Smooth muscle cell injury after cryopreservation of human thoracic aortas. *Cryobiology* 52/2 (2006) 309-316.
- [115] D.E. Pegg; The current status of tissue cryopreservation. *Cryo Letters* 22/2 (2001) 105-114.
- [116] D.E. Pegg, L. Wang, D. Vaughan; Cryopreservation of articular cartilage. Part 3: The liquidus-tracking method. *Cryobiology* 52/3 (2006) 360-368.
- [117] D.E. Pegg, M.C. Wusteman, L. Wang; Cryopreservation of articular cartilage. Part 1: Conventional cryopreservation methods. *Cryobiology* 52/3 (2006) 335-346.
- [118] H.M. Picton, S.S. Kim, R.G. Gosden; Cryopreservation of gonadal tissue and cells. *Br Med Bull* 56/3 (2000) 603-615.
- [119] C. Polge, A.V. Smith, A.S. Parkes; Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164/4172 (1949) 666.
- [120] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A.R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu, P. de Vos; Chemistry and the biological response against immunisolating alginate-polycation capsules of different composition. *Biomaterials* 27/28 (2006) 4831-4839.
- [121] J.C. Pound, D.W. Green, H.I. Roach, S. Mann, R.O.C. Oreffo; An ex vivo model for chondrogenesis and osteogenesis. *Biomaterials* 28/18 (2007) 2839-2849.
- [122] J.A. Radford, B.A. Lieberman, D.R. Brison, A.R. Smith, J.D. Critchlow, S.A. Russell, A.J. Watson, J.A. Clayton, M. Harris, R.G. Gosden, S.M. Shalet; Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high dose chemotherapy for Hodgkin´s lymphoma. *Lancet* 357/9263 (2001) 1172-1175.
- [123] W.F. Rall, P. Mazur, J.J. McGrath; Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouse embryos by glycerol and dimethyl sulphoxide. *Biophys J* 41/1 (1983) 1-12.
- [124] D.H. Rasmussen, M.N. Macaulay, A.P. MacKenzie; Supercooling and nucleation of ice in single cells. *Cryobiology* 12/4 (1975) 328-339.
- [125] D.H. Rasmussen, A.P. MacKenzie; Effects of solutes on ice-solution interfacial free energy: Calculation from measured homogenous nucleation temperatures. In H.H.G. Jellinek; *Water*

