

Untersuchungen zur Präparation komplexer Zellsysteme im Kontext neuer Therapien

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III

- Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften -

der Universität des Saarlandes

von

Ina Meiser, M. Sc.

Saarbrücken

2014

Tag des Kolloquiums:

23. Juli 2014

Dekan:

Prof. Dr. Volkhard Helms

Berichterstatter:

Prof. Dr. Heiko Zimmermann

Prof. Dr. Elmar Heinzle

Vorsitz:

Prof. Dr. Christoph Wittmann

Akademische Mitarbeiterin:

Dr. Fozia Noor

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Zusammenfassung.....	V
Summary	VI
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Grundlagen.....	7
2.1 Neue Therapien	7
2.1.1 Historie und Terminologie im Kontext neuer Therapien	7
2.1.2 Zellquellen im Kontext neuer Therapien	10
2.2 Biophysikalische Prozesse biologischer Proben in Biobanken	15
2.2.1 Langsame Kryokonservierung mit Kristallisation	15
2.2.2 Sehr schnelle Kryokonservierung ohne Kristallisation (Vitrifikation).....	17
2.2.3 Rolle der kryoprotektiven Stoffe und Rekrystallisation	18
2.2.4 Kryokonservierung von Mikrogeweben	20
2.3 Anforderungen an die Zellen.....	22
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Techniken der Zellkultur.....	24
3.1.1 Zellen und Zellkultur.....	24
3.1.2 Methoden zur Generierung von Mikrogeweben	27
3.1.3 Vitalitätstests und Funktionalitätsnachweise	29
3.1.4 Herstellung artifizierter Gerüststrukturen	32
3.2 Kryokonservierung.....	34
3.2.1 Kristallisationsverfahren zur Kryokonservierung	34
3.2.2 Vitrifikation durch Self Pressurized Freezing (SPF).....	34
3.2.3 Adhärente Vitrifikation auf Deckgläschen.....	34
3.2.4 Pelletierungsverfahren zur tropfenbasierten Vitrifikation.....	35
4 Ergebnisse	37
4.1 Identifizierung, Etablierung und Charakterisierung verschiedener Zelltypen im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit in neuen Therapien	37
4.1.1 Identifikation eines optimalen Zelltyps im Kontext metabolischer Therapien	37
4.1.2 Identifikation eines optimalen Zelltyps im Kontext zellulärer Therapien	38
4.1.3 Identifikation eines optimalen Zelltyps im Kontext struktureller Therapien	41

4.2	Untersuchungen zur <i>in vitro</i> Aufbereitung therapeutisch relevanter Zellsysteme.....	43
4.2.1	Untersuchungen zur Positionierung von Bioimplantaten in immunisierenden Hydrogelkapseln im Kontext metabolischer Therapien	43
4.2.2	Untersuchungen zur Immobilisierung therapeutisch relevanter Zellen in offenen Gerüststrukturen im Kontext von zellulären und strukturellen Therapien.....	49
4.2.3	Etablierung und Charakterisierung skalierbarer Mikrobioreaktoren zur Aufbereitung relevanter Zellen im Kontext neuer Therapien	52
4.3	Entwicklung zellspezifischer Kryokonservierungsprozeduren mit Funktionalitätserhalt	59
4.3.1	Untersuchung von Kristallisationsverfahren zur Kryokonservierung adhärenter Zellen	59
4.3.2	Untersuchung von Vitrifikationsverfahren zur Kryokonservierung adhärenter Zellen	64
4.3.3	Vergleichende Untersuchungen miniaturisierter Ansätze zur Kryokonservierung von Zellen in Suspension mit Kristallisation	68
4.3.4	Untersuchung eines miniaturisierten Ansatzes zur Vitrifikation von Zellen in Suspension.....	73
4.3.5	Vergleichende Untersuchungen zum inter- und intrazellulären Strukturertalt	76
4.4	Entwicklung von anwendungsbezogenen Automatisierungsprozeduren für medizinisch relevante Zellsysteme.....	82
4.4.1	Etablierung einer automatisierten Produktion und Kultivierung humaner Stammzellen für regenerative und medikamentenbasierte Medizin	82
4.4.2	Untersuchungen zum Einfluss von Pelletierverfahren zur tropfenbasierten Vitrifikation von Zellen in Suspension	88
4.4.3	Etablierung einer scherkraftfreien Applikationseinheit zur definierten Ablage vitrifizierter Zellen	96
5	Diskussion.....	102
6	Literatur.....	130
7	Anhang	141
	Danksagung	141
	Eidesstattliche Erklärung.....	143
	Veröffentlichte Arbeiten	144
	Lebenslauf	147

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acetamid
AMI	Akuter Myokardinfarkt
bFGF	Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
bpm	Kontraktionsfrequenz (beats per minute)
BSA	Bovines Serumalbumin
CHMC	Herzmuskelzellen Hühnchen (chick heart muscle cells)
CLSM	Konfokales Laser-Raster-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy)
CPAs	Kryoprotektive Stoffe (cryoprotective agents)
DMEM	Dulbecco's modified essential medium (Basalmedium für die Zellkultur)
DMEM/F12	Dulbecco's modified essential medium mit Nährstoffzusatz F12 (Basalmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSBs	Doppelstrangbrüche der DNA
EBs	Embryoid Bodies
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EG	Ethylenglykol
ESCs	Embryonale Stammzellen (embryonic stem cells)
EtBr	Ethidiumbromid
F	Fibronektin
FBS	Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gH2AX	Phosphoryliertes Histon H2AX, Marker für DNA-Strangbruch
GvHD	Transplantat-Wirt-Reaktion (graft-versus-host disease)
HDs	Hängende Tropfen (hanging drops)
hESCs	Humane embryonale Stammzellen (human embryonic stem cells)
hiPSCs	Human induziert pluripotente Stammzellen (human induced pluripotent stem cells)
hMSCs	Humane mesenchymale Stammzellen
HR	Homologe Rekombination (DSB-Reparaturmechanismus)
HSA	Humanes Serumalbumin
hSCs	Humane Stammzellen (human stem cells)
IIF	Intrazelluläre Eisbildung (intracellular ice formation)
iPSCs	Induziert pluripotente Stammzellen (induced pluripotent stem cells)
L929	Zelllinie von murinen Fibroblasten
LHI	Langerhans'sche Inselzellen
<i>L.n.</i>	<i>Lessonia nigrescens</i> (Braunalge)
<i>L.t.</i>	<i>Lessonia trabeculata</i> (Braunalge)
MG	Proteingemisch sekretiert von murinen Sarkomazellen (Markenname: Matrigel)
MPLSM	Multiphotonen-Laser-Raster-Mikroskopie (multiphoton laser scanning microscopy)
N	Anzahl an unabhängigen Experimenten
NHEJ	Non-Homologous-End-Joining (DSB-Reparaturmechanismus)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFD	Perfluordecalin

PMEFs	Primäre embryonale Mausfibroblasten (primary mouse embryonic fibroblasts)
Poly-HEMA	Polyhydroxyethylmethacrylate
PTFE	Polytetrafluorethylen, Handelsname Teflon
REM	Rasterelektronenmikroskopie (scanning electron microscopy)
REM-RE	Rasterelektronenmikroskopie im Rückstreuelektronenmodus
RKI	Robert Koch-Institut
RIN-m	Zelllinie von Insulin-produzierenden Insulinomazellen
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPMI-1640	Basismedium für die Zellkultur
SPF	Self Pressurized Freezing (Druckgestütztes Einfrieren ohne Phasenseparation)
SR	Kryokonservierung mit Kristallisation (langsamer Abkühlrate; Englisch: slow rate)
StZG	Stammzellgesetz
TGF- β	Wachstumsfaktor (transforming growth factor)
UHV-Alginat	Ultra hoch viskoses Alginat
WF/V	Wachstumsfläche zu Volumen
Y	Rho-assoziierte Proteinkinase Inhibitor, ROCK-Inhibitor Y-27635

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Arbeitsablauf zur Präparation komplexer, funktionaler Zellsysteme im Kontext neuer Therapien in die vier Hauptschritte Gewinnung, Aufbereitung, Kryokonservierung und Applikation eingeteilt und hinsichtlich möglicher Schädigungsmechanismen und Optimierungsmöglichkeiten untersucht. Dazu wurde ein Zellpanel aus relevanten Zelltypen mit entsprechenden Modellsystemen entwickelt und ein Algorithmus zur Protokollentwicklung und Methodenwahl abgeleitet.

Vergleichende Untersuchungen von Wachstumsoberflächen und neuartigen, miniaturisierten Bioreaktoren mit Automatisierungspotenzial wurden im Hinblick auf Generierung und Verarbeitung funktionaler Mikrogewebe durchgeführt und ihre Einflüsse auf Zellen analysiert. Erstmals wurden Raum-Zeit-Kurven einschlussimmobilisierter Bioimplantate in Hydrogelkapseln während des Polymerisationsprozesses untersucht und quantifiziert.

Unter Berücksichtigung des Erhalts zellspezifischer Funktionalität, wurden neuartige Verfahren zur Kryokonservierung mit Automatisierungspotenzial entwickelt und untersucht. In miniaturisierten, tropfenbasierten Verfahren zur Vitrifikation konnten zellspezifische Eigenschaften sowie eine größtmögliche Flexibilität der Proben für die weitere Applikationen erhalten werden.

Zur unmittelbaren Anwendung kryokonservierter Proben wurde eine neuartige Applikationseinheit entwickelt. Ihr Einfluss auf die Funktionalität applizierter Proben wurde anhand therapeutisch relevanter Zellen untersucht.

Summary

Within this thesis the workflow for the preparation of complex cell systems in new therapies was subdivided into the four main steps retrieval, processing, cryopreservation and application. Each step was examined in terms of damage mechanisms and screened for optimization. Therefore, a cell panel of therapeutically relevant cells and according model systems was established and an algorithm for the selection of protocols and methods was developed.

Comparative investigations of growth surfaces and novel miniaturized bioreactors were performed with regard to generation and processing of functional micro tissues. Bioreactor's potentials for automation was examined, as well as their influences on cells. For the first time, trajectories of immobilized grafts in hydrogel capsules were observed and quantified during the polymerization process.

Considering the preservation of functionality, novel cryopreservation methods with the possibility for automation were established and examined. Functionality of cells was preserved in droplet-based vitrification techniques, which kept the maximal flexibility of the frozen sample.

A setup was established for the direct application of vitrified samples by air pressure. Its influence on cell's functionality was investigated by different therapeutically relevant cell systems.

1 Einleitung und Zielsetzung

Die drei Wellen der ökonomischen Innovation, beginnend in der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts mit der Industrialisierung über die Globalisierung und der heutigen Digitalisierung (Mines 2010), veränderten und verändern maßgeblich unsere Lebens- und Arbeitsbedingungen. Die sogenannten Wohlstandskrankheiten wie endokrinologische und kardiovaskuläre Dysfunktionen (Diabetes mellitus, Hypothyreose, Hypertonie oder ischämische Kardiomyopathie) entwickeln sich seither nahezu epidemieartig. Während 1980 weltweit noch 175 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt waren, sind es heute bereits doppelt so viele - Tendenz steigend (Danaei et al. 2011; Laino 2011). Kardiovaskuläre Erkrankungen sind weltweit die häufigste Todesursache (ca. 17 Mio. Fälle pro Jahr (Go et al. 2013)): Allein in Deutschland erleiden jährlich ca. 250.000 Menschen einen Herzinfarkt und es werden 350.000 Operationen am Herzen durchgeführt (Statistisches-Bundesamt 2012). Um dieser Entwicklung entgegen zu wirken ist, neben einer effektiven Prävention durch Aufklärung und frühzeitige gesundheitsfördernde Maßnahmen, die Verbesserung aktueller sowie die Entwicklung neuartiger Medikamente und Therapieansätze von entscheidender Bedeutung (Daley 2012).

Während der noch immer an Bedeutung gewinnende Therapieansatz „Transplantation“ ganze Organe ersetzt, zielt die sogenannte regenerative Medizin auf die Heilung dysfunktionaler Organe durch Bioimplantate (Erklärung der Terminologien im Kontext neuer Therapien folgt in Kapitel 2.1.1). Grundgedanke hierbei ist das Einbringen von biologischen Implantaten mit funktionalen Zellen oder Mikrogeweben (Zellverbände im Bereich von Mikrometer) in einen Patienten, um dessen dysfunktionale Zellen oder Gewebe zu regenerieren. Die Anzahl der klinischen Studien über zellbasierte neue Therapien stieg in den letzten Jahren beständig an (Ilic 2009; 2012; 2013). Bereits erfolgreich etabliert sind aber erst wenige, wie zum Beispiel die Bioimplantation von humanen, hematopoetischen Stammzellen adulter Spender in Leukämie- oder Immunschwächepatienten (Beelen et al. 2011) oder die Bioimplantation von Dermoplasten zur Hautregeneration diabetischer Geschwüre oder Brandwunden (Marston et al. 2003). Klinische Studien zur Bioimplantation von insulinproduzierenden Betazellen in die Bauchspeicheldrüse von Diabetes mellitus Patienten (Elliott et al. 2007; Tuch et al. 2011) oder die Applikation von adulten Stammzellen nach einem Myokardinfarkt, um den geschwächten Herzmuskel zu regenerieren (George 2010), geben der Forschung weiteren Auftrieb. In mehreren Studien konnten die positiven Effekte adulter Stammzellen auf Patienten nach einem Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Dimmeler et al. 2005; Segers und Lee 2008; Strauer und Steinhoff 2011). Allerdings lassen sich kaum statistischen Aussagen treffen, da die durchgeführten klinischen Therapien im Einzelnen stark voneinander abweichen: Die verwendeten Zellzahlen bei intrakoronaren Infusionen von Progenitorzellen in das Infarktgefäß variieren von $6,8 \cdot 10^7$ bis $19,8 \cdot 10^7$ Zellen pro Patient (Tonn et al. 2007), der Zeitpunkt der Applikation schwankt zwischen weniger als fünf Tagen bis hin zu weniger als vier Stunden nach dem akuten Myokardinfarkt (George 2010). Hinzu kommt, dass schon kleine Teilschritte im Arbeitsablauf, wie die Wahl des Polymers für die Dichtegradientenzentrifugation, entscheidend ist für den Isolations- und damit auch den Therapieerfolg, wie Seegers et al. 2007 für Knochenmarkstammzellen zur Behandlung eines akuten Myokardinfarkts zeigten: Während die Vitalität der Zellen mit 99% in den beiden Isolationsprotokollen zwar gleich hoch blieben, reduzierte sich die Qualität, gemessen an der Anzahl CD45- und CD34-positiven Zellen in einem Protokoll um 36% (Seeger et al. 2007).

Ein weiteres Problem ist, dass Zellsuspensionen nur sehr schwer am definierten Wirkort zu halten sind und insbesondere in bewegtem Gewebe, wie dem Myokard, sofort nach intravenösem oder

intrakoronaren Einbringen stark verdünnt und abtransportiert werden (Dimmeler et al. 2005). Um diesem Prozess entgegen zu wirken, liegen auch Mikrogewebe im Fokus der Forschung. Diese können lokal definiert, mit und ohne Gerüststrukturen und minimalinvasiv direkt in defektes Gewebe eingebracht werden (Kelm und Fussenegger 2010).

Komplexe Zellsysteme spielen für Anwendungen in der regenerativen Medizin eine zunehmend große Rolle. Dazu gehören zum Beispiel Kardiomyozyten mit kontraktilen Aktin-Myosinfilamenten, Insulin und Glukagon sekretierende Langerhans'sche Inselzellen sowie Stammzellen, mit ihren multi- bis pluripotenten Differenzierungspotenzialen in Zelltypen eines Keimblattes oder aller Keimblätter. Des Weiteren finden sie Anwendung als Modellsysteme für das Verständnis von Krankheiten sowie in Toxikologie- beziehungsweise Wirksamkeitsstudien für neue Wirkstoffe in medikamentenbasierten Therapien: In systematischen Testverfahren könnten mit Hilfe dieser Zellen Einflüsse verschiedener Faktoren auf spezifische Zellfunktionen oder potenzielle Wirkstoffe parallel im Hochdurchsatz getestet werden (Drewitz et al. 2011), wodurch Tierversuche auf das nötigste reduziert werden könnten.

Um eine optimale Versorgung der Patienten in der regenerativen Medizin und eine ausreichende Anzahl an Modellsystemen für Untersuchungen zu medikamentenbasierten Therapien gewährleisten zu können, ist vor allem eine ständige Verfügbarkeit von Bioimplantaten in gleichbleibender Qualität und Funktionalität essentiell. Beispielsweise müssen für eine effiziente Behandlung von Patienten nach einem akuten Myokardinfarkt (AMI), innerhalb der ersten vier bis fünf Tage zwischen 7 und 14 Millionen Vorläuferzellen aus Blut oder Knochenmark perfundiert werden (Assmus et al. 2002; Leistner et al. 2011). Um im Kontext neuer Therapien sowohl in der regenerativen, als auch in der medikamentenbasierten Medizin Fortschritte erzielen zu können, braucht man wohldefinierte Bedingungen und Infrastrukturen an Laborgeräten für die Gewinnung, Aufbereitung, Lagerung und Applikation (Salaway und Ilic 2008).

Für solche neuartigen Therapien, sowohl in der regenerativen als auch in der medikamentenbasierten Medizin müssen relevante Zellen in vielschichtigen Arbeitsabläufen gewonnen und bereits von Beginn an im Hinblick auf ihre spätere Anwendung präpariert werden. Jeder dieser Arbeitsabläufe birgt physikalische und chemische Schädigungsmechanismen für das biologische Material (zum Beispiel mangelnde Fokalkontakte auf Grund von Scherstress oder Osmolarität), das jedoch in gleichbleibend hoher Qualität vorliegen muss. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit erstmals die notwendigen Arbeitsabläufe für neue Therapien, von den möglichen Zellquellen bis hin zur funktionalen Anwendung, in die folgenden vier Klassen eingeteilt, charakterisiert und mögliche Verbesserungen aufgezeigt:

- i. Gewinnung von Zellmaterial aus verschiedenen Quellen
- ii. Aufbereitung des Zellmaterials hinsichtlich der späteren Anwendungsgebiete
- iii. Kryokonservierung unter Berücksichtigung des Funktionalitätserhalts
- iv. Innovative Applikationen mit Automatisierungspotenzial von Mikrogeweben

Der erste Arbeitsschritt hin zu effizienten, zellbasierten Therapien ist daher die Gewinnung von funktionalem Rohmaterial. Die derzeit bereits durchführbaren Therapien, wie die Bioimplantation von Insel- und Leberzellen oder Herz- und Hauttransplantationen, gewinnen das nötige Zellmaterial meist aus explantierten Spenderorganen, was für den Empfänger immunsuppressive Begleittherapien erfordert und den kompletten klinischen Bedarf nicht decken kann. Auf Grund der terminalen Differenzierung ist eine Expansion des Materials nicht möglich (Kuilman et al. 2010) und wegen der

zahlreichen Unbekannten im Prozess der Explantation, können diese Zellquellen nicht das Mittel der Wahl sein. Diese Unbekannten sind zum Beispiel nicht-standardisierte Abläufe an unterschiedlichen Standorten, unvorhersehbare ischämische oder nekrotische Bereiche im Gewebe, die die Anzahl funktionaler Zellen reduziert sowie Alter oder Zustand des Spenderorgans.

Seit Thomson 1998 die erste humane Linie entwickelte, galten die embryonalen Stammzellen (hESCs) ein knappes Jahrzehnt als große Hoffnungsträger der regenerativen Medizin, da sie das Potenzial unbegrenzter Proliferation und der Differenzierung in alle möglichen Zelltypen der drei Keimblätter besitzen (Thomson et al. 1998). Auf Grund der Tatsache, dass für ihre Gewinnung jedoch menschliche Embryonen zerstört werden, sind hESCs stets ethisch fragwürdig und unterliegen strengen Regularien. Ein bedeutender Schritt in die Richtung der personalisierten Medizin brachte die Entwicklung von humanen, induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSCs) im Jahr 2006 (Takahashi und Yamanaka 2006), deren Wegbereiter John B. Gurdon und Erfinder Shinya Yamanaka nur 6 Jahre nach der Entdeckung der Nobelpreis verliehen wurde (Gurdon und Yamanaka 2012). Der maßgebliche Vorteil der iPSC-Zellen ist, dass adulte und damit ethisch völlig unbedenkliche Körperzellen, zum Beispiel mit Hilfe von viralen Vektoren und den in der Embryogenese aktiven, regulatorischen Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4, in einen pluripotenten Zustand reprogrammiert werden können. Allerdings steht das Forschungsfeld noch am Anfang; die Reprogrammierungseffizienz liegt meist unter 1% und variiert je nach Ausgangsmaterial und angewendeten Protokollen. Eine direkte Anwendung von hiPSCs und hESCs *in vivo* ist allerdings auf Grund ihres tumorbildenden Potenzials nicht möglich. Ebenso ist die Verwendung viraler Vektoren nicht geeignet für einen therapeutischen Einsatz der Zellen, da das Ablesen von körperfremden Transgenen aus diesen Vektoren nicht komplett ausgeschlossen werden kann (Daley 2012).

Im zweiten Schritt des Arbeitsablaufes für zellbasierte neue Therapien, müssen die Zellen aufbereitet, gegebenenfalls zu Mikrogeweben kombiniert, expandiert und bewertet werden, um eine gleichbleibende Qualität zu sichern. Je nach Anwendung muss entschieden werden, ob die Zellen einzeln oder als Mikrogewebe, mit oder ohne artifiziellen Gerüststrukturen, immunisoliert oder nicht immunisoliert verwendet und dementsprechend präpariert werden. Zur Expansion eukaryotischer Zellen werden standardmäßig statische zweidimensionale Kulturen in Zellkulturflaschen angelegt, die sowohl arbeits-, als auch materialintensiv sind. Automatisierbare Hochdurchsatzverfahren, wie Zellkulturroboter oder großvolumige Bioreaktoren, können diesen zeitaufwendigen Prozess beschleunigen, jedoch bleibt der hohe Materialverbrauch sowie der Einsatz tierischer Zusätze, die unkontrollierbare chargenspezifische Eigenschaften aufweisen. In der Regel leidet die Homogenität und damit die Qualität der resultierenden Zellen und Mikrogewebe (Kurosawa 2007). Aktuell werden Möglichkeiten und Limitierungen dieser großvolumigen Kultivierungssysteme für humane Stammzellen (hSCs) verstärkt evaluiert (Serra et al. 2012). Um standardisiertes und hochwertiges Ausgangsmaterial für eine anschließende Verwendung in neuen Therapien zur Verfügung stellen zu können, bieten Miniaturisierungsansätze (i.d.R. Mikrowellplatten) in Kombination mit einer Automatisierung einen vielversprechenden, aber problembehafteten Ansatz (Brafman 2012). In kleinsten Volumina (<50µl) können Zellen oder Mikrogewebe ressourcenoptimiert in kontrollierbarer Umgebung kultiviert werden.

Dieser Arbeitsschritt muss allerdings bereits im Hinblick auf die zukünftigen Anforderungen für die angestrebte Anwendung konzipiert werden. Das bedeutet, dass die relevanten Zellsysteme vorausschauend in adäquaten Kultivierungsformen und Gefäßen zur kryogenen Lagerung präpariert werden: Beispielsweise sind Bioimplantate zur Regeneration von Haut nach Verbrennungen darauf

angewiesen, dass intakte dermale Zellen, die von außen auf die Wunde aufgebracht werden, direkten Kontakt zum erkrankten Gewebe haben. Dazu müssen diese, lokal definiert, auf einer Gerüststruktur wachsen, um direkt in das erkrankte Gewebe migrieren zu können, um ein neues, funktionales Netzwerk aufzubauen (Marston et al. 2003). Funktional bedeutet in diesem Kontext Zellen mit intaktem Zytoskelett und den daran befestigten Ankerproteinen (Integrine, Cadherine, Troponine etc.), die Zell-Zell- beziehungsweise Zell-Matrix-Kontakte mit der Umgebung etablieren.

Bei einer Bioimplantation endokriner Zellen hingegen, die eine Hormoninsuffizienz durch die Sekretion selbiger bekämpfen soll, müssen die entsprechenden Zellen möglichst schonend, in immunisierenden Mikroeinheiten eingeschlossen werden (Orive et al. 2003). Dadurch wird ein direkter Kontakt zum Empfänger verhindert und eine immunsuppressive Therapie könnte selbst nach einer speziefremden (xenogenen) Bioimplantation überflüssig sein.

Für Anwendungen im Diagnostikbereich (Screening-Verfahren) ist die Anordnung der Zellen untereinander von entscheidender Bedeutung (Souza et al. 2010): Um die spezifische Funktionalität des Zellsystems zu erhalten, sollte eine möglichst native dreidimensionale Kultivierungsform zur Verfügung gestellt werden. Beispielsweise über native oder artifizielle Gerüststrukturen (dezellularisierte Matrizen oder biokompatible Polymere wie Polylactide), die die dazu notwendigen interzellulären Kontakte und Signaltransduktionswege zum Beispiel über Gap Junctions nicht behindern (Abbott 2003; Weaver et al. 1997). Weitere zu beachtende Parameter für kontaktbasierte Anwendungen sind die ausreichende Versorgung mit Nährstoffen, die Reduktion mechanischer Belastungen sowie das Sicherstellen der Interaktionen der therapeutisch relevanten Zellen mit ihrer Umgebung (Fokaladhäsionen mit nativer oder artifizieller Matrix, Zell-Zell-Kontakte).

Der dritte Schritt im Arbeitsablauf von neuen, effizienten Therapien ist die Vorratshaltung von relevantem Zellmaterial in ausreichenden Mengen, die bislang nur im Zuge der Kryokonservierung, also einer Lagerung bei Temperaturen unterhalb der Glasübergangstemperatur von Wasser ($<-130^{\circ}\text{C}$) möglich ist. Bei diesen geringen Temperaturen werden chemische Prozesse und somit auch der Metabolismus von Zellen ausgesetzt. Die Zelle altert somit nicht und ist theoretisch zeitlich unbegrenzt in den tiefkalten Vorratstanks von Biobanken lagerfähig. Es werden auch aktuell bereits Zellen für die regenerative Medizin kryokonserviert, die jedoch in der Regel vor der eigentlichen Applikation wieder kultiviert und expandiert werden, um Zellen in ausreichender Menge und applikationsgerechter Form, wie zum Beispiel auf einer Gerüststruktur zur Knochenregeneration, zu erhalten (Marston 2004). Transplantationen oder Bioimplantationen werden hauptsächlich mit Geweben und Organen durchgeführt, die in physiologischen Lösungen bei 4°C transportiert werden, was hinsichtlich der zeitlichen Limitierung bei dieser Lagertemperatur und der Sterilität, sowohl für die Logistik, als auch für die Applikation sehr aufwändig ist. Diese Vorgehensweise ist bedingt durch die mangelnde Effizienz vorhandener Kryokonservierungsprotokolle; Hersteller wie zum Beispiel das WiCell Research Institute garantieren Überlebensraten zwischen 0,1-1% für hESCs. Solche Protokolle müssen auf Grund zellspezifischer Eigenschaften wie zum Beispiel Membranleitfähigkeit und osmotische Toleranzen auf jedes Zellsystem zugeschnitten werden und stellen sich insbesondere bei dreidimensionalen, großen Konstrukten mit ihren verschiedenen Wärmeleitwerten und Diffusionsraten als problematisch dar.

Des Weiteren müssen xenogene Zusätze vermieden werden, um Immunantworten im Patienten zu vermeiden. Zudem sollten, wie auch bei der Expansion, die kryobiologischen Substrate so konzipiert und entwickelt werden, dass die Aufbewahrung der Proben und deren Applikation Hand in Hand gehen können: Ineffizient ist die Konservierung zellulärer Proben in den Standardvolumen von 1-5mL, wenn

die Applikation einzelne Zellen oder Mikrogewebe erfordert, wie zum Beispiel für ein Diagnosearray. Aus diesem Grund sollte die Lagerung von qualitativ gleichwertigen Proben in kleinen, portionierbaren Volumen in Biobanken angestrebt werden. In diesen kleinen Einheiten können Zellen und Mikrogewebe nach Bedarf entnommen werden und ermöglichen eine ressourcenoptimierte und damit kosteneffiziente Langzeitlagerung therapeutisch relevanter Zellen und Mikrogewebe, die sich in miniaturisierte Volumen zudem noch deutlich besser kryokonservieren lassen (Fahy et al. 1990).

Nach der Lagerung und dem Transport der Proben zum Einsatzort ist abschließend die Applikation der Bioimplantate beziehungsweise die Anwendung der Modellsysteme der vierte und letzte Schritt. In heutigen zellbasierten Therapien, zum Beispiel im kardiovaskulären Bereich werden die Zellen mangels Alternativen in Suspension implantiert. Das fördert in hohem Maße ein Auswaschen und somit die Delokalisation der Zellen, da diese in der kurzen Zeit kaum eine Möglichkeit haben Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakte auszubilden (Strauer und Steinhoff 2011). Die Folgen der Delokalisation transplantierte Zellen in andere Bereiche des Organismus sind nicht abzuschätzen (Dimmeler et al. 2005).

Ziel dieser Arbeit war es daher, die oben beschriebenen Präparationsschritte im Rahmen neuer Therapien, sowohl im Bereich der regenerativer Medizin als auch für Diagnostikmethoden im Bereich der medikamentenbasierten Medizin, zu charakterisieren und Optimierungsansätze aufzuzeigen. Dabei wurden mechanische und biochemische Schädigungsmechanismen an therapeutisch relevanten Zellsystemen untersucht. Wenn auch bereits in den einzelnen Feldern viel und sehr spezifisch geforscht wurde, fehlt es jedoch noch an einem Gesamt-Arbeitsablauf, der je nach Applikation für die einzelnen Zellsysteme ausgelegt und optimiert werden muss (Salaway und Ilic 2008). Im Einzelnen bedeutet das zunächst geeignete, relevante Zellsysteme für spezifische Bereiche der Therapie und Diagnostik zu identifizieren, zu etablieren und zu charakterisieren. Diese Zellsysteme müssen metabolisch aktiv sein und entsprechend ihrer Anwendung zum Beispiel therapeutische Faktoren sekretieren können oder eine intakte Membran und ein intaktes Zytoskelett haben, um in das Empfängergewebe migrieren zu können. Zur Untersuchung dieser komplexen Aufgabe werden im Rahmen dieser Arbeit geeignete Zellsysteme herausgearbeitet und entsprechend den Arbeitsschritten eingesetzt.

Wichtige Aspekte des ersten Arbeitsschrittes, der Gewinnung des Zellmaterials, sind die Voraussetzungen, die jedes System mitbringt, um als potenzielles Therapeutikum zu fungieren: Es stellt sich die Frage nach der Verfügbarkeit, dem Expansionsverhalten (Proliferation) aber auch dem Funktionalitätserhalt (metabolische Aktivität und Differenzierungspotenzial) über die benötigte Kultivierungsdauer.

Zur Aufbereitung und Expansion des Zellmaterials werden verschiedene, automatisierbare Hochdurchsatz-Technologien in Betracht gezogen: Werden für endokrinologische Therapien Zellsysteme verkapselt, ist es notwendig, die Lokalisation der Bioimplantate in den Kapseln zu betrachten, um eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten. Im Fall von Mikrogewebe werden die Adhäsionsmöglichkeiten, sowohl Zell-Zell-, als auch Zell-Gerüst-spezifischer Art untersucht.

Für die anschließende Kryokonservierung müssen die Kryokonservierungsprotokolle zellspezifisch zugeschnitten werden. Unter anderem werden die Möglichkeiten verschiedener Verfahren, die Zusammensetzung des Kryomediums, sowie die zellumgebende Matrix (ECM) in Betracht gezogen. Ziel der Kryokonservierungsprozeduren ist der Funktionalitätserhalt der Zellen. Ebenso wird auf eine

anwendungsorientierte Lagerung, also aliquotierbare und flexible kryobiologische Substrate, geachtet. Mechanischer und thermisch bedingter zellulärer Stress werden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Es werden anwendungsbezogene Substrate für eine effektive Kryokonservierung und neuartige, direkte, scherstressfreie Applikationsformen für kryokonservierte Bioimplantate entwickelt und deren Einfluss auf die Funktionalität applizierter Zellsysteme untersucht.

2 Grundlagen

2.1 Neue Therapien

Seit den 1950er Jahren lassen sich medizinisch grundsätzlich zwei Ansätze unterscheiden, um dysfunktionale Organsimen zu behandeln: Die medikamentenbasierte und die zellbasierte Therapie. Schon Jahrtausende bevor Wirkstoffe industriell zu Medikamenten verarbeitet oder die Mechanismen der Wechselwirkungen auch nur ansatzweise erforscht wurden, sind bereits Pflanzen wie Myrrhe, Fenchel und Leinsamen von den Ägyptern sozusagen als Medikamente erster Generation eingesetzt worden (Aboelsoud 2010). Anfang des 20. Jahrhunderts, mit der Entdeckung von Penicillin und Aspirin haben Medikamente ihren Siegeszug in der Medizin eingeläutet und sind aus Therapien nicht mehr wegzudenken. Jedoch steigt mit zunehmender Lebenserwartung, Industrialisierung und Bevölkerung auch die Zahl der medizinischen Probleme, wie zum Beispiel den kardiovaskulären, neurodegenerativen Erkrankungen und Stoffwechselstörungen, die sich mit den heute bekannten Medikamenten nicht mehr kontrollieren lassen (Carrera-Bastos et al. 2011; Eaton et al. 1988). Blut- oder Organtransplantationen können in vielen Fällen helfen, es herrscht jedoch ein eklatanter Mangel an Spendermaterial. Bei der europäischen Vermittlungsstelle für Organspenden Eurotransplant standen zum ersten Januar 2014 mehr als 15000 Patienten auf der Warteliste, knapp 4000 mehr als im Jahr 2013. Dem gegenüber standen 6866 Organe verstorbener Spender (Eurotransplant International Foundation, URL www.eurotransplant.org/cms (Stand 20.03.2014)). Große Hoffnung ruht hier auf den kleinsten Bausteinen des Lebens, den Zellen. Je nach ihrem Ursprung und ihrer Präparation können sie einzeln oder im Verbund als sogenannte Mikrogewebe (Zellverbände im Bereich von Mikrometer) direkt in zellbasierten Therapien der regenerativen Medizin dysfunktionales Gewebe ersetzen oder aber als Testsysteme zur verbesserten und schnelleren Medikamentenentwicklung in Hochdurchsatzstudien der medikamentenbasierten Medizin dienen.

2.1.1 Historie und Terminologie im Kontext neuer Therapien

Die grundsätzliche Idee einem Körper frische Zellen zuzuführen, wurde von Charles-Edward Brown-Séquard bereits vor 200 Jahren dokumentiert und durchgeführt. Der medizinische Nutzen subkutan injizierter Zellen aus Meerschweinchen und Hunden zur Verjüngung war allerdings schon damals fraglich und konnte weder von ihm, noch 100 Jahre später vom wohl größten Verfechter der sogenannten Frischzellentherapie Paul Niehans, schlüssig belegt oder gar risikofrei für den Patienten durchgeführt werden. Für die moderne, regenerative zellbasierte Medizin gilt daher die Arbeit von Alexis Carrel Anfang des 20. Jahrhundert als Initialzündung (siehe Abbildung 1): Als experimenteller Chirurg vollzog Carrel die ersten erfolgreichen Transplantationen von Blutgefäßen und ganzen Organen, um dysfunktionale Gewebe mit lebendigem, organischem Material zu ersetzen. Für diese Pionierarbeit wurde er 1912 mit dem Nobelpreis in Physiologie und Medizin geehrt (Carrel 1912). Es dauerte jedoch weitere vier Jahrzehnte und bedurfte der Vorarbeit von Baruj Benacerraf, George D. Snell und Jean Dausset, bis ein weiterer Meilenstein in der regenerativen Medizin gelang und die Abstoßungsreaktionen von allogenen Transplantaten im Empfängerorganismus durch T-Lymphozyten verstanden wurden. Die Entdeckung des humanen Leukozytenantigen-Systems (HLA-System) und der Tatsache, dass diese Antigene Erkennungsmotive für körpereigenes oder körperfremdes Material sind entschlüsselten das Prinzip der Immunantwort (Nobelpreis 1980). Nachfolgend zeigte Joseph Edward

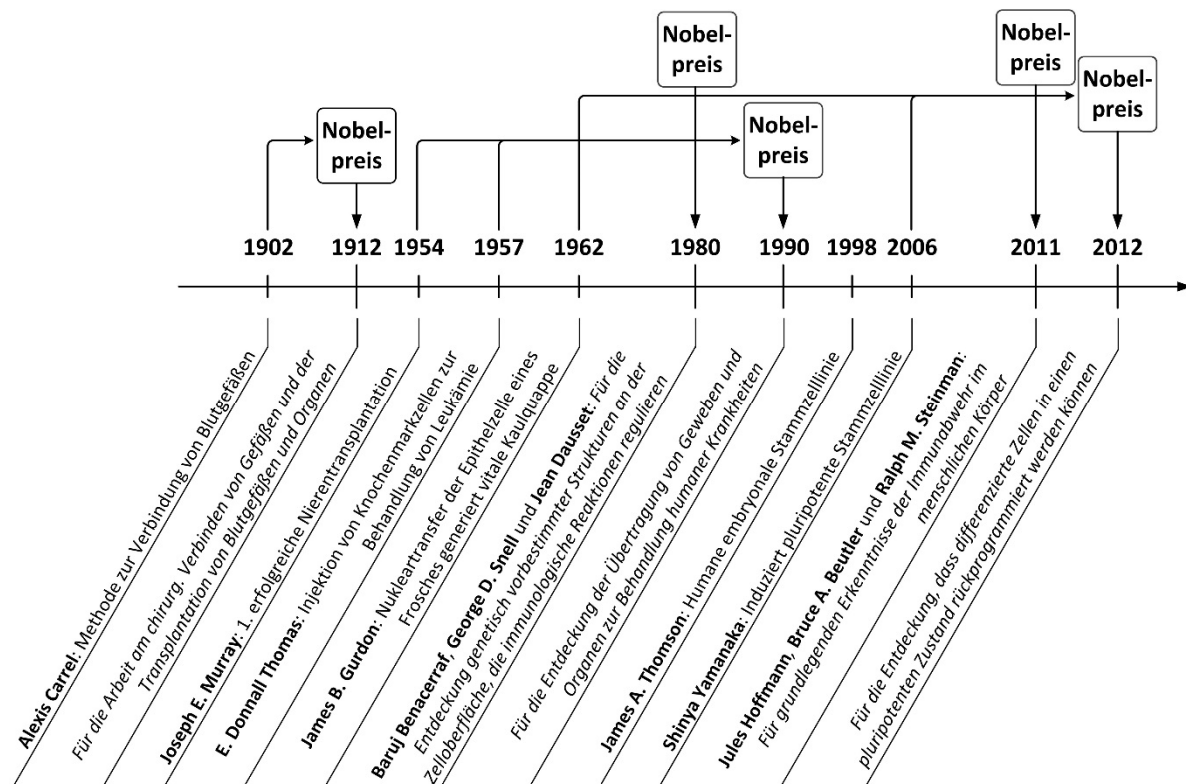


Abbildung 1: Zeitstrahl wegweisender Entdeckungen im Kontext neuer Therapien, die mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin geehrt wurden.