- structure at the water-polymer interface. Plenum, New York 1972; zitiert in P.L. Steponkus; *Advances in low temperature biology* Vol. 1, JAI Press Ltd., London 1992.
- [126] P.J. Reddig, R.L. Juliano; Clinging to life: Cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 24/3 (2005) 425-439.
- [127] M.J. Rein; The transition regime between coalescing and splashing drops. *J Fluid Mech* 306 (1996) 145-165.
- [128] R. Reuss, J. Ludwig, R. Shirakashi, F. Ehrhart, H. Zimmermann, H. Schneider, M.M. Weber, U. Zimmermann, H. Schneider, V.L. Sukhorukov; Intracellular delivery of carbohydrates into mammalian cells through swelling activated pathways. *J Memb Biol* 200 (2004) 67-81.
- [129] J.A. Rowley, G. Madlambayan, D.J. Mooney; Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 20/1 (1999) 45-53.
- [130] A. Sakai, F. Engelmann; Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: A review. *Cryo Letters* 28/3 (2007) 151-172.
- [131] M.T. Santini, G. Rainaldi, P.L. Indovina; Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit Rev Oncol Hematol.* 36/2-3 (2000) 75-87.
- [132] S. Sá Santos, L.L. Fonseca, M.J. Carrondo, P.M. Alves; Culturing primary brain astrocytes under a fully controlled environment in a novel bioreactor. *J Neurosci Res* 79/1-2 (2005) 26-32.
- [133] L.M. Sasnoor, V.P. Kale, L.S. Limaye; A combination of catalase and trehalose as additives to conventional freezing medium results in improved cryoprotection of human hematopoietic cells with reference to in vitro migration and adhesion properties. *Transfusion* 45/4 (2005) 622-633.
- [134] Y. Sawada; The preservation of human semen by deep freezing. *Int J Fertil* 9 (1964) 525-532.
- [135] S. Schelenz; Untersuchung schneller Einfrierprozesse beim Aufprall auf tiefkalte Oberflächen. Diplomarbeit (2003).
- [136] S. Schneider, P. Feilen, H. Cramer, M. Hillgärtner, F. Brunnenmeier, H. Zimmermann, M.M. Weber, U. Zimmermann; Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways. *J Microencapsul* 20/5 (2003) 627-636.
- [137] R. Shirakashi, C.M. Köstner, K.J. Müller, M. Kürschner, U. Zimmermann, V.L. Sukhorukov; Intracellular delivery of trehalose into mammalian cells by electroporation. *J Memb Biol* 189 (2002) 45-54.
- [138] N.E. Simpson, C.L. Stabler, C.P. Simpson, A. Sambani, I. Constantinidis; The role of the CaCl<sub>2</sub>-gulfuronic acid interaction on alginate encapsulated bTC3 cells; *Biomaterials* 25/13 (2004) 2603-2610.
- [139] O. Smidsrod; Molecular basis for some physical properties of alginates in gel state. *J Chem Soc Faraday Trans* 57 (1974) 79-89.
- [140] O. Smidsrod, G. Skjak-Braek; Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 8/3 (1990) 71-78.
- [141] A.U. Smith; Cartilage. In A.M. Karow, G.J.M. Abouna, A.L. Humphries; *Organ preservation for transplantation*, Little Brown and Co., Boston 1976.
- [142] A. Steinert, M. Weber, A. Dimmler, C. Julius, N. Schütze, U. Nöth, H.Cramer, J. Eulert, U. Zimmermann, C. Hendrich; Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* 21 (2003) 1090-1097.
- [143] V. Stensvaag, T. Furmanek, K. Lonning, A.J. Terzis, R. Bjerkvig, T. Visted; Cryopreservation of alginate-encapsulated recombinant cells for antiangiogenic therapy. *Cell Transplant* 13/1 (2004) 35-44.
- [144] P.L. Steponkus, D.G. Stout, J. Wolfe, R.V.E. Lovelace; Possible role of transient electric fields in freezing induced membrane destabilization. *J Membrane Biol* 85 (1985) 191-198.

- 
- [145] P.L. Steponkus, M.F. Dowgert; Phenomenology of intracellular ice nucleation in isolated protoplasts. *Plant Physiol* 67 (1981) 58.
- [146] P.L. Steponkus, M.F. Dowgert, W.J. Gordon-Kamm; Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Cryobiology* 20/4 (1983) 448-465.
- [147] S.L. Stott; Kinetic study of intracellular ice formation in micropatterned endothelial cell cultures using high speed video cryomicroscopy. Dissertation (2006).
- [148] K. Tananuwong, D.S. Reid; Differential scanning calorimetry of glass transition in frozen starch gels. *J Agric Food Chem* 52/13 (2004) 4308-4317.
- [149] H. Takamatsu, B. Rubinsky; Viability of deformed cells. *Cryobiology* 39/3 (1999) 243-251.
- [150] M.J. Taylor, D.E. Pegg; The effect of ice formation on the function of smooth muscle tissue stored at -21 or -60 degrees C. *Cryobiology* 20/1 (1983) 36-40.
- [151] M.J. Taylor, Y.C. Song, K.C.M. Brockbank; Vitrification in tissue preservation: New developments. In B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson ; *Life in the frozen state*. CRC Press LLC, Boca Raton 2004.
- [152] R.S. Tedder, M.A. Zuckerman, A.H. Goldstone, A.E. Hawkins, A. Fielding, E.M. Briggs, D. Irwin, S. Blair, A.M. Gorman, K.G. Patterson, D.C. Linch, J. Heptonstall, N.S. Brink; Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 346 (1995) 137-140.
- [153] B. Thu, P. Bruheim, T. Espevik, O. Smidsrod, P. Soon-Shiong, G. Skiak-Braek; Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* 17/11 (1996) 1031-1040.
- [154] M. Toner, E.G. Cravalho, M. Karel; Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *J Appl Phys* 67/3 (1990) 1582-1593.
- [155] C.R. Valeri, G. Ragno, S. Khuri; Freezing human platelets with 6 percent dimethyl sulfoxide with removal of the supernatant solution before freezing and storage at -80 degrees C without postthaw processing. *Transfusion* 45/12 (2005) 1890-1898.
- [156] A. Vogel, J. Noack, G. Hüttman, G. Paltauf; Mechanisms of femtosecond laser nanosurgery of cells and tissues. *Appl Phys B* 81 (2005) 1015-1047.
- [157] I.P. Vysekantsev, T.M. Gurina, V.F. Martsenyuk, T.F. Petrenko, E.V. Kudokotseva, S.V. Koshchiy, M.I. Groshevoy; Probability of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage. *Cryo Letters* 26/6 (2005) 401-408.
- [158] M. Weber, A. Steinert, A. Jork, A. Dimmler, F. Thürmer, N. Schütze; Formation of cartilage matrix proteins by BMP-transfected murine mesenchymal stem cells encapsulated in a novel class of alginates. *Biomaterials* 23 (2002) 2003-2013.
- [159] R. Wolf, D. Zimmermann, M. Weber, P. Feilen, F. Ehrhart, M. Salinas-Jungjohann, A. Katsen, M. Behringer, P. Gessner, L. Pliess, A. Steinbach, J. Spitz, J.A. Vásquez, S. Schneider, E. Bamberg, M.M. Weber, U. Zimmermann, H. Zimmermann; Real-time 3-D dark-field microscopy for the validation of the cross-linking process of alginate microcapsules. *Biomaterials* 32 (2005) 6386-6393.
- [160] J. Wolfe, G. Byrant; Freezing, drying and/or vitrification of membrane solute-water systems. *Cryobiology* 39 (1999) 103-129.
- [161] J. Wolfe, G. Byrant; Cellular cryobiology: Thermodynamic and mechanical effects. *Int J Refrig* 24 (2001) 438-450.
- [162] W.F. Wolkers, N.J. Walker, F. Tablin, J.H. Crowe; Human platelets loaded with trehalose survive freeze-drying. *Cryobiology* 42/2 (2001) 79-87.
- [163] D.C. Wood, J. Wood; Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci* 243 (1975) 7-19.
- [164] E.J. Woods, J.D. Benson, Y. Agca, J.K. Critser; Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48/2 (2004) 146-156.
- [165] A. Worthington; *A Study of Splashes*. Longman & Green Verlag, London 1918.
- [166] L. Xu, W.W. Zhang, S.R. Nagel; Drop splashing on a dry smooth surface. *Phys Rev Lett* 94 (2005) 184505.

- 
- [167] H. Zimmermann, F. Ehrhart, D. Zimmermann, K. Müller, A. Katsen-Globa, M. Behringer, P.J. Feiler, P. Gessner, G. Zimmermann, S. Shirley, M.M. Weber, J. Metze, U. Zimmermann; Hydrogel-based encapsulation of biological functional tissue: Fundamentals, technologies and applications. *Appl Phys A* 89 (2007) 909-922.
- [168] H. Zimmermann, M. Hillgartner, B. Manz, P. Feilen, F. Brunnenmeier, U. Leinfelder, M. Weber, H. Cramer, S. Schneider, C. Hendrich, F. Volke, U. Zimmermann; Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging, *Biomaterials* 24/12 (2003) 2083-2096.
- [169] H. Zimmermann, A.D. Katsen, F.R. Ihmig, C.H.P. Durst, S.G. Shirley, G.R. Fuhr; First steps of an interdisciplinary approach towards miniaturised cryopreservation of cellular nanotechnology. *IEE Proc.-Nanobiotechnol* 151/4 (2004)134-138.
- [170] U. Zimmermann, F. Thürmer, A. Jork, M. Weber, S. Mimietz, M. Hillgärtner, F. Brunnenmeier, H. Zimmermann, I. Westphal, G. Fuhr, U. Nöth, A. Steinert, C. Hendrich; A novel class of amitogenic alginate capsules for long-term immunoisolated transplantation. *Ann N Y Acad Sci* 944 (2001) 199-215.
- [171] H. Zimmermann, F. Wählich, C. Baier, M. Westhoff, R. Reuss, D. Zimmermann, M. Behringer, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, C. Giese, U. Marx, V.L. Sukhorukov, J.A. Vasquez, P. Jakob, S.G. Shirley, U. Zimmermann. Physical and biological properties of barium-cross-linked alginate membranes. *Biomaterials* 28/7 (2007) 1327-1345.
- [172] H. Zimmermann, D. Zimmermann, R. Reuss, P. J. Feilen, B. Manz, A. Katsen, M. Weber, F. R. Ihmig, F. Ehrhart, P. Geßner, M. Behringer, A. Steinbach, L. H. Wegner, V. L. Sukhorukov, J. A. Vasquez, S. Schneider, M. M. Weber, F. Volke, R. Wolf, U. Zimmermann; Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation; *J Mater Sci Med* 16/6 (2005) 491-501.
- [173] W.R. Zipfel, R.M. Williams, W.W. Webb; Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol* 21 (2003) 1369-1377.