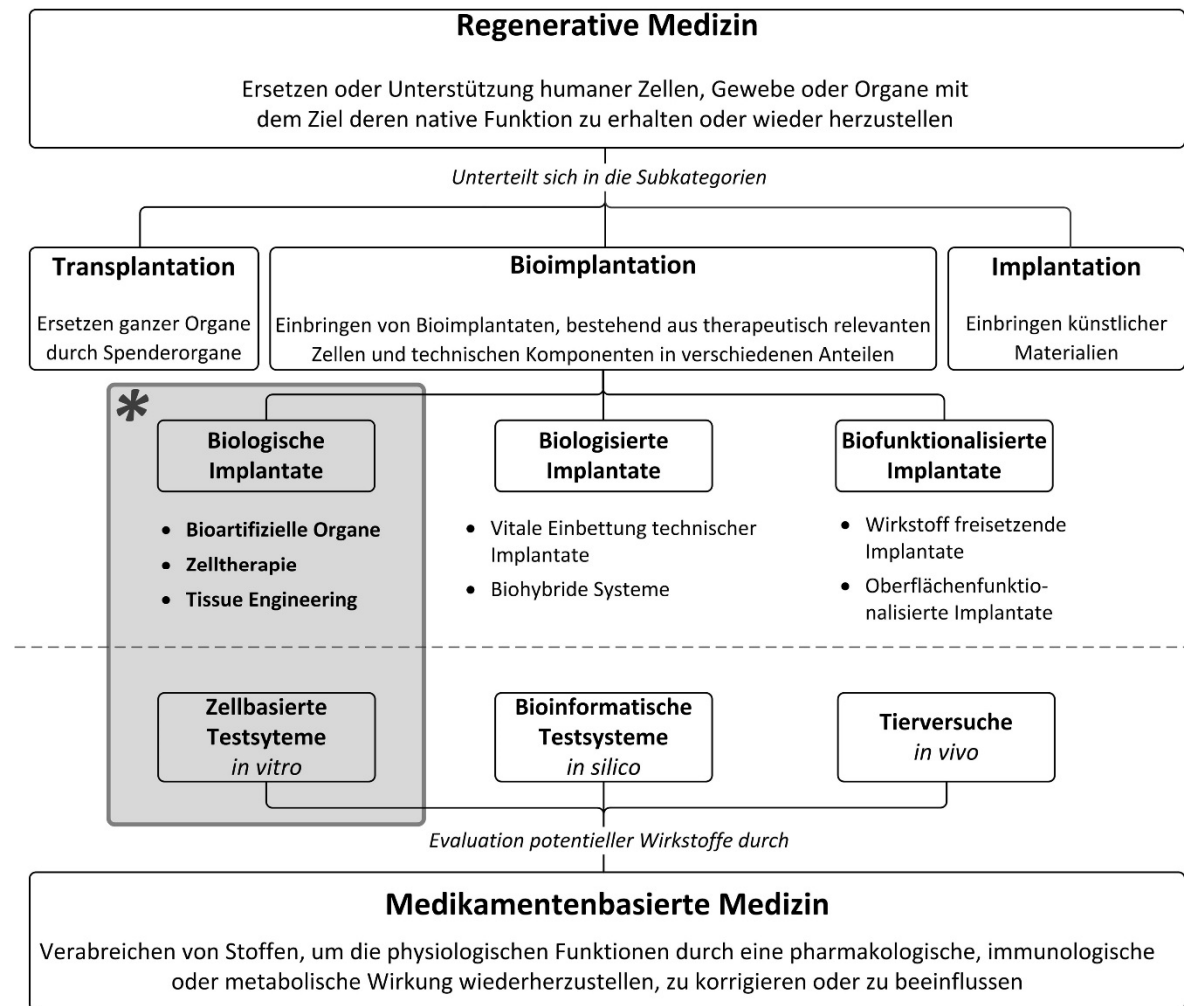
Murray Wege, wie sich diese Abstoßungsreaktionen nach einer Transplantation (Graft versus host disease, (Jacobsohn und Vogelsang 2007)) umgehen beziehungsweise minimieren lassen: 1954 transplantierte er erstmals erfolgreiche eine Niere zwischen eineiigen Zwillingen, deren HLA-Systeme identisch waren. Das Transplantat wurde also als körpereigenes Material vom Empfänger identifiziert und löste keine Immunantwort aus. Nur 3 Jahre später gelang E. Donnall Thomas ein weiterer Meilenstein in der regenerativen Medizin: Die Injektion von Knochenmarkszellen generierte neue Blutzellen im Patienten und eröffnete Wege zur Heilung von Leukämie (Thomas et al. 1957). Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass in der heutigen Zeit solch eine schnelle Vorgehensweise undenkbar wäre; Thomas führte seine Studien gleichzeitig an Hunden und Menschen durch. Präklinische und klinische Phasen zur Risikominimierung in medizinischen Therapien, die in der heutigen Zeit Voraussetzung sind, waren noch nicht eingeführt. Murray und Thomas wurden 1990 mit dem Nobelpreis für ihre Entdeckungen bezüglich Organtransplantationen und Zellbioimplantationen zur Behandlung menschlicher Krankheiten geehrt.

Um dem zuvor bereits genannten Mangel an Spenderorganen zu begegnen, müssen für zukünftige zellbasierte Therapien und zur Entwicklung neuer Medikamente Quellen erschlossen werden, die in der Lage sind den stetig steigenden Bedarf zu decken. Die Entdeckung der humanen embryonalen Stammzellen durch James A. Thomson 1998 und insbesondere die Entdeckung der induzierbaren Pluripotenz in somatische Zellen durch Shinya Yamanaka im Jahre 2006 bieten sich, 40 Jahre nach der Vorarbeit von John B. Gurdon, als Lösung des Versorgungsproblems an (siehe Abschnitt 2.1.2 Zellquellen im Kontext neuer Therapien).

Seither werden unter dem Oberbegriff der regenerativen Medizin ständig neue Verfahren, Arbeitsweisen und Therapien erforscht und entwickelt, die aus zahlreichen naturwissenschaftlichen Bereichen, wie zum Beispiel den Materialwissenschaften, inspiriert, beeinflusst oder gar erst möglich werden. Strikte Grenzen, an denen ein Arbeitsbereich aufhört und der nächste beginnt, sind in den seltensten Fällen abzustecken; die Übergänge sind fließend. Durch die Interdisziplinarität dieses Aufgabenfeldes und das wachsende öffentliche Interesse werden die eingeführten Begrifflichkeiten nicht konsistent genutzt. Oftmals überschneiden sich die Fachbegriffe thematisch oder werden sogar synonym gebraucht. Der Begriff „Tissue Engineering“ wurde zum Beispiel 1993 eingeführt (Langer und Vacanti 1993), nach und nach aber durch „Bioengineering“, „Zelltherapie“ oder „regenerative Medizin“ abgelöst (Mason et al. 2011). „Regenerative Medizin“ kristallisiert sich zunehmend als Oberbegriff für die modernsten Ansätze heraus, die darauf abzielen, defekte oder dysfunktionale Zellen, Gewebe oder Organe zu ihrer nativen Funktion zu verhelfen. In diesem Abschnitt werden nun die Begrifflichkeiten für die nachfolgende Arbeit definiert.

Mason und Dunnill haben den Mangel an klaren Definitionen erkannt und für regenerative Medizin eine kurze aber umfassende Definition entwickelt (Mason und Dunnill 2008), die im Rahmen dieser Arbeit übernommen wird (siehe Abbildung 2). Um das weite Feld weiter zu untergliedern, wird hier vorgeschlagen, die regenerative Medizin weiter in Subkategorien zu unterteilen und zwar abhängig von dem Gehalt an organischem Material, das in den Empfängerorganismus zur Wiederherstellung der nativen Funktion eingebracht wird. Während sich Implantation als das Einbringen rein künstlicher Materialien (zum Beispiel Nägel mit inerte Titanlegierung zur Behandlung von Knochenbrüchen) und die Transplantation als das Ersetzen ganzer Organe (zum Beispiel Spenderniere für Dialysepatienten) leicht abgrenzen lassen, ist für den dazwischenliegenden Bereich die Definition nicht ganz so simpel.

Dieses weite, interdisziplinäre Feld wird in dem gemeinsamen Positionspapier des VDE und der acatech (Schmitz-Rode 2011) unter dem Begriff Bioimplantation geführt. Die eingebrachten Materialien gliedern sich nach ihrem Gehalt an organischem Material in die folgenden drei Kategorien: Oberflächenfunktionalisierte Implantate (*biofunktionalisierte Implantate*), deren spezielle Beschichtungen Wachstumsfläche für körpereigene Zellen bieten, um so dysfunktionale Bereiche zu regenerieren. Sie enthalten kein, bis wenig organisches Material und werden im Bereich der Knochenregeneration verwendet. Einen höheren Anteil an organischem Material enthalten Mischprodukte von Gerüststrukturen und Zellen, die sogenannten *biologisierten Implantate*. Die dritte Kategorie wird unter dem Begriff der biologischen Implantate geführt. Diese bestehen hauptsächlich aus Einzelzellen oder Mikrogeweben, die mit oder ohne Gerüststrukturen gezüchtet worden sind. Diese *biologischen Implantate* bergen ein großes Potenzial und spielen auch für den zweiten Ansatz neuer Therapien, der medikamentenbasierten Therapie eine große Rolle. Mit Hilfe solcher zellulären Einheiten können potenzielle Wirkstoffe *in vitro* realitätsnaher getestet werden als Bioinformatik-basierte *in silico* Experimente das vermögen. Unwirksame oder gar toxische Kandidaten können so bereits vor *in vivo* Studien am Tier oder Menschen ausgeschlossen werden.



*** Applikation komplexer Zellsysteme im Kontext neuer Therapien**

Abbildung 2: Terminologien im Bereich der regenerativen Medizin nach Mason und Dunnill. Der Oberbegriff ist weiter unterteilt in die Bereiche Transplantation, Bioimplantation und Implantation, je nach Zusammensetzung und Art des Materials, das in den Empfänger eingebracht wird. Terminologie und Definitionen der Bioimplantation wurde nach dem VDE Positionspaper übernommen (Schmitz-Rode 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wird die Präparation von Einzelzellen und Mikrogewebe untersucht, die sowohl relevant im Kontext der Bioimplantation sind, als auch im Kontext der zellbasierten Hochdurchsatz-Testsysteme für die medikamentenbasierte Medizin.

2.1.2 Zellquellen im Kontext neuer Therapien

Wie auch bei den Organtransplantationen ist die Menge an benötigtem Zellmaterial der limitierende Faktor für die Entwicklung neuer Therapien (Klepetko et al. 2004), da der menschliche Organismus bis auf einige Ausnahmen (zum Beispiel Blutzellen) nur wenig Regenerationspotenzial besitzt. Bis vor wenigen Jahren unterschied man Zellen grundsätzlich in Zellen mit und ohne Differenzierungspotenzial, die jeweils eigene Vor- und Nachteile mit sich bringen (siehe Abbildung 3). Somatische Zellen ohne weiteres Differenzierungspotenzial, beispielsweise Kardiomyozyten, sind in ihrer Proliferation begrenzt und können daher im Kontext neuer Therapien lediglich eine Nebenrolle spielen. Ihre Zahl bleibt im adulten Organismus konstant, das Wachstum des Herzens wird durch kardiale Hypertrophie, also dem Volumengewinn einzelner Zellen (Sugden und Clerk 1998), gewährleistet.

Zellen mit Differenzierungspotenzial, die sogenannten humanen Stammzellen (hSCs) zeichnen sich zum einen durch ihre Möglichkeit aus, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und zum anderen auch durch die erhöhte Telomeraseaktivität für vermehrte oder gar unbegrenzte Proliferation. Beide Eigenschaften hängen vom Ursprung der Zellen ab (Pera et al. 2000; Sethe et al. 2006): Adulte Stammzellen, wie die hematopoetischen oder mesenchymalen Stammzellen zeichnen sich durch Multipotenz aus (Differenzierbarkeit in Zellen innerhalb eines Keimblattes) und können unter geringen Belastungen des Spenders aus adulten Organismen gewonnen werden (Patel et al. 2013). Sie werden bereits routinemäßig in der Medizin eingesetzt, zum Beispiel bei Knochenmarktransplantationen oder Knochenheilungsprozessen, benötigen aber vor ihrer Applikation aufwändige Untersuchungen, um die Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger zu prüfen. Ihre Telomeraseaktivität ist nur marginal erhöht (Ninagawa et al. 2011).

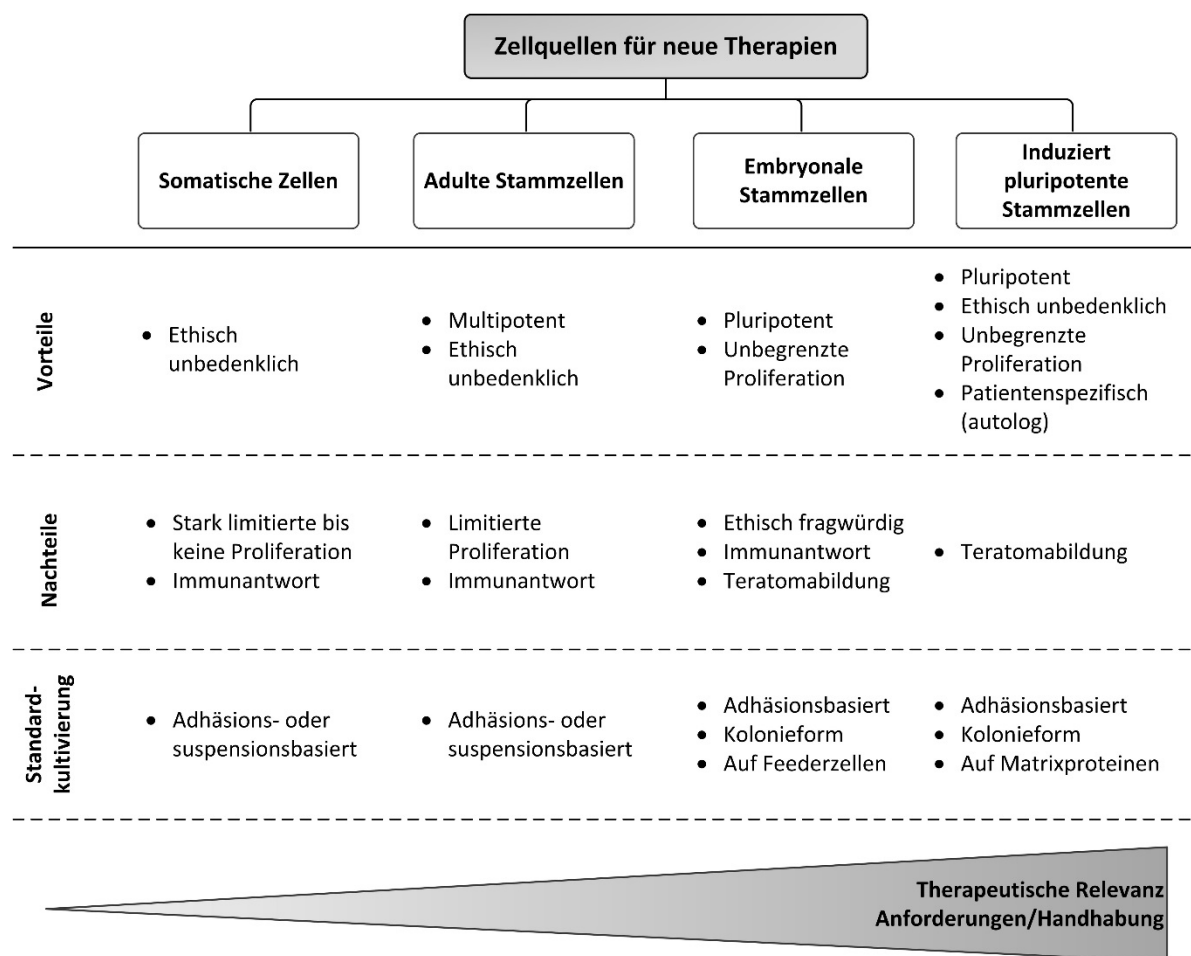


Abbildung 3: Mögliche Zellquellen zur Verwendung in neuen Therapien, untergliedert nach ihrer Herkunft. Die jeweiligen Vor- und Nachteile im Kontext neuer Therapien mit ihren Standard-Kultivierungsbedingungen werden aufgelistet.

Humane embryonale Stammzellen (hESCs) konnten 1998 von Thomson zum ersten Mal als Linie erzeugt werden (Thomson et al. 1998) und standen seither im Mittelpunkt der Forschung, da sie großes Potenzial zur Differenzierung in Zelltypen aller Keimblätter (Pluripotenz) und somit zur Regeneration dysfunktionaler Gewebe besitzen (Schöler 2003). Eine direkte Applikation von hESCs in der regenerativen Medizin kommt jedoch aus mehreren Gründen nicht in Frage: Zur Gewinnung von hESCs wird die innere Zellmasse einer Blastozyste entnommen und *in vitro* als Zellkolonien auf Feederzellen

kultiviert. Durch das Zerstören der Blastozyste wird potenzielles Leben verhindert und aufgrund dieser ethischen Brisanz unterliegen Arbeiten mit hESCs in Deutschland dem Embryonenschutzgesetz (ESchG). Nur wenigen Forschungseinrichtungen sind zielgerichtete Arbeiten überhaupt erlaubt. Alle Forschungsvorhaben mit hESCs in dieser Arbeit sind gemäß den Genehmigungen 18 und 44 (nach §6 Abs. 4 Stammzellgesetz) des Robert Koch Instituts durchgeführt worden. Durch den Kontakt mit xenogenen Feederzellen (i.d.R. murine Fibroblasten), die routinemäßig zum Erhalt der Pluripotenz von hESCs eingesetzt werden, kommt es zu chargenbedingten Abweichungen in der Qualität (Eiselleova et al. 2008; Hongisto et al. 2012) sowie zu potenziellen Verunreinigungen mit tierischem Material. *In vivo* neigen hESCs zur Bildung von Teratomakarzinomen (Fong et al. 2010) oder sie können vom Immunsystem eines Empfängers erkannt werden und Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Jedoch sind diese Zellen zweifellos sowohl in undifferenziertem, als auch differenziertem Zustand äußerst interessant als Modellsystem für die Forschung an neuen Wirkstoffen oder in der Entwicklungsbiologie (Davila et al. 2004).

Die Entwicklung von iPSCs von Yamanaka et al. vollzog einen Paradigmenwechsel in der Biologie (Takahashi und Yamanaka 2006): Es war zwar hinreichend bekannt, dass auch somatische Zellen noch immer sämtliche genetische Informationen enthielten aber diese eben nicht mehr nutzen können, um alle Funktionen in einem Organismus zu übernehmen. Mit ihrer Arbeit zeigten sie, dass neben den Methoden des nuklearen Kerntransfers und der Zellfusion, einfach durch das Einbringen einiger weniger definierter Faktoren (Oct4, Sox2, c-myc, Klf-4) Pluripotenz mit Hilfe viraler Vektoren induziert werden kann (Yamanaka und Blau 2010) und dass Zellen nach ihrer Herkunft unterteilt werden sollten.

Das Genexpressionsprogramm von hiPSCs ist ein Produkt der Regulierung durch spezifische Transkriptionsfaktoren, Chromatin-modifizierende Enzyme, regulatorische RNA-Moleküle (Suh et al. 2004) und Signaltransduktionswegen (Jaenisch und Young 2008). Essentielle Regulatoren, wie zum Beispiel Oct4 und Nanog, sind in den frühen Entwicklungsstadien der Blastozyste verantwortlich für den Erhalt der Pluripotenz (Chambers und Smith 2004), gehen aber verloren (Chambers et al. 2007; Masui et al. 2007). Die Transkriptionsfaktoren Oct4, Sox2 und Nanog binden sowohl an ihre eigenen, als auch an die Promotoren der Gene für die jeweils anderen und bilden somit eine autoregulative zirkuläre Einheit (Boyer et al. 2005), die die Stabilität der Genexpression erhöht (Alon 2007).

Zur Reprogrammierung wurden nach und nach sowohl an der Anzahl als auch an der Komposition notwendiger Faktoren gefeilt (Nakagawa et al. 2008), die Prozedur wurde an verschiedenen humanen Zellen vollzogen (Li et al. 2013; Yu et al. 2007) und ebenso die Methoden zum Einbringen der Faktoren variiert (Das und Pal 2010; Davis et al. 2011; Gonzalez et al. 2011). Die stabilste und effizienteste Methode stellt die Transduktion mit Lenti-, oder Retroviren dar (Robinton und Daley 2012), die allerdings die Gefahr birgt, Transgene zu exprimieren und somit Mutationen zu verursachen (Yu et al. 2009; Yu et al. 2007). Transgenfreie Methoden (nicht-virale Transfektionen), wie integrative oder nicht-integrative DNA-basierte Vektoren (Khan et al. 2013; Si-Tayeb et al. 2010; Tsukiyama et al. 2011) und DNA-freie Ansätze (mRNA- oder Protein-basiert) zeigen aber mit Ausnahme der mRNA-Ansätze (Warren et al. 2010) eine geringe Effizienz der Reprogrammierung (siehe Abbildung 4 A).

Die Erforschung von hiPSCs kann neue Wege der regenerativen Medizin aufweisen (Grskovic et al. 2011; Jopling et al. 2011), es muss jedoch genauestens auf die Randbedingungen geachtet werden. Neben den großen Hoffnungen, den die neuen zellbasierten Technologien mit sich bringen, gilt es auch die Nebeneffekte und noch zu beseitigende Probleme zu betrachten: iPSC-Zellen ändern zum Beispiel je nach Art ihrer Generierung ihre Eigenschaften. Die mit Transkriptionsfaktoren reprogrammierten

Zellen zeigen noch immer die epigenetischen Eigenschaften der Ursprungszellen (epigenetisches Gedächtnis), im Gegensatz zu hiPSCs generiert mittels somatischem Kerntransfer. Ebenso hängt die Reprogrammierungseffizienz auch vom Ursprung der Ausgangszellen ab (Kim et al. 2010) und noch kann nicht beantwortet werden, aus welchen Zellen am besten iPSCs generiert werden oder welche Mechanismen für die geringe Effizienz verantwortlich sind (Hussein et al. 2011). Wenn auch manche hiPSCs in der Expression mancher Marker für Pluripotenz nicht von hESCs zu unterscheiden sind (Jaenisch und Young 2008; Maherali et al. 2007), zeigten einige andere Linien gewisse Abweichungen (epigenetische Veränderungen, verschiedene DNA-Methylierungen) zu hESCs. Aus diesem Grund ist die Forschung von hESCs nach wie vor wichtig (Eisenstein 2010; Gore et al. 2011; Huang 2010; Laurent et al. 2011; Lister et al. 2011; Mayshar et al. 2010).

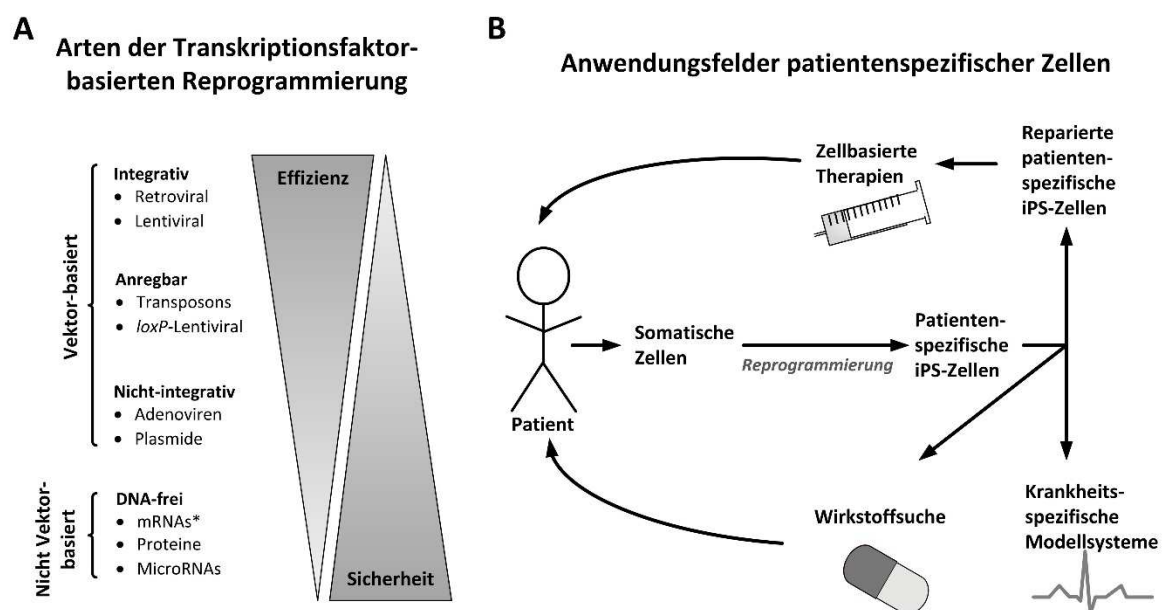


Abbildung 4: A Arten der Reprogrammierung somatischer Zellen in hiPSCs basierend auf Transkriptionsfaktoren. *mRNA-basierte Reprogrammierung weist im Vergleich zu den anderen nicht Vektor-basierten Methoden hohe Reprogrammierungseffizienz auf. B Anwendungsfelder patientenspezifischer Zellen im medizinischen Bereich.

Diese Ähnlichkeit zu den Ursprungszellen lässt sich aber für die Herstellung autologer, also patienten- und somit krankheitsspezifischer Gewebe, nutzen (siehe Abbildung 4 B). iPSCs können in symptomrelevante Zelltypen zur verbesserten Wirkstofffindung umgewandelt werden oder als krankheitsspezifische Modellsysteme zur Grundlagenforschung verwendet werden (Dimos et al. 2011). Itzhaki et al. modellierten 2011 mit hiPSCs, generiert aus Zellen eines Patienten mit Long-QT-Syndrom, kardiale Zellen mit der krankheitsspezifischen, verzögerten Repolarisation und damit verlängertem Aktionspotenzial (Itzhaki et al. 2011). Nicht zuletzt schüren auch Studien im Tiermodell die Hoffnung, dass mit Hilfe der iPSC-Technologie autologe Bioimplantate hergestellt werden können und somit personalisierte Therapien tatsächlich in greifbare Nähe rücken: Neuronale Zellen, gewonnen aus iPSC-Zellen und transplantiert in Ratten und Mäusen, konnten deren Parkinson-Symptome verbessern (Tabar et al. 2008; Wernig et al. 2008). Ebenso stellten sich Verbesserungen bei an Leukämie-erkrankten Mäusen ein, nachdem hematopoetische Progenitorzellen transplantiert wurden, die aus iPSC-Zellen generiert wurden (Hanna et al. 2007).

Probleme dieser Technologien sind, dass selbst bei einer kleinen Anzahl an un- oder fehl-differenzierten Zellen für die Anwendung die Teratomabildung nicht ausgeschlossen werden kann

(Baker et al. 2007). Diese wird zum Beispiel durch Transgene ausgelöst, die genetisch nicht ruhig gestellt (gesilenced) werden konnten (Pera 2011). Um die Möglichkeit der Tumorbildung zu verringern, wie es bereits bei Mäusen festgestellt wurde (Sumi et al. 2007), versuchte man bereits onkogene Faktoren wie zum Beispiel c-myc in der Reprogrammierung wegzulassen (Nakagawa et al. 2008; Yu et al. 2007). Ebenfalls noch unklar ist, ob andere onkogene Faktoren (Klf-4, Lin28) eventuell zu einem späteren Zeitpunkt Tumore hervorrufen. Der Nachweis einer abgeschlossenen Reprogrammierung oder Differenzierung ist nur durch massive, häufig terminale Behandlungen der Proben zu bestimmen, wie zum Beispiel durch Fixierung mit anschließender immunzytochemischer Färbung oder ins Genom integrierte Markergene. Und bereits die abnormale Expression eines einzelnen Gens kann die Zelle für Differenzierungen unempfindlich machen.

Die Kultivierung der Stammzellen wird mit zunehmender therapeutischer Relevanz schwieriger (siehe Abbildung 3). Während adulte Stammzellen ähnlich den meisten somatischen Zelltypen in relativ einfachen Nährmedien auf einer einfachen Oberfläche wachsen, bilden hESCs Kolonien und werden zum Erhalt der Pluripotenz auf mitotisch inaktivierten, xenogenen Fibroblasten kultiviert (Ulloa-Montoya et al. 2005). Xenofreie Ansätze wurden bereits entwickelt, zum Beispiel auf einer definierten Proteinschicht (Xu et al. 2001) oder auf Fibroblasten-artigen Zellen, die aus hESCs gewonnen wurden (Xu et al. 2004). Für hESCs konnten sich diese aber in der Standardkultivierung nicht durchsetzen, wohingegen hiPSCs routinemäßig auf Matrigel-beschichteten Oberflächen kultiviert werden (Bhatia et al. 2012).

2.2 Biophysikalische Prozesse biologischer Proben in Biobanken

Um eine ständige Verfügbarkeit biologischer Proben im ausreichenden Maße für neue Therapien zu gewährleisten und sie über lange Zeiträume lagern zu können, ist die Konservierung bei Temperaturen unter dem physiologischen Bereich (sog. kryogene Temperaturen) bislang die einzige Möglichkeit (Li und Ma 2012; Meryman 2007). Durch das kontrollierte Abkühlen der wässrigen Proben unter deren Gefrierpunkt werden sämtliche biochemischen Prozesse eingestellt und somit Alterungsprozesse ausgesetzt. Das entscheidende Molekül dieses Prozesses ist Wasser, das wichtige Aufgaben in sämtlichen Bereichen des Lebens übernimmt: Durch Wasserstoffbrückenbindungen werden Proteine in ihrer funktionalen dreidimensionalen Struktur gehalten, Wasser dient als Lösungsmittel und die meisten biochemischen Reaktionen laufen im wässrigen Milieu ab. Werden die Proben nach dem Einfrieren bei Temperaturen unter der Glasübergangstemperatur T_G von Wasser gelagert (etwa -143°C bei 1bar), werden sämtliche Molekülbewegungen eingestellt und die Proben können theoretisch unbegrenzt lange gelagert werden (Chen et al. 2002). Allerdings sind, mit einigen wenigen Ausnahmen, biologische Proben nicht in der Lage, kryogene Temperaturen zu überleben, was Luyet in seinem umfassenden Werk bereits 1940 verdeutlichte (Luyet und Gehenio 1940). In Einfrier- und Auftauprozessen, bei denen einem System durch die Kristallisation und Rekristallisation Wasser entzogen wird, ist Osmose, also das Bestreben nach einem Gleichgewicht der chemischen Potentiale μ , der entscheidende Prozess. Der Wasserhaushalt und somit das Volumen einer Zelle wird über ihre Membran und deren hydraulische Leitfähigkeit geregelt, die im Rahmen des osmotischen Druckgradienten, der an ihr anliegt, reagiert (Muldrew et al. 2004):

$$\frac{dv_w}{dt} = L_p A R T (\pi_i - \pi_e) \quad \text{Formel (1)}$$

wobei L_p die hydraulische Leitfähigkeit, A die Oberfläche der Zelle, R die Gaskonstante, T die absolute Temperatur und π die interne (i) beziehungsweise externe (e) Osmolarität ist.

Um therapeutisch relevante Zellen unter Erhalt der Funktionalität kryokonservieren zu können, müssen die osmotischen Prozesse, im Hinblick auf die Eisbildung, durch Anpassung der Kühlrate und der Zugabe gewisser Stoffe, zugesetzt werden. Grundlegend unterscheidet man die beiden Kryokonservierungsregime mit einsetzender Kristallisation bei definierten Kühlraten und die Vitrifikation sowie zwei Arten von kryoprotektiven Stoffen, die in den nachfolgenden Abschnitten genauer erläutert werden.

2.2.1 Langsame Kryokonservierung mit Kristallisation

In dem Einfrierregime mit einsetzender Kristallisation (nachfolgend abgekürzt mit SR für Englisch: slow rate) entsteht bei moderaten Kühlraten von etwa $1^\circ\text{C}/\text{min}$ eine Equilibrierungsphase: Zellen erhalten so die Möglichkeit das osmotische Ungleichgewicht, das durch die Eiskristallbildung entsteht, aus-, beziehungsweise anzugleichen.

Wässrige Lösungen wie zum Beispiel Zellsuspensionen, deren Temperatur bereits den Schmelzpunkt T_s unterschritten hat, werden als unterkühlt bezeichnet. Sie befinden sich in einem metastabilen Zustand, der durch die Nukleation beendet wird. Durch das Einfrieren gehen die Wassermoleküle in einen thermodynamisch günstigeren, kristallinen Zustand über, wodurch die Enthalpie in dem System herabgesetzt wird. Unterschieden wird hierbei zwischen der heterogenen und homogenen Nukleation:

In den wässrigen biologischen Proben kommt es auf Grund der hohen Anzahl an gelösten Stoffen vorwiegend zur heterogenen Nukleation, dabei ist der Startpunkt der Kristallisation ein Partikel oder eine Oberfläche eines Gefäßes. Die Ursache der heterogenen Nukleation kann bis heute noch nicht endgültig geklärt werden, jedoch legen Untersuchungen im materialwissenschaftlichen Bereich nahe, dass der heterogene Nukleationskeim der geordneten Kristallstruktur von Wasser ähnelt, an die sich Wassermoleküle anlagern und zu einem Kristall wachsen (Meryman 2007). Im Fall der homogenen Nukleation entsteht ein Eiskeim aus reinem Wasser einer kritischen Größe, der thermodynamisch in der Lage ist, einen Kristall auszubilden. Im Falle reinen Wassers liegt diese Temperatur bei etwa -40°C . Die kritische Größe, also die Anzahl an Wassermolekülen, die sich spontan geordnet zusammenlagern und dann in der Lage sind einen Kristall auszubilden, beträgt 70 Moleküle. Die spontane Zusammenlagerung dieser Anzahl an Wassermolekülen ist relativ häufig, jedoch ist die Enthalpie in wärmeren Systemen zu groß, um einen Kristall dieser Größe zu stabilisieren. Da sich innerhalb der Zellen kaum mögliche Nukleationskeime befinden (Franks et al. 1983; Rasmussen et al. 1975), bilden sich Eiskristalle in der Regel in der extrazellulären Lösung. Konsequenz daraus ist die Konzentrationserhöhung gelöster Stoffe und somit ein Ungleichgewicht des chemischen Potentials im intra- und extrazellulären Raum, das Zellen bestrebt sind durch Wasserefflux auszugleichen.

Dieser Wasserverlust einer Zelle nach einsetzender Kristallisation und die daraus resultierenden Schädigungsmechanismen für Zellen ist abhängig von der angelegten Kühlrate und wurde von Mazur et al. zur Zwei-Faktor-Hypothese zusammengefasst (Mazur et al. 1972). Bei einer zu langsamen Kühlrate (siehe Abbildung 5, oben) tritt nach der extrazellulären und in diesem Fall langsamen Eisbildung mehr Wasser aus den Zellen aus. Experimentell konnte das schon für verschiedene Zelltypen belegt werden zum Beispiel für Samen der Roteiche bei Kühlraten von weniger als 10°C pro Minute (Sun 1999; Wood und Rosenberg 1957). Bei einem zu starken Wasserausstrom wird die Zelle durch den hydrostatischen Druck belastet und es bilden sich osmotisch bedingte Risse in den Zellmembranen (Meryman 1974). Beispielsweise zeigten Zellen der Nitella-Algen hydrostatisch bedingte Membranschäden in hypertonsicher Lösung, die der 2,5-fachen isotonsichen Konzentration entsprach (Baker 1972).

In der Rehydratisierungsphase beim Auftauprozess können Zellen aus zwei Gründen an ihre elastische Grenze kommen und lysieren: Steponkus postulierte, dass die Plasmamembran während des Wassereffluxes in sich zusammenfällt, Einschlüsse bildet und so von ihrer Oberfläche einbüßt (Steponkus 1984). Eine aktuellere Hypothese von Muldrew besagt, dass Zytoplasmaproteine mit Salzbrücken während der hypertonsichen Phase in Lösung übergehen, um mit der NaCl-Aufnahme den Ionenverlust auszugleichen (Muldrew 2008). Beim Auftauen gelangen die Ionen zurück in Lösung. In beiden Fällen platzen die Zellen durch Wasserinflux und lysieren post-hypertonisch.

Die zweite Möglichkeit Zellen bei der Kryokonservierung zu schädigen, ist eine zu hohe Kühlrate (siehe Abbildung 5, unten). In diesem Fall ist die Equilibrierungsphase zu kurz, die Zellen sind nicht mehr in der Lage ausreichend Wasser auszuschleusen und es bildet sich intrazelluläres Eis (nachfolgend IIF genannt für Englisch: intracellular ice formation, (Acker und Croteau 2004)). Auch hier kann bislang nicht eindeutig geklärt werden, welche Mechanismen für IIF verantwortlich sind. Momentan vermutet man ein Zusammenspiel folgender drei Theorien: (1) Auf Grund des sich schnell ausbildenden hohen Konzentrationsgradienten und des dementsprechend hohen osmotischen Drucks entlang der Plasmamembran reißt diese. Durch die auftretenden Risse können sich Eiskristalle ins Zellinnere fortpflanzen und IIF entsteht (Muldrew und McGann 1990). Intakte Membranen bilden dagegen eine stabile Barriere (Acker et al. 2001; Mazur 1965). (2) Sind die Spitzen des extrazellulären Eiskristalls klein

genug, ist ein Fortschreiten der Kristallisation ins Zellinnere durch Poren in der intakten Plasmamembran (Transmembranproteine wie zum Beispiel Aquaporine) möglich (Muldrew und McGann 1990). (3) Die Plasmamembran selbst agiert als Eiskeim und initiiert die intrazelluläre Kristallisation (Toner et al. 1990).

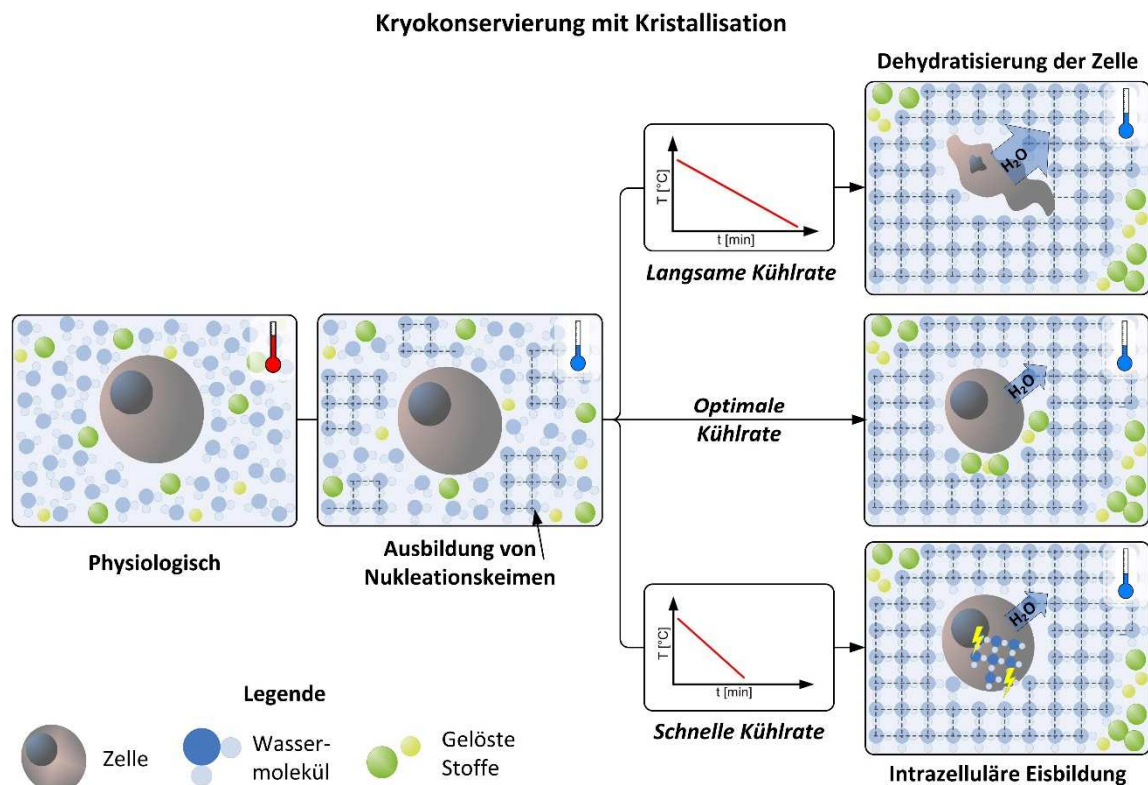


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kryokonservierung mit Kristallisation. Die zwei-Faktor-Hypothese von Mazur besagt, dass es eine optimale Abkühlrate für jeden Zelltyp gibt, die intrazelluläres Eis sowie Wasserverlust der Zellen soweit eindämmt, dass vitale Zellen nach dem Auftauen in großer Zahl vorhanden sind.

Um Zellen trotz einsetzender Kristallisation erfolgreich kryokonservieren zu können, muss eine Kühlrate angelegt werden, die sowohl die Schäden durch Dehydratation, als auch durch IIF verhindert (siehe Abbildung 5, mittig). Diese Kühlrate variiert je nach der physikalischen und chemischen Beschaffenheit der zu konservierenden Zelle (siehe Formel 1): Zellfläche A , Wassergehalt, Anzahl an Transmembranproteinen und damit hydraulische Leitfähigkeit L_p , Ionenkonzentration und damit Osmolarität π etc. Um therapeutisch relevante Zellen tolerabler gegen die potenziellen Schäden bei der Kryokonservierung zu machen, werden Gefrierschutzmittel zugesetzt, die in Abschnitt 2.2.3 genauer behandelt werden.

2.2.2 Sehr schnelle Kryokonservierung ohne Kristallisation (Vitrifikation)

Da die Schädigungsmechanismen bei dem Equilibrierungsregime in beiden Fällen von entstehenden Eiskristallen herrühren (Dehydratation und mechanische Schäden), wurde in den frühen achtziger Jahren versucht eine Kryokonservierung ohne Phasenseparation umzusetzen (Fahy et al. 1984).

Das Erstarren einer Lösung zu einem amorphen Material durch Abkühlen ohne Kristallisation wird Vitrifikation (Verglasung) genannt und kann theoretisch durch sehr hohe Kühlraten, über 10^7 °C/s für reines Wasser (Wolfe und Bryant 2001), erreicht werden (siehe Abbildung 6). In biologischen Proben wurde allerdings bereits nachgewiesen, dass sehr wohl Kristalle vorhanden sind, allerdings sehr viel kleinere als die, die während der Abkühlung bei der langsamen Kryokonservierung mit Equilibrierung entstehen würden (Fahy et al. 1990), so dass man in der Kryobiologie exakter von partieller Vitrifikation sprechen würde. Nachfolgend wird aus praktischen Gründen auf den Zusatz „partiell“ verzichtet. In der Praxis kann auch keine Kühlrate gewährleistet werden, die ausreichend groß ist, um eine wässrige Lösung oder gar reines Wasser zu vitrifizieren. Deshalb wird zusätzlich zur hohen Kühlrate die Konzentration an gelösten Stoffen erhöht, um die Viskosität bereits künstlich zu erhöhen. Auf diese gelösten Stoffe, die auch für die Kryokonservierung mit Kristallisation eingesetzt werden, wird im nächsten Abschnitt genauer eingegangen.

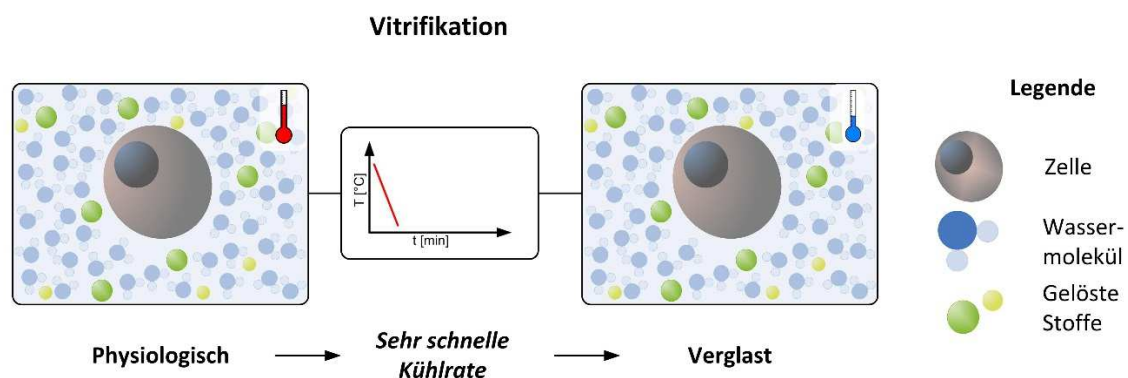


Abbildung 6: Schematische Darstellung des sehr schnellen Einfrierregimes ohne Kristallisation (Vitrifikation). Ist die Abkühlrate sowie die Konzentration an gelösten Stoffen ausreichend hoch, können Zellen ohne Phasenseparation kryokonserviert werden.

2.2.3 Rolle der kryoprotektiven Stoffe und Rekristallisation

Wie bereits erwähnt, ist es nicht möglich therapeutisch relevante Zellen ohne Weiteres tiefkalten Temperaturen auszusetzen, die eine theoretisch unbegrenzt lange Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur T_g von Wasser ermöglichen. Einige Tiere, wie zum Beispiel der Waldfrosch, sind in der Lage, Temperaturen unter dem Gefrierpunkt zu überleben, indem sie sogenannte Antifreeze-Proteine ausschütten, um ihren Gefrierpunkt herabzusetzen oder Nukleationskeime im extrazellulären Raum setzen, um nach osmotisch induzierter Dehydratisierung ein Gefrieren in der Zelle zu vermeiden (Storey und Storey 1984).

Man unterscheidet die Gefrierschutzmittel (nachfolgend CPA für Englisch: cryoprotective agents) grundsätzlich in die beiden Klassen der permeablen und impermeablen CPAs, je nachdem ob sie in der Lage sind Zellmembranen zu passieren (Fuller 2004). Noch sind Art und Weise ihres Nutzens nicht komplett geklärt (Mullen und Critser 2007). Permeable CPAs sind niedermolekulare Stoffe mit unspezifischen kolligativen Eigenschaften, die einen Teil der gelösten Stoffe in Lösung aufnehmen und die somit in geringerem Maße in der wässrigen Lösung beim Einfrieren aufkonzentriert und osmotisch aktiv werden. Der Anteil an Eiskristallen in einer Probe wird reduziert und Zellschädigungen durch osmotische Effekte (zu starke Volumenregulation und Dehydratisierung) werden unterbunden.

Permeable CPAs ersetzen also Wassermoleküle und stabilisieren Zellbestandteile in ihrer nativen, dreidimensionalen Struktur. Beispiele für diese Art der CPAs sind Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylenglykol (EG) oder Glycerin (Fuller und Paynter 2004). Impermeable CPAs sind hochmolekulare Stoffe, wie zum Beispiel Hydroxyethylenstärke, Sucrose, Polyvinylalkohole oder Trehalose, die Zellmembranen nicht passieren können. Ihre Schutzfunktion erklärt man zum einen durch die Stabilisierung der Zellmembran (Water-Replacement-Theorie (Clegg et al. 1982)) und zum anderen durch die Dehydratisierung von Zellen auf Grund der erhöhten extrazellulären Osmolarität, wodurch In- und Efflux von Wasser kontrolliert werden kann (Friedler et al. 1988). Für beide Arten an CPAs gilt, dass sie Wassermoleküle in ihrer Anordnung stören und so die Ausbreitung beziehungsweise Entstehung großer Eiskristalle verhindern (Korber et al. 1982).

Um eine Vitrifikation zu erreichen, setzt man CPAs in Konzentrationen von bis zu 2mol/l ein, die viskositäts erhöhend wirken und somit die Temperatur der heterogenen Nukleation T_h herabsetzen (siehe Abbildung 7, (Fahy et al. 1984; Kuleshova et al. 1999)). So reichen auch Kühlraten von 20000°C/min, um eine Vitrifikation zu erreichen (Kuleshova und Lopata 2002). Zudem bewirken CPAs eine Erhöhung der Glasübergangstemperatur T_g unterhalb der keine Molekülbewegungen mehr stattfinden und somit keine Kristallisationsgefahr mehr besteht.

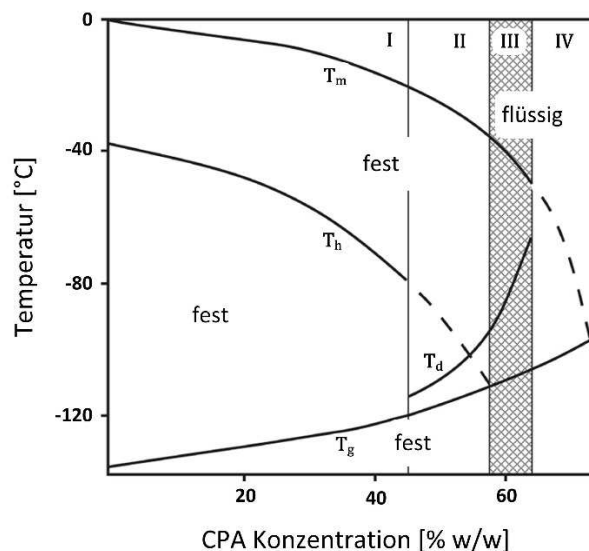


Abbildung 7: Phasendiagramm einer hypothetischen wässrigen Lösung, die Möglichkeit eine Vitrifikation zu erreichen hängt maßgeblich von der Konzentration an CPA ab, verändert nach Fahy et al. 1984. Die Abbildung wurde verändert nach Mullen und Critser 2007. Dargestellt ist der Einfluss der CPA-Konzentration auf das Zusammenspiel der homogenen Nukleationstemperatur (gleichbedeutend mit der Schmelztemperatur) T_m , der heterogenen Nukleationstemperatur T_h , der Devitrifikationstemperatur T_d und der Glasübergangstemperatur T_g .

Durch die Zugabe an CPAs in ausreichender Konzentration kann eine Vitrifikation biologischer Proben erreicht werden. Im Bereich I der Abbildung 7, mit CPA-Konzentrationen <45% ist eine Vitrifikation nicht möglich, da sich die Nukleationstemperatur T_h stets oberhalb der Glasübergangstemperatur T_g befindet. Problematisch wird es bei der Vitrifikation, wie auch bei der Kryokonservierung mit Kristallisation, wieder beim Auftauen der Probe. Erreicht die Temperatur in den Bereichen II und III die Devitrifikationstemperatur T_d , kommt es zur Rekristallisation beziehungsweise überhaupt zur Kristallisation der Probe mit sämtlichen schädlichen Effekten, die zuvor diskutiert wurden. Je größer die Kristalle in der Probe, desto schlechter wird die Überlebensrate der Zellen sein. Da die Größe der

Eiskristalle proportional zu der angelegten Kühl- beziehungsweise Wärmerate ist, gilt ein möglichst schnelles Auftauen ($>400^{\circ}\text{C}$) der Probe als günstig (Mazur 2004).

2.2.4 Kryokonservierung von Mikrogeweben

In den Abschnitten 2.2.1 und 2.2.2 wurde bereits deutlich, dass es schon für Einzelzellen je nach ihrer physikalischen und chemischen Beschaffenheit (Größe, hydraulische Leitfähigkeit, Wassergehalt etc.) unterschiedliche Kühloptima gibt (Taylor et al. 2004a). Wenn nun für Gewebe oder gar ganze Organe noch Zellverbände und Adhäsionskontakte zu nativen oder artifiziellen Wachstumsoberflächen hinzukommen, potenziert sich die Problematik der Kryokonservierung (Brockbank et al. 2000).

Bereits in einem sphärischen Zellverband (Sphäroide) aus nur einem Zelltyp steigt das IIF-Vorkommen im Vergleich zu den gleichen Zellen in Einzelzellsuspension (siehe Abbildung 8). Grund hierfür sind interzelluläre Verbindungen (gap junctions) und Transmembranporen, die eine Fortpflanzung der Eiskristalle von Zelle zu Zelle zulassen (Acker et al. 2001). Die Wahrscheinlichkeit von IIF in adhärenen Einzelzellen steigt ebenfalls im Vergleich zu den Suspensionszellen, da vermutlich die Adhäsionskontakte ebenfalls die geordnete Wasserstruktur weitergeben und so Eiswachstum übermitteln (Acker et al. 1999).

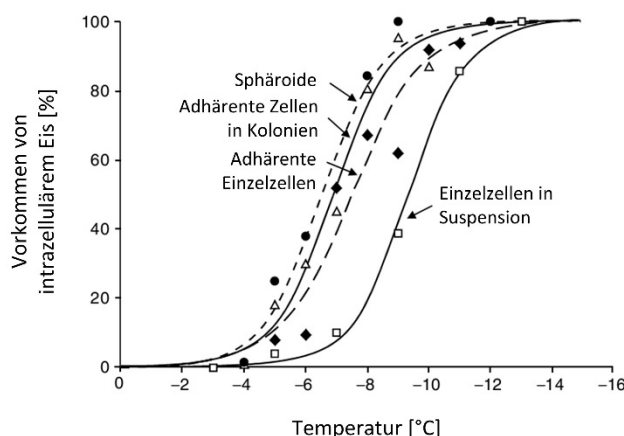


Abbildung 8: Einfluss von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten bei der Kryokonservierung (Acker et al. 1999). Abbildung verändert nach Muldrew et al. 2004.

Zellverbände wie Mikrogewebe oder gar ganze Organe sind in ihrer Beschaffenheit sehr heterogen. Verschiedene Zelltypen werden über Zell-Zell- und auch Zell-Matrix-Verbindungen in ihrer Form gehalten. Matrizen zwischen den einzelnen Zellen werden als extrazelluläre Matrix (nachfolgend ECM für Englisch: extracellular matrix) bezeichnet und bestehen hauptsächlich aus Kollagenfasern und Glykosaminoglykanen, die neben weiteren Aufgaben, wie zum Beispiel das Speichern von Zytokinen, den Wasserhaushalt in Geweben regulieren. Hat sich während der Kryokonservierung ein Eiskeim in einem Gewebe gebildet, "fließt" Wasser aus den umliegenden Bereichen zu dem Eiskeim hin und lässt ihn weiter wachsen (siehe Abbildung 9). In der Folge wird das Gewebe durch die mechanische und osmotische Belastung zerstört. Für die Kryokonservierung gilt es deshalb eine Kristallisation so weit wie möglich zu verhindern, um IIF zu vermeiden und die Inkubationszeiten in hypertonischen Lösungen

zu verringern (Taylor et al. 2004a). Auf Grund der sehr hohen Wärmekapazität von Proben mit großem Volumen oder ganzen Organen ist eine erfolgreiche Konservierung nicht möglich, da man weder eine ausreichend hohe Kühlrate, noch eine gleichmäßige Diffusion der CPAs gewährleisten kann (Fahy et al. 1990). Für Zellverbände und Mikrogewebe dagegen kann sehr wohl eine Vitrifikation erreicht werden, die sich positiv auf die Überlebensraten auswirkt. Sogar Zellen und Zellverbände bei denen die Strukturhaltung für die Funktion entscheidend ist, zeigen deutlich bessere Überlebensraten nach Vitrifikation: Bereits 1983 zeigten Taylor und Pegg, dass die Kryokonservierung von glatten Muskelzellen aus Meerschweinchen ohne Phasenseparation (Vitrifikation) von 21% auf 78% verbessert werden konnte (Taylor und Pegg 1983). Song et al zeigten 2001, dass Karotisarterien von Kaninchen eisfrei mit Überlebensraten von über 80% kryokonserviert werden konnten (Taylor et al. 2004a).

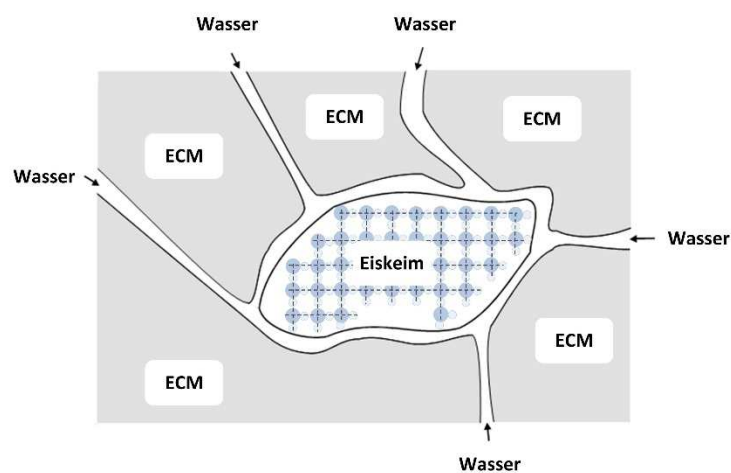


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Schäden durch interzelluläres Eis in Gewebe. Verändert nach Muldrew et al. 2004.

2.3 Anforderungen an die Zellen

Sowohl für die Generierung passender Zellen und Mikrogewebe für neue Therapien, als auch für ihre Konservierung und Applikation, müssen Zellen gewisse Voraussetzungen erfüllen, die über sämtliche Arbeitsschritte hinweg erhalten werden. Zunächst muss die Homöostase gewährleistet sein: Zellen müssen in ihrem physiologischen Zustand die Möglichkeit zur Aufrechterhaltung ihres Metabolismus haben. Das heißt, sie müssen ausreichend mit Nährstoffen versorgt sein, der Austausch von Wasser und Gasen muss gewährleistet sein und therapeutische Faktoren oder Zytokine für Signaltransduktionswege müssen sekretiert beziehungsweise aufgenommen werden können. Die Ultrastruktur von Zellen in Mikrogeweben wird unterteilt in das Zytoskelett, die Fokaladhäsionen (Zell-Matrix-Kontakte) und die interzellulären Verbindungen über gap junctions (Liu und McGrath 2005a). Insbesondere der Zellmembran mit ihren Transmembranproteinen für den Stoffaustausch, ihren Ankerpunkten für das Zytoskelett, die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten kommen wichtige Aufgaben innerhalb der gesamten Ultrastruktur zu, weshalb der Erhalt ihrer Integrität von entscheidender Bedeutung ist. Das Zytoskelett gibt Zellen ihre Gestalt und die Grundlage für ihre Bewegungen. Es besteht aus Aktinfilamenten (auch Mikrofilamente genannt), die zusammen mit Mikrotubuli und Intermediär-Filamenten ein Netzwerk bilden. Die Aktinfilamente (F-Aktin) sind zweisträngige Polymere, die helixförmig aus dem Aktinmonomer (globuläres Aktin, G-Aktin) polymerisiert werden (Pollard und Cooper 1986). Zusammen mit Myosinfilamenten, die Bewegungen an der Zelloberfläche realisieren, entsteht ein hochdynamisches Netzwerk, das die Polarität der Zellmembran aufrechterhält, dessen Mechanismen aber noch nicht komplett geklärt sind (Li und Gundersen 2008; Risler 2011).

Interzelluläre Kontakte werden durch Cadherine realisiert. Diese Kalzium-abhängigen Transmembran-Glykoproteine bilden intrazellulär Komplexe mit Cateninen, die an Aktinfilamente gebunden sind (Bergin et al. 2000). Fokaladhäsionen auf nativen oder artifiziellen Oberflächen werden hauptsächlich über die scherstresssensitiven Integrine vermittelt (Li et al. 2005). Das sind ebenfalls Transmembranproteine, die eine spezielle Form der Apoptose, die Anoikis, auslösen können, wenn sie durch chemische oder mechanische Reize gestört werden. Der Begriff Anoikis (aus dem Griechischen für den Zustand der Heimatlosigkeit) wurde 1994 von Frisch und Francis geprägt (Frisch und Francis 1994). Durch das Zerstören der Verankerungen zur ECM in Epithelzellen konnte Apoptose induziert werden (Frisch und Screaton 2001). Je nach Zelltyp ist es unterschiedlich, welche Integrine binden müssen, um Anoikis zu vermeiden (Grossmann 2002; Minambres et al. 2006). Die exakte Initiierung der Caspase-Kaskade nach Verlust Integrin-basierter Zelladhäsion ist jedoch noch nicht geklärt (Papaliagkas et al. 2007). Gesichert sind nur die morphologischen Zelländerungen, wie Kontraktion, Chromosomenkontraktion, Bläschenbildung an der Membran (Zellblebbing) und die Veränderungen am Aktin-Myosin-Netzwerk im Zellinneren (Torgerson und McNiven 1998).

Eine besondere Rolle spielt die Anoikis bei embryonalen und induziert pluripotenten Stammzellen: Vereinzelt man diese, um Mikrogewebe mit definierter Zellzahl zu erhalten, induzieren Rho GTPasen den programmierten Zelltod (BurrIDGE und Wennerberg 2004). Die Rho GTPasen sind ebenfalls verantwortlich für Zytoskelett, Zellpolarität, Endozytose, Zellproliferation und Differenzierung. Watanabe et al. ermöglichten durch die Anwendung des Rho-assoziierten Kinase-Inhibitors (ROCK) erstmals eine Dissoziation vitaler hESCs (Watanabe et al. 2007). ROCK ist ein Enzym, das direkt auf die Regulation der Aktin-Depolymerisation sowie die Kontraktilität von Zellen wirkt.

Wie bereits erwähnt, spielt die Volumenregulation, die über schnelle Polymerisations- und Depolymerisationsprozesse von Aktinfilamenten realisiert wird, in der Kryokonservierung eine entscheidende Rolle. Schäden an Zellen nach dem Auftauen sind häufig auf den Verlust der Membranfluidität und Integrität zurückzuführen, was oxidativen Stress zur Folge hat, der zur Lipidperoxidation führt (Grossmann 2002; Liu und McGrath 2005b).

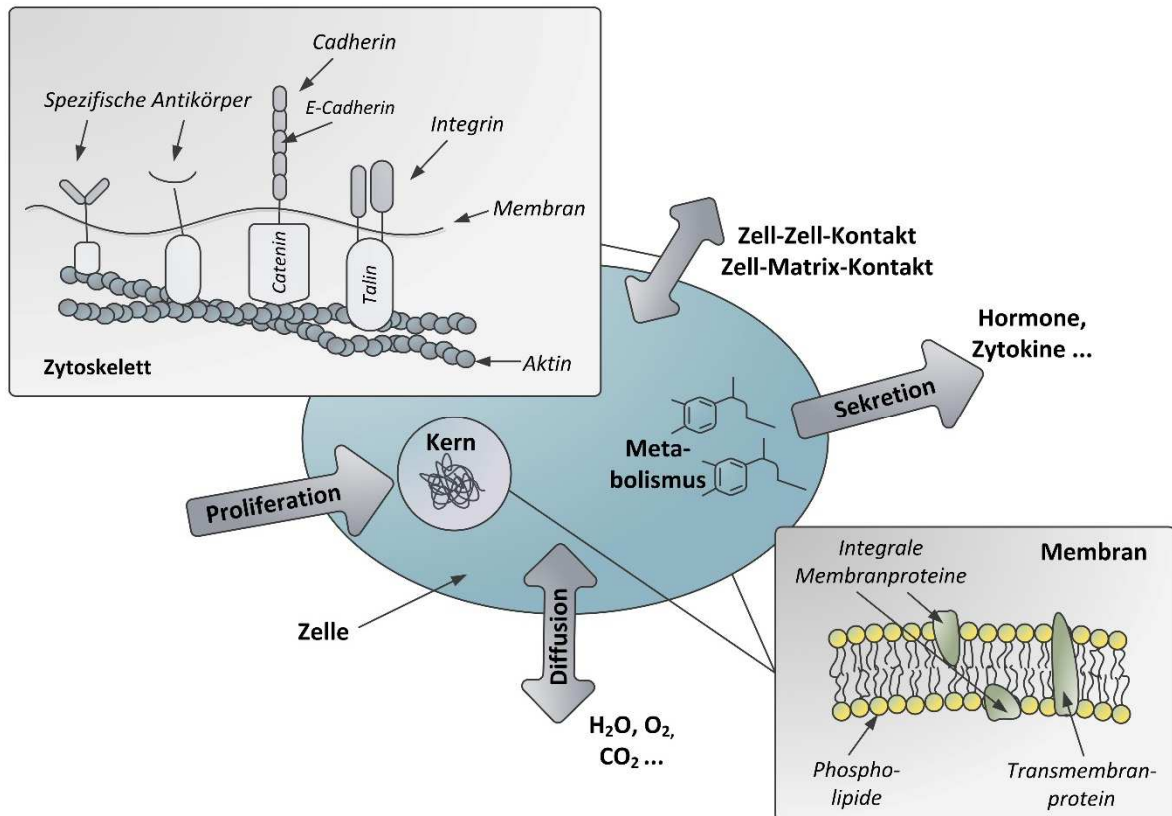


Abbildung 10: Funktionen und Mechanismen von Zellen, die im Hinblick auf Arbeitsabläufe im Rahmen neuer Therapien konserviert werden müssen.

3 Material und Methoden

3.1 Techniken der Zellkultur

3.1.1 Zellen und Zellkultur

Kultivierung muriner Fibroblasten (L929)

Die murine Fibroblastenlinie L929 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurde als Monolayer in DMEM mit 10% FBS und 20µg/ml Gentamycin (alles von Gibco, Karlsruhe) bis zur Konfluenz in Zellkulturflaschen mit 75cm² Wachstumsfläche (Corning, Kaiserslautern) kultiviert. Zur Passage wurde der Monolayer mit 5ml PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (nachfolgend PBS(-,-)) gespült und anschließend mit 3ml 0,05% Trypsin/EDTA bei 37°C abgelöst (beides Gibco, Karlsruhe). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7ml serumhaltigen Kulturmedium abgestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde bei 1000rpm für 3min abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde anhand einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Aus den gezählten Zellen in den 4 Großquadraten x_i einer Zählkammer mit einer Fläche von 1mm² und einer Höhe von 0,1mm berechnete sich die Zellzahl pro ml folgendermaßen:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\sum_{i=1}^{i=4} x_i}{4} * 10^4 \quad \text{Formel (2)}$$

Bei einer Zelldichte von 1 bis 5·10⁴ Zellen/cm² wurden die Zellen 2x wöchentlich passagiert und in einem Brutschrank (Binder, Tuttlingen) bei 37°C, 5%CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Kultivierung der Insulinomazelllinie (RIN-m)

Die Insulinomazelllinie RIN-m aus der Ratte (ATCC, Manassas, VA, USA) wurde in RPMI-1640 mit 10% FBS und 20µg/ml Gentamycin bis zu einer Konfluenz von 70% in Zellkulturflaschen (Corning, Kaiserslautern) kultiviert. Zum Passagieren wurden diese Zellen ebenso wie L929-Zellen mit PBS(-,-) gespült und mit 0,05% Trypsin/EDTA abgelöst. Bei einer Zelldichte von 1 bis 5·10⁴ Zellen/cm² wurden die Zellen 2x wöchentlich passagiert und im Brutschrank inkubiert.

Kultivierung humaner adulter Stammzellen (hMSCs)

Verwendet wurden humane mesenchymale Stammzellen aus der Nabelschnur (Promocell, Heidelberg), die in Zellkulturflaschen in DMEM/F12 mit 10% FBS kultiviert wurden (Gibco, Karlsruhe), dem 1% Penicillin/Streptomycin und 0,05% bFGF (basic fibroblast growth factor, Fisher Scientific, Darmstadt) zugesetzt wurden. Bei einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen ebenfalls mit 0,05% Trypsin/EDTA nach dem Ablöseprotokoll für L929- und RIN-m-Zellen passagiert.

Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen (hESCs)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die embryonale Stammzelllinie H9 (WiCell Research Institute, Madison, WI, USA) gemäß der vom Robert Koch Instituts (RKI) erteilten Genehmigung 18 und 44 für Forschungsvorhaben an hESCs gemäß §6 Absatz 4 des deutschen Stammzellgesetzes (StZG)

verwendet. Zur Erhaltung ihrer Pluripotenz wurden die Zellen auf mitotisch inaktivierten Mausfibroblasten kultiviert. Die dazu verwendeten primären, embryonalen Mausfibroblasten (PMEFs) des CF-1 Stamms wurden von Millipore (Schwalbach) bezogen und in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem FBS und 1% nicht essentiellen Aminosäuren (MEM, Gibco, Karlsruhe) kultiviert und durch die Zugabe von 0,01µg/ml Mitomycin C (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) für 120min wurden die Zellen inaktiviert. Diese inaktivierten PMEFs wurden mit einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² Wachstumsfläche in zuvor mit Gelatine-beschichteten Zellkulturschalen (5cm Durchmesser mit Nunclon-Oberfläche von Nunc, VWR, Darmstadt) ausgesät. Die verwendete Gelatinelösung aus Schweinehaut wurde 0,1%ig (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) angesetzt und vor Besiedelung wurden die Schalen für mindestens 2h bei 37°C damit inkubiert. Die so vorbereiteten Petrischalen mit Feederzellen wurden für mindestens 24h im Brutschrank inkubiert bevor die embryonalen Stammzellen zugegeben wurden. Zur Passage auf eine Schale mit frischen PMEFs wurden morphologisch undifferenzierte Kolonien mit Hilfe einer Präparationsnadel (Fine Science Tools, Heidelberg) zunächst von den umliegenden PMEFs getrennt, anschließend mechanisch zu Fragmenten zerteilt, vorsichtig von der Oberfläche gelöst und übertragen (ca. 50 Fragmente pro 5cm Feederschale). Das verwendete Medium bestand aus DMEM/F12 (Gibco, Karlsruhe) mit 20% synthetischem Serumersatz (Knock-out Serum Replacer), 2mM L-Glutamin, 4ng/ml bFGF, 1% nicht essenzielle Aminosäuren (MEM), 1% Penicillin/Streptomycin und 100µM β-Mercaptoethanol (alle Zusätze von Sigma-Aldrich, Schnelldorf). Die H9-Kolonien wurden für maximal 7 Tage kultiviert, wobei alle 2-3 Tage das Medium ersetzt wurde. Wurde eine hESC-Fragmentsuspension für Untersuchungen verwendet, so wurde diese 4 bis 7 Tage nach der letzten Passage gewonnen.

Kultivierung humaner induziert pluripotenter Stammzellen (hiPSCs)

Verwendet wurde die humane induziert pluripotente Stammzelllinie iPS(Foreskin)-2 von WiCell (Wisconsin, USA), die feederfrei in mTeSR-Medium (Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich) kultiviert wurde. Die Kultur wuchs auf Petrischalen mit einem Durchmesser von 5cm, die zuvor für mindestens 2h bei 37°C mit Matrigel (BD Biosciences, Heidelberg) beschichtet wurden (0,01mg/cm² Wachstumsfläche). Nach 7 Tagen wurden die hiPSC-Kolonien wie folgt auf frische Petrischalen passagiert: Vor dem enzymatischen Ablösen wurden die Petrischalen von Kolonien, Zellen und Koloniebereichen gesäubert, die morphologisch differenziert erschienen. Dies beinhaltete Kolonien, die keine glatten Ränder aufwiesen oder deren Zellen ungleichmäßige Formen aufzeigten und vereinzelte Fibroblasten-artige Zellen zwischen Kolonien (siehe Abbildung 11). Dazu wurde eine Pipettenspitze schräg angeschnitten, mit der die entsprechenden Bereiche abgeschabt wurden. Verbleibende, „gute“ Kolonien, die eine gewisse Größe überschritten (>500x500µm), wurden mit der angeschrägten Spitze zerteilt. Nach der Säuberung wurden die Petrischalen mit 3-5ml DMEM/F12 (37°C) gespült, anschließend wurden 2ml Dispaselösung (1U/ml, Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich) zugegeben und die Schalen für 7min bei 37°C inkubiert, Zell-Matrix-Kontakte werden so angedaut. Nach der Inkubationszeit wurden die Schalen 2x mit jeweils 5ml DMEM/F12 (37°C) gespült. Nach der Zugabe von 3ml frischem Kulturmedium wurden die verbliebenen undifferenzierten Kolonien mit einem Zellschaber vorsichtig abgeschabt und zur weiteren Passage in einem Verhältnis von 1:4 bis 1:10, je nach Dichte der Kolonien, auf frische Matrigel-beschichtete Petrischalen aufgeteilt. Wurde eine hiPSC-Fragmentsuspension für Untersuchungen verwendet, so wurde diese 5 bis 7 Tage nach der letzten Passage gewonnen.

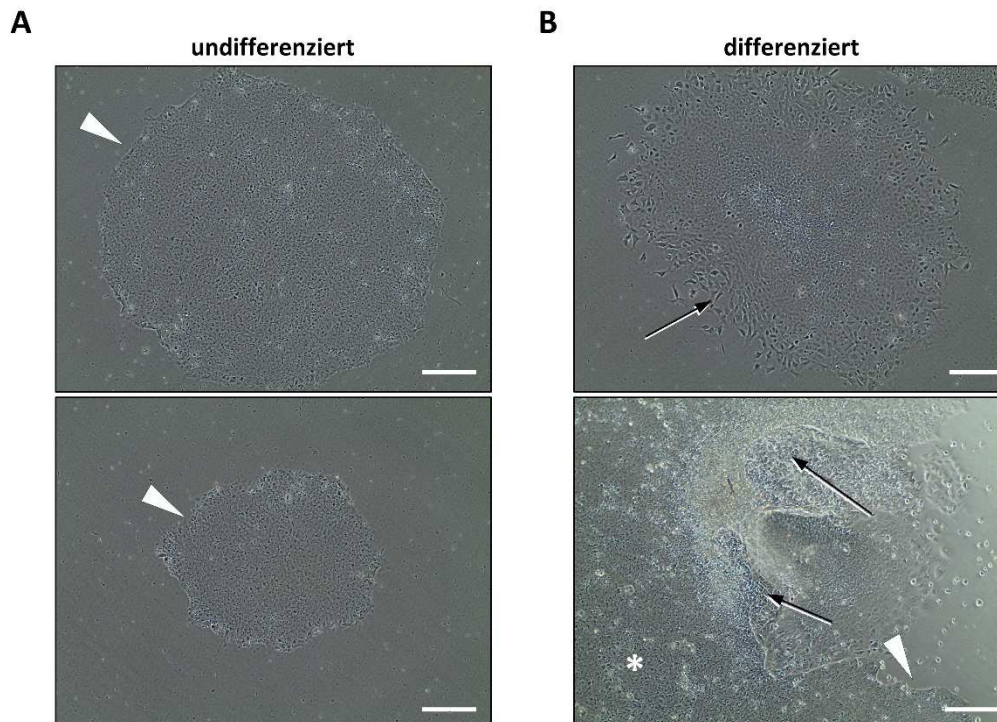


Abbildung 11: Morphologische Unterschiede von hiPSCs. A Undifferenzierte hiPSC Kolonien weisen einen glatten Rand (weiße Dreiecke) und homogene Zellen auf. B Differenzierte hiPSCs können ebenfalls kolonie-artig wachsen, haben aber keinen glatten Rand und die Zellen unterscheiden sich untereinander in Form und Größe (schwarze Pfeile). Manche Kolonien weisen auch nur einen differenzierten Teilbereich auf, der Rest zeigt die Morphologie undifferenzierter hiPSCs (weißer Stern und weißes Dreieck). Die Balken entsprechen 200µm.

Präparation und Kultivierung primärer embryonaler Hühnerherzmuskelzellen (CHMC)

Die Hühnereier (LSL-Rhein-Main Geflügelvermehrungsbetrieb Dieburg, Deutschland) wurden 7 Tage lang in einem Brutautomat bebrütet. Vor dem Öffnen wurden sie mit 70% Ethanol desinfiziert und in eine waagerechte Position gelegt. Bei jedem Ei wurde die Schale etwa 1,5cm² weit geöffnet. Mit einer gebogenen Pinzette wurde der Hühnerembryo vorsichtig herausgehoben, mit einer weiteren Pinzette wurde der Kopf abgetrennt. Der restliche Embryo wurde in gekühltes F-12 Medium (Gibco, Karlsruhe) überführt, in dem auch durch Öffnen des Brustkorbes und Abklemmen an der Aorta der Herzbeutel entnommen wurde. Der Herzbeutel wurde in warmes F-12 Medium überführt, um restliches Blut heraus zu pumpen. Dieser Vorgang wurde pro Präparation für etwa 40 Eier durchgeführt, die tatsächliche Anzahl an entnommenen Herzbeuteln wurde bestimmt, das Medium wurde abgenommen und die Herzbeutel mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Die verbleibende Masse wurde in 1ml 0,05% Trypsin/EDTA aufgenommen und bei 37°C inkubiert. Nach 10min wurde die Dissoziation durch Zugabe von 500µl hitzeinaktiviertem Pferdeserum (Gibco, Karlsruhe) abgestoppt. Die nun erhaltene Einzelzellsuspension wurde mit Präparationsmedium verdünnt (etwa 10ml für 50 Herzbeutel). Das Präparationsmedium setzte sich aus dem Medium M199 mit 10% FBS, 50U/ml Penicillin und 50g/ml Streptomycin zusammen (alles von Gibco, Karlsruhe). Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und 1,2·10⁶ Zellen/ml wurden in unbeschichteten Plastikpetrischalen (35mm, Corning, Kaiserslautern) ausgesät. Nach 24h wurde das Präparationsmedium durch das Kulturmedium ersetzt (DMEM mit 1x N2-Supplement, 50U/ml Penicillin und 50g/ml Streptomycin; alles von Gibco, Kaiserslautern). An Tag 5 konnten die sphärischen Mikrogewebe, die autonom kontrahierten für Untersuchungen verwendet werden.

Bezug primärer Gewebe

Primäre Langerhans Inseln (LHI) wurden von Projektpartnern der Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechselkrankheiten der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen (BMBF-Verbundprojekt „ μ Cryolab“; Kennzeichen 16SV2385). Die LHIs wurden aus acht Wochen alten Sprague Dawley Ratten präpariert und über einen Ficoll-Gradienten gemäß eines bereits veröffentlichten Protokolls abgetrennt (Schneider et al. 2003).

Humanes Kolongewebe, das am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf explantiert wurde, stellten Projektpartner der Indivumed GmbH (Hamburg) mit Einverständnis des Donors zur Verfügung (BMBF-Verbundprojekt „ μ Cryolab“; Kennzeichen 16SV2385). Die Gewebestücke wurden in der Organtransportlösung Hypo Therosol (BioLife Solutions Inc., Bothell, WA, USA) für maximal 24h auf Eis transportiert. Das Gewebe wurde mit einer Schere in etwa 1cm² große Stücke geschnitten und anschließend für 75min in 1x Trypsin/EDTA bei 37°C auf einem Wippschüttler enzymatisch verdaut. Um Mikrogewebe zu erhalten wurden die Tumorstücke mit Hilfe eines Glasstößels durch ein Metallsieb mit einer Maschenweite von 300 μ m passiert.