---

## 8. Anhang

### Abkürzungen

Å	Ångström, Längeneinheit, $1 \times 10^{-10}$ m, 100pm
CHO	chinese hamster ovary – Zellen, Zelllinie
CPA	Kryoprotektive Substanz (cryoprotective agent)
CPD	Kritische Punkt Trocknung
DMEM	Dulbeccos modified Eagle Medium; Basismedium für Zellkultur
DMSO/Me <sub>2</sub> SO	Dimethylsulfoxid
EB	Ethidiumbromid
ECM	Extrazelluläre Matrix (extra cellular matrix)
FBS	Fötale Kälberserum
FDA	Fluoresceindiaceetat
Ham's F12	Kulturmedium
HEPES	organischer Puffer
HES	Hydroxyethylstärke
HSA	humanes Serumalbumin
LDH	Laktat-Dehydrogenase
N2a	Zelllinie aus Neuroblastomazellen
L929	Zelllinie aus murinen Fibroblasten
Lp	Hydraulische Leitfähigkeit
NMR	Magnetresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC-3	Zelllinie aus humanen Prostatacarcinomazellen
PLL	Poly-L-Lysin
RBC	Erythrozyten (red blood cells)
REM	Rasterelektronenmikroskop/ie
RPMI	Basismedium zur Zellkultur
TEM	Transmissionselektronenmikroskop/ie
UHV-CG Alginat	ultra-hoch viskoses Alginat von klinischer Reinheit

## **Erklärungen**

### **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

(Unterschrift)

---

## Veröffentlichte Arbeiten

### Artikel in Fachzeitschriften

1. F. Ehrhart, I. Meiser, S.G. Shirley, H. Zimmermann; Alginate polymerisation validated by high speed video. BBRC, in Vorbereitung.
2. D. Dörr, M. Stark, F. Ehrhart, H. Zimmermann, F. Stracke; Multiphoton microscopy for the in-situ-investigation of cellular processes and integrity in cryopreservation. *Biotech J*, eingereicht.
3. R. Malpique, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, M.J.T. Carrondo, H. Zimmermann, P.M. Alves; Cryopreservation of adherent cells: Strategies to improve cell viability and function after thawing. *Tissue Eng*, eingereicht.
4. M.M. Gepp, F. Ehrhart, S.G. Shirley, S. Howitz, H. Zimmermann; Contactless dispensing of ultra high viscosity alginate gels: a new tool for rapid prototyping of scaffolds and implants. *Biotechniques*, akzeptiert.
5. F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, H. Zimmermann; Development of techniques for improved cryopreservation to tissue. *Bioforum Europe 7-8 (2008)*, im Druck.
6. F. Ehrhart, J.C. Schulz, A. Katsen-Globa, J. Hain, U. Zimmermann, H. Zimmermann; A comparative study of freezing single cells and spheroids: Towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumors. *Cryobiology*, akzeptiert.
7. H. Zimmermann, F. Ehrhart, D. Zimmermann, K. Müller, A. Katsen-Globa, M. Behringer, P.J. Feiler, P. Gessner, G. Zimmermann, S. Shirley, M.M. Weber, J. Metze, U. Zimmermann; Hydrogel-based encapsulation of biological functional tissue: Fundamentals, technologies and applications. *Appl Phys A* 89 (2007) 909-922.
8. H. Zimmermann, F. Wählich, C. Baier, M. Westhoff, R. Reuss, D. Zimmermann, M. Behringer, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, C. Giese, U. Marx, V.L. Sukhorukov, J.A. Vasquez, P. Jakob, S.G. Shirley, U. Zimmermann. Physical and biological properties of barium-cross-linked alginate membranes. *Biomaterials* 28/7 (2007) 1327-1345.
9. R. Wolf, D. Zimmermann, M. Weber, P.J. Feilen, F. Ehrhart, M. Salinas Jungjohann, A. Katsen, M. Behringer, P. Gessner, L. Pliess, A. Steinbach, J. Spitz, J.A. Vasquez, S. Schneider, E. Bamberg, M.M. Weber, U. Zimmermann, H. Zimmermann; Real-time 3-D dark-field microscopy for the validation of the cross-linking process of alginate microcapsules. *Biomaterials* 26/32 (2005) 6386-6393.
10. F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, R. Reuss, P.J. Feilen, S. Schelenz, V.L. Sukhorukov, U. Zimmermann, M.M. Weber, H. Zimmermann; Barium - Alginate Microcapsule Formation for Regenerative Medicine Validated by High Speed Video. *Biomedizinische Technik* 50/2 (2005) 1571-1572.
11. H. Zimmermann, D. Zimmermann, R. Reuss, P.J. Feilen, B. Manz, A. Katsen, M. Weber, F.R. Ihmig, F. Ehrhart, P. Gessner, M. Behringer, A. Steinbach, L.H. Wegner, V.L. Sukhorukov, J.A. Vasquez, S. Schneider, M.M. Weber, F. Volke, R. Wolf, U. Zimmermann; Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J Mater Sci Mater Med* 16/6 (2005) 491-501.
12. R. Reuss, J. Ludwig, R. Shirakashi, F. Ehrhart, H. Zimmermann, H. Schneider, M.M. Weber, U. Zimmermann, H. Schneider, V.L. Sukhorukov; Intracellular delivery of carbohydrates into mammalian cells through swelling activated pathways. *J Memb Biol* 200 (2004) 67-81.