Porcine Herzschnitte wurden von Projektpartnern von Sanofi-Aventis (Frankfurt) bezogen. Humane Herzschnitte aus Herzgewebe, das ebenfalls an der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf explantiert wurde, stellten Projektpartner der Abteilung experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität zu Lübeck mit Einverständnis des Patienten zur Verfügung (BMBF-Verbundprojekt „Organotypische menschliche Herzkulturen“; Kennzeichen 01GG0709). Beide wurden zu Gewebeschnitten mit 200 μ m Dicke verarbeitet und auf Eis in der Organtransportlösung Hypo Therosol für maximal 24h transportiert.

3.1.2 Methoden zur Generierung von Mikrogeweben

Standardmethode Hängende Tropfen (HD)

Die Methode der HDs zur Anzucht von Mikrogeweben aus RIN-m und hiPSCs wurde auf zwei Arten durchgeführt. Zunächst die manuelle Methode durch das Setzen von ca. 50 20 μ l-Tropfen auf die Deckelinnenseite einer Petrischale. In den Boden der Petrischale wurde zur Prävention der Evaporation 10ml PBS gefüllt. Anschließend wurde der Deckel vorsichtig invertiert und auf den Boden der Schale gesetzt. Um Medienwechsel sowie mikroskopische Aufnahmen der HDs durchzuführen, wurde der Deckel mit den HDs wieder invertiert. Medienwechsel wurden vollzogen durch die Zugabe von 20 μ l des entsprechenden Kulturmediums in jeden HD. Bevor der Deckel wieder auf den Boden gesetzt wurde, wurden 18 μ l wieder abgenommen, so dass die Tropfen ausreichend stabil für den Transport waren. Die zweite Methode zur Anzucht von Mikrogeweben aus hiPSCs wurde mit Hilfe von Lochplatten realisiert. Diese Lochplatten aus eigener Produktion wurden auf das Format einer handelsüblichen 96-Wellplatte angepasst. In jedes Töpfchen der 96-Wellplatte wurde unten 70 μ l PBS zur Prävention der Evaporation vorgelegt. In jedes der 96 Löcher wurden von oben 20 μ l-Tropfen gesetzt. Die spezielle Lochgeometrie hielt die Tropfen stabil in ihrer vorgesehenen Position. Die Schwierigkeiten, die durch das Invertieren des Deckels in der althergebrachten Methode zur Kultivierung in HDs vorlagen, können so umgangen werden. Diese Lochplatten wurden auch in den Untersuchungen zur automatisierten Kultivierung in HDs eingesetzt.

Vorbereitung der sphärischen Mikroträger

Die verwendeten Mikroträger Cytodex-3 (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) wurden nach Herstellerangaben in einer Konzentration von 1g/50ml in PBS rehydratisiert und autoklaviert. Sie wurden zur Kultivierung von hMSCs, hESCs und hiPSCs eingesetzt.

Für hMSCs wurden die Mikroträger nicht weiter modifiziert, da sie standardmäßig bereits mit Kollagen beschichtet sind.

Für eine Kultivierung der hESCs wurden die Mikroträger mit Proteinen der extrazellulären Matrix MaxGel® (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) in einem Verhältnis von 1%-Vol. für mindestens 24h bei 37°C inkubiert. Vor der Besiedelung der Mikroträger wurde die Suspension in allen Fällen mit warmem Waschpuffer gewaschen.

Zur Bestimmung der Mikroträgerkonzentration in einer Lösung wurden 4x 10µl dieser auf eine Oberfläche pipettiert und die Anzahl der darin enthaltenen Mikroträger im Mikroskop bestimmt. Das Mittel aus den 4 Werten wurde bestimmt und die Anzahl der Mikroträger pro ml bestimmt.

Die Mikroträger wurden für die Kultivierung mit hiPSCs mit Matrigel, den extrazellulären Matrixproteinen, die auch in der Standardkultur verwendet werden, beschichtet. Mit den Herstellerangaben über die Wachstumsfläche der Mikroträger (175µm² pro Träger) und der bestimmten Trägeranzahl pro ml wurden diese mit 0,01mg/cm² Protein beschichtet.

hESCs in fluiden Mikrobioreaktoren

Zur feederfreien Kultivierung in miniaturisierten Bioreaktoren wurden H9-Fragmente auf beschichteten, sphärischen Mikroträgern in konditioniertem Medium kultiviert. 3ml der Cytodex-3-Stammlösung wurden mit PBS gewaschen und in 300µl Volumen konditioniertes H9-Medium aufgenommen. Zur Konditionierung wurde H9-Kulturmedium für 24h auf Feedern inkubiert und anschließend mit weiteren 6ng/ml bFGF versetzt (Endkonzentration bFGF: 10ng/ml). Wenn das konditionierte Medium nicht gleich verwendet wurde, lagerte es bei -20°C. Besiedelt wurden die Mikroträger mit H9-Koloniefragmenten, die an Tag 4 ihrer Standardkultur mechanisch abgelöst wurden. Zum Ablösen der auf den Mikroträgern kultivierten H9 wurden die Zellen für 10 bis 20min mit 0,1% Kollagenase bei 37°C inkubiert.

Die verwendete Kompartimentierungssonde, die Zellsuspension mit Hilfe des Trägermediums Perfluordecalin (PFD, Pharmpur, Königsbrunn) in einzelne Segmente unterteilt, wurde von Projektpartnern des Instituts für Bioprozess- und Analysenmesstechnik (iba e.V., Heilbad Heiligenstadt) realisiert (EU-Projekt „HYPERLAB“; Kennzeichen FP7-223011). Sie bestand aus einem doppelwandigen Metallrohr das über PFTE-Schläuche (2,4mm Innendurchmesser, 1/8inch Außendurchmesser, Jasco, Gross-Umstadt) am oberen Ende an zwei Spritzenpumpen (nemeSys, Cetoni, Korbußen) angeschlossen wurde (Meiser et al. 2013b). Die untere Seite der Sonde wurde in die zu kompartimentierende Zellsuspension getaucht, die in einem Messkolben auf einem Magnetrührer gerührt wurde. Durch das Anlegen eines negativen Vorschubs von -2400µl/min an das innere Rohr in der Sonde wurde Zellsuspension eingesaugt. Ein gepulster Vorschub von 2400µl/min des Trägermediums PFD durch das äußere Rohr der Sonde trennt den kontinuierlichen Zellsuspensionsfluss in einzelne Kompartimente. Die Dauer des PFD-Vorschubs betrug 2,5s und wurde für 0,5s pausiert.

Adhärenz Kultivierung von hiPSCs in HDs

Zur Kultivierung der hiPSC in hängenden Tropfen als Embryoid Bodies oder auf Mikroträger wurden diese zuvor enzymatisch dissoziiert. Dazu wurden die Petrischalen mit den hiPSC-Kolonien zunächst für 1h mit 10µM ROCK-Inhibitor Y-27632 (Merck, Darmstadt) inkubiert, dann mit 5ml DMEM/F12 gewaschen und anschließend für 3min mit 2ml 0,05% Trypsin/EDTA vereinzelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8ml frischem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde bei 800rpm für 5min zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und 3ml frisches Medium zugeben. Die Zahl lebender Zellen wurde anhand einer Trypanblau Färbung in einer Neubauer-Kammer ermittelt (siehe unten). Daraufhin wurden Suspensionen mit verschiedenen Zellkonzentrationen angesetzt ($1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^5$, $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml), entweder in reinem Kulturmedium, in Kulturmedium mit 10µM Y oder in Kulturmedium mit 10µM Y und 10 µg/ml Fibronectin (Invitrogen, Karlsruhe). Im Fall der adhärenz kultivierten hiPSCs in HDs wurden MG-beschichtete Mikroträger zugegeben.

3.1.3 Vitalitätstests und Funktionalitätsnachweise

Nachweis der metabolischen Aktivität und Membranintegrität (FDA/EtBr-Assay)

Die Färbelösung zur Untersuchung der metabolischen Aktivität und Membranintegrität bestand aus 5ml Basalmedium (DMEM, DMEM/F12, oder PBS ohne Proteinzusatz), 8µl FDA-Stocklösung (Fluoreszeindiacetat, 5mg/ml in Aceton (Invitrogen, Karlsruhe)) und 50µl EtBr-Stocklösung (Ethidiumbromid, 1mg/ml in Aqua bidest. (Invitrogen, Karlsruhe)). Diese Färbelösung wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit der zu untersuchenden Probe gemischt und für 5min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Falle von Einzelzellsuspensionen wurden jeweils 10µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert, andere Proben wurden direkt in einem Fluoreszenzmikroskop (Eclipse TE300, Nikon, Amsterdam, Niederlande) angesehen und Aufnahmen im Tripelbandfilter gemacht (DAPI-FITC-Texas Red Filter, Nikon, Amsterdam, Niederlande). FDA wird in metabolisch aktiven Zellen durch Esterasen zu Fluoreszein gespalten und lässt diese Zellen grün leuchten. Ethidiumbromid diffundiert durch defekte Membranen toter Zellen und interkaliert mit der DNA, wodurch diese Zellen rot leuchten. Für Einzelzellsuspensionen errechnet sich die Vitalität wie folgt:

$$Vitalität[\%] = \frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl aller Zellen}} * 100 \quad \text{Formel (3)}$$

Mit Hilfe der beiden Bildanalyseprogramme ImageJ (NIH, Bethesda, USA) und NIS Elements (Nikon, Amsterdam, Niederlande) wurde die Vitalität von Mikrogewebe oder adhärenz Zellen anhand der Intensitätswerte evaluiert, wie es bereits beschrieben wurde (Ehrhart et al. 2009). Pro Ansatz wurden mindestens 8 Mikrogewebe ausgewertet, die Vitalität wurde in Prozent angegeben.

Nachweis der Vitalität mit Trypanblau

Trypanblau ist ein polyanionischer Farbstoff, der nur in tote Zellen eindringt und in diese dunkelblau färbt. Die 0,4% Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) wurde 1:1 gemischt und die Zellen wurden in einer Neubauerkammer ausgezählt. Lebende Zellen nehmen diesen Farbstoff nicht auf und erscheinen in der Neubauerkammer hell, vor einem blauen Hintergrund.

Bestimmung der Kontraktionsfrequenz von CHMC

Zur Bestimmung der Kontraktionsfrequenz von autonom kontrahierenden Herzmuskelzellen wurden die entsprechenden Mikrogewebe unter dem Mikroskop betrachtet. Die Kontraktionsfrequenz wurde in Kontraktionen pro Minute (bpm, Englisch für beats per minute) bestimmt. Für länger andauernde Untersuchungen wurde die entsprechende Probe in einer temperierten Kammer bei 37°C auf dem Mikroskop gehalten, da der Vorgang temperatursensitiv ist.

Bestimmung der Anwachsrate humaner Stammzellen

Zur Bestimmung der Anwachsrate von hESCs und hiPSCs wurde eine definierte Anzahl an Fragmenten des entsprechenden Zellsystems unter Standardbedingungen auf Kulturschalen ausgesät. Im Fall der hESCs fiel die Bestimmung der Anzahl der Fragmente deutlich leichter, da dieses Zellsystem nicht so scherstresssensitiv ist. Die hiPSCs zerfallen schnell wodurch eine Größe festgelegt werden musste, ab der ein Fragment gezählt wurde. Diese kritische Größe wurde auf 40µm im Durchmesser gesetzt. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und alle angewachsenen Kolonien wurden bei einer 4x-Vergrößerung am Mikroskop ausgezählt. Die Anwachsrate berechnet sich wie folgt:

$$\text{Anwachsrate}[\%] = \frac{\text{Anzahl der angewachsenen Fragmente}}{\text{Anzahl der ausgesäten Fragmente}} * 100 \quad \text{Formel (4)}$$

Pluripotenznachweis humaner Stammzellen über immunzytochemische Färbungen

Um die Pluripotenz von hESCs und hiPSCs nachzuweisen, wurde die Expression des spezifischen Human-Embryonic-Stem-Cell-Antigen-2 (HESCA-2) untersucht. Dazu wurden die entsprechenden Zellen zunächst mit Waschpuffer gewaschen und anschließend fixiert. Die Fixationslösung setzte sich zusammen aus 0,15M Natriumcacodylat-Puffer mit 2% Glutaraldehyd (beides Agar Scientific, Essex, UK) und die Zellen wurden für mindestens 24h bei 4°C fixiert. Vor der Blockierung in 1,5% Ziegen Serum in PBS(-,-) wurde die Probe 3x mit PBS(-,-) gewaschen. Der Anti-HESCA-2 Primärantikörper (Millipore, Schwalbach) wurde im Verhältnis 1:100 zur Blockierungslösung zugegeben und bei 4°C für mindestens 18h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung wurde der sekundäre Antikörper im Verhältnis 1:200 zugegeben. Die verwendeten Antikörper waren entweder der sekundäre Antikörper Alexa-Fluor-594 oder Alexa-Fluor-488 (beides goat anti mouse, Invitrogen, Karlsruhe). Die sekundären Antikörper wurden entweder 2h bei Raumtemperatur oder mindestens 18h bei 4°C inkubiert.

Pluripotenznachweis humaner Stammzellen mit FACS-Analyse

Die Quantifizierung der Pluripotenz von hSCs wurde über eine FACS-Analyse durchgeführt (FACS Calibur, BD, Heidelberg). Dazu wurden die entsprechenden Zellen mit Waschpuffer gewaschen und mit 0,05% Trypsin/ETDA für 3min bei 37°C vereinzelt. Der enzymatische Verdau wurde durch die Zugabe von FACS-Puffer (1% FBS und 0,09%NaN₃ in PBS(-,-)) in zehnfacher Menge des vorhandenen Volumens gestoppt. Nach einer Zentrifugation bei 1000rpm für 3min, wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Fixationspuffer (BD, Heidelberg) resuspendiert und für mindestens 20min bei 4°C fixiert. Wurden intrazelluläre Marker verwendet, so wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt der Überstand verworfen und das Zellpellet im Perm Buffer III (BD, Heidelberg) für 30min bei 4°C

permeabilisiert. Nach Bestimmung der Zellkonzentration in einer Neubauerzählkammer wurden die unten aufgeführten Antikörper in der Konzentration von 1µl pro $1 \cdot 10^5$ Zellen zugesetzt und mindestens 30min auf Eis inkubiert.

Zur Pluripotenzbestimmung von hESCs und hiPSCs wurden die Zellsuspensionen mit PE-gekoppeltem Anti-Oct-3/4, Alexa-Fluor-488-gekoppeltem Anti-Tra-1-81 oder PE-gekoppeltem Anti-Nanog-Antikörper gefärbt (alle von BD, Heidelberg). Im Fall der hMSCs wurden die von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie empfohlenen negativen Marker HLA-DR, CD34, CD45 und CD73, sowie die positiven Marker CD44 CD90 und CD105 verwendet (alle von BD, Heidelberg). Vor der Analyse der gefärbten Proben, wurden die Spannungen des Photomultipliers (PMT-Voltages) im Vorwärts- und Seitwärtsstreudiagramm jeweils mit den ungefärbten Proben so eingestellt, dass die Populationen unter 10^1 lagen. Ein FACS-Ereignis wurde als positiv erachtet, wenn das Fluoreszenzsignal oberhalb von 10^1 lag. Für jede FACS-Analyse wurden mindestens 10.000 Ereignisse gezählt.

Untersuchungen von Zytoskelett und DNA-Doppelstrangbrüchen

L929-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro 13mm Deckglas ausgesät und für mindestens 24h anwachsen gelassen. Für die Proben mit extrazellulären Matrixproteinen (ECM) wurden Glasdeckgläser mit 500µl ECM (Invitrogen, Karlsruhe), die 1:25 im kaltem Basismedium DMEM verdünnt wurde, für mindestens 2h bei 37°C inkubiert. Das ECM-Gemisch wurde anschließend abgenommen und die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 20min bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,2% TritonX in PBS für 20min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Vor der Blockierung in 1% BSA und 0,2% Tween in PBS wurde ebenfalls wieder 3x mit PBS gewaschen. Die Inkubation in der Blockierungslösung betrug bei Raumtemperatur mindestens 30min, bei 4°C bis zu 48h. Vor der Färbung wurden die Deckgläser auf Zellulose abgetupft und anschließend wurden 50µl der folgenden Färbelösung für 30min bei Raumtemperatur zugegeben: 1,65µM Bodipy FL Phalloidin (Invitrogen, Karlsruhe) zum Anfärben von F-Aktin und 9µg/ml DNase I konjugiert mit Texas Red (Invitrogen, Karlsruhe) zum Anfärben von G-Aktin in der Blockierungslösung. Zur Kontrastfärbung der Kerne wurde noch 0,1% DAPI zugegeben. Um die Proben für einen längeren Zeitraum lagern zu können wurden diese wiederum auf Zellulose abgetupft, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. 3µl Prolong-Antifade-Lösung wurden aufgebracht und die Deckgläser wurden mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger gelegt. Nach etwa 1min wurden die Ränder der Deckgläser mit transparentem Nagellack (dm, Karlsruhe) bestrichen, um die Probe dicht zu verschließen.

Als Antwort auf einen Doppelstrangbruch wird Serin-140 des Histonkomplexes gH2AX phosphoryliert (Rogakou et al. 1998). Zur Färbung der Doppelstrangbrüche wurden ebenfalls L929 Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro 13mm Deckglas ausgesät. Die Prozedur zur Färbung der DNA-Strangbrüche mit Anti-gH2AX (abcam, Cambridge, UK) verlief bis zum Blockierungsschritt identisch zur oben beschriebenen Zytoskelettfärbung. Der erste Antikörper (Anti-gH2AX) wurde zu 0,1% in die Blockierungslösung gemischt und die Probe darin für mindestens 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit der Blockierungslösung wurde der sekundäre Antikörper 2%ig in der gleichen Lösung zugeben und auf den Proben für 30min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Untersuchungen der Ultrastrukturen von Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung von Zellen oder Zellkonstrukten am Rasterelektronenmikroskop (Philips XL30 ESEM, FEI, Niederlande) wurden diese mindestens 3x mit PBS gewaschen und anschließend in 0,1M Glutaraldehyd in einer 0,3M Cacodylatlösung oder alternativ in der BD-Cytofix-Lösung (BD, Heidelberg) für mindestens 2h bei 4°C fixiert. Die Präparation erfolgte weiter nach einem bereits veröffentlichten Protokoll (Katsen et al. 1998): Nach erneutem Waschen wurden die Proben in einer ansteigenden Ethanolreihe mit einem Kritisch-Punkt-Trockner (CPD-7501, Quorum Technologies, UK) oder mit Hexymethyldisilazan (HMDS, Sigma-Aldrich, Schnelldorf) getrocknet und mit Gold, Palladium und/oder Kohle beschichtet. Zur besseren Kontrastierung wurden die Proben vor der Entwässerung mit 1% Tanninsäure (Sigma-Aldrich, Schnelldorf), 1% Uranylacetat (Ted Pella, Redding CA, USA) und 2% Osmiumtetroxid (Roth, Karlsruhe) behandelt. Für die Untersuchungen an Herzschnitten und Mikrogewebe wurde auch die Block-Face-REM-Methode benutzt (Katsen-Globa et al. 2005). Diese basiert auf dem Rückstreuелеktronenmodus des Rasterelektronenmikroskops und ermöglicht eine Detektion der inneren Strukturen, ähnlich eines Transmissionselektronenmikroskops (TEM). Die Methode erlaubt ein schnelles Abrastern ganzer Schnitte mit einer Ultrastrukturanalyse. Dazu wurden die Proben in Epoxy-Harz eingebettet und mit einer Diamantsäge oder dem Ultramikrotom geschnitten. Um eine glatte Oberfläche zu erzeugen wurden die Schnitte mit Diamantpaste poliert.

3.1.4 Herstellung artifizieller Gerüststrukturen

Untersuchungen der Raumkurven von Bioimplantaten in Alginatkapseln während des Polymerisationsprozesses mittels Hochgeschwindigkeitskamera

Hochviskoses Alginat aus eigener Produktion wird aus getrockneten Stängeln von *Lessonia nigrescens* und *Lessonia trabeculata* hergestellt. Die Algen wurden an der chilenischen Küste geerntet, geschält und getrocknet. Das Alginat wurde entsprechend der bereits veröffentlichten Protokolle mit 50mM EDTA (Roth, Karlsruhe) und 50mM Natriumglukonat (Merck Darmstadt) im Falle von *L.t.* oder 50mM Diiminosuccinat (Lanxess, Leverkusen) im Falle von *L.n.* extrahiert (Ehrhart 2008; Zimmermann et al. 2005). Nachdem das Alginat in Lösung gegangen ist, werden Schwebstoffe und Zelldebris über diverse Filtrationsschritte entfernt und anschließend wird das Alginat in mehreren Durchgängen mit Ethanol gefällt. Nach diesem Schritt hat das Alginat etwa die Konsistenz von nasser Watte und wird mit Scheren in Stücke von etwa 3x5mm geschnitten und getrocknet. Zur Herstellung der Natrium-Alginatlösungen wurden die getrockneten Alginatkörner in steriler 0,9% Natriumchloridlösung rehydratisiert. *L.n.* und *L.t.* wurden getrennt voneinander zu 0,5%-Gew. und 0,7%-Gew. angesetzt und bis zur vollständigen Durchmischung in einen Rotationsmischer gestellt.

Zur Herstellung der Bioimplantatmodelle wurden die 0,7%igen Lösungen aus *L.n.* und *L.t.* in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und mit Hilfe der Verkapselungsanlage vernetzt (Zimmermann et al. 2001). Dazu wurde die Alginatlösung in einer 1ml-Einwegspritze aufgezogen und in einen Vorschub eingespannt. Ein Motor drückt die Alginatlösung durch eine Düse, wo ein koaxialer Luftstrom Tropfen im Mikroliterbereich abreißt und in ein Fällbad eintropft. Zusätzlich zu der äußeren Vernetzung der Kapseln wurde mit Hilfe der „Crystal Gun“ durch das Einschießen von Bariumchloridkristallen auch intern vernetzt (Zimmermann et al. 2003; Zimmermann et al. 2007). Zur Beobachtung der Kapseldeformation und Bioimplantatraumkurven wurden Alginatlösungen aus den verschiedenen Algensorten und den verschiedenen Konzentrationen mit den Bioimplantatmodellen gemischt und aus

13,5cm Höhe in ein Fällbad eingetropt (115mM Natriumchlorid, 20mM Bariumchlorid und 5mM Histidin (alles von Sigma, Schnelldorf). Der Prozess wurde mit einer Hochgeschwindigkeitskamera Speed Cam Visario LT400 (Weinberger, Erlangen) bei 1000 Bildern pro Sekunde aufgenommen. Als Lichtquelle wurden zwei ILP-1 Geräte (Olympus) verwendet. Um die notwendige räumliche Auflösung zu erreichen wurde ein Aluminiumspiegel (Thorlabs, Dachau) verwendet.

Makroporige Gelatine-Alginat-Kryogele

Die zur Kultivierung von hMSCs verwendeten Gelatine-Alginat-Kryogele wurden von den Projektpartnern Y. Petrenko A. Petrenko, R. Ivanov und V. Lozinsky und gemäß des Patentes (Lozinsky et al. 1994) wie folgt hergestellt: 1,5%-Gew. Natriumalginat (Manugel DMD, ISP, USA) wurde in destilliertem Wasser gelöst und in Petrischalen gegeben, so dass der Flüssigkeitsfilm etwa 2mm dick war. Die Petrischalen wurden in einen Kryostaten (FP 45 MH, Julabo, Germany) gegeben und für 3h bei -15°C gefroren. Anschließend wurden die Petrischalen in einen Lyophilisator (Alpha 1-2 LD, Martin Christ, Deutschland) gegeben und für weitere 24h gefriergetrocknet. Die nun getrockneten, großporigen Alginatscheiben wurden in eine mit CaCl₂ gesättigte Ethanollösung (Pancreac Quimica, Spanien) überführt und für drei Tage auf einem Schüttler inkubiert, um das Natriumalginat zu Calciumalginat zu vernetzen. Zur Desinfektion wurden die Calciumalginatscheiben mehrfach mit reinem Ethanol gespült. Zur Modifikation der Alginatscheiben werden diese in einer 0,1M Calciumhydroxidlösung (Pancreac Quimica, Spanien) inkubiert und mit Argon begast. Anschließend wurden 0,75%-Gew. Divinylsulfon zugegeben und die Alginatscheiben wurden für weitere 18h bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Alginatscheiben mit destilliertem Wasser gewaschen und in eine 1%-Gew. Gelatinelösung in destilliertem Wasser gegeben (Gelatine aus Schweinehaut Typ A (GA), Sigma, USA). Der pH-Wert wurde mit Calciumhydroxid auf 9 eingestellt und die Scheiben wurden für weitere 12h auf einem Schüttler bei 40°C inkubiert. Schließlich wurden die Scheiben mit warmem, destilliertem Wasser (40°C) gewaschen und bis zur Verwendung bei 4-6°C in Ethanol gelagert.

3.2 Kryokonservierung

3.2.1 Kristallisationsverfahren zur Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung im Kristallisationsverfahren mit einer definierten, langsamen Kühlrate wurde der Computer-gesteuerte Einfrierautomat IceCube verwendet (Sy-Lab, Neupurkersdorf, Österreich). Die Zellen wurden entsprechend der jeweiligen experimentellen Anforderung vorbereitet (Einzelzellen oder Mikrogewebe, in Suspension oder adhärent), in serumfreien oder serumhaltigen Medien mit CPA versetzt (DMSO, WAK-Chemie Medical, Steinbach) und in die jeweiligen Substrate gefüllt. Es wurden folgende Substrate verwendet: Standardkryoröhrchen (nunc über VWR, Darmstadt), miniaturisierte Kryoröhrchen (Perma-Cryo-Technologie, St. Ingbert), 30-Well-Kryosubstrat aus eigener Produktion (Zimmermann et al. 2004) und Teflon-Schläuche (0,5mm Innendurchmesser, Jasco, Gross-Umstadt). Bis zum Start des computergestützten Einfrierprozesses wurden die Proben für maximal 30min bei 4°C gelagert. Die Kühlrate wurde auf 1°C/min von 4°C auf -80°C eingestellt. Nach diesem Prozess wurden die Proben in einen BioSafe-Lagertank (Cryotherm, Euteneuen) überführt und bei Temperaturen unter -140°C für mindestens 24h gelagert. Aufgetaut wurden die Proben in einem Wasserbad (37°C). Zur Minimierung des osmotischen Schocks, wurde den aufgetauten biologischen Proben tropfenweise frisches Medium zugeführt.

3.2.2 Vitrifikation durch Self Pressurized Freezing (SPF)

Zusammen mit Projektpartnern der Abteilung für Molekulare Physiologie des Max-Planck-Instituts in Dortmund wurde ein dort entwickelter Aufbau zur Vitrifikation im SPF-Verfahren evaluiert. Dazu wurden hESC- und hiPSC-Fragmentsuspensionen in einem Vitrifikationsmedium aufgenommen und mit Hilfe einer Pipette in etwa 2cm lange Aluminiumröhrchen (Goodfellow GmbH, Bad Nauheim) gefüllt. Das Medium bestand aus 10% EG (Sigma-Aldrich, Schnellendorf), 10,7% Acetamid, 30%-Gew. Ficoll 70 und 0,5M Sucrose in PBS(-,-) das mit 0,5mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) versetzt wurde (Mazur und Seki 2011). Die Röhrchen hatten einen Außendurchmesser von 0,6mm, eine Wandstärke von 0,15mm und einen Innendurchmesser von 0,3mm (Goodfellow, Bad Nauheim). Die Röhrchen wurden entweder mit einer Zange an beiden Enden zusammengedrückt oder offen mit Hilfe eines Fallbeils in ein Gefäß mit flüssigem Ethan eingetaucht. Das Ethangefäß stand in flüssigen Stickstoff, durch regelmäßiges Eintauchen eines warmen Metallspatels wurde es bei etwa -180°C flüssig gehalten. Die Proben wurden anschließend sofort in warmem PBS(-,-) aufgetaut. Die geschlossenen Röhrchen wurden mit einer Schere aufgeschnitten und die Proben in den nun offenen Röhrchen wurden mit einer Pipette entnommen. Zur Evaluation wurden sowohl die Vitalität (FDA/EtBr-Assay), als auch die Anwachsrate und der Pluripotenzerhalt bestimmt.

3.2.3 Adhärenente Vitrifikation auf Deckgläschen

Zur adhärenente Vitrifikation von hiPSCs wurden diese auf MG-beschichteten Plastik-Deckgläschen (Thermanox®, nunc, Langenselbold) kultiviert. Um die Deckgläschen besser überführen zu können, wurden sie vor der Besiedelung mit einer Schere an 2 Stellen nebeneinander eingeschnitten. Dieser Teil wurde mit einer Pinzette umgebogen, sodass ein Henkel entstand. Die verwendeten Vitrifikationslösungen wurden, ähnlich zu den bereits an hESCs evaluierten Lösungen (Beier et al. 2011;

Beier et al. 2013; Richards et al. 2004), wie folgt angesetzt: Die Vitrifikationslösung V1.1 bestand aus 80%-Vol. mTeSR-Medium, 10%-Vol. DMSO und 10%-Vol. EG. Die zweite Vitrifikationslösung V2.1 bestand aus 30%-Vol. 1M Sucrose in mTeSR, 30%-Vol. mTeSR, 20% DMSO und 20% EG. Die zu vitrifizierenden Proben wurden zunächst in Waschpuffer getaucht, dann für 1min in V1.1 inkubiert, für 5s in V2.1 überführt und anschließend direkt in flüssigen Stickstoff getaucht. Zwischen den jeweiligen Inkubationsschritten in den verschiedenen Medien, wurden die Deckgläschen seitlich auf Zellulosepapier aufgetupft, um möglichst wenig Flüssigkeit zu übertragen. Die Proben wurden entweder sofort aufgetaut oder bei Temperaturen unter -160°C gelagert.

Um den osmotischen Schock beim Auftauen zu reduzieren wurden folgende Aufwärmelösungen verwendet: Die erste Aufwärmelösung W1 enthielt 200mM Sucrose in mTeSR, die zweite Lösung W2 enthielt 100mM Sucrose. Die Deckgläschen wurden direkt in W1 überführt (37°C) und für 1min inkubiert. Anschließend wurden sie für 5min in W2 inkubiert, bevor Vitalität und Pluripotenz der Zellen untersucht wurden.

3.2.4 Pelletierungsverfahren zur tropfenbasierten Vitrifikation

Um Vitrifikationen zu erzielen die an kein Gefäß gebunden sind, wurden die verschiedene Zellsysteme in Suspension gebracht, stufenweise in 2 Schritten mit den entsprechenden Vitrifikationsmedien versehen und in flüssigen Stickstoff eingetroppt. Dazu wurde zunächst ein Aliquot der Probe zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250µl der ersten Vitrifikationslösung aufgenommen und resuspendiert. Nach 1min wurde 250µl der zweiten Vitrifikationslösung zugegeben und 1x resuspendiert. Sofort wurden die 500µl mit einer Pipette aufgenommen und schrittweise wurden 20µl in flüssigen Stickstoff getropft. Um ein Zusammenlagern der kurz nacheinander im Stickstoff eintreffenden Tropfen zu verhindern, wurden in dem Stickstoffbehälter Bereiche mit Hilfe von Alufolie abgeteilt.

Die verwendeten Zellsysteme waren L929-Einzelzellen, CHMC-Mikrogewebe, hiPSC-Fragmente und hiPSC-Mikrogewebe. Die Kryokonservierungsmedien wurden, je nach verwendetem Zelltyp, mit dem jeweiligen Kulturmedium angesetzt und bei Raumtemperatur verwendet.

Im Fall der L929 wurden das zweite Vitrifikationsmedium und die Inkubationszeiten der beiden optimiert. Die verschiedenen Zusammensetzungen sind der Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 1: Zusammensetzung der verschiedenen zweiten Vitrifikationslösungen. KM steht für das jeweilige Kultivierungsmedium des verwendeten Zellsystems. Alle Angaben sind in Volumenprozent.

V2.1	30% KM, 30% 1M Sucrose in KM, 20% DMSO, 20% EG
V2.2	40% 1M Sucrose in KM, 30% DMSO, 30% EG
V2.3.	30% KM, 30% 2M Sucrose in KM, 20% DMSO, 20% EG
V2.4.	40% 2M Sucrose in KM, 30% DMSO, 30% EG

Die vitrifizierten-Tropfen wurden entweder in, mit flüssigem Stickstoff gefüllten Standardkryoröhrchen gelagert oder sofort in warmem Waschpuffer aufgetaut (maximal 5 vitrifizierte Tropfen pro 10ml Medium). Anschließend wurden die Proben in die jeweiligen Kulturmedien aufgenommen und auf Vitalität, Funktionalität oder Pluripotenz untersucht.

Für alle weiteren Zelltypen wurden nachfolgend kontaktfreie Vitrifikationen in Suspension mit der Kombination aus den Vitrifikationslösungen V1 und V2.3 mit den entsprechenden Kulturmedien durchgeführt. Im Fall der hiPSCs wurden, wenn nicht anders erwähnt, 10 μ M ROCK-Inhibitor zugesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung, Etablierung und Charakterisierung verschiedener Zelltypen im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit in neuen Therapien

Anwendungen im Kontext neuer Therapien für regenerative Medizin sowie zur Wirkstofffindung für die medikamentenbasierte Medizin basieren auf den gleichen Zelltypen. Dabei stellt jede Anwendung eigene Anforderungen an das zelluläre Ausgangsmaterial: Zur Behandlung von Hormoninsuffizienzen muss das Bioimplantat vom Immunsystem des Empfängers zum Beispiel durch biokompatible Einschlussimmobilisierungen geschützt werden. Im Gegensatz dazu sind Bioimplantate zur Regeneration von Hautgewebe auf offene Gerüststrukturen angewiesen, die den Zellen Zugang zum dysfunktionalen Gewebe ermöglichen. Um Untersuchungen zur Präparation komplexer Zellsysteme im Kontext neuartiger Therapien durchführen zu können, mussten aus Mangel an standardisierten Modellsystemen zunächst adäquate Zelltypen identifiziert und charakterisiert werden. Lysaght und Hazlehurst teilen neue Therapien und die dazugehörigen Zellsysteme je nach ihrem späteren Anwendungsgebiet in die 3 Hauptgruppen metabolisch, zellulär und strukturell ein (siehe Abbildung 12 (Lysaght und Hazlehurst 2004)). In dieser Arbeit wurden Zelltypen für jede dieser Hauptgruppen identifiziert und untersucht. Der metabolische Bereich umfasst die Anwendungen der bioartificialen Organe, der zelluläre Bereich die Zellbioimplantationen und der strukturelle Bereich Haut, kardiovaskuläre und skelettmuskuläre Anwendungen.

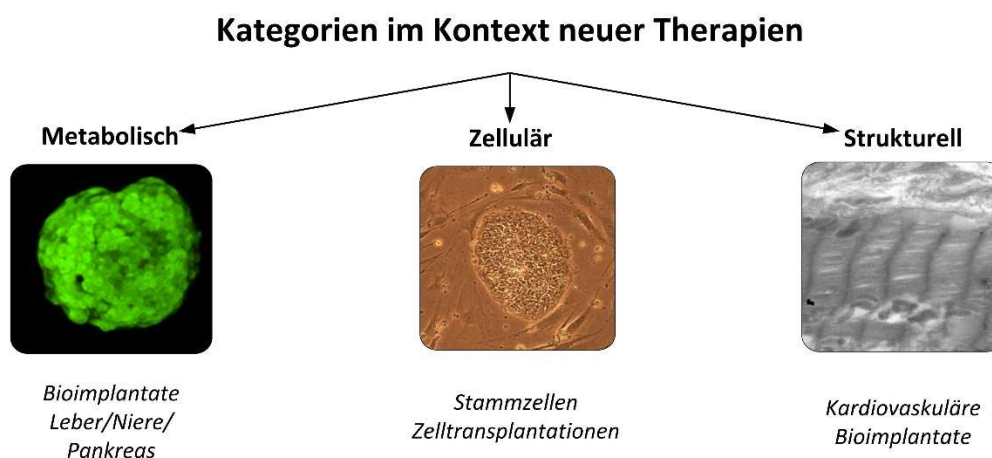


Abbildung 12: Kategorien im Kontext neuer Therapien nach Lysaght und Hazlehurst. Die mikroskopische Aufnahme in der metabolischen Kategorie zeigt eine Langerhans-Insel, die mit FDA/EtBr angefärbt wurde. In der Aufnahme für die zelluläre Kategorie wird eine mikroskopische Aufnahme einer human induzierten pluripotenten Stammzellkolonie auf einem Feederlayer im Phasenkontrast gezeigt. In der strukturellen Kategorie wird eine REM-Aufnahme eines Herzmuskelschnittes gezeigt.

4.1.1 Identifikation eines optimalen Zelltyps im Kontext metabolischer Therapien

Das am weitesten verbreitete Krankheitsbild metabolischer Dysfunktionen ist Diabetes mellitus, eine Krankheit, die durch Fehlfunktionen der Langerhans-Inseln (nachfolgend LHI) in der Bauchspeicheldrüse eine Überzuckerung des Blutes nach sich zieht. Die Hoffnung der Typ-1-Patienten, deren dysfunktionale LHIs einen Insulinmangel hervorrufen, ist die Bioimplantation funktionaler LHIs. LHIs

gelten als kleinstes Organ und machen 1-2% der Bauchspeicheldrüsenmasse aus. Sie bestehen aus den Insulin-produzierenden Betazellen, den Glukagon-produzierenden Alphazellen sowie den pankreatischen Polypeptidzellen. Die Zellen wachsen in einem dichten Verbund, der hauptsächlich Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte ausbildet. Für die vorliegende Arbeit wurden von Projektpartnern der Universität Mainz LHIs aus der Ratte präpariert. Um dieses wertvolle Primärmaterial nur gezielt einsetzen zu müssen und so unnötige Tierversuche zu vermeiden, wurden Ratteninsulinomazellen (RIN-m, ATCC) als entsprechendes Modellsystem identifiziert (siehe Abbildung 13). Zellen dieser Linie bilden in Suspension ebenso wie die LHIs sehr dichte Zell-Zell-Kontakte aus und sekretieren ebenfalls die Hormone Insulin, Glukagon und Somastotatin.

Zur Untersuchung von Bioimplantatpositionen in immunisierenden Hydrogelkapseln und den auf die Zellen wirkenden Kräfte während des Verkapselungsvorganges wurde ein physikalisches Modell eines Mikrogewebes verwendet. Sphärische, elastische Tröpfchen aus polymerisiertem Alginate weisen im Gegensatz zu natürlich gewachsenen Strukturen wie LHIs (siehe Abbildung 13) stets einen zentralen Schwerpunkt auf und räumen daraus resultierende Artefakte in den durchgeführten Berechnungen aus (Kapitel 4.2.1).