---

**Abstract und Posterbeiträge**

1. R. Reuss, R. Shirakashi, F. Ehrhart, H. Zimmermann, U. Zimmermann, H. Schneider, H. Schneider, V.L. Sukhorukov; Introduction of carbohydrates into mammalian cells through swelling activated pathways. Posterbeitrag anlässlich des International Forum on Heat Transfer (IFHT2004) in Kyoto, 24.-26.11.2004.
2. A. Katsen-Globa, R. Malpique, F. Ehrhart, P.M. Alves, H. Zimmermann; Cryopreservation of Caco-2 Human colon cancer cells in Fraunhofer micro-cryosubstrates: SEM and block-face SEM for study of cell differentiation after thawing. PSI Proceedings 05-01 (2005) 193.
3. F.C. Wählich, C. Baier, M. Salinas Jungjohann, F. Ehrhart, C. Giese, U. Marx, V. Sukhorukov, U. Zimmermann, H. Zimmermann; Focus on AFM techniques - non contact scanning of alginate sheets in liquid environment. Posterbeitrag anlässlich der Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Berlin, 21.10.2005.
4. F.C. Wählich, C. Baier, M. Salinas, F. Ehrhart, C. Giese, U. Marx, V. Sukhorukov, U. Zimmermann, H. Zimmermann; Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen von Alginat-Schichtsystemen als Matrix für den künstlichen Lymphknoten. Posterbeitrag anlässlich des 2. BMBF-Symposium Nanobiotechnologie in Hannover, 18.-19.10.2005.
5. C.H.P. Durst, F.R. Ihmig, F. Ehrhart, F. Biel, M. Daffertshofer, H. Zimmermann; A method and technology for reliable sample-controlled execution of preparation and freezing protocols in biomedical laboratories and cryobanks. Posterbeitrag zum 43. Meeting of the Society for Cryobiology in Association with the Society for Low Temperature Biology in Hamburg, 24.-27.07.2006, Abstractbook 152.
6. H. Zimmermann, F.R. Ihmig, A. Katsen-Globa, F. Ehrhart, C.H.P. Durst, S.G. Shirley; Cryobiotechnology – Low temperature microsystems for biotechnology and regenerative medicine. Microsystems Technology 2006 (2006) 22-25.
7. F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, R. Reuss, V.L. Sukhorukov, J.C. Schulz, M. Stark, F. Stracke, S. Kasimir-Bauer, J. Hain, U. Zimmermann, H. Zimmermann; Towards a new model system for optimising freezing protocols for cryo-banking of human tumours. Posterbeitrag anlässlich des 43. Meeting of the Society for Cryobiology in Association with the Society for Low Temperature Biology in Hamburg, 24.-27.07.2006, Abstractbook 108.
8. A. Katsen-Globa, O.A. Kofanova, F. Ehrhart, V.L. Sukhorukov, I. Bernhard, U. Zimmermann, H. Zimmermann; A first cryopreservation of alginate-encapsulated red blood cells in IBMT-miniaturized cryosubstrates. Posterbeitrag anlässlich des 43. Meeting of the Society for Cryobiology in Association with the Society for Low Temperature Biology in Hamburg, 24.-27.07.2006, Abstractbook 101.
9. R. Reuss, H. Zimmermann, F. Ehrhart, P.J. Feilen, M.M. Weber, R. Shirakashi, U. Zimmermann, V.L. Sukhorukov; Intracellular inositol delivery through swelling-activated channels offers cryoprotection to Langerhans islets. Posterbeitrag anlässlich des 43. Meeting of the Society for Cryobiology in Association with the Society for Low Temperature Biology in Hamburg, 24.-27.07.2006, Abstractbook 68.
10. H. Zimmermann, A. Katsen-Globa, F. Ehrhart, R. Reuss, P.J. Feilen, V.L. Sukhorukov, M.M. Weber, U. Zimmermann; Improved Cryopreservation of pancreatic islets and multicellular spheroids in IBMT-miniaturized cryosubstrates. Posterbeitrag anlässlich des 43. Meeting of the Society for Cryobiology in Association with the Society for Low Temperature Biology in Hamburg, 24.-27.07.2006, Abstractbook 105.
11. F. Ehrhart, M.M. Gepp, S. Howitz, H. Zimmermann; Selective 2D alginate encapsulation of adherent cells for regenerative medicine with a novel nanoplotter. Posterbeitrag anlässlich des 12. Leipziger Workshop, Biotechnological-Biomedical Center (BBC) Leipzig 19.-21.04.2007.
12. F. Ehrhart, I. Meiser, S.G. Shirley, V.L. Sukhourukov, H. Zimmermann; High speed video analysis of  $\mu$ -capsule formation for life science applications. Posterbeitrag anlässlich des Mikrosystemtechnik-Kongresses 2007, Dresden, VDE Verlag GmbH Berlin Offenbach.

13. A. Katsen-Globa, P.J. Feilen, F. Ehrhart, M.M. Weber, H. Zimmermann; Alginate encapsulation improves viability and integrity of cryopreserved pancreatic islets and multicellular spheroids: combined fluorescence, scanning and block-face scanning electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis* 13/3 (2007) 190-191.
14. A. Katsen-Globa, J. Schulz, F. Ehrhart, P. Feilen, M.M. Weber, H. Zimmermann; Vitality and functionality of pancreatic islets and multicellular spheroids after cryopreservation in micro-cryosubstrates with automatic addition of cryoprotectants. Posterbeitrag zum Mikrosystemtechnik-Kongress 2007, Dresden, VDE Verlag GmbH Berlin Offenbach.
15. A. Katsen-Globa, R. Malpique, F. Ehrhart, P.M. Alves, H. Zimmermann; Cryopreservation of Caco-2 human colon cancer cells in Fraunhofer micro-cryosubstrates: SEM and block-face – SEM for study of cell differentiation after thawing. *PSI Proceedings of Microscopy conference, Davos* (2005) 193.
16. I. Meiser, S.G. Shirley, U. Zimmermann, H. Zimmermann, F. Ehrhart Quantitative High speed video analysis to embedding-immobilization with alginates. Posterbeitrag anlässlich des 12. Leipziger Workshop 2007.
17. H. Zimmermann, J. Baunach, A. Katsen-Globa, F. Ehrhart, J. Schulz; Towards a medically approved technology for large scale stem cell banks: Tools and Methods. 2008

### Vorträge

1. F. Ehrhart; Aspects of Cryotechnology. GHRC Workshop, Sulzbach, 22.01.08.
2. J.C. Schulz, A.F.J. Beier, J.J.S. Baunach, F. Ehrhart, H. Zimmermann; Alginate encapsulated spheroids – A new tumour model for optimization of cryoprotocols. *BMT Kongress Aachen* 26.-29.09.2007.
3. I. Meiser, S.G. Shirley, J.J.S. Baunach, F. Ehrhart, M. Climaco, H. Zimmermann; Kinetic masks: A new approach and device to metering of biologically relevant fluids. *BMT Kongress Aachen* 26.-29.09.2007.
4. R. Malpique, F. Ehrhart, A. Katsen-Globa, M. Carrondo, P. Alves, H. Zimmermann; Cryopreservation of adherent cells: Strategies to improve cell viability and neuronal differentiation after thawing. *ESACT 2007, 20<sup>th</sup> Meeting of the European Society Dresden* 17.-20.06.2007
5. F. Ehrhart; Cryobiology and Cryonanotechnology. *CellProm Summer School, Sulzbach* 26.10.2007.
6. F. Ehrhart; Investigations about cryopreservation of cells and tissues. *IBET/ITQB, Universität Lissabon, Portugal* 02.05.2007.
7. F. Ehrhart, D. Dörr, M. Stark, K. König, H. Zimmermann; Laser-assisted processing of cross-linked alginate hydrogel. *Proceedings of the Fourth International WLT-Conference on Lasers in Manufacturing 2007, LIM, München* 17.-22. 06.2007.
8. H. Zimmermann, F.R. Ihmig, F. Ehrhart, A. Katsen; Miniaturisierte Kryokonservierung für die zelluläre Biotechnologie. *12. Heiligenstädter Kolloquium, Heilbad Heiligenstadt* 29.09.2004.
9. H. Zimmermann, A. Katsen-Globa, F. Ehrhart, R. Reuss, P.J. Feilen, H. Schneider, V.L. Sukhorukov, S. Schneider, U. Zimmermann, M.M. Weber; A new system for improved cryopreservation of multicellular spheroids. *14. International Conference of Medical Physics, Nürnberg* 14.09.2005.
10. H. Zimmermann, F. Ehrhart, J. Baunach, J. Schulz, A. Katsen-Globa; Neue Verfahren zur Kryokonservierung therapeutisch relevanter Zellen. *13. Heiligenstädter Kolloquium, Heilbad Heiligenstadt* 26.09.2006.
11. F. Ehrhart, H. Zimmermann, S. Wiedemeier, K. Müller, R. Danzebrink, M. Jung, U. Zimmermann, J. Metzger; A new technique for optimized  $\mu$ -encapsulation of hormone productive tissue *on chip*. *12. Leipziger Workshop, Leipzig* 2007

- 
12. F. Ehrhart, M.M. Gepp, S. Howitz, H. Zimmermann; Generation of  $\mu$  - hydrogel spots for cell biology: a new tool for tissue engineering and stem cell culture. Mikrosystemtechnik-Kongress 2007, Dresden, VDE Verlag GmbH Berlin Offenbach.
  13. M.M. Gepp, F. Ehrhart, J.J.S Baunach, S. Howitz, H. Zimmermann; Towards new applications in regenerative medicine and cell culture with a novel alginate plotter. BMT Kongress, Aachen 26.-29.09.2007.