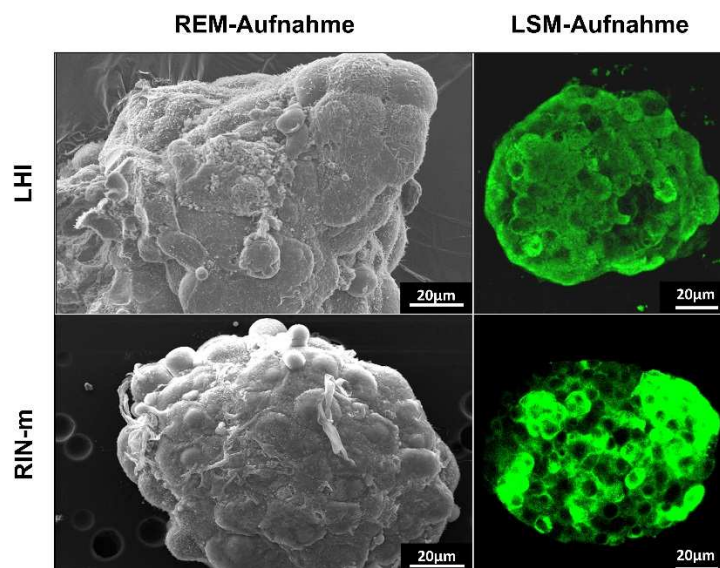


Abbildung 13: REM- und LSM-Aufnahmen von nativen Langerhans-Inseln und Mikrogeweben aus Insulinomazellen (RIN-m). Die Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop zeigen die ausgeprägten Zell-Zell-Kontakte beider Mikrogewebe. Fluoreszenz-Aufnahmen im Laser-Scanning-Mikroskop zeigen die immunzytochemische Anti-Insulinfärbung (Aufnahmen von A. Katsen-Globa).

4.1.2 Identifikation eines optimalen Zelltyps im Kontext zellulärer Therapien

Fibroblasten sind prozentual die häufigsten Zellen in den Bindegeweben. Sie kommen in den unterschiedlichsten Organen vor und unterscheiden sich auch je nach Ursprung im Phänotyp sowie im Gehalt der sekretierten Proteine, wie zum Beispiel Kollagen (Souders et al. 2009). Häufig gehen Herzerkrankungen mit einer Fibrose einher, der Überwucherung von kardialen Gewebe mit Fibroblasten, das zu einer Versteifung und somit einer gestörten Organarchitektur und -funktion führt (Krenning et al. 2010). Dabei wird das mechano-elektrische Wechselspiel zwischen den Kardiomyozyten gestört, womit das Risiko für Arrhythmien ansteigt. Aus diesen Gründen sind Fibroblasten schon seit geraumer Zeit Gegenstand der Forschung und somit eines der am besten

charakterisierten Zellsysteme. Durch den hohen Gehalt an hochkonservierten Aktinfilamente in ihrem Zytoskelett eignen sich Fibroblasten hervorragend für Untersuchungen von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen, die es im Rahmen der Zellpräparation für neue Therapien zu konservieren gilt. Mit den an Aktinfilamente gebundene Ca^{2+} -abhängigen Cadherinen und Integrinen verfügt die Zelle über die notwendigen Adhäsionskontakte, um komplexe Gewebearchitekturen bilden zu können (Gumbiner 1996). In dieser Arbeit wurden murine Fibroblasten (L929) als Modellsystem ausgewählt.

Die murinen Fibroblasten eignen sich auch besonders, um die therapeutisch relevanten adulten Stammzellen zu modellieren (Davila et al. 2004). Beide wachsen Einzelzell-basiert und adhärent. Adulte, mesenchymale Stammzellen wurden in dieser Arbeit als Modellsystem für Untersuchungen im Hinblick neuer Therapien gewählt, da sie ein großes Potenzial zur Regeneration in kardiovaskulären, ventrikulären oder osteogenen Bereichen der Medizin besitzen. Ursprünglich wurden mesenchymale Stammzellen hinsichtlich ihrer Möglichkeiten untersucht, defektes Knochengewebe zu reparieren. Im Laufe der Zeit zeigte sich aber ihr Transdifferenzierungspotenzial, das ihre Verwendung in weiteren Einsatzgebieten wie zum Beispiel in Lunge, Niere, Herz oder bei diabetischen Leiden ermöglicht. Allerdings ist das gesamte Differenzierungspotenzial noch nicht aufgedeckt (Phinney und Prockop 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane adulte mesenchymale Stammzellen verwendet, die aus Nabelgewebe gewonnen wurden.

Weitere Zellsysteme, die in dieser Arbeit im Kontext der zellulären Therapie verwendet wurden, sind embryonale und induziert pluripotente Stammzellen (hESCs, hiPSCs). Beide Zelltypen besitzen die Fähigkeit, in sämtliche Zelltypen aller Keimblätter differenzieren zu können und sind durch ihre erhöhte Telomeraseaktivität theoretisch unbegrenzt teilbar. Im Gegensatz zu hESCs unterliegt die Verwendung von hiPSCs keinen ethischen Einschränkungen, da letztere aus beliebigen somatischen Zellen reprogrammiert werden können und so als Modellsystem für hESCs dienen. Beide Zelltypen wachsen koloniebasiert und werden durch aufwändiges Säubern der Kultur nach ihrem morphologischen Erscheinungsbild im undifferenzierten Zustand erhalten. Dabei zeigen sich die hiPSCs in ihrer Kultivierung aufwendiger; für sie ist es in der Standardkultur notwendig, sämtliche differenzierte Bereiche durch mechanisches Freikratzen zu entfernen, wohingegen in der hESC-Standardkultur undifferenzierte Bereiche übertragen werden. Für den Erhalt einer undifferenzierten hiPSCs-Kultur ist bereits die Größe der ausgesäten Fragmente entscheidend. Wie in Abbildung 14 A gezeigt wird, konnten die höchsten Anwachsrate der hiPSC-Fragmente nach einer Standardpassage bei Kolonien größer als $40\mu\text{m}$ erreicht werden. Ausgewertet wurden alle Koloniefragmente, die mehr als 4 deutlich sichtbare Zellen aufzeigten, beziehungsweise einen Querschnitt von mindestens $10\mu\text{m}$. Koloniefragmente mit einem Durchschnitt kleiner als $40\mu\text{m}$ wuchsen im Mittel weniger als 15% an, nach 3 Tagen konnten kaum Kolonien in dieser Kultur gefunden werden. Viele Fragmente zerfielen zu Einzelzellen, starben ab oder differenzierten in der Folge. Ebenso konnte belegt werden, dass zu große Fragmente in Kolonien resultierten, die morphologisch differenziert erschienen (siehe Abbildung 14 B). Untersuchungen zur Vitalität der Koloniefragmente mit FDA/EtBr-Assay zeigten, dass eine hohe Vitalität der abgelösten Koloniefragmente keinen Hinweis auf das Anwachverhalten liefert (Daten nicht gezeigt) und die Vitalität somit kein adäquater Parameter zur Kultivierung der hiPSCs ist.

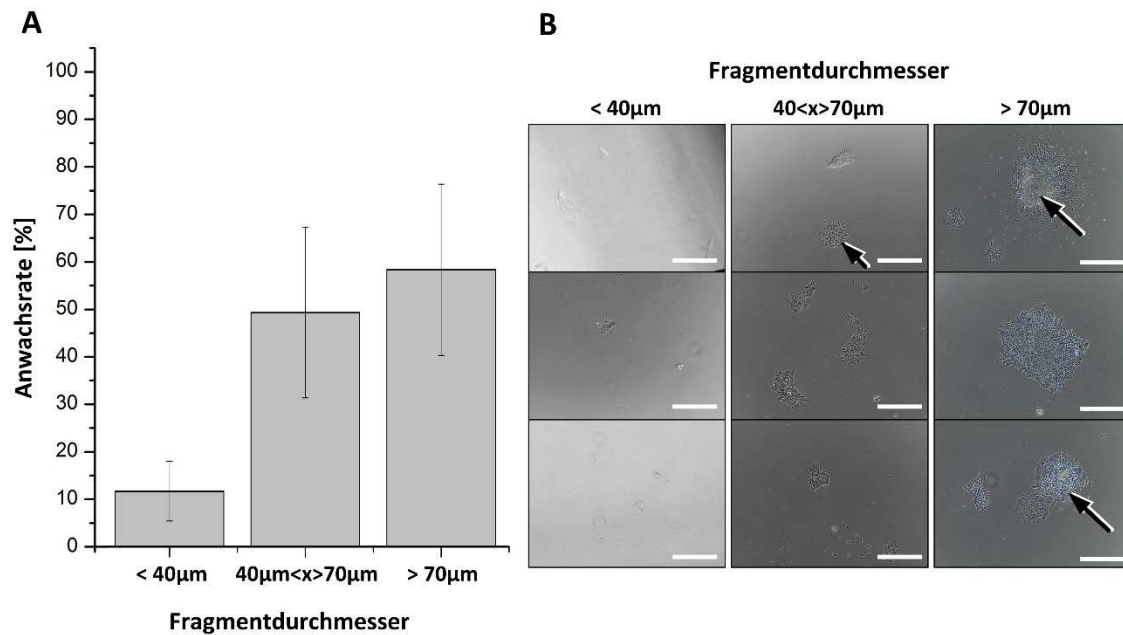


Abbildung 14: A Einfluss der Fragmentgröße auf das Anwachsverhalten von hiPSCs. B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von hiPSC-Kolonien im Phasenkontrast 24h nach dem Aussäen. Die Pfeile zeigen differenzierte Kolonien. Die Wahrscheinlichkeit differenzierte Kolonien zu erhalten, steigt mit der Größe der ausgesäten Fragmente. Die Balken entsprechen 100µm; N=3.

Dieses relativ schmale Fenster der optimalen Fragmentgröße zeigt sich als entscheidend für die Verwendung von hiPSCs als Zellsystem für Untersuchungen im Hinblick neuer Therapien, da sie im Gegensatz zu den hESCs sehr empfindlich auf Scherkräfte im Passagierungsprozess reagierten. Um den schädlichen Einfluss der zahlreichen Pipettierschritte quantifizieren zu können, wurden hiPSCs gemäß des Standardprotokolls abgelöst und verschieden oft mit einer 1ml Pipette und einer Kanüle resuspendiert. Es wurde jeweils 1ml der Zellsuspension in 1s pipettiert beziehungsweise injiziert. Anschließend wurden die verbleibenden Größen aller Fragmente aus mindestens 4 mikroskopischen Aufnahmen bestimmt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 15 dargestellt sind. Bereits nach dem ersten Pipettierschritt reduzierte sich die Fragmentgröße auf weniger als 30% im Mittelwert relativ zur Kontrolle, was der oberen Grenze des Fensters zum optimalen Anwachsen (70µm) entsprach. Nach bereits 5 Pipettierschritten war die kritische Mindestgröße unterschritten.

Den Vorteil den die hiPSCs im Hinblick auf neue Therapien mit sich bringen, erkaufte man sich also durch eine schwierigere Kultivierung dieser Zellen mit Hindernissen, die stets berücksichtigt werden müssen.

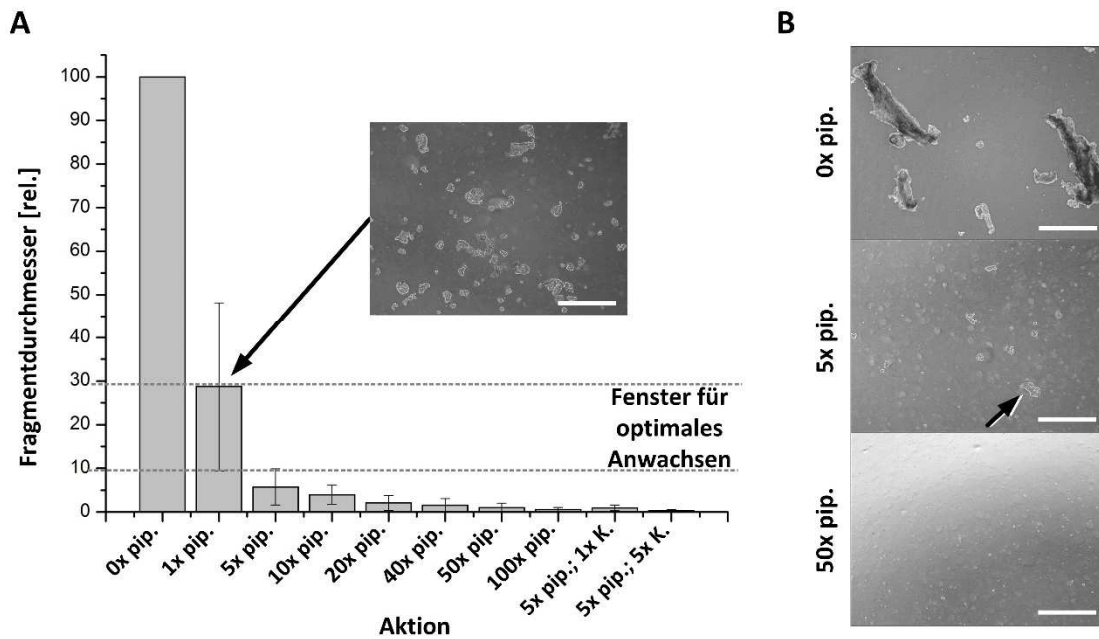


Abbildung 15: Einfluss der mechanischen Belastung durch Pipettieren oder Injizieren auf die Größe der hiPSC-Fragmente. **A** Einfluss wiederholter Pipettierschritte (pip.) und Injektionsschritte durch eine Kanüle (K.); die gestrichelten Linien zeigen das Fenster für die optimale Anwachsrate (Fragmentgrößen zwischen 40 und 70µm). **B** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast nach 0, 5 und 50 Pipettierschritten. Die Balken entsprechen 100µm; N=3.

4.1.3 Identifikation eines optimalen Zelltyps im Kontext struktureller Therapien

Wohl keine funktionalen Interaktionen von Zellen sind so eindeutig wie Mikrogewebe aus Herzmuskelzellen, die autonom kontrahieren. Diese auf den ersten Blick sichtbare Funktion ist ein hochkomplexes Zusammenspiel von Transmembran-Ionenkanälen und Proteinen des kontraktile Apparates. Für sämtliche Präparationen, die im Kontext neuer, struktureller Therapien anfallen, gilt es daher, diese Funktion über den gesamten Prozess zu konservieren. Um diese Präparationsschritte zu untersuchen, wurde das kardiale Zellsystem der embryonalen Herzmuskelzellen aus Hühnern (CHMC) verwendet, die nach ihrer Gewinnung und der anschließenden mechanischen und enzymatischen Dissoziation zu Einzelzellen wieder zu Mikrogeweben gezüchtet werden, die autonom und zu 100% kontrahieren. Wie in Abbildung 16 gezeigt, wurden dazu 7 Tage alte Hühnerembryonen dekaptiert. Anschließend wurden die Herzbeutel aus dem Brustkorb präpariert und mechanisch sowie enzymatisch zu einer Einzelsuspension zerkleinert. Mikrogewebe, die aus dieser Zellsuspension nach 5-tägiger Kultivierung entstehen, zeichnen sich durch eine autonome Kontraktion aus.

Es ist jedoch bekannt, dass solche Modellsysteme, die aus Einzelzellen zusammengesetzt wurden, nicht beziehungsweise nur in geringem Maße die strukturellen Eigenschaften besitzen, die adulte kardiale Gewebe auszeichnen (vergleiche den kardialen Gewebeschnitt aus Abbildung 12). Aus diesem Grund wurden über Projektpartner (Sanofi-Aventis und Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) porcine und humane Herzschnitte aus explantiertem Gewebe bezogen. Diese wurden zu 200µm dicken Schnitten verarbeitet und maximal 24h auf Eis in der Organtransportlösung Hypothermosol transportiert. Da diese Gewebe keine offensichtliche Funktion wie die Kontraktion ausüben, wurden diese durch

hochauflösenden Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop untersucht, wodurch die Einflüsse der Präparationsschritte auf die komplexe Ultrastruktur visualisiert werden kann.

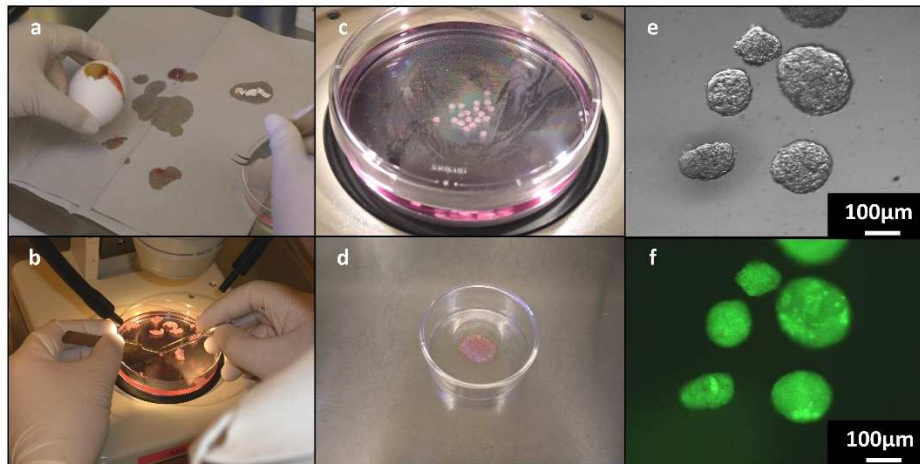


Abbildung 16: Präparation der Herzmuskelzellen. a Aufbrechen der Schale eines für 7 Tage bebrüteten Eies und Dekaptation des Embryos. b Öffnen des Embryos und Entnahme des Herzbeutels. c Entnommene Herzen in Medium. d Mechanisch zerkleinerte Herzbeutel. e Mikroskopische Aufnahme kontrahierender Mikrogewebe aus fetalen Herzmuskelzellen von Hühnern im Phasenkontrast. f Mikroskopische Aufnahme kontrahierender Mikrogewebe, angefärbt mit FDA/EtBr.

4.2 Untersuchungen zur *in vitro* Aufbereitung therapeutisch relevanter Zellsysteme

Nach der Gewinnung relevanter Zellen im Kontext regenerativer und medikamentenbasierter Medizin muss das Augenmerk auf die weitere Verarbeitung der Zellen gelegt werden. In diesem Schritt müssen sorgfältig Gerüststrukturen ausgewählt werden, die unterstützend oder gar notwendig sind für die zukünftige Applikation der Zellen. In metabolischen Kategorien, wie zum Beispiel der Behandlung von Diabetes-Patienten mit Insulin-produzierenden Zellen aus einem Spendergewebe ist eine immunisierende Einschlussimmobilisierung unablässig, wohingegen in zellulären Kategorien ein Kontakt zum Zielgewebe durch offene Gerüststrukturen Voraussetzung ist.

4.2.1 Untersuchungen zur Positionierung von Bioimplantaten in immunisierenden Hydrogelkapseln im Kontext metabolischer Therapien

Die Einschlussimmobilisierung von Zellen und Mikrogeweben stellt eine vielversprechende Methode dar, Patienten mit hormonellen Mangelerscheinungen langfristig therapieren zu können. Das native Biopolymer Alginat, das aus Guluron-(G) und Mannuronsäuren (M) besteht und aus Braunalgen gewonnen wird, erwies sich in zahlreichen Studien als hervorragendes Material zur Verkapselung therapeutisch relevanter Zellen oder Mikrogewebe: Durch Eintropfen einer Alginat-Zell-Suspension in eine Polymerisationslösung (Fällbad) mit mehrwertigen Kationen bilden sich Kapseln aus einem stabilen Hydrogel. Dieses erlaubt den eingeschlossenen Zellen und Mikrogeweben die Versorgung mit Nährstoffen sowie den Abtransport therapeutischer Faktoren, wie zum Beispiel Insulin. Die Alginathülle schirmt das Bioimplantat gegenüber dem Immunsystem des Empfängers ab, wodurch auf Immunsuppressiva verzichtet werden kann. Aus diesem Grund spielt die Zentralität des Bioimplantates im Inneren der Kapsel eine entscheidende Rolle. Bislang ist noch keine Methode bekannt, die die Position der Bioimplantate im Inneren der Kapsel und damit die Qualität der Kapseln bereits während des Polymerisationsprozesses evaluieren kann.

Konstruktion des Aufbaus

In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt eine Alginatkapsel während des Eintropfvorgangs gleichzeitig auf ihr charakteristisches Deformationsverhalten und die Position des Bioimplantates hin zu untersuchen. Dazu wurde eine Apparatur entwickelt, deren schematische Zeichnung in Abbildung 17 A gezeigt wird. An einem Stativ wird eine Spritze befestigt, die mit nicht-polymerisierter Alginatsuspension und Bioimplantatmodellen gefüllt ist. Die Alginatsuspension wurde zur Kontrasterhöhung mit 2mg/ml Phenolrot angefärbt, die Bioimplantatmodelle mit Alcianblau. Darunter steht ein Fällbad mit einer 20mM BaCl₂-Lösung, deren Kationen das Hydrogel Alginat vernetzen. Durch manuellen Vorschub der Spritze reißt ein Tropfen der Suspension reproduzierbar an einer glatten Kanüle mit einem Innendurchmesser von 0,4mm gerade ab und fällt senkrecht über eine Höhe von 13,5cm in das Fällbad. Für zusätzliche Informationen wurden in dem Fällbadgefäß eine Skala und ein Aluminiumspiegel angebracht. Der Eintropfvorgang sowie der Polymerisationsprozess werden mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgezeichnet. Die Videos wurden zu Einzelbildern extrahiert und ausgewertet. Der Spiegel steht in 45° Winkel zur Kamera und erweitert so die frontale Ansicht der Alginatkapsel bei absoluter Synchronität um die laterale Ansicht (siehe Abbildung 17 B), wodurch die

Raumkurve (Trajektorie) des Bioimplantates im Kapselinneren dreidimensional untersucht werden konnte.

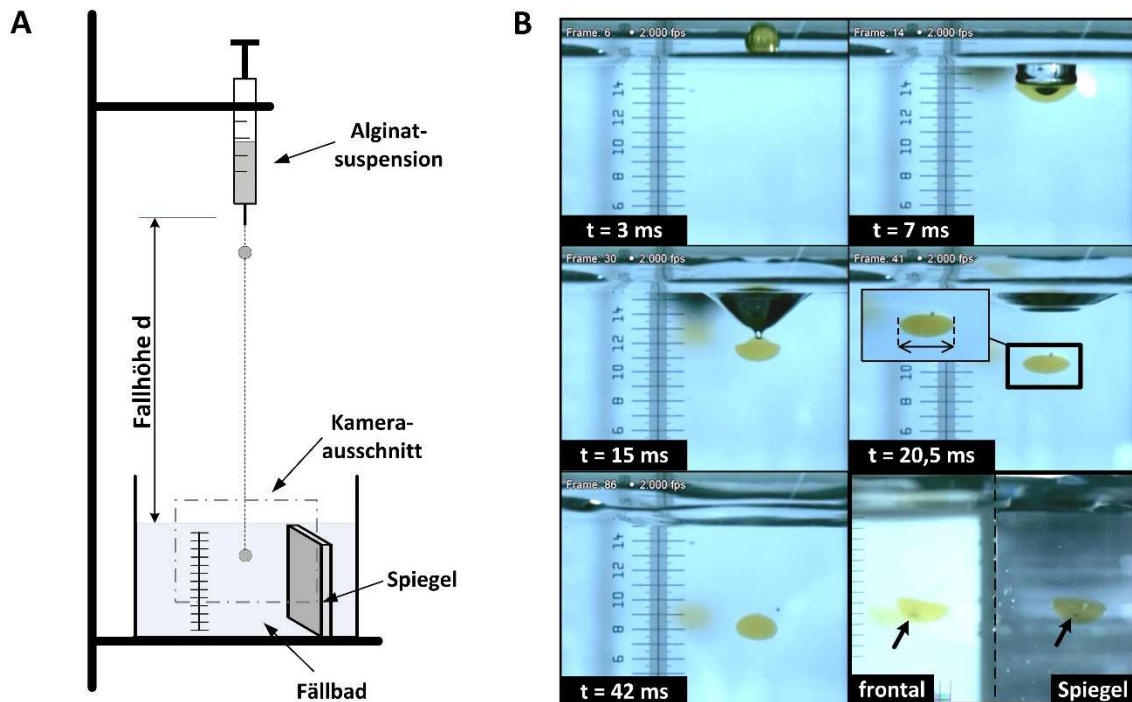


Abbildung 17: A Schematische Darstellung des Aufbaus zur entwickelten Deformations- und Trajektorienmethode. Um homogene Tropfen zu generieren, wurde eine glatte Kanüle verwendet von der Tropfen gleichmäßig abreißen. Nach der Fallhöhe d treffen die Tropfen auf die Oberfläche des Fällbades. Der Eintropfvorgang sowie die anschließende Polymerisation der Kapsel werden mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen. B Repräsentative Bilder aus einem Hochgeschwindigkeitsvideo; die Skala ist in mm eingeteilt. Im letzten Bild der Serie ist ein Bioimplantatmodell in der Alginatkapsel zu sehen (schwarze Pfeile): Durch den Spiegel (Grenze wird durch die gestrichelte Linie angedeutet) im Fällbad wird in dem Hochgeschwindigkeitsvideo, das von nur einer Kamera aufgezeichnet wird, die dritte Dimension ohne Synchronisationsprobleme sichtbar. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2013a.

Deformationsmethode zur Validierung von Hydrogelkapseln in Vernetzungsprozessen

Misst man die Ausdehnung der Kapsel an ihrer breitesten Stelle während des Eintropfvorganges und der nachfolgenden Polymerisation gegen die Zeit (siehe Abbildung 18 bei $t=20,5\text{ms}$), lassen sich reproduzierbare, charakteristische Stationen in den Graphen erkennen, die spezifisch nach den veränderten Parameter variieren: Die Alginatsuspension wird beim Auftreffen auf die Fällbad-Oberfläche am stärksten deformiert, was sich im Einschlagsmaximum des jeweiligen Deformationsgraphen niederschlägt. Nach dem Ablösungsminimum, an dem die Kapsel von der Oberfläche des Fällbades abreißt, nimmt der horizontale Durchmesser an der Relaxationsspitze wieder zu, bis die Kapsel im Laufe der Abnahmephase zu ihrem finalen Durchmesser im Fällbad findet (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Nomenklatur der charakteristischen Stationen in einem Deformationsgraph mit den jeweiligen Nachweisen in den zugehörigen Abbildungen.

Nomenklatur der charakteristischen Stationen	Nachweis in den Abbildungen
Einschlagsmaximum	Abbildung 17 B t=7ms und Abbildung 18 A (1)
Ablösungsminimum	Abbildung 17 B t=15ms und Abbildung 18 A (2)
Relaxationsspitze	Abbildung 17 B t=20,5ms und Abbildung 18 A (3)
Abnahmeperiode	Abbildung 17 B t=42ms und Abbildung 18 A (4)

Eine 1:1 Mischung der Alginatlösungen aus den Braunalgen *Lessonia nigrescens* (*L.n.*) und *Lessonia trabeculata* (*L.t.*) hat sich mit einem Verhältnis 65% Guluron- zu 35% Mannuronsäureketten für biomedizinische Zwecke als geeignet herausgestellt und wurde hier verwendet. Die Deformationsgraphen in Abbildung 18 A zeigen, dass die 1:1-Mischung der beiden untersuchten Alginatlösungen aus zwei verschiedenen Algenspezies in gleicher Konzentration zwischen den beiden reinen Alginatlösungen liegt. Alginatlösungen aus *L. n.* (roter Graph), mit einem hohen Gehalt an den linearen Mannuronsäureketten, zeigten sich während des Eintropfvorganges als weniger deformierbar als die Alginatlösung aus *L. t.* (schwarzer Graph). Die resultierende Größe der Alginatkapseln hängt ebenfalls von der gewählten Algenspezies ab; Kapseln aus *L.n.*-Alginat weisen mit einem relativen Wert von 1,05 einen kleineren Durchmesser auf als Kapseln aus *L.t.*-Alginat (1,14 rel.). Die relativen Werte beziehen sich auf den initialen Durchmesser des Alginattropfens vor dem Auftreffen (siehe Abbildung 17 B t=3ms). Der absolute Wert des Kapseldurchmessers einer 1:1-Mischung aus *L.n.* und *L.t.* beträgt $2,39 \pm 0,02\text{mm}$. Ebenso zeichnen sich charakteristische Veränderungen an den Deformationsgraphen ab, wenn man die Alginatlösungen mit therapeutisch relevanten Zusätzen wie humanem Serumalbumin (HSA), Poloxamer oder Zellen mischt (siehe Abbildung 18).

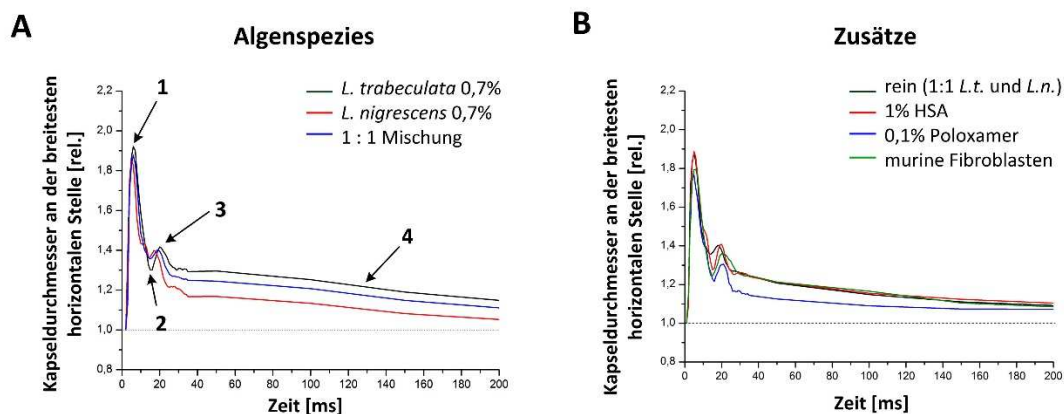


Abbildung 18: Deformationsgraphen von Alginatkapseln. Aufgetragen wird der relative Durchmesser einer Kapsel an ihrer breitesten Stelle gegen die Zeit in ms. Die reine Deformationsmethode, ihre Reproduzierbarkeit, sowie weitere Parameter, die einen Einfluss auf die Kapseldeformation haben, wurden in der Dissertation von Dr. F. Ehrhart detailliert beschrieben (Ehrhart 2008). A Einflüsse der Algenspezies auf die Kapseldeformation während des Eintropfens in die Vernetzerlösung. Die charakteristischen Stadien während des Vernetzungsprozesses sind das Einschlagsmaximum (1), das Ablösen von der Flüssigkeitsoberfläche am Ablösungsminimum (2), die Relaxationsspitze (3) und die Abnahmeperiode des Kapseldurchmessers (4); N=5. B Einflüsse verschiedener therapeutisch relevanter Zusätze auf die Kapseldeformation. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2013a; N=3.

Der Zusatz von 1% HSA hat keine Auswirkung auf das Einschlagsmaximum oder die Relaxationsspitze, senkt aber das Einschlagsminimum charakteristisch ab. Die Zugabe von 0,1% Poloxamer reduziert den Kapseldurchmesser komplett bis zum Endpunkt, wobei die Relaxationsspitze um 2ms verzögert ist und die Abnahmephase bereits nach 100ms annähernd linear zu sein schien. In einem weiteren Versuchsansatz wurde der Einfluss eines vitalen Bioimplantatmodells auf die Kapseldeformation untersucht. Dazu wurde die Alginatlösung mit einer Zellsuspension muriner Fibroblasten (L929, $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml) gemischt. Im Vergleich zum Deformationsgraph der gleichen, unbeladenen Alginatlösung, wiesen die beladenen Kapseln eine ebenfalls um 2ms verschobene Relaxationsspitze auf.

Trajektorienmethode zur Validierung der Bioimplantatposition in Hydrogelkapseln während des Polymerisationsprozesses

Als Bioimplantatmodell in den Alginatkapseln dienten bereits auspolymerisierte Alginatkügelchen, die nach der „Crystal-Gun“-Methode hergestellt und für einen besseren Kontrast mit dem polyvalenten Farbstoff Alcianblau angefärbt wurden. Durch den integrierten Spiegel im Versuchsaufbau war die Bestimmung der Bioimplantatposition im dreidimensionalen Raum ohne Synchronisationsprobleme möglich (siehe Abbildung 17 B, letzte Aufnahme). Die Vorgehensweise ist in Abbildung 19 schematisch dargestellt. Zunächst wurde der Kapselmittelpunkt sowie die frontale und laterale Position des Bioimplantates relativ zum Kapselmittelpunkt in den Einzelaufnahmen der Hochgeschwindigkeitsvideos bestimmt (siehe Abbildung 19 A und B). Der Kapselmittelpunkt ist in den Abbildungen jeweils als rotes Kreuz dargestellt. Von Millisekunde 0 bis 50 wurden die Positionen in Abständen von 1ms bestimmt, um die Auswirkungen des Einschlags auf das Bioimplantat bis zur beginnenden Abnahmephase hochaufgelöst untersuchen zu können. Danach wurden die Positionen in Abständen von 2ms bestimmt. Zur Visualisierung wurden die Positionen des Bioimplantates in ein Koordinatensystem überführt, in dem der Kapselmittelpunkt als Ursprung dient. Die einzelnen Datenpunkte wurden nach der Zeit farbkodiert. Eine repräsentative Bewegungstrajektorie eines Bioimplantates in einer Alginatkapsel während des Polymerisationsprozesses ist in Abbildung 19 C dargestellt.

Um die Signifikanz der Raumkurven zu untersuchen, wurden 9 Durchgänge einer 0,5% Alginatlösung und 6 Durchgänge einer 0,7% Alginatlösung ausgewertet. Die resultierenden Trajektoriengraphen sind in Abbildung 20 dargestellt. Um alle Durchgänge vergleichen zu können, wurden diese auf den jeweiligen Kapselmittelpunkt normiert. Abbildung 20 A zeigt farbkodiert den Einfluss der Alginatkonzentration in den Kapseln auf den Bewegungsradius der Bioimplantatmodelle. Trajektorien in 0,5% Alginatkapseln sind als weiße Punkte dargestellt, die Trajektorien in den visköseren 0,7% Alginatkapseln sind als grüne Punkte dargestellt. Bioimplantatmodelle in den geringer konzentrierten Kapseln legten mit $0,79 \pm 0,49$ mm im Mittel die größeren Distanzen zurück, im Vergleich zu den Modellen in 0,7% Kapseln, die im Mittel nur $0,25 \pm 0,09$ mm zurücklegten.

In dem Dichtegraph, der in Abbildung 20 B dargestellt ist, wurden alle untersuchten Durchgänge als schwarze Kreuze dargestellt, um den Bereich zu verdeutlichen, in denen kein Bioimplantatmodell je vordrang („No-Go-Area“). Dieser Bereich lag kegelförmig um das Kapselzentrum und breitet sich nach oben aus. Alle Raumkurven der Bioimplantate in 0,7% Alginatkapseln und die meisten Raumkurven der Bioimplantate in 0,5% Alginatkapseln lagen in der unteren Kapselhälfte.

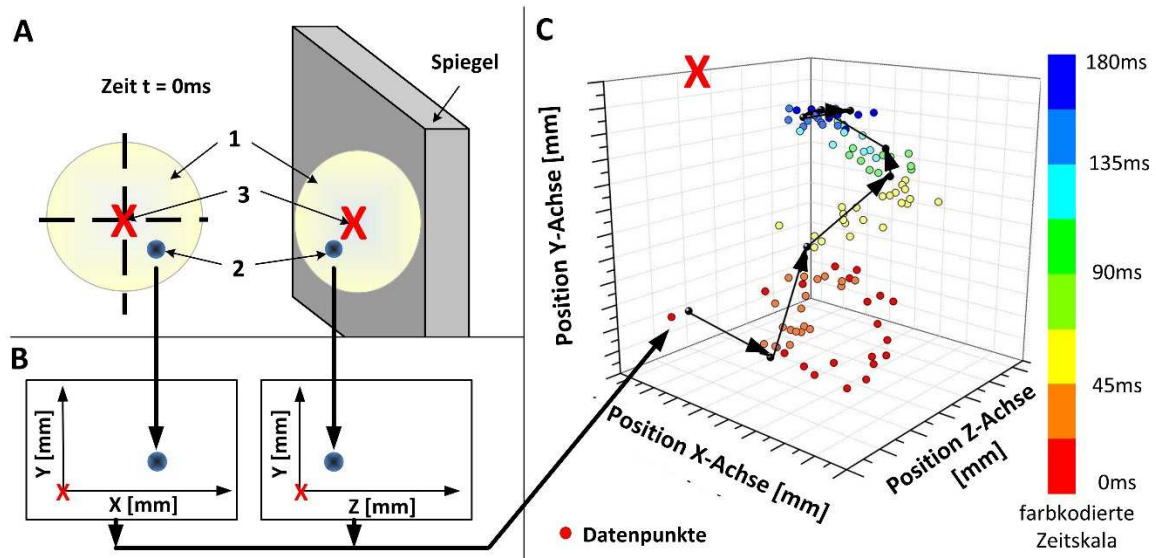


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Raumkurvenbestimmung und der Generierung eines Trajektoriengraphs. A Bestimmung der frontalen und lateralen Lage eines Bioimplantatmodells (2) zum Zeitpunkt t relativ zum Kapselzentrum (3, rotes Kreuz) einer Alginatkapsel (1). B Transformation der Position in ein YX- und YZ-Koordinatensystem, bei denen das Kapselzentrum den Mittelpunkt darstellt. C Resultierende Raumkurve, dargestellt in einem Trajektoriengraph eines Bioimplantates in einer Alginatkapsel während des Vernetzungsprozesses. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der Trajektorien in einem zeitlichen Abstand von 45ms. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2013a.

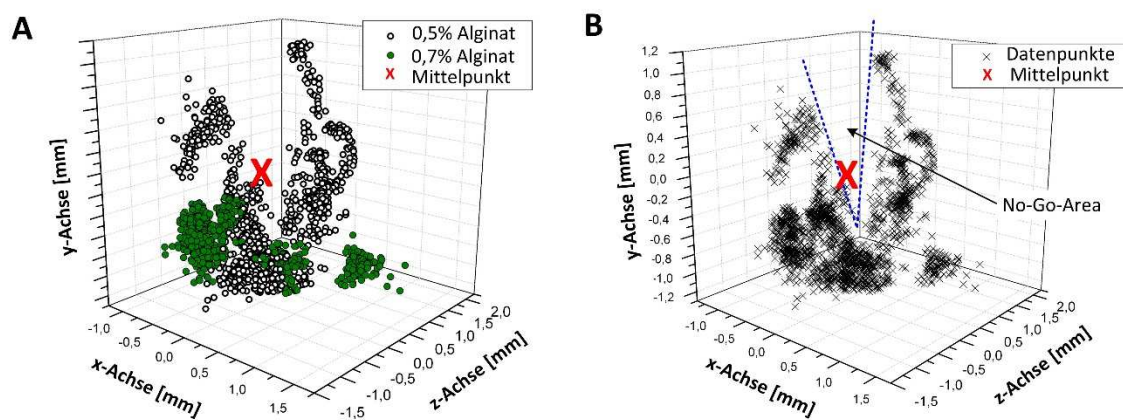


Abbildung 20: A Trajektoriengraph von Bioimplantaten in 15 Alginatkapseln. Die Datenpunkte wurden entsprechend der Alginatkonzentration gefärbt, das Kapselzentrum stellt den Mittelpunkt dar und wird als rotes Kreuz gezeigt. In Kapseln aus 0,5% Alginat (weiße Punkte; $N=9$) zeigen die Bioimplantate mit $0,79 \pm 0,46\text{mm}$ größere Bewegungen als in den Alginatkapseln aus 0,7% Alginaten (grüne Punkte; $0,25 \pm 0,09\text{mm}$; $N=6$). B Dichtegraph aller Versuche ($N=15$) zeigt deutlich einen Bereich um den Mittelpunkt in denen kein Bioimplantat zu finden war (gestrichelte blaue Linie, „No-Go-Area“). Abbildung verändert aus Meiser et al. 2013a.