### **Patentanmeldungen**

Deutsches Patent Nr. 10 2006 054 789 (22.11.2006)

„Verfahren und Vorrichtung zur Behandlung biologischer Zellen auf einem Substrat“ H. Zimmermann, F. Ehrhart, G.R. Fuhr

---

## Lebenslauf

Name: Friederike Ehrhart  
Geburtsdatum: 26. Juni 1980  
Geburtsort: Augsburg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

### *Schulausbildung*

1986 – 1990 Besuch der Grundschule Göggingen West (Augsburg)  
1990 – 1999 Besuch des mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweigs des Maria Stern Gymnasiums (Augsburg)  
Juli 1999 Abschluss mit Abitur

### *Studium*

Oktober 1999 - Mai 2004 Immatrikuliert an der Julius-Maximiliansuniversität Würzburg  
- Mai 2004 Studiengang Biologie (Diplom)  
2003 – 2004 Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Biotechnologie  
Mai 2004 Abschluss mit Diplom  
Diplomarbeit zum Thema: *Untersuchungen zur Kryokonservierung tierischer Zellen: Kryomikroskopische Untersuchungen an Zellen und Zellmodellen*  
Durchgeführt am Lehrstuhl für Biotechnologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Zimmermann  
Juni 2004 Beginn der Promotion am IBMT in St. Ingbert in der Abteilung für Kryobiochemie und Kryotechnologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Zimmermann  
April – Juli 2007 Forschungsaufenthalte am IBET/ITQB in Oeiras (Portugal) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Paula Marques (Direktor Prof. Dr. M. Carrondo)  
seit April 2008 Arbeitsgruppenleiterin am IBMT, Arbeitsgruppe Medizinische Biotechnologie

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. H. Zimmermann, Leiter der Abteilung für Kryobiophysik und Kryotechnologie des IBMT, für die Überlassung des Themas. Durch sein Interesse an der Thematik hat er diese mit zahlreichen hilfreichen, motivierenden, kritischen und kreativen Diskussionen und Ideen unterstützt.

Bei Herrn Prof. Dr. Lehr vom Lehrstuhl für Biopharmazie und Pharmazeutische Biotechnologie der Universität des Saarlandes möchte ich mich für die wissenschaftliche Begleitung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Fuhr, Institutsdirektor des IBMT, danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am IBMT durchzuführen. Sein besonderes Interesse an der Immobilisierungstechnologie und Kryobiophysik hat sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. U. Zimmermann vom Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg, danke ich für die hilfreichen Diskussionen über die biophysikalischen Eigenschaften von Alginatsheets.

Frau Dr. A. Katsen-Globa möchte ich für die Aufnahme der EM-Bilder danken sowie für hilfreiche fachliche Diskussionen und Ideen.

Frau J. Schulz, Frau I. Meiser, Herrn M. Gepp und Herrn D. Dörr möchte ich für die Zuarbeit danken, die sie im Rahmen ihrer Master- bzw. Diplomarbeiten geleistet haben.

Ebenso gilt mein Dank Frau S. Zöllner für ihre wertvollen Hinweise zur praktischen Durchführung vieler Versuche.

Unter den Studentinnen und Studenten, die mich durch ihre Mitarbeit unterstützt haben müssen Herr A. Beier und Frau C. Graf genannt werden, die im Rahmen ihrer Praktika Untersuchungen zur Verkapselung von PC-3 Sphäroiden und humanen Erythrozyten gemacht haben.

Herrn Prof. Dr. M. Carrondo, dem Direktor des IBET/ITQB in Oeiras (Portugal) möchte ich für die Möglichkeit danken in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. P. Marques Untersuchungen zur Verkapselung von neuronalen Zellen und Hepatozyten durchzuführen. Mein Dank gilt im Einzelnen Frau R. Malpique für die Zusammenarbeit an N2a-Zellen und der Aufnahme der CLSM und fluoreszenzmikroskopischen Bilder mit N2a, sowie Frau Dr. S. Sá Santos und Frau D. Ferreira für die Unterstützung mit der Arbeit an primären neuronalen Zellen und die Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Bilder.