Die Bioimplantatgeschwindigkeit v und -beschleunigung a wurde nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\vec{v} = \begin{pmatrix} v_x \\ v_y \\ v_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} dx/dt \\ dy/dt \\ dz/dt \end{pmatrix} \text{ und } |\vec{v}| = \sqrt{v_x^2 + v_y^2 + v_z^2} \quad \text{Formel (5)}$$

$$\vec{a} = \begin{pmatrix} a_x \\ a_y \\ a_z \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} d^2x/dt^2 \\ d^2y/dt^2 \\ d^2z/dt^2 \end{pmatrix} = \vec{v} \text{ und } |\vec{a}| = \sqrt{a_x^2 + a_y^2 + a_z^2} \quad \text{Formel (6)}$$

Trägt man die Geschwindigkeit und Beschleunigung der Modelle gegen die Zeit auf und setzt sie ins Verhältnis mit dem Deformationsgraphen, wie in Abbildung 21 gezeigt, wird die Kohärenz dieser Eigenschaften deutlich. Sowohl Geschwindigkeit, als auch Beschleunigung der Bioimplantate wiesen mit der stärksten horizontalen Deformation bis zum Eintritt in die Abnahmephase auch die größten Werte auf. In 0,5% Alginatekapseln wurde eine Geschwindigkeit v von $0,79 \pm 0,10 \text{ mm/ms}$ erreicht; v in 0,7% Alginatekapseln $0,75 \pm 0,09 \text{ mm/ms}$. Während der Abnahmephase zeigten sowohl Beschleunigung, als auch Geschwindigkeit die Eigenschaften einer gedämpften Oszillation, die Werte betragen $v(0,5\%) = 0,13 \pm 0,02$ und $v(0,7\%) = 0,1 \pm 0,02 \text{ mm/ms}$. Während man jedoch bei der Geschwindigkeit noch Unterschiede zwischen den Alginatekonzentrationen erkennen konnte, lagen die Beschleunigungen dort in beiden Konzentrationen auf annähernd gleichem Niveau. In der Phase des Einschlagsmaximums betrug die Beschleunigung $0,23 \pm 0,1 \text{ mm/ms}^2$

Diese Methode ermöglicht erstmals eine Quantifizierung der schädigenden Einflüsse sowie eine Qualitätsanalyse von Bioimplantaten während der Einschlussimmobilisierung.

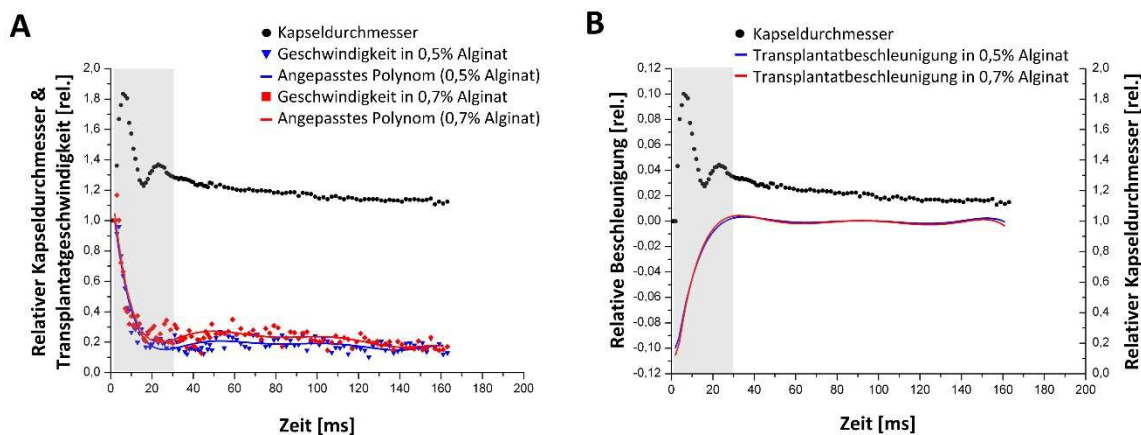


Abbildung 21: A Kohärenzgraph der Bioimplantatgeschwindigkeit in verschiedenen Alginatekonzentrationen (N=6 für jede Konzentration). Die schwarzen Punkte zeigen einen Deformationsgraph als Referenz, um die Geschwindigkeiten den einzelnen Stadien des Vernetzungsprozesses zuweisen zu können. Die Mittelwerte der Geschwindigkeit werden als Punkte gezeigt, das jeweilige angepasste Polynom als Linie (blau für 0,5% Alginate und rot für 0,7% Alginate). B Kohärenzplot der Bioimplantatbeschleunigung. Die aufgetragene Beschleunigung berechnet sich als die erste Ableitung der angepassten Polynome der Geschwindigkeit. In A und B sind Einschlagsmaximum, Ablösungsminimum und Relaxationsspitze als graue Fläche von 0 bis 25ms eingezeichnet. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2013a; N=6 für beide Alginatekonzentrationen.

4.2.2 Untersuchungen zur Immobilisierung therapeutisch relevanter Zellen in offenen Gerüststrukturen im Kontext von zellulären und strukturellen Therapien

Im Kontext zellulärer und struktureller Kategorien neuer Therapien sind neben den zuvor behandelten immunisierenden, metabolischen Therapien auch Zelltypen gefragt, die sich in einen Empfängerorganismus integrieren müssen. Das Einbringen hematopoetischer Stammzellen zur Behandlung von Leukämiepatienten oder das Einbringen mesenchymaler Stammzellen für die Heilung von Knochen sind dabei nur zwei Anwendungsbeispiele, die bereits den Einzug in die tägliche medizinische Routine gehalten haben. Dazu ist es notwendig, eine ausreichende Menge an funktionalen Zellen lokal definiert in das Empfängergewebe einzubringen und sicherzustellen, dass diese unmittelbar Kontakt zu ihrem neuen Umfeld ausbilden können. Das bedeutet, dass die Möglichkeit Fokalkontakte auszubilden und Zellkommunikation zu betreiben durch die Präparation nicht beeinträchtigt werden darf. Offene Gerüststrukturen aus biokompatiblen Materialien, die eine Oberfläche mit biologischen oder mechanischen Signalen zur Adhäsion und gute Diffusionswege aufweisen, sind im Kontext solcher Therapien das Mittel zur Wahl. Im Rahmen dieser Arbeit wurden flexible Alginat-Hydrogele untersucht, deren großporige Struktur durch Eiskristalle während eines definierten Kühlprozesses erreicht wurde. Auf Grund dieses Prozesses werden diese Konstrukte als Kryogele bezeichnet. Durch den Zusatz eines Gelatine-Anteils weisen die Kryogele Adhäsionssignale auf, die adhären Zellsystemen eine Wachstumsoberfläche bieten. Um eine Delokalisation oder ein Auswaschen der therapeutisch wirksamen Zellen am Wirkort zu verhindern, ist eine Immobilisierung dieser unablässig. Mesenchymale Stammzellen mit ihrem großen regenerativen Potenzial finden bereits medizinische Anwendung und eignen sich somit ausgezeichnet zur Untersuchung von Immobilisierungen von therapeutisch relevanten Zellen im Kontext zellulärer und struktureller Therapien.

Abbildung 22 zeigt eine repräsentative REM-Aufnahme eines mit hMSCs bewachsenen Gelatine-Alginat-Kryogels. Eiskristalle haben während der Präparation Poren in das Hydrogel gedrückt, die sich durch das ganze Konstrukt ziehen und zwischen 10 und 100µm groß sind. Durch die kovalente Kopplung der Gelatine an die sauren Polysaccharidketten im Alginat fanden die hMSCs genügend Adhäsionspunkte und ließen sich sehr gut auf den Gelatine-Alginat-Kryogelen kultivieren. In der Abbildung wurden einzelne Zellen durch weiße Dreiecke kenntlich gemacht.

In Abbildung 23 wird in repräsentativen CSLM und REM-Aufnahmen gezeigt, wie sich hMSCs im Verlauf einer mehrtägigen Kultivierung auf den Kryogelen verhalten. Dazu wurden die Kryogele auf etwa 5x5x2mm zurechtgeschnitten, mit $1 \cdot 10^5$ hMSCs in 100µl besiedelt und für 0,5, 2, 24 und 48h in einem Inkubator kultiviert. Zur besseren Visualisierung wurden die Zellen vor den CSLM-Aufnahmen mit FDA/EtBr angefärbt, die lebenden hMSCs (grün) sind von den toten Zellen (rot) deutlich zu unterscheiden. Nach einer Kultivierungsdauer von 0,5h haben die Zellen bereits erste Fokalkontakte ausgebildet, die Zellen sind aber noch weitestgehend kugelförmig (weiße Dreiecke in Abbildung 23). Mit zunehmender Kultivierungsdauer breiten sich die Zellen aus, bilden weitere Fokalkontakte und werden flacher. Die REM-Aufnahmen zeigen in jeder Probe die für hMSCs typischen Mikrovilli-Strukturen, die Aufnahmen im Rückstreuungselektronenmodus (REM-RE-Aufnahmen) lassen die Ausbreitung der einzelnen Zellen deutlich erkennen.

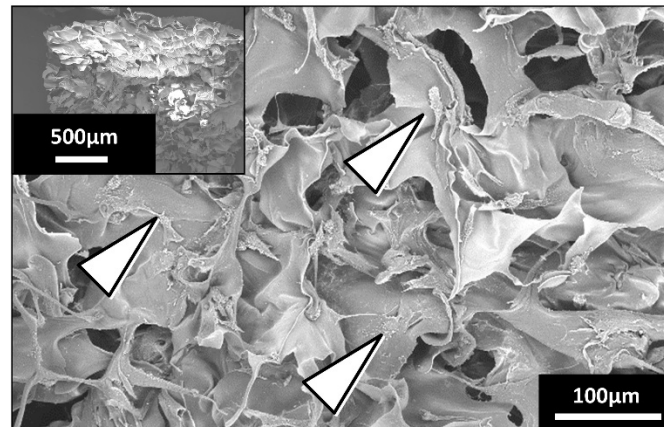


Abbildung 22: Repräsentative REM Aufnahme eines Gelatine-Alginat-Kryogels. Die weißen Dreiecke zeigen adhärenente hMSCs 24h nach der Besiedelung. Abbildung verändert aus Katsen-Globa et al. 2014.

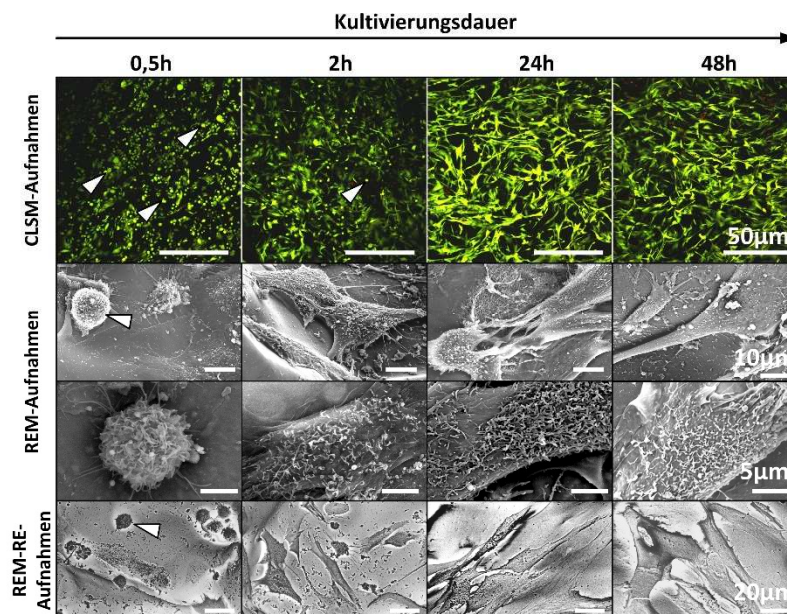


Abbildung 23: Kultivierung von hMSCs auf Gelatine-Alginat-Kryogelen. Nach 0,5h Kultivierung liegen die Zellen am häufigsten noch kugelförmig (weiße Dreiecke), mit wenig Oberflächenkontakt vor. Mit zunehmender Kultivierungsdauer breiten sich die Zellen aus, werden flacher und intensivieren den Kontakt zur Oberfläche. Die Balken in der oberen Reihe der REM-Aufnahmen entsprechen 10µm, in der unteren 5µm. In den Aufnahmen im Rückstreuerelektronenmodus (REM-RE-Aufnahmen) entsprechen die Balken 20µm. Abbildung verändert aus Katsen-Globa et al. 2014.

Um die Auswirkungen der Kultivierungsdauer auf Gelatine-Alginat-Kryogelen auch quantitativ untersuchen zu können, wurde eine Routine entwickelt, die auf diesen CLSM-Aufnahmen basiert und mit Hilfe von Bildanalyse-Software (NIS Elements, Image J) sowohl die Vitalität, als auch die Fläche der adhärenenten Zellen bestimmen kann. Die Routine wird in Abbildung 24 detailliert beschrieben. Kurzgefasst wurden die Anzahl der Lebendzellen über die mittlere Zellgröße und die gesamte besiedelte Zellfläche im grünen Kanal berechnet und die Anzahl der toten Zellen im roten Kanal über

einen Objekterkennungsalgorithmus bestimmt. Die resultierende Vitalität der hMSCs wird in Abbildung 25 dargestellt: Die Vitalität der hMSCs bleibt über den gesamten Kultivierungszeitraum gleich hoch (über 95%). Beginnend mit einer Fläche von knapp 200µm² (pro Zelle) haben die Zellen nach 2h ihre typische Fläche von etwa 400µm² erreicht, die sie auch für die restliche Kultivierung beibehalten.

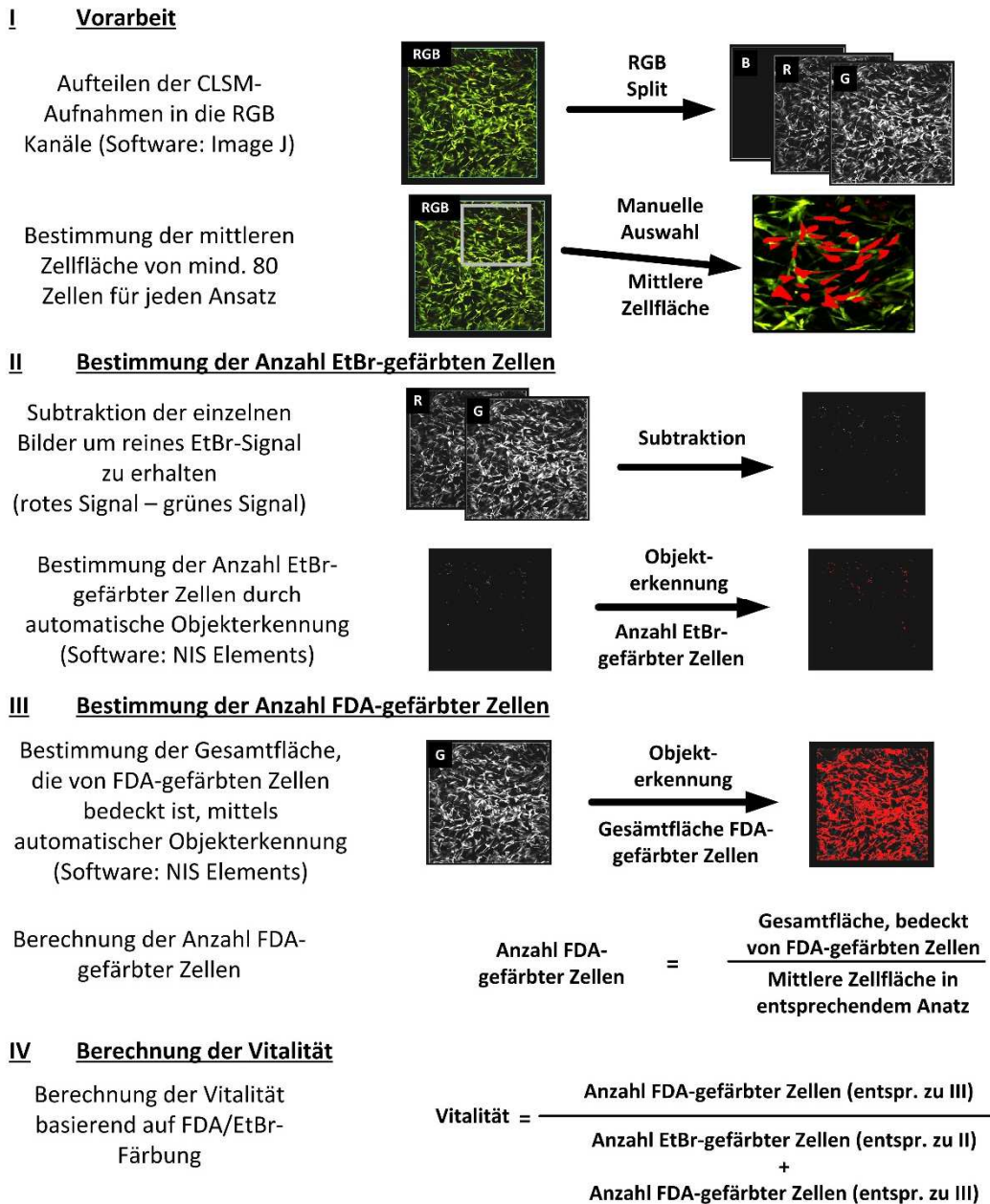


Abbildung 24: Routine zur Bestimmung der Vitalität adhärenter hMSCs mit Hilfe der Bildanalyseprogramme Image J und NIS Elements. Abbildung verändert aus Katsen-Globa et al. 2014.

Damit wurde erstmals der Einfluss der Kultivierungsdauer von hMSCs auf ihre Vitalität und Morphologie bei adhärenter Kultivierung auf Gelatine-Alginat-Kryogele untersucht.

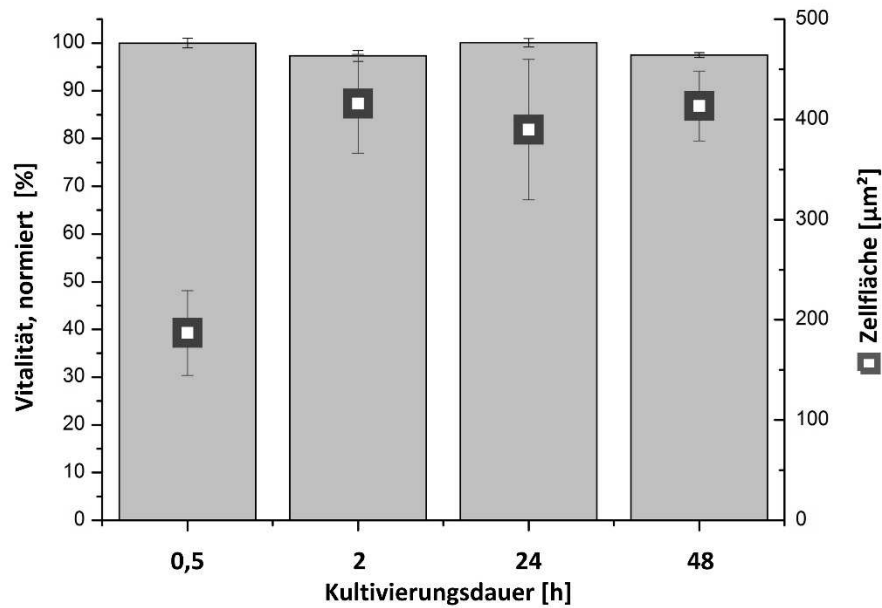


Abbildung 25: Vitalität und Zellfläche adhärenter hMSCs auf Gelatine-Alginat-Kryogelen nach 0,5, 2, 24 und 48h Kultivierungsdauer. Vitalität und Zellfläche wurden gemäß dem Schema berechnet, das in Abbildung 24 gezeigt wurde. Die absolute Vitalität der für 0,5h kultivierten Zellen betrug $94,9 \pm 1,0\%$.

4.2.3 Etablierung und Charakterisierung skalierbarer Mikrobioreaktoren zur Aufbereitung relevanter Zellen im Kontext neuer Therapien

Im Kontext neuer Therapien ist zum einen der hohe Bedarf an relevanten Mikrogeweben eine Herausforderung, die es in naher Zukunft zu lösen gilt und zum anderen die gleichbleibend hohe Qualität der Implantate. Während man mit großvolumigen Batch-Bioreaktoren bereits erfolgreich Bakterienkulturen oder eukaryotische Suspensionszellen expandieren kann, sind die Anforderungen für therapeutisch relevante Zellsysteme oftmals ungleich höher: Häufig sind solche Zellsysteme adhäsionsbasiert und brauchen somit eine wohldefinierte Umgebung, um ihre Funktionalität erhalten zu können und nicht durch fehlende Zell-Matrix-Kontakte den programmierten Zelltod einzuleiten (Anoikis). Um die Homogenität der Konstrukte gewährleisten zu können, ist die Miniaturisierung der Reaktionsräume zu definierbaren Bereichen mit stets gleichen Konzentrationen an eingesetztem Material oder zugegebener Faktoren ein adäquater Ansatz. Im Zuge der Miniaturisierung entstehen gleichzeitig ressourcenoptimierte Verhältnisse von Nährmedienvolumen zu Wachstumsfläche, die oftmals auch Potenzial zur Automatisierung zeigen. In diesem Kapitel werden Möglichkeiten zur Anzucht homogener Mikrogewebe etabliert und untersucht, die in neuen Therapien eine Rolle spielen könnten.

Untersuchungen zur homogenen Anzucht von Mikrogeweben in miniaturisierten Kavitäten in mikrofluidischem Verbund

Die Idee der Miniaturisierung wurde in den gebräuchlichen Mikrowellplatten bereits bis zur 384er Wellplatte im standardisierten Format umgesetzt. In Rahmen dieser Arbeit wurden Wellkavitäten im Submillimeterbereich durch μ Contact-printing von SU8-Strukturen von einem Projektpartner

umgesetzt und zur Verfügung gestellt (BMBF-Verbundprojekt „BioDisc3: i3C“; Kennzeichen 0315029A). Eine Petrischale mit einer solchen gedruckten Struktur ist in Abbildung 26 A gezeigt. In diesem Fall haben die einzelnen Wells einen Durchmesser von 250µm, um Mikrogewebe anzüchten zu können. Abbildung 26 B zeigt repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten und Herzmuskelzellen, die über einen Zeitraum von 72h in ihrem entsprechenden Medium kultiviert werden. Durch den mikrofluidischen Verbund ist die Nährstoffdiffusion in der ganzen Schale gewährleistet. Wie die weißen Dreiecke aber zeigen, wuchsen die verwendeten Zellsysteme, selbst nach 0,5%iger poly-HEMA-Beschichtung, die Zell-Matrix-Kontakte verhindern soll, adhäsionsbasiert. Im Falle der verwendeten CHMCs hatte dies aber keinen Einfluss auf ihre Funktionalität, die Sterne markieren autonom kontrahierende Mikrogewebe. Um die Mikrogewebe aus diesen Strukturen wieder herauszulösen, blieb allerdings eine enzymatische Behandlung nicht aus.

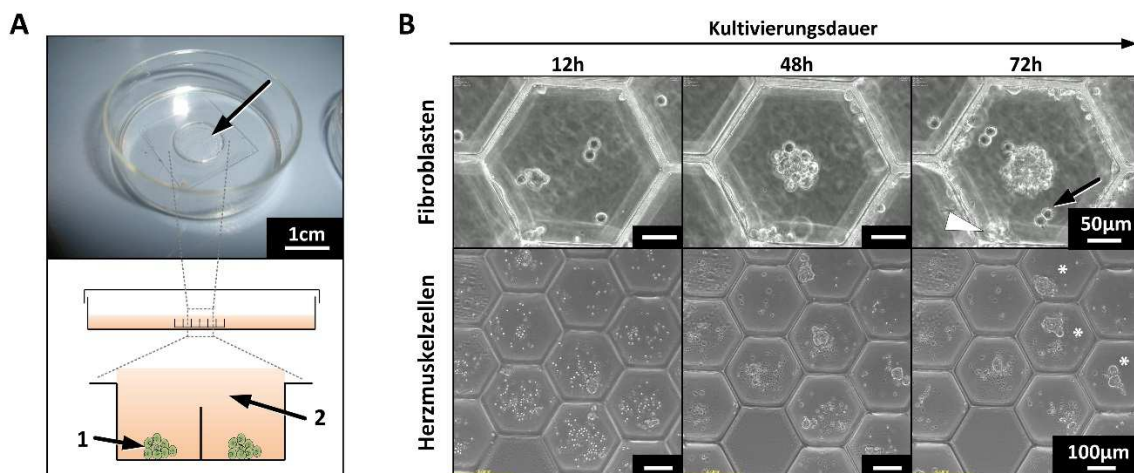


Abbildung 26: A Photographie und Schemazeichnung eines Mikrowellssubstrates. In einer 35mm Petrischale werden die wabenartigen Wellstrukturen mit variablem Durchmesser gedruckt. In den einzelnen Kavitäten können einzelne Zellen (Deutsch et al. 2010) oder Mikrogewebe (1) im mikrofluidischen Verbund (2) kultiviert werden. B Kultivierung von murinen Fibroblasten (L929) und fetalen Herzmuskelzellen aus Hühnern (CHMC) in Mikrowellssubstraten (Wabendurchmesser 250µm). Trotz einer 0,5% Poly-HEMA-Beschichtung zur Vermeidung von Zell-Matrix-Kontakten adhären die Fibroblasten an den Wänden (weißes Dreieck) und am Boden der einzelnen Wells (schwarzer Pfeil). Die Kultivierung von CHMCs resultiert in funktionalen kontrahierenden Mikrogeweben (weiße Sterne).

Schlauchbasierte fluide Mikrobioreaktoren zum Flexibilitätserhalt

Die Untersuchungen adhäsionsbasierter Zellsysteme in Mikrowellstrukturen mit mikrofluidischem Verbund zeigten, dass es möglich ist, homogene Mikrogewebe heranzüchten. Es ist aber problematisch, diese in den vorgegeben Strukturen zu handhaben. Durch die nicht kontrollierbare Adhäsion wird ein Großteil an Flexibilität eingebüßt: Der Transport von Proben ist ohne enzymatische Behandlung nicht möglich. Ebenso ist ein mikrofluidischer Verbund nicht immer von Vorteil; im Hinblick auf automatisierte Hochdurchsatzapplikationen sind voneinander abgetrennte Kompartimente wünschenswert, um möglichst viele Ansätze parallel untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurde nachfolgend untersucht, ob sich relevante Zellsysteme in segmentierten Kompartimenten in Schläuchen zu homogenen Geweben heranzüchten lassen. Vorteile eines solchen Ansatzes sind die voneinander getrennten Kompartimente, die in inerten Schläuchen mit Hilfe von Spritzenpumpen und einem Trägermedium flexibel transportiert werden können. Jedes einzelne Kompartiment agiert als Mikrobioreaktor, der steril abgeschlossen und verglichen mit den Mikrowellssubstraten im mikrofluidischen Verbund, ressourcenoptimiert ist.

Abbildung 27 A zeigt eine Fotografie des schlauchbasierten Aufbaus, der vom Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik realisiert wurde. Über eine Spritzenpumpe (NemeSys, Cetoni GmbH, Deutschland) wird in einem Kanal das inerte Trägermedium Perfluordekalin zugepumpt und im zweiten Kanal durch das Anlegen eines Unterdrucks, die Probe aus dem gerührten Glaskolben gesaugt. Die Flussraten betragen im Probenkanal $-2400\mu\text{l}/\text{min}$ und im Perfluordekalinkanal $+2400\mu\text{l}/\text{min}$, wobei letzterer alle 2,5s für 1s pausiert. Die mit diesen Einstellungen erzielten Kompartimenten enthielten etwa $100\mu\text{l}$ Kulturmedium.

Für die Untersuchungen der schlauchbasierten Kultivierung wurden hESCs ausgewählt, die durch ihr adhäsionsbasiertes Wachstum und ihre pluripotenten Eigenschaften ein relevantes Zellmodell im Kontext zellulärer Therapien sowie für Hochdurchsatzapplikationen in der Wirkstoffforschung darstellen. Ihre übliche Kolonie-basierte Wachstumsform und die Abhängigkeit von Feederzellen zum Erhalt ihrer Charakteristiken stellen Anforderungen, deren Einhaltung für die Anwendung dieser Technologie untersucht werden müssen. Um eine Kultivierung der hESCs zu ermöglichen, wurde ihnen eine künstliche Wachstumsfläche in der Form von sphärischen Mikroträgern zugegeben. Die Kokultivierung mit Feederzellen wurde durch ein konditioniertes Medium, das die entsprechenden Zytokine enthält, die in der Standardkultivierung von Feederzellen sekretiert werden, ersetzt. Im Rahmen der Untersuchungen wurden 90 H9-Koloniefragmente auf Maxgel-beschichtete Mikroträger gebracht und mit der Sonde in PTFE-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 2,4mm zu Kompartimenten, bestehend aus Medium, Mikroträgern und H9-Fragmenten segmentiert (siehe Abbildung 27 B und C). Eine Kontrollgruppe von ebenfalls 90 Koloniefragmenten auf beschichteten Mikroträgern wurde in Petrischalen (3,5cm Durchmesser, 2ml Probenvolumen) kultiviert. Beide Ansätze (schlauchbasierte Probe und Kontrolle) wurden für 7 Tage ohne Mediumwechsel kultiviert und an den Tagen 0, 1, 2, 3 und 7 auf Vitalität, Proliferation und Pluripotenz erhalten untersucht.

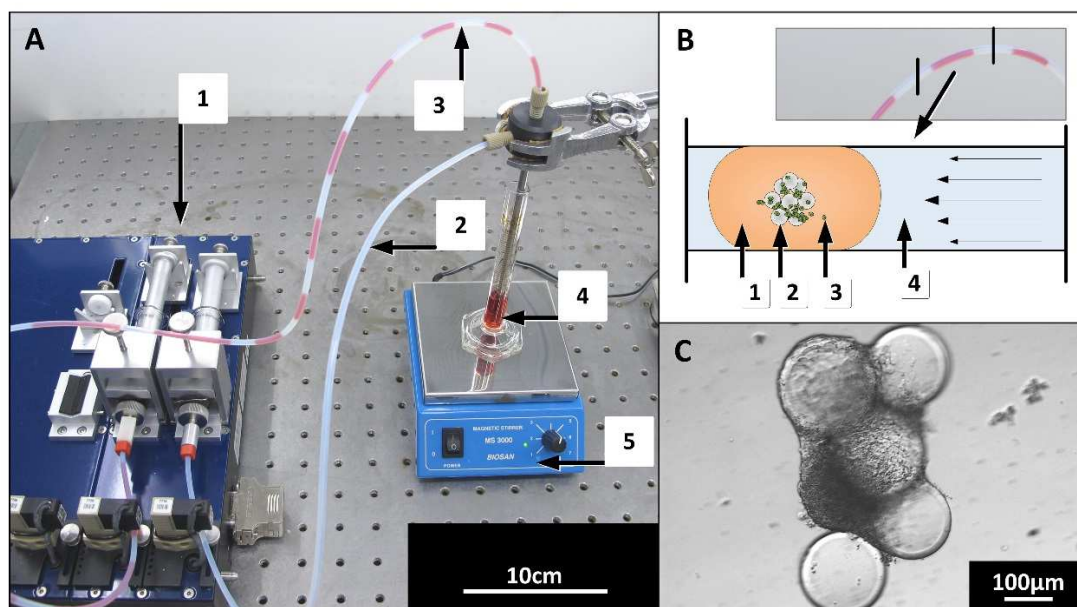


Abbildung 27: A Fotografie des Aufbaus der schlauchbasierten Kultivierung von hESCs auf Mikroträgern. Über eine Spritzenpumpe (1) wird durch einen PTFE-Schlauch (2) das transparente Trägermedium Perfluordecalin (PFD) mit einem Vorschub von $+2400\mu\text{l}/\text{min}$ zugepumpt. Durch Anlegen eines negativen Drucks an den zweiten Schlauch (3; $-2400\mu\text{l}/\text{min}$) wird Zell-Mikroträger-Suspension (4) eingesaugt und gleichzeitig kompartimentiert. B Fotografie und schematische Zeichnung eines Kompartiments aus Medium (1), Mikroträgern (2) und Zellen (3) in einem mit PFD (4) gefüllten Schlauch. C Mikroskopische Aufnahme einer hESC-Kolonie, die in einem Kompartiment auf Mikroträgern kultiviert wurde. Abbildung verändert nach Meiser et al. 2013b.

Die Vitalität wurde nach dem FDA/EtBr-Assay bestimmt, die Proliferation über den AlamarBlue-Assay (nach Herstellerprotokoll mit 23h Inkubationszeit) und der Pluripotenzerhalt über immunzytochemische Färbung mit Anti-HESCA-2. Um quantitative Aussagen über den Pluripotenzerhalt tätigen zu können, wurde an den Tagen 0, 3 und 7 eine FACS-Analyse mit Hilfe des Pluripotenzmarkers Oct3/4 durchgeführt. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen nach einer 10minütigen Inkubation mit Dispase von den Mikroträgern gelöst und zur weiteren Expansion für 7 Tage in eine Standardkultivierung überführt. Pro Ansatz wurden mit N=3 mindestens 10.000 FACS-Ereignisse vermessen gemessen mit der Ausnahme N=2 bei der schlauchbasierten Probe an Tag 7; hier konnten nicht genügend Zellen wiedergefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

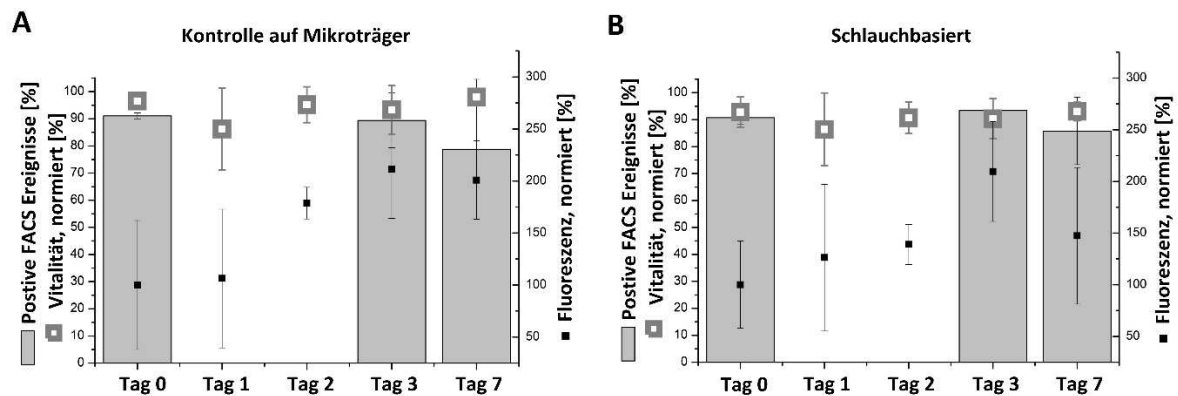


Abbildung 28: Entwicklung der Vitalität (FDA/EtBr-Assay), Pluripotenz (Oct3/4-Marker) und Proliferation (Fluoreszenz nach Alamar Blue Assay, gemessen bei $\lambda=560\text{nm}$) von hESCs an den Tagen 0, 1, 2, 3 und 7 bei der Kontrollkultivierung (A) und bei der schlauchbasierten Kultivierung (B).

Bis Tag 3 sind die Werte für Proliferation, Vitalität und Pluripotenz in den beiden Ansätzen annähernd gleich. Die Vitalitätswerte, erhalten aus dem FDA/EtBr-Assay, liegen an allen gemessenen Tagen etwa gleich auf, jedoch nimmt die Proliferation der Zellen nach dem dritten Tag in der schlauchbasierten Probe deutlich ab. Ebenfalls vergleichbar bis zum dritten Tag ist auch der prozentuale Anteil der pluripotenten Zellen, der mit Hilfe von FACS-Analysen bestimmt wurde. Auch die mikroskopischen Aufnahmen, die in Abbildung 29 gezeigt werden, belegen die Vergleichbarkeit.

Als problematisch bei diesen Untersuchungen stellte sich das Abtrennen des Trägermediums von der Probe nach dem Ernten aus dem Schlauch dar. Ebenso wenig ließ sich ein Mediumwechsel in dem schlauchbasierten System umsetzen. Aus diesem Grund wurden in den nächsten Untersuchungen weitere Kultivierungsmethoden betrachtet, die auf ein Trägermedium verzichten können, trotzdem aber die Vorteile der Miniaturisierung und Medienwechsel erhalten.

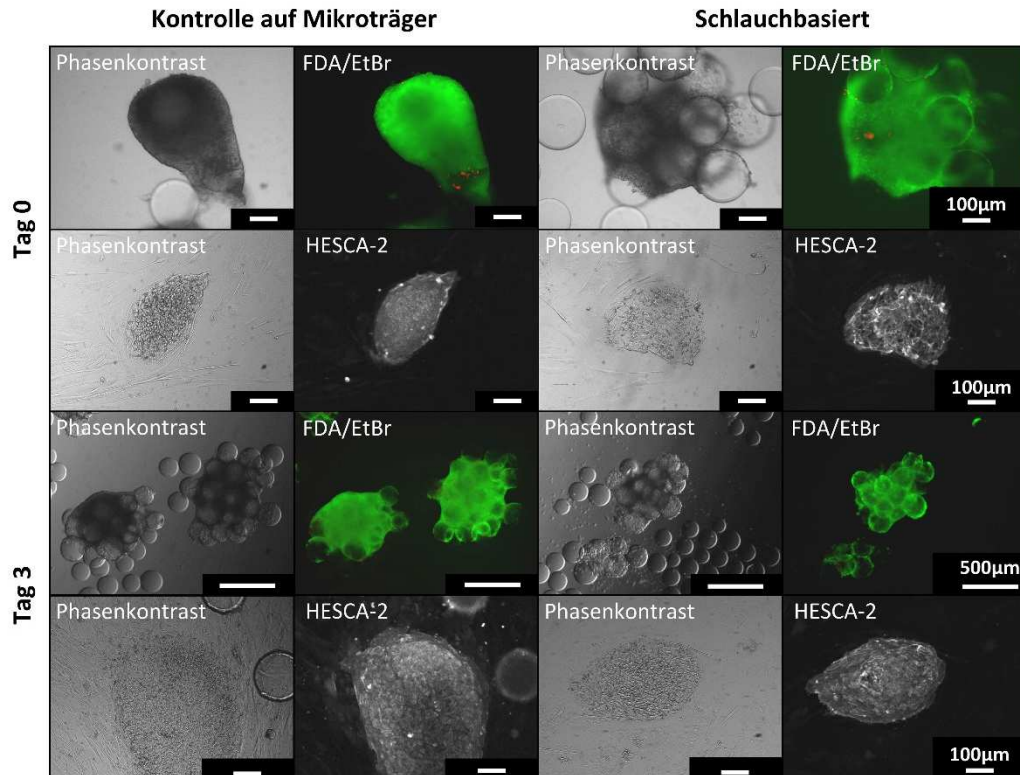


Abbildung 29: Mikroskopische Aufnahmen der kultivierten hESCs auf Mikroträgern (Kontrolle und schlauchbasiert) im Phasenkontrast und mit FDA/EtBr-Färbung an den Kultivierungstagen 0 und Tag 3. Die entsprechenden HESCA-2-Färbungen wurden nach einer anschließenden 7-tägigen Standardkultivierung auf Feederzellen durchgeführt, N=3.

Statische Mikrobioreaktoren (Hängende Tropfen, HDs) zum verbesserten Gas- und Nährstoffaustausch

Der schlauchbasierte Ansatz zur Kultivierung hat im Vergleich zu der Kultivierung im miniaturisierten mikrofluidischen Verbund einen weiteren Fortschritt hinsichtlich der Ressourcenoptimierung gebracht, bei vergleichbaren Ergebnissen hinsichtlich Vitalität, Proliferation und Pluripotenz über drei Tage. Allerdings können durch die schlauchbasierten Kompartimente in diesem Aufbau auch nur parallele Hochdurchsatzapplikationen mit stets gleichen Parameter umgesetzt werden. Der Gewinn an Sterilität und Flexibilität wird aber durch nicht durchführbare Medienwechsel und stark begrenztem Gastransport erkauft. Hängende Tropfen sind eine elegante Lösung dieser Schwierigkeiten. Jeder einzelne Tropfen stellt einen separaten Bioreaktor dar, der individuell angesetzt werden kann, wodurch Hochdurchsatzanalysen mit Wirkstoffgradienten umgesetzt werden können.

Für diese Untersuchungen wurden hiPSCs gewählt, die wie hESCs in ihrem pluripotenten Zustand ein Kolonie-basiertes Wachstum aufweisen. Züchtet man diese Zellsysteme aber ohne Wachstumsoberfläche zu einem dreidimensionalen Konstrukt, bilden sie sogenannte Embryoid Bodies (nachfolgend EBs genannt), den Startpunkt für Differenzierungen in verschiedene Keimblätter. Somit zeichnen sich die hiPSCs zu einem idealen Modellsystem sowohl für Studien der Evolutionsbiologie, als auch für hochparallele Hochdurchsatzanalysen, zur Evaluation verschiedenster therapeutischer Faktoren aus.

Für eine erfolgreiche Kultivierung dieses Zellsystems, sowohl im undifferenzierten, als auch im differenzierten Zustand, ist man maßgeblich auf Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte angewiesen, ohne die diese Zellen in den programmierten Zelltod übergehen. Aus diesem Grund werden Zellpassagen standardmäßig durch eine Kombination aus enzymatischem und mechanischem Ablösen von Koloniefragmenten umgesetzt und keine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Methode ist allerdings zur Anzucht homogener Mikrogewebe nicht geeignet, da die Zellzahl nicht exakt bestimmt werden kann. Aus diesem Grund wurden hier Einzelzellsuspensionen unter dem Einfluss von ROCK-Inhibitor Y-27365 (Y, siehe Kapitel 2.3) und Fibronektin (F) untersucht und welche Zellkonzentrationen eingesetzt werden müssen, um Mikrogewebe aus hiPSCs in hängenden Tropfen bilden zu können.

Um bei der Vereinzelnung durch 0,05% Trypsin/EDTA zu vermeiden, wurden die hiPSCs für 1h in Kulturmedium mit $10\mu\text{M}$ Y inkubiert. Nach der Vereinzelnung wurde die Lebendzellzahl mit Trypanblau bestimmt und hängende Tropfen mit $20\mu\text{l}$ Volumen wurden in folgenden Zellkonzentrationen gesetzt: $1 \cdot 10^4$ Zellen/ml, $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml und $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml, jeweils in reinem Kulturmedium, in Kulturmedium mit $10\mu\text{M}$ Y und in Kulturmedium mit $10\mu\text{M}$ Y und 10mg/ml F. Die Medien wurden alle zwei bis drei Tage gewechselt durch die Zugabe von $20\mu\text{l}$ des entsprechenden frischen Mediums und die Abnahme von $18\mu\text{l}$, um die Stabilität des Tropfens zu gewährleisten. Die Differenz von $2\mu\text{l}$ wurde als Puffer für die Evaporation der Tropfen genommen.

Die Anteile an gebildeten EBs mit ihren korrespondierenden Flächen sind in Abbildung 30 A dargestellt, die entsprechenden mikroskopischen Aufnahmen im Phasenkontrast in Abbildung 30 B. Der prozentuale Anteil an gebildeten EBs steigt deutlich mit der Zugabe von Y. Die zusätzliche Gabe von F hat nur bei den geringen Zellkonzentrationen einen deutlichen Effekt. Es ist zu erkennen, dass es eine Mindestzahl an lebenden Zellen braucht, um einen EB zu generieren. Die Zugabe der Faktoren Y und F verbessert die Effizienz der Methode.

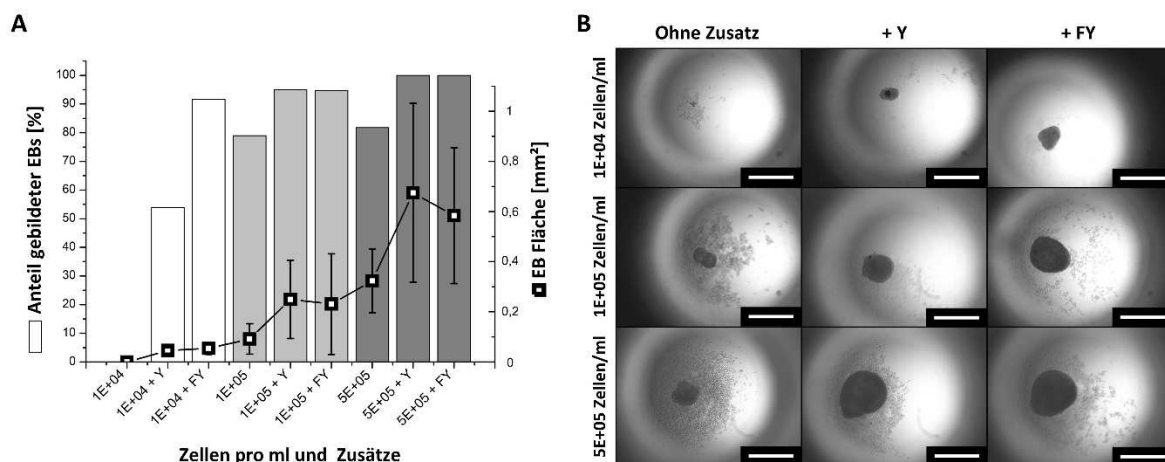


Abbildung 30: A Die linke Y-Achse zeigt den prozentualen Anteil gebildeter Mikrogewebe aus hiPSC nach 7-tägiger Kultivierung im hängenden Tropfen, die rechte Y-Achse deren Fläche in mm². Angesetzt wurden jeweils $20\mu\text{l}$ Tropfen mit verschiedenen Zellkonzentrationen ($1\text{E}+04$, $1\text{E}+05$ und $5\text{E}+05$ Zellen/ml) und Zusätzen: ohne Zusatz, mit $10\mu\text{M}$ ROCK-Inhibitor (Y) oder mit $10\mu\text{M}$ Y und $10\mu\text{g/ml}$ Fibronektin (F) B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der hiPSCs nach 7-tägiger Kultivierung im hängenden Tropfen ohne künstliche Wachstumsfläche. Balken entsprechen $500\mu\text{m}$; N=3, pro Ansatz wurden mindestens 15 Tropfen ausgewertet.

Um die Pluripotenz der hiPSCs zu erhalten und nicht über die Bildung von EBs eine Differenzierung einzuleiten, ist es notwendig eine Wachstumsfläche zur Verfügung zu stellen, was hier durch Matrigel-

beschichtete, sphärische Mikroträger realisiert wurde. Die errechnete Soll-Konzentration an Mikroträgern betrug 60 Träger/ml, die absolute Anzahl in den einzelnen HDs kann mitunter jedoch stark abweichen. Durch die klebrige Beschaffenheit der Proteinbeschichtung und manuelles Pipettieren ist eine homogene Durchmischung der Probe schwierig. Insbesondere die Zugabe von Fibronectin (siehe schwarzer Pfeil in Abbildung 31 A) hat einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsion der hiPSCs und deren nachfolgende Proliferation, ebenso wie die eingesetzte Konzentration an hiPSCs. Nach 7-tägiger Kultivierung im HD haben hiPSCs, die mit $1 \cdot 10^5$ Zellen/ml angesetzt wurden ein relativ dichtes Netzwerk an adhärenenten Zellen auf den Mikroträgern gebildet. Mikrogewebe aus $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml bilden nach den 7 Tagen bereits ein sehr dichtes Aggregat, in dem keine freie Wachstumsfläche mehr zu sehen ist (siehe Abbildung 31 B).

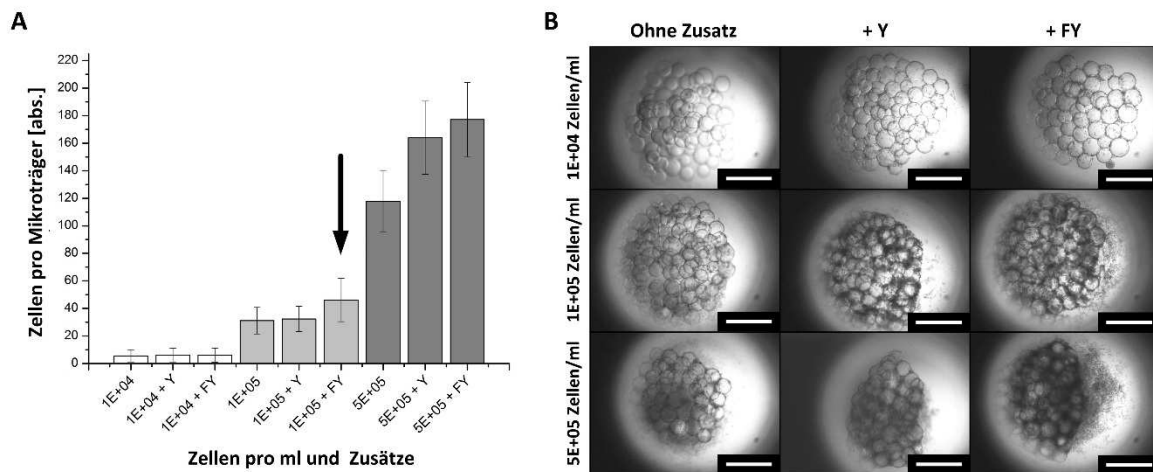


Abbildung 31: A Aufgetragen ist die absolute Anzahl an adhärenenten hiPSCs nach 4 Stunden auf einem Mikroträger entsprechend der verschiedenen Zellkonzentrationen ($1E+04$, $1E+05$ und $5E+05$ Zellen/ml) und Zusätze: ohne Zusatz, mit $10\mu\text{M}$ ROCK-Inhibitor (Y) oder mit $10\mu\text{M}$ Y und $10\mu\text{g/ml}$ Fibronectin (F). B Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der hiPSCs nach 7-tägiger Kultivierung auf Mikroträger. Balken entsprechen $500\mu\text{m}$, $N=3$, es wurden mindestens 15 sphärische Mikroträger ausgewertet.

4.3 Entwicklung zellspezifischer Kryokonservierungsprozeduren mit Funktionalitätserhalt

Um im Rahmen der regenerativen und medikamentenbasierten Medizin ständig ausreichend biologisches Material zur Verfügung zu haben, spielt die Lagerung dieser eine entscheidende Rolle. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Kryokonservierung der einzig erfolgreiche Ansatz zur Langzeitlagerung biologischer Proben mit Funktionalitätserhalt. Dazu werden biologische Proben in der Regel in Plastikgefäßen mit Kristallisationsverfahren kryokonserviert. Während die Entwicklung der Infrastruktur von großen Biobanken bereits weit fortgeschritten ist, steckt die Entwicklung direkt anwendbarer kryokonservierter Proben noch in den Kinderschuhen. Oftmals ist nach der Auftauprozedur eine längere Expansionsphase der therapeutisch relevanten Zellen vonnöten, bevor diese auf eine adäquate Gerüststruktur aufgebracht werden und Verwendung finden. Bisweilen fehlt eine anwendungsbezogene Kryokonservierung im Kontext neuer Therapien, die nachfolgend entwickelt und evaluiert werden soll. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls die Miniaturisierung angestrebt, die neben der definierten Anzucht homogener Gewebe im Hinblick auf die Kryokonservierung den Vorteil des optimierten Wärmetransfers sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen mit sich bringt. Des Weiteren ermöglicht die Miniaturisierung die Entnahme definierter Mengen und kann so einer Verschwendung an Ressourcen entgegenwirken.

4.3.1 Untersuchung von Kristallisationsverfahren zur Kryokonservierung adhärenter Zellen

In Kapitel 4.2.2 dieser Arbeit wurde bereits die Kultivierung therapeutisch relevanter hMSCs auf Gelatine-Alginat-Kryogelen untersucht. Über einen Zeitraum von 48h ist die Vitalität gleichbleibend hoch und die Zellen proliferieren. Im Hinblick auf eine langfristige Lagerung wurde nun die Kryokonservierbarkeit dieser Mikrogewebe untersucht. Die Idee, die es im Kontext neuer Therapien umzusetzen gilt, sind gebrauchsfertige Gelatine-Alginat-Kryogele mit hMSCs, die zu einem beliebigen Zeitpunkt aufgetaut und unmittelbar verwendet werden können.

Neben den thermischen Spannungen, die in den Gerüststrukturen entstehen können, ist das Hauptproblem der adhärenter Kryokonservierung der Erhalt der Zell-Matrix-Kontakte während des Einfrierprozesses. Die Entstehung von Eiskristallen beim Einfrieren mit langsamen Kühlraten zerstört die Fokalkontakte, die Zellen lösen sich von der Oberfläche und gehen durch nachfolgende Waschschrirte zum Austausch der Kryomedien verloren. Hier wurde ebenfalls untersucht, ob das hier verwendete elastische Gelatine-Alginat-Kryogel mit seinem hohen Wassergehalt einen positiven Effekt hinsichtlich der thermischen Spannungen hat.

Um den Einfluss der Intensität und Menge an Zell-Matrix-Kontakten zu untersuchen, wurden therapeutisch relevante hMSCs verschieden lange (0,5h, 2h und 24h) auf den Gelatine-Alginat-Kryogelen kultiviert bevor das gesamte Konstrukt eingefroren wurde. Dazu wurde je ein mit hMSCs besiedeltes Gelatine-Alginat-Kryogel in ein Standard-Kryovial gegeben und mit dem SR-Kryokonservierungsprotokoll bei 1°C/min auf -80°C heruntergekühlt und anschließend für mindestens 24h unter -160°C, in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert. Aufgetaut wurden die Proben im 37°C-Wasserbad und anschließend in warmen PBS gewaschen. Zur Evaluation wurden die Zell-Matrix-Konstrukte jeweils direkt (0h) beziehungsweise nach einer 24- und 48-stündigen Erholungsphase

mittels hochauflösender Rasterelektronenmikroskopie auf ihre Adhäsion untersucht und mittels des FDA/EtBr-Assays und der konfokalen Laserscanningmikroskopie auf ihre Vitalität (gemäß der Auswertungsprozedur in Abbildung 24).

Abbildung 32 A zeigt die Vitalität der hMSCs nach adhärenter Kryokonservierung auf Gelatine-Alginat-Kryogelen sowie repräsentative CLSM-Aufnahmen in B. In den Aufnahmen erkennt man, dass hMSCs nach 0,5h Kultivierung bereits an den Kryogelen adhäreren, jedoch hauptsächlich noch kugelförmig vorliegen und nicht ausgebreitet sind wie es in der 24h-Aufnahme der Kontrolle zu sehen ist. In dieser Aufnahme wird auch deutlich, dass die hMSCs im Laufe des Kultivierungszeitraums proliferiert haben; das exemplarisch gezeigte Kryogel ist dicht besiedelt mit Zellen. Während die Vitalitäten nach den verschiedenen Kultivierungszeiten in der Kontrolle annähernd gleich sind, unterscheiden sie sich nach der Kryokonservierung innerhalb der gleichen Erholungszeiträume. Mit statistischer Signifikanz (t-Test mit $p < 0,05$) weisen hMSCs nach einer 24 stündigen Kultivierung die geringste Vitalität auf, wohingegen die Vitalitäten zwischen 0 und 2 Stunden nicht signifikant voneinander abweichen (t-Test mit $p < 0,05$). In den Proben nach einer 2-stündigen Kultivierung vor der Kryokonservierung zeichnen sich die höchsten Vitalitäten ab (über 70% absolut).

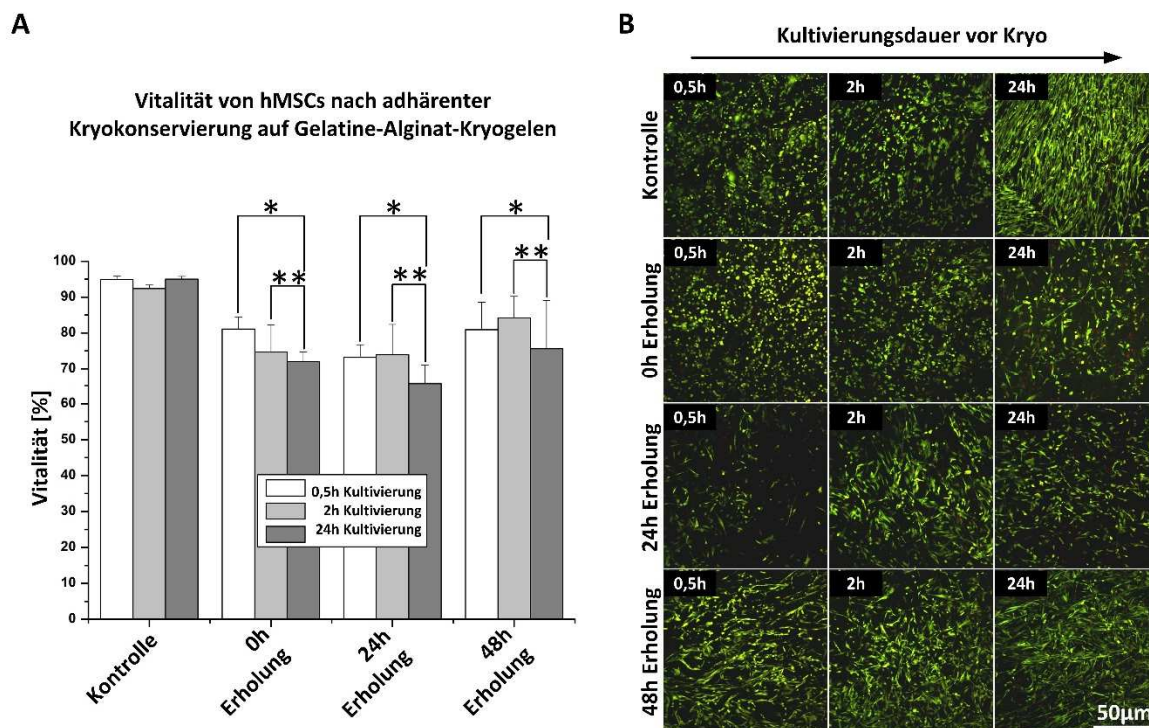


Abbildung 32: A Vitalität von hMSCs nach adhärenter Kryokonservierung auf Gelatine-Alginat-Kryogelen, bestimmt nach der Evaluationsmethode aus Abbildung 24. Die Erholungsphasen betragen hierbei 0, 24, und 48h. Alle Werte zwischen 0,5h und 24h (*), sowie zwischen 2 und 24h (***) Kultivierungsdauer sind signifikant unterschiedlich (t-Test, $p < 0,05$). B zeigt repräsentative CLSM-Aufnahmen FDA/EtBr-gefärbter Zellen. Abbildung verändert aus Katsen-Globa et al. 2014, N=3.

In den Abbildung 33, 34 und 35 sind repräsentative REM-Aufnahmen von hMSCs mit unterschiedlich langer Kultivierung vor der Kryokonservierung und den entsprechenden Erholungsphasen gezeigt. In den hochaufgelösten REM-Aufnahmen ist nach einer Kultivierungsdauer von 0,5 Stunden deutlich zu erkennen, dass die Zellen hauptsächlich kugelförmig vorliegen, nur wenig Fokalkontakte ausgebildet haben, sich dementsprechend noch nicht ausgebreitet und wenig bis keine Zellspuren gebildet haben

(siehe Abbildung 33 a-d). Nach der Kryokonservierung in den repräsentativen Aufnahmen nach 24 und 48 Stunden Erholung haben sich die Zellen ausgebreitet und die Zellspuren sind deutlich zu erkennen (siehe Abbildung 33 e-h). Nach einer Kultivierungsdauer von 2h weisen die Zellen bereits vor der Kryokonservierung eine etwas breitere, flachere Form und ein dichteres Netzwerk an Zellspuren auf (siehe Abbildung 34 a-d). Gibt man den hMSCs 24 Stunden Zeit zur Adhäsion auf den Gelatine-Alginat-Kryogelen, sind in der Kontrolle und direkt nach dem Auftauen die meisten Zellspuren zu erkennen (siehe Abbildung 35 b und d). Hier weisen die Zellen auch die flachste Form auf.

0,5h Kultivierung

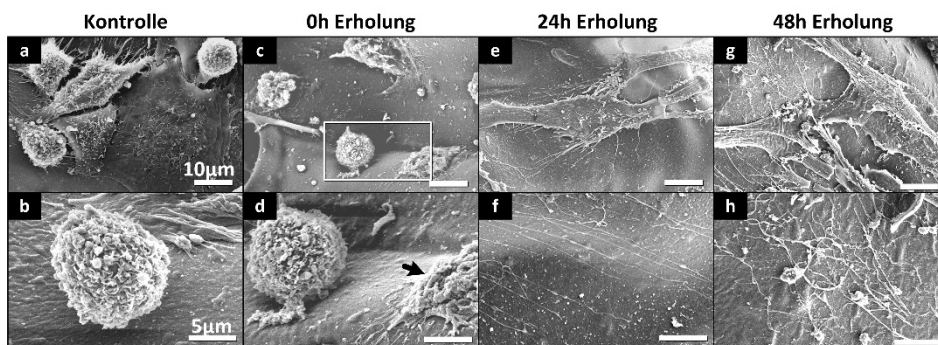


Abbildung 33: Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop von hMSCs, die vor der adhärennten Kryokonservierung 0,5h auf den Gelatine-Alginat-Kryogelen kultiviert wurden. Die Aufnahmen zeigen die Zellen in der nicht gefrorenen Kontrolle und nach 0, 24 und 48h Erholungsphase. Die Aufnahme in d ist eine Vergrößerung des in c gezeigten Kryogels (Rahmen) und zeigt neben einer intakten Zelle eine mit defekter Membran (schwarzer Pfeil). Die Balken in den Bildern a, c, e und g entsprechen 10µm; Balken in b, d, f und h entsprechen 5µm. Abbildung verändert aus Katsen-Globa et al. 2014, N=3.

2h Kultivierung

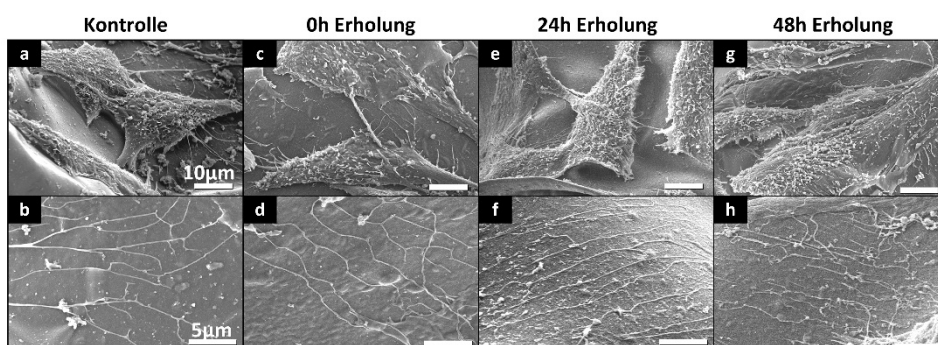


Abbildung 34: Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop von hMSCs, die vor der adhärennten Kryokonservierung 2h auf den Gelatine-Alginat-Kryogelen kultiviert wurde. Die Aufnahmen zeigen die Zellen in der nicht gefrorenen Kontrolle und nach 0, 24 und 48h Erholungsphase. Die Balken in den Bildern a, c, e und g entsprechen 10µm; Balken in b, d, f und h entsprechen 5µm. Abbildung verändert aus Katsen-Globa et al. 2014, N=3.

24h Kultivierung

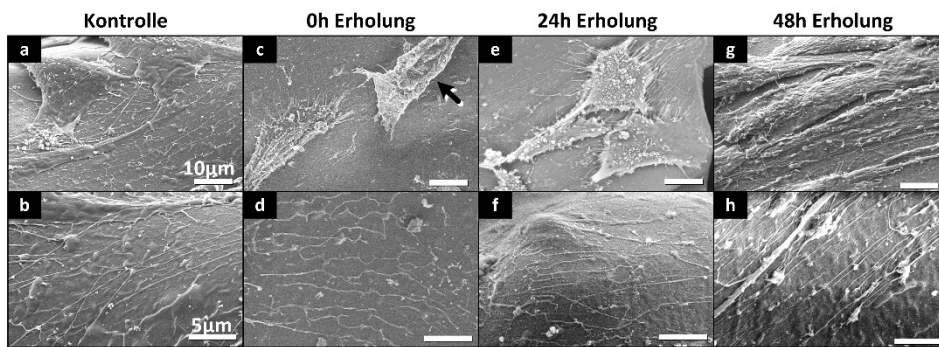


Abbildung 35: Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop von hMSCs, die vor der adhärennten Kryokonservierung 24h auf den Gelatine-Alginat-Kryogelen kultiviert wurde. Die Aufnahmen zeigen die Zellen in der nicht gefrorenen Kontrolle und nach 0, 24 und 48h Erholungsphase. Der schwarze Pfeil zeigt eine Zelle mit defekter Membran. Die Balken in den Bildern a, c, e und g entsprechen 10µm; Balken in b, d, f und h entsprechen 5µm. Abbildung verändert aus Katsen-Globa et al. 2014, N=3.

Die REM-Aufnahmen belegen auch die Auswertung, die in Abbildung 32 gezeigt wird: Die Zellen weisen nach der Kultivierung keine veränderte Morphologie oder Ultrastruktur auf. In allen Aufnahmen sind die vielen Mikrovilli zu erkennen, die für hMSCs typischen Membranausstülpungen.

Um die adhärennt kryokonservierten Zellen weiter auswerten zu können, wurden die Kryogele im Rückstreuemodus des Rasterelektronenmikroskops aufgenommen. Repräsentative Aufnahmen werden in Abbildung 36 dargestellt und zeigen den deutlich erhöhten Kontrast, der für die Evaluation notwendig ist. Ausgewertet wurden zum einen die Ausbreitungsfläche der Zellen und zum anderen deren Form, da diese Rückschlüsse auf das Differenzierungspotenzial geben kann. Auch in diesen Aufnahmen zeigt sich die Eigenschaft der Zellen zur Ausbreitung mit steigender Kultivierungsdauer (siehe Aufnahmen der Kontrolle).

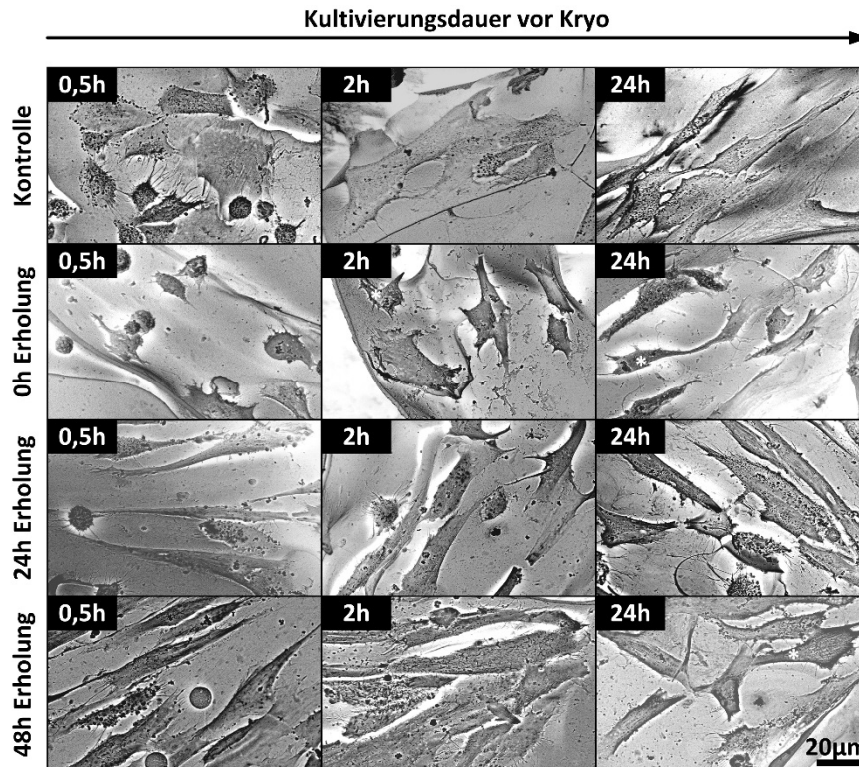


Abbildung 36: Repräsentative Aufnahmen im Rasterelektronenmikroskop (Rückstreuelektronenmodus) von adhärenz kryokonservierten hMSCs auf Gelatine-Alginat-Kryogelen nach 0, 24 und 48h Erholungsphase und der nicht gefrorenen Kontrolle. Vor der adhärenz Kryokonservierung wurden die Zellen für 0,5, 2 und 24 auf den Kryogelen kultiviert. Die Aufnahmen wurden sowohl zur Berechnung der Zellfläche, als auch zur Bestimmung der Zellform genutzt. Die weißen Sterne markieren exemplarisch Zellen in Sternform. Abbildung verändert nach Katsen-Globa et al. 2014, N=3.

In den Graphen in Abbildung 37 sind die Ausbreitungsfläche (A) und der Anteil sternförmiger Zellen (B) vor und nach der adhärenz Kryokonservierung aufgetragen. Nach dem Auftauen konnte eine signifikante Abnahme der Ausbreitungsfläche beobachtet werden. Deutlich ist auch die geringe Ausbreitungsfläche von Zellen mit einer Kultivierungsdauer von 0,5 Stunden zu jedem Zeitpunkt in der Erholungsphase. Vergleicht man die Form der adhärenz Zellen, so erkennt man, dass länger kultivierte Zellen (2h und 24h) zu allen Zeitpunkten hauptsächlich sternförmig vorlagen, im Gegensatz zu den Zellen, die nur für 0,5h vor der Prozedur auf den Kryogelen kultiviert wurden.

Vergleicht man die Zellzahlen, die vor und nach der Kryokonservierung auf den Kryogelen gefunden werden konnten, sieht man, dass nach einer vorangegangenen zweistündigen Kultivierung fast alle Zellen auf den Kryogelen konserviert werden konnten ($99,8 \pm 1,3\%$, siehe Tabelle 3). Der Verlust in den absoluten Zellzahlen bei der Kultivierungsdauer von 2 Stunden in der Kontrolle lässt sich durch die notwendige Medienzugabe nach 0,5 Stunden erklären, um ein Austrocknen der Kryogele zu verhindern. Nach 24 Stunden stieg die absolute Zellzahl aufgrund der Proliferation wieder an.

Nach diesen Untersuchungen scheinen die porösen Gelatine-Alginat-Kryogele eine optimale Wachstumsoberfläche für die Kryokonservierung adhärenz Zellen mit Kristallisationsverfahren zu sein. Damit können Bioimplantate konserviert werden, die nach dem Auftauen sofort in neuen Therapien verwendet werden können.

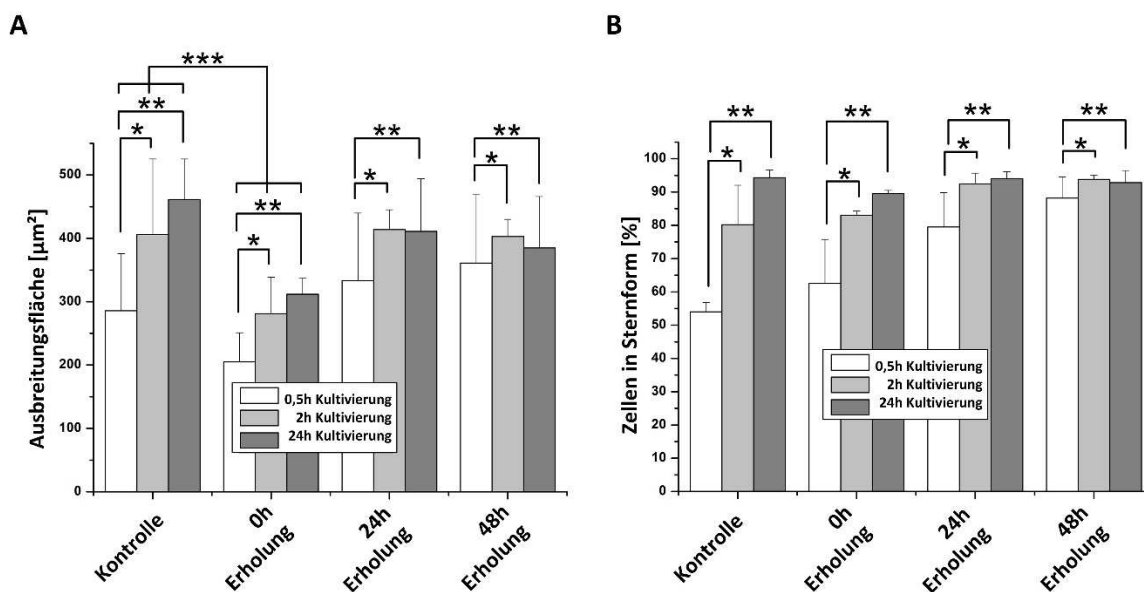


Abbildung 37: A Aufgetragen sind die Flächen der hMSCs in μm^2 in der nicht gefrorenen Kontrolle sowie nach adhärenter Kryokonservierung und 0, 24 und 48h Erholungsphase. B zeigt den prozentualen Anteil sternförmiger Zellen nach adhärenter Kryokonservierung. In beiden Fällen wurden die hMSCs vor der adhärenter Kryokonservierung für 0,5, 2 und 24h auf den Kryogelen kultiviert. Alle mit Sternen gekennzeichneten Werte sind signifikant unterschiedlich (t-Test, $p < 0,05$). Abbildung verändert nach Katsen-Globa et al. 2014, N=3.

Tabelle 3: Aufgetragen sind die Mittelwerte der absoluten Zellzahlen aus den einzelnen unabhängigen Experimenten (N=3) sowie der daraus berechnete prozentuale Anteil.

Absolute Werte der lebenden Zellen

Erholungszeit	Kultivierungsdauer		
	0,5h	2h	24h
Kontrolle	20253 ± 377	10809 ± 200	21227 ± 327
0h	13577 ± 271	11608 ± 155	10089 ± 187
24h	8738 ± 142	9121 ± 178	10340 ± 170
48h	10896 ± 185	13050 ± 162	15728 ± 261

Prozentualer Anteil der lebenden Zellen normiert auf die Kontrolle [%]

0h	64,0 ± 2,0	99,8 ± 1,3	45,6 ± 1,9
24h	41,2 ± 1,6	78,4 ± 2,0	46,7 ± 1,6
48h	51,3 ± 1,7	112,2 ± 1,2	71,0 ± 1,7

4.3.2 Untersuchung von Vitrifikationsverfahren zur Kryokonservierung adhärenter Zellen

Wie bereits erwähnt ist eine Kryokonservierung von Zellen und insbesondere Zellverbände wegen der Eiskristallbildung und den entstehenden thermischen Spannungen in festen Oberflächen problematisch. Je nach Beschaffenheit der verwendeten Materialien, dehnen diese sich unterschiedlich aus und stressen die zu konservierende Probe. Das in Kapitel 4.3.1 untersuchte Kristallisationsverfahren zur Kryokonservierung von adhärenter Zellen auf einem elastischen Kryogel

konnte den mechanischen Belastungen trotzen und erreichte hohe Vitalitäten und relativen Zellzahlen nach der Kryokonservierung von über 70%. Wie alle Kryokonservierungsprotokolle ist auch dieses jedoch zelltypabhängig: Zellen, wie hiPSCs und hESCs, die in Kolonien wachsen und auf spezielle Zell-Zell und Zell-Matrix-Kontakte angewiesen sind, reagieren direkt durch Differenzierungen, Ablösen oder gar Anoikis auf geänderte Umgebungen. Das bedeutet, sie benötigen andere Voraussetzungen für eine adhärenzte Kryokonservierung, die Vitrifikationsprozeduren eventuell bieten könnten. Durch den Einsatz spezieller Kryomedien mit höherer CPA-Konzentration, kürzeren Inkubationszeiten und höheren Abkühlraten kann eine Vitrifikation erreicht und die schädlichen Auswirkungen der Eiskristalle umgangen werden. Ob sich dieses Verfahren für hiPSCs eignet wurde hier untersucht.

Nachdem die adhärenzte Vitrifikation für embryonale Stammzellkolonien bereits erfolgreich etabliert und untersucht wurde, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkungen auf das therapeutisch relevante Zellsystem hiPSC untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Standardprotokoll abgelöst, mechanisch zu Koloniefragmenten zerkleinert und auf Matrigel-beschichteten Thermanox®-Deckgläschen ausgesät, so dass mindestens 5 Kolonien anwachsen und ausgewertet werden konnten. Die Thermanox-Deckgläschen wurden eingesetzt, weil sie biegsam sind und durch Einschneiden und Umbiegen ein Henkel zum besseren Transport gemacht werden kann. Die Kolonien wurden für 7 Tage nach Standardbedingungen kultiviert (Mediumwechsel alle 2-3 Tage). Zur Kryokonservierung wurden die Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette für 1min in der Vitrifikationslösung V1 und für 5sec in der zweiten Vitrifikationslösung V2 bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff kryokonserviert wurden. Aufgetaut wurden sie durch 1-minütige Inkubation in 5ml Auftaulösung W1 und 5-minütiger Inkubation in Auftaulösung W2 bei jeweils 37°C. Die verwendeten Evaluationsparameter waren zum ersten die Koloniefäche, analysiert in Phasenkontrastaufnahmen, zum zweiten die Vitalität, errechnet aus CLSM-Aufnahmen nach FDA/EtBr-Färbung und zum dritten der Erhalt der Pluripotenz, bestätigt durch eine HESCA-2-Antikörperfärbung. In 3 unabhängigen Experimenten wurden jeweils 3 Thermanox®-Deckgläschen an Tag 0 vor und nach der Vitrifikation und an Tag 3 nach der Vitrifikation und einem Mediumwechsel untersucht. Zur Bestimmung der Koloniefäche wurden die Proben in einer Biostation CT (Nikon, Japan) im Phasenkontrast aufgenommen und zu einem Panorama zusammengesetzt. Die Fluoreszenzaufnahmen nach FDA/EtBr-Assay und HESCA-2-Färbung, gekoppelt mit Alexa-Fluor-488 wurden aufgrund der höheren Auflösung mit dem CLSM durchgeführt. Abbildung 38 zeigt die zusammengesetzten Panoramen im Phasenkontrast von demselben Deckgläschen jeweils vor der Vitrifikation, direkt danach (Tag 0) und drei Tage danach. In der linken Spalte wurde ein Deckgläschen beobachtet, das durch die thermischen Spannungen am Material Risse (Fissuren) bekommen hat. In 4 von 18 Deckgläschen sind solche Beschädigungen aufgetreten, die in der Auswertung berücksichtigt wurden. In der FDA/EtBr-Färbung an Tag 0 erkennt man die Auswirkungen der Risse auf eine hiPSC-Kolonie (siehe Abbildung 38, einfache Pfeile). Teile davon sind von der Oberfläche abgesprengt worden, die Randbereiche weisen tote Zellen auf, die durch EtBr rot gefärbt wurden. Betrachtet man aber dasselbe Deckgläschen an Tag 3 sieht man, dass durch die Proliferation die Risse wieder zugewachsen sind (siehe Abbildung 38, Doppelpfeil). An allen beobachteten Zeitpunkten war die berechnete Vitalität gleichbleibend hoch, Schädigungen durch die Fissuren fielen bei diesem Parameter nicht ins Gewicht.

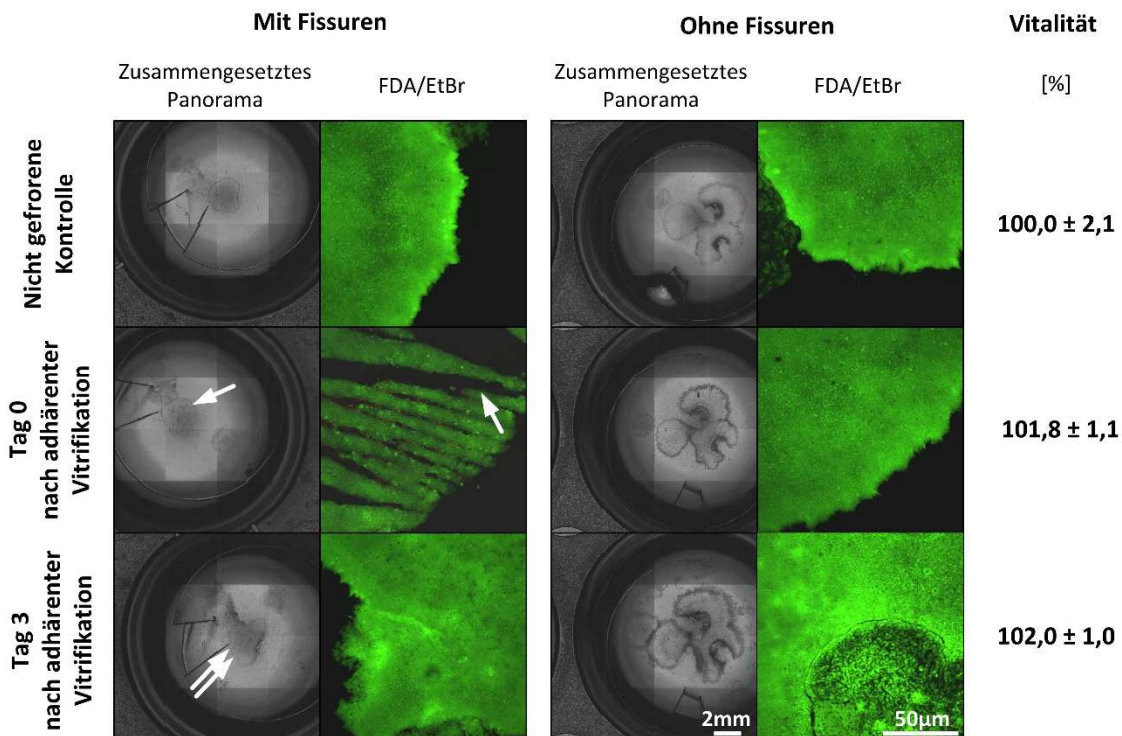


Abbildung 38: Zusammengesetzte Panoramen im Phasenkontrast von jeweils demselben Deckgläschen (Thermanox®) zu verschiedenen Zeitpunkten und repräsentative Fluoreszenzaufnahmen adhärenter hiPSCs vor und nach der Vitrifikation. Die Pfeile in den Aufnahmen auf der linken Seite zeigen Fissuren an den hiPSCs, entstanden durch thermische Spannungen im Material. Im Rahmen der Untersuchungen wiesen 4 von 18 Deckgläschen solche Risse auf. Der Doppelpfeil an Tag 3 zeigt dieselbe hiPSC-Kolonie wie an Tag 0 nach der Wundheilung. Die Vitalitätswerte wurden aus den Fluoreszenzaufnahmen der FDA/EtBr-Färbung berechnet und auf die Kontrolle normiert (absoluter Wert der Kontrolle: $80,9 \pm 1,8\%$), $N=3$.

Abbildung 39 zeigt in der oberen Bildreihe die zusammengesetzten Panoramen im Phasenkontrast und entsprechend die Aufnahmen der HESCA-2-Färbung im Fluoreszenzkanal. Zu jedem beobachteten Zeitpunkt wiesen die Kolonien eine intensive HESCA-2-Färbung auf, die auf den Erhalt der Pluripotenz der hiPSCs schließen lässt. Auch hier spielen die Fissuren am Deckgläschen nur eine untergeordnete Rolle, die HESCA-2 Signale sind zu jedem Zeitpunkt zu detektieren.

Misst man die von hiPSC-Kolonien bedeckte Fläche auf den Deckgläschen aus, so wie es in Abbildung 40 dargestellt ist, erkennt man, dass die Vitrifikationsprozedur nur wenig Einfluss auf die vitale Restfläche hat. Betrachtet man sämtliche untersuchte Deckgläschen, belief sich die Differenz vor und nach der Vitrifikation auf 4,3%. Lässt man die mechanisch geschädigten Deckgläschen mit den Fissuren außen vor, so betrug die Differenz der besiedelten Flächen nur 1,2%.

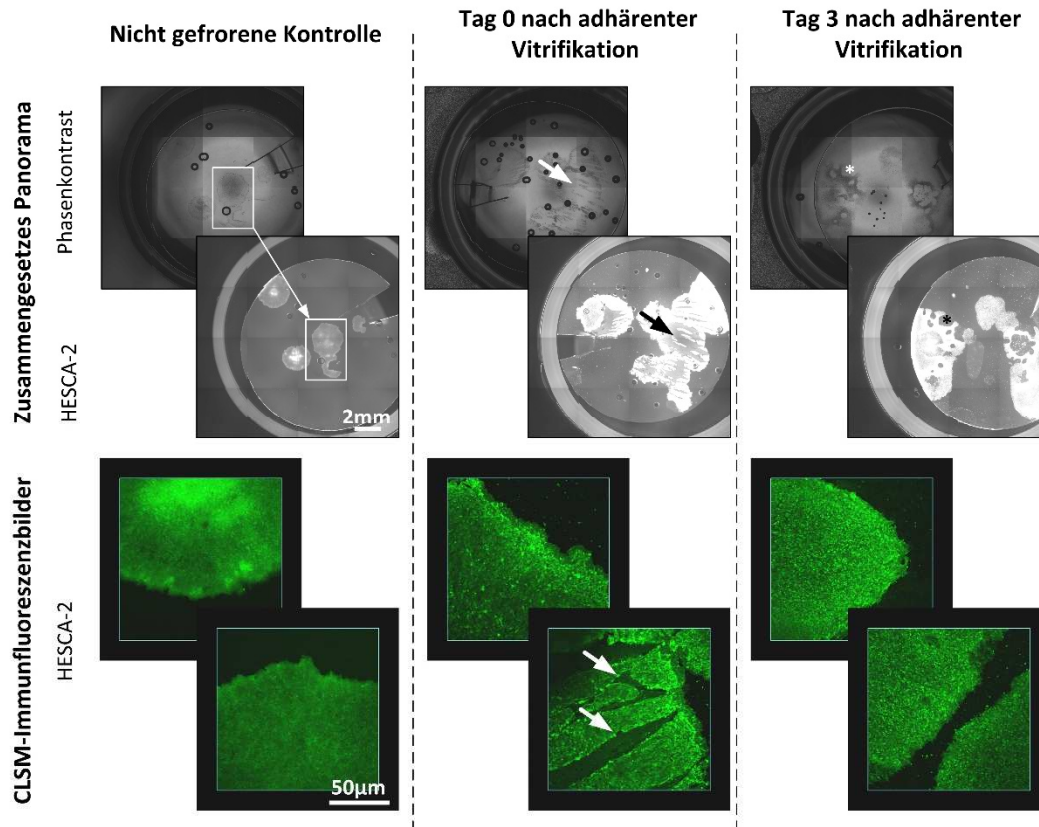


Abbildung 39: Oben gezeigt sind zusammengesetzte Panoramen im Phasenkontrast von gefrorenen und nicht gefrorenen adhärenen hiPSC-Kolonien auf Deckgläschen und die entsprechenden Fluoreszenzaufnahmen (Immunfluoreszenzfärbung mit dem Pluripotenzmarker HESCA-2; gekoppelt mit Alexa-Fluor-488). Unten gezeigt sind repräsentative CLSM-Aufnahmen derselben Immunfluoreszenzfärbung. Die Pfeile an Tag 0 zeigen die durch mechanische Spannungen im Material entstandenen Fissuren. Die Sterne in den Aufnahmen an Tag 3 zeigen differenzierte Bereiche außerhalb der Kolonien, die kein HESCA-Signal aufweisen, N=3.

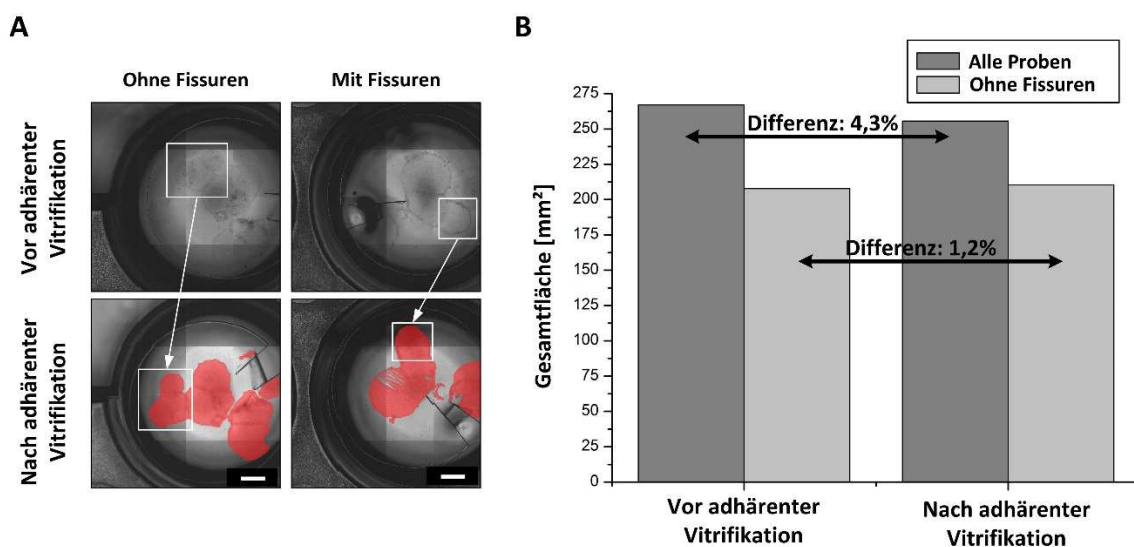


Abbildung 40: A Bildanalyse der zusammengesetzten Panoramen zur Berechnung der verbleibenden Fläche an Tag 0 nach adhärenter Vitrifikation von hiPSCs. B Differenz der gesamten, von hiPSCs bedeckten Fläche in mm² vor und an Tag 0 nach adhärenter Vitrifikation, N=3.

4.3.3 Vergleichende Untersuchungen miniaturisierter Ansätze zur Kryokonservierung von Zellen in Suspension mit Kristallisation

In den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2 wurden die beiden Regime Kryokonservierung mit Kristallisation und Vitrifikation an therapeutisch relevanten, adhären Zellsystemen untersucht. Die grundsätzliche Eignung beider Prozeduren an therapeutisch relevanten Zellen konnte also im Rahmen dieser Arbeit belegt werden. Für den Einsatz dieser Prozeduren im Kontext neuer Therapien fehlt allerdings die Infrastruktur, um möglichst viele Proben parallel und steril konservieren und ablegen zu können. Dazu sind Methoden der Miniaturisierung und Mikrofluidik unerlässlich. Ihr Einfluss in kryobiologischen Prozessen bisher noch kaum untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mögliche, schädliche Einflüsse miniaturisierter Substrate bei der Kryokonservierung von Mikrogeweben untersucht. Dazu wurde zunächst ein geeignetes primäres Zellsystem ausgewählt. Zum Beispiel zur direkten Behandlung von Diabetes-Patienten oder zur Untersuchung neuer Wirkstoffe in der Kategorie der metabolischen Therapien, sind primäre LHIs und Mikrogewebe aus RIN-m optimale Modellsysteme. Im gleichen Zug wurde neben den miniaturisierten Substraten auch der Einfluss serumfreier Medien untersucht sowie die mögliche Reduktion der CPA-Konzentration, die für medizinische Anwendungen der Mikrogewebe eine entscheidende Rolle spielen: Xenogene Stoffe, die unerwünschte Nebenwirkungen auslösen könnten und zytotoxische Einflüsse der CPAs können so reduziert werden. Dazu wurde jeweils eine Suspension von LHIs und Mikrogeweben aus RIN-m mit entsprechendem serumhaltigen Kulturmedium oder dem serumfreien Basalmedium gemischt und das CPA DMSO wurde in den Konzentrationen 5, 7 und 10%-Vol. zupipettiert. Die Proben wurden in die miniaturisierten Kryosubstrate (30-Well-Kryosubstrat, MST-Kryoröhrchen, siehe Abbildung 44 B) gegeben und nach einer Inkubationszeit von 30min bei 4°C mit dem SR-Kryokonservierungsprotokoll bei 1°C/min bis -80°C eingefroren und anschließend für mindestens 24h unter -160°C gelagert. Nach dem Auftauen im 37°C-Wasserbad wurde mit dem FDA/EtBr-Assay die metabolische Aktivität und die Membranintegrität bestimmt, der direkte Vergleich ist in Abbildung 41 dargestellt. Die Tendenz in beiden Zellsystemen bei den veränderten Bedingungen ist identisch. Auch wenn die Unterschiede zwischen den Vitalitätswerten nicht statistisch signifikant sind (t-Test, $p < 0,05$), so zeigen die in serumfreien Medien kryokonservierten Mikrogewebe doch mit Vitalitäten über 90%, dass die miniaturisierten Substrate geeignet sind, die Funktionalität der Zellen zu erhalten.

Schlauchbasiertes Verfahren zur Kryokonservierung mit Kristallisation

Um der mangelnden Parallelisierung und Automatisierbarkeit bei der Kryokonservierung entgegen zu wirken, werden in diesem Kapitel Wege aufgezeigt, die die Vorteile der schlauchbasierten Kultivierung (Miniaturisierung, Sterilität, Automatisierungspotenzial, Flexibilität) mit der Kryokonservierung vereinen. An therapeutisch relevanten Primärgeweben und entsprechenden Modellsystemen wurde der von Projektpartner des iba e.V. entwickelte Aufbau zur Mikrofluidik-basierten Kryokonservierung evaluiert (BMBF-Verbundprojekt „ μ Cryolab“; Kennzeichen 16SV2385). Untersucht wurden ebenfalls die Auswirkungen eines serumfreien Kryomediums, welches ohne xenogene Substanzen wichtige Voraussetzungen für eine unmittelbare therapeutische Verwendung kryokonservierter Proben erfüllt.

Für dieses Vorhaben wurde ein mikrofluidischer Aufbau entwickelt, der in Abbildung 42 A dargestellt ist: Über Spritzenpumpen wurden ähnlich der Kompartimentierungs-sonde aus Kapitel 4.2.3

Zellsuspension aus einem Mischgefäß und das Trägermedium PFD über PTFE-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,5mm in einen mikrofluidischen Kompartimentierungs- und Zudosierungschip geleitet. Die eingestellte Flussrate betrug dabei 300µl/s. Im Inneren des Chips, der in Abbildung 42 B schematisch dargestellt ist, wurde der kontinuierliche Fluss aus Mikrogewebssuspension durch das Zuleiten von PFD in Kompartimente segmentiert. Jedes Kompartiment stellt eine separate Probe dar, deren Anstände über zwei Photodioden vermessen wurden. Anhand des berechneten Abstandes und der Fließgeschwindigkeit der einzelnen Kompartimente wurde der korrekte Zeitpunkt zur automatisierten CPA-Zugabe über ein Mikroventil bestimmt. Durch den kontinuierlichen Vorschub über die Spritzenpumpen wurden die mikrovolumigen Kompartimente (65nl) aus Suspension und CPA in PTFE-Schläuche von etwa 1m Länge gefördert, die anschließend mit Stecknadeln verschlossen und nach einer Inkubationszeit von etwa 30min mit 1°C/min bis -80°C kryokonserviert wurden.

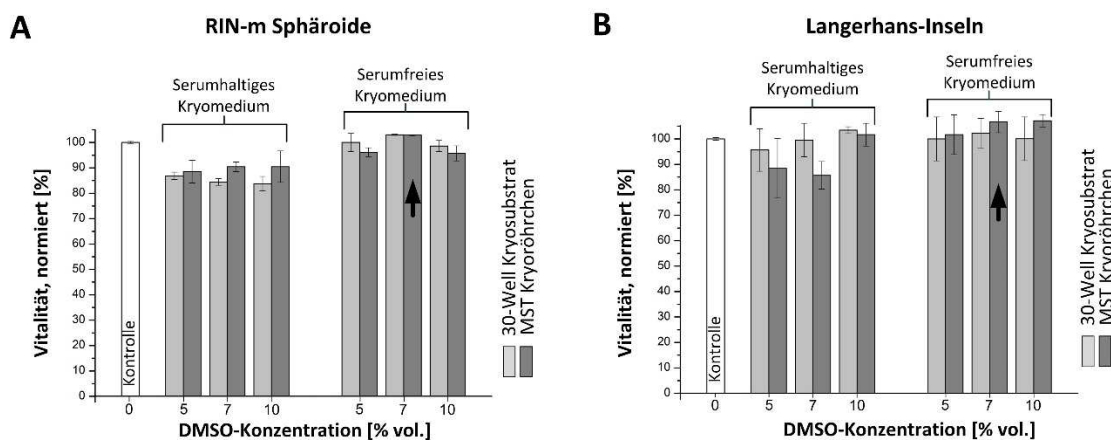


Abbildung 41: Vergleichende Untersuchung zur Vitalität von RIN-m Mikrogeweben und Langerhans-Inseln bei der Kryokonservierung mit Kristallisation in serumhaltigen und serumfreien Medien und in miniaturisierten Substraten. Die jeweils besten Ergebnisse (in beiden Fällen serumfrei in MST Kryoröhrchen) wurden mit einem schwarzen Pfeil markiert, N=3.

Der Aufbau zur schlauchbasierten Kryokonservierung wurde evaluiert durch Zellsuspensionen aus dem Modellsystem Insulinomazellen aus der Ratte (RIN-m), den primären Langerhans-Inseln aus der Ratte (LHI) und primärem Karzinomgewebe, die in ihren jeweiligen serumhaltigen Kulturmedium sowie in einem serumfreien Basalmedium gefördert wurden. Die Öffnungszeit des Mikroventils zur CPA-Zugabe wurde so gewählt, dass DMSO in einer Endkonzentration von 7%-Vol. vorlag. In Vorversuchen zeichnete sich diese als optimal ab. Als Kryokonservierungskontrolle wurden die entsprechenden Zellsuspensionen ebenfalls mit 7%-Vol. DMSO versetzt und in miniaturisiertem Probenvolumen von 30µl und den gleichen Abkühlraten kryokonserviert. Schläuche und Substrate wurden anschließend für mindestens 24 Stunden unter -160°C gelagert, bevor sie in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut wurden. Die Vitalität nach FDA/EtBr-Assay der oberflächenbasiert kryokonservierten Mikrogewebe und repräsentative Mikroskopaufnahmen werden in Abbildung 43 gezeigt. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen die Mikrogewebe, kryokonserviert in Schläuchen nach dem Auftauen eine signifikant schlechtere Vitalität auf (t-Test, $p < 0,05$). Der direkte Vergleich mit der kryokonservierten Kontrolle zeigte ebenfalls deutlich schlechtere Werte. Für LHI-Mikrogewebe konnte in der serumhaltigen Probe sogar nach Poolen der Schläuche aus den unabhängigen Experimenten keine Mikrogewebe mehr

gefunden werden, die auswertbar waren. Während der Experimente zeigte sich, dass die Zudosierung von CPA in die einzelnen Kompartimente nicht komplikationsfrei lief. Durch den hohen Anteil an Proteinen in den Kompartimenten traten öfter Verstopfungen im Mikrofluidiksystem auf, die Verzögerungen in der Fließgeschwindigkeit nach sich zogen und den Druck im System erhöhten. Resultat von diesen Prozessen waren CPA-Konzentrationen in den Kompartimenten, die teilweise erheblich von dem Sollwert (7%-Vol.) abwichen. Die Unterschiede konnten visuell anhand der unterschiedlichen Färbung der Kompartimente beobachtet werden.

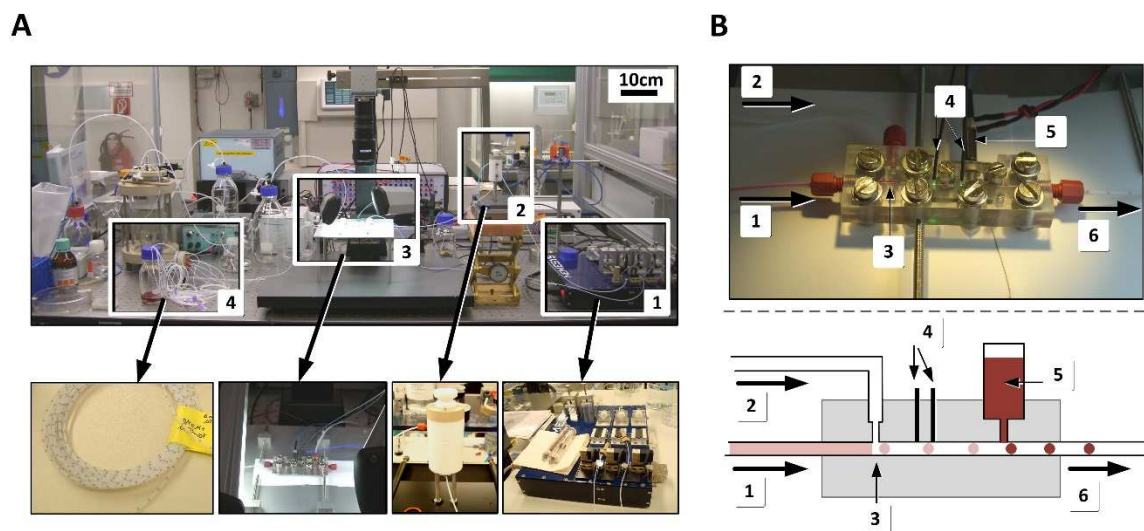


Abbildung 42: A Photographie des Gesamtaufbaus zur schlauchbasierten Kryokonservierung. Über eine Spritzenpumpe (1) werden die Zellsuspension aus dem Mischgefäß (2) und das Trägermedium Perfluordecalin (PFD) in den mikrofluidischen Kompartimentierungs- und Zudosierchips (3) transportiert. Die Zellsuspensions-Kompartimente, denen im Chip nach einer optischen Detektion kryoprotektive Stoffe zudosiert wurden, werden in Schläuchen (4) gesammelt und anschließend kryokonserviert. B Photographie (oben) und schematischer Aufbau (unten) des mikrofluidischen Kompartimentierungs- und Zudosierchips. Die Zellsuspension (1) wird durch den Zustrom des Trägermediums (2) an der Schnittstelle (3) in Kompartimente unterteilt. Durch optische Detektion (4) des Kontrastunterschiedes wird die Position und Geschwindigkeit des Kompartimentes in dem kontinuierlichen Strom bestimmt, so dass über ein Mikroventil (5) kryoprotektive Stoffe in die einzelnen Kompartimente injiziert werden können. Nach dem Chip werden die Kompartimente in Schläuchen gesammelt und kryokonserviert.

Aufgrund der Nachteile, die während der Untersuchungen zur schlauchbasierten Kryokonservierung im mikrofluidischen System aufgetreten sind, wurde dieser Ansatz als Komplettsystem nicht weiter verfolgt.

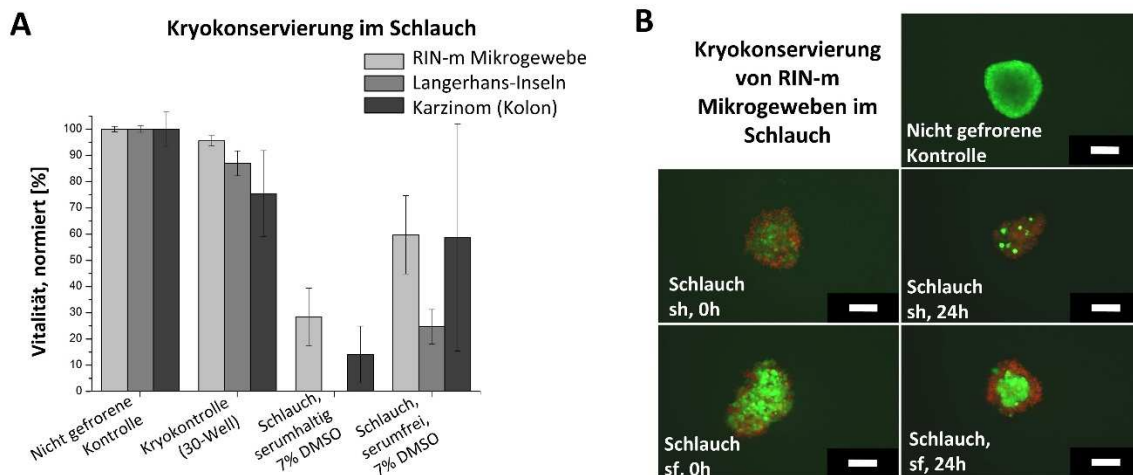


Abbildung 43: A Vitalitätswerte von RIN-m-, Langerhans- und Kolonkarzinom-Mikrogeweben nach der SR-Kryokonservierung im Schlauch in serumhaltigen (sh) und serumfreien (sf) Medien mit automatisierter DMSO-Zugabe über ein Mikroventil. Die Vitalitätswerte wurden aus Fluoreszenzaufnahmen nach FDA/EtBr-Assay berechnet. **B** Repräsentative Fluoreszenzbilder des FDA/EtBr-Assays von RIN-m Mikrogeweben in der nicht gefrorenen Kontrolle und nach der schlauchbasierten Kryokonservierung mit serumhaltigen (sh) und serumfreien (sf) Kryomedien. Die Aufnahmen nach einer 24h Erholungsphase zeigen, dass die Zellen sich kaum regenerieren. Die absoluten Werte in den nicht gefrorenen Kontrollen betragen $92,49 \pm 0,95\%$ (RIN-m), $93,1 \pm 1,1$ (LHI) und $83,8 \pm 5,5\%$ (Kolon). Die Balken entsprechen $100\mu\text{m}$, $N=3$.

Mikrosubstratbasiertes Verfahren zur Kryokonservierung mit Kristallisation

Da die schlauchbasierte Kryokonservierung einen deutlichen Verlust der metabolischen Aktivität und Membranintegrität der Mikrogewebe mit sich brachte, die Vorteile der Miniaturisierung im Kontext neuer Therapien aber auf der Hand liegen, wurde weiter untersucht, mit welchen mikrofluidischen Hilfsmitteln eine Kryokonservierung relevanter Mikrogewebe im Hinblick auf eine Automatisierung realisierbar ist.

Der neuartige Aufbau wurde modular konzipiert und ist in Abbildung 44 gezeigt. Der Vorteil der PTFE-Schläuche zum Erhalt der Sterilität während des Prozesses bleibt erhalten. Eine miniaturisierte Rührflasche zur Homogenisierung der Probe, Spritzenpumpen zur langsamen und dadurch osmotisch günstigen Zugabe von CPAs und eine Dosierungseinheit zum Einfüllen in MST-Kryoröhrchen aus eigener Produktion wurden aufgebaut und evaluiert. Die MST-Kryoröhrchen aus eigener Produktion verfügen über einen integrierten elektronischen Chip, der zu jeder Zeit die darin enthaltene Probe eindeutig identifizieren kann und kleinste Probenvolumen erlaubt. Zur Analyse der Eignung des Aufbaus im Kontext der metabolischen Kategorie der regenerativen Medizin wurden jeweils $70\mu\text{l}$ Suspension mit RIN-m-Mikrogeweben, primären LHIs und Kolonkarzinom-Mikrogewebe (Fragmente $< 200\mu\text{m}$) untersucht. Die Proben wurden zum einen in standardisierten Kryoröhrchen und 30-Well-Kryosubstraten manuell befüllt und zum anderen mit der modularen, mikrofluidischen Anlage bearbeitet. Anschließend wurden die Proben mit dem SR-Kryokonservierungsprotokoll bei $1^\circ\text{C}/\text{min}$ bis -80°C eingefroren und bis zum Auftauen im 37°C -Wasserbad für mindestens 24 Stunden unter -160°C gelagert. Die metabolische Aktivität, sowie die Membranintegrität wurden mittels des FDA/EtBr-Assays bestimmt.

Die erhaltenen Vitalitäten sowie repräsentative mikroskopische Aufnahmen sind in der Abbildung 45 gezeigt. Mit durchschnittlich weit über 70% konnten die Proben erfolgreich kryokonserviert werden.

Dabei sind die Unterschiede zwischen den verschiedenen Kryokonservierungsansätzen statistisch nicht signifikant (t-Test $p < 0,05$), die automatisierte Prozedur zur Kryokonservierung schneidet also ebenso gut ab, wie die gebräuchlichen manuellen Prozeduren.

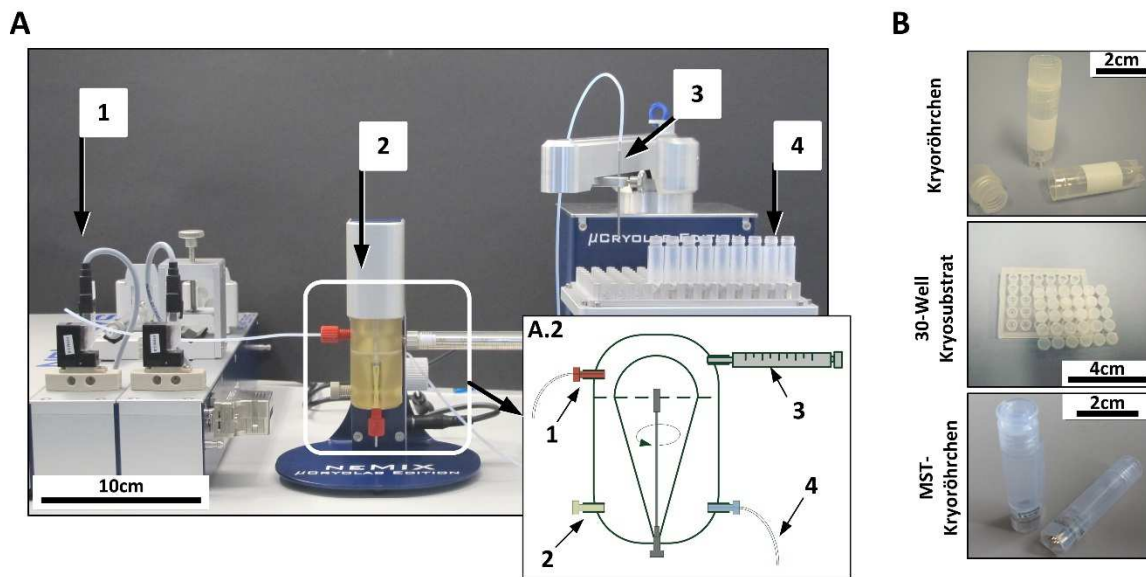


Abbildung 44: A Photographie des modularen Aufbaus zur Kryokonservierung therapeutisch relevanter Zellsysteme in Mikrosystemtechnik-basierten Kryosubstraten mit Automatisierungspotenzial. Über eine Spritzenpumpe (1) wird das Kryoprotektiv DMSO langsam bis zu einer Endkonzentration von 7% in die Mischflasche mit Zellsuspension (2) dosiert. Über einen Pipettierautomat (3) wurden die MST-Kryoröhrchen (4) befüllt. Die schematische Zeichnung in A.2 zeigt den Aufbau der Mischflasche mit Entlüftungsschlauch (1) und Blindstopfen (2), die sowohl die Homogenität der Zellsuspension (3) garantiert, als auch das Kryoprotektiv DMSO (4) untermischt. B Fotografien der verwendeten miniaturisierten Kryosubstrate. Standard-Kryoröhrchen wurden mit 1ml Volumen bestückt, die 30-Well Substrate mit 30x25µl und die MST-Kryoröhrchen mit 70µl.

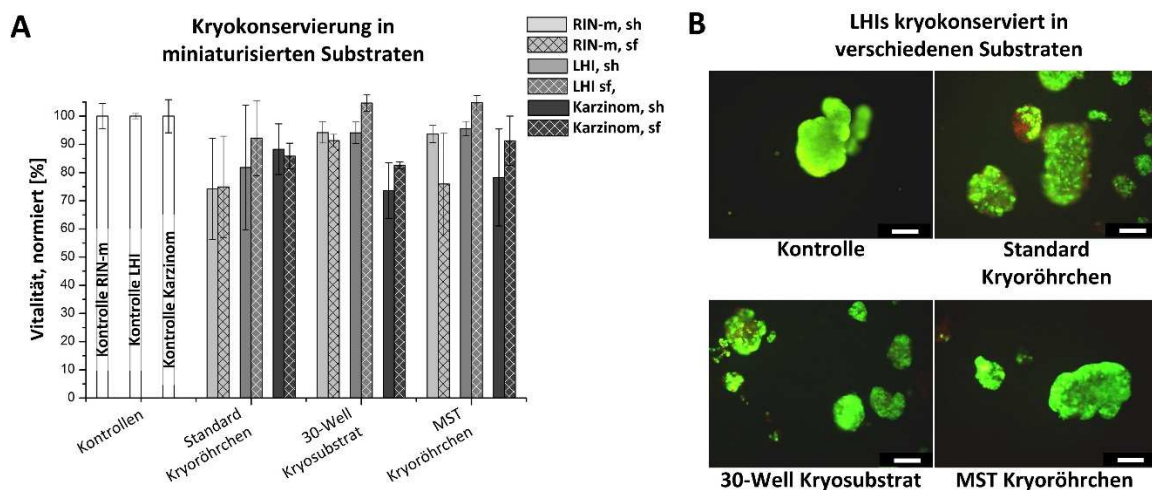


Abbildung 45: A Ergebnisse der SR-Kryokonservierung verschiedener Zellsysteme (RIN-m Mikrogewebe, Langerhans-Inseln (LHI) und Kolonkarzinomfragmente) in miniaturisierten Substraten (siehe Abbildung 41 b) mit serumhaltigen (sh) und serumfreien (sf) Kryokonservierungsmedien. B Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Langerhans-Inseln kryokonserviert in serumhaltigem Medium in verschiedenen Substraten 72h nach dem Auftauen. Die Balken entsprechen 100µm. N=3, außer bei den Experimenten mit Primärgeweben (hier N=2), es standen nur 2 verschiedenen Gewebeprobe zur Verfügung.

4.3.4 Untersuchung eines miniaturisierten Ansatzes zur Vitrifikation von Zellen in Suspension

Nachdem die Kryokonservierung mit Kristallisation erfolgreich zur automatisierten Ablage der Proben in miniaturisierten MST-Kryoröhrchen etabliert und an therapeutisch relevanten Zellsystemen evaluiert werden konnte, stellte sich die Frage, ob eine miniaturisierte Kryokonservierung auch ohne Phasenseparation umzusetzen ist. Auch in diesem Fall war das Ziel kleinste Einheiten an lagerfähigen Bioimplantationseinheiten zu entwickeln, die über lange Zeiträume gelagert werden können und im Gegensatz zur adhärenen Vitrifikation aus Kapitel 4.3.2, sterile, abgeschlossene Einheiten bilden, die flexibel zu bewegen sind. Neben kleinsten Probenvolumen und hohen Wärmetransferraten müssen hohe Konzentrationen an CPAs zur erfolgreichen Vitrifikation erfüllt sein, können aber durch das Anlegen eines hohen Umgebungsdrucks auf zellschonendere Mengen reduziert werden (siehe Kapitel 2.2.2 und 2.2.3). Deshalb wurde der im Laufe dieser Arbeit veröffentlichte Ansatz des Self Pressurized Freezing (SPF) untersucht, bei dem die biologischen Proben in Metallröhrchen eingefroren werden. Durch die Expansion des Wassers beim sehr schnellen Abkühlen baut sich ein hoher Druck in den Röhrchen auf, der die Vitrifikation bei relativ geringen CPA-Konzentrationen theoretisch begünstigt. Die Verwendung von sterilen, abgeschlossenen Röhrchen erlaubt auch die Benutzung anderer Kühlmittel, wie zum Beispiel Ethan, das keinen Leidenfrost-Effekt auslöst und somit noch günstigere Kühlraten erreichen kann.

Untersucht wurde der Ansatz des SPF mit hSCs (hESCs und hiPSCs), da deren problematische Kryokonservierung hinlänglich bekannt ist und diese möglicherweise von der Kryokonservierungsmethode profitieren. Ohne beziehungsweise mit nur sehr wenig gebildeten Eiskristallen könnten Schädigungen der Membran und somit der Ausbildung der wichtigen Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte verhindert werden. Der zum SPF verwendete Aufbau wurde von Projektpartnern des MPI in Dortmund realisiert und wird in Abbildung 46 dargestellt: Mit Hilfe von Pipetten werden die vorbereiteten Zellsuspensionen in die Silberröhrchen eingesaugt, die dann mit einer handelsüblichen Zange fest verschlossen werden. Die geschlossenen Silberröhrchen mit einer Pinzette an einem Fallbeil fixiert. In einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporbox steht ein Edeltank mit Ethan, in den die Probenröhrchen getaucht werden.

An Tag 7 der Standardkultivierung werden Zellsuspensionen hergestellt, die wie folgt verarbeitet wurden: Je ein Teil der Kontrolle wurde für einen FDA/EtBr-Assay zur Bestimmung der metabolischen Aktivität und der Membranintegrität verwendet und der andere Teil wurde in beschichtete Zellkulturschalen zur Bestimmung der Anwachsrate überführt. Um schädigende Einflüsse der Prozedur zu analysieren, die vor der Kryokonservierung stattfinden könnten, wurden die Zellen in dem entsprechenden Kulturmedium inkubiert (Mediumkontrolle) und ohne Kryokonservierung in die Röhrchen eingebracht (Röhrchenkontrolle). Um zu evaluieren, ob die Ausbildung von Druck in den Röhrchen stattfand, wurden neben den geschlossenen Röhrchen auch noch offene Röhrchen kryokonserviert. Alle kryokonservierten Proben wurden direkt wieder in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, die Röhrchen wurden mit einer Schere aufgeschnitten, die enthaltene Zellsuspension wurde entnommen und mittels FDA/EtBr-Assay und der Bestimmung der Anwachsrate untersucht.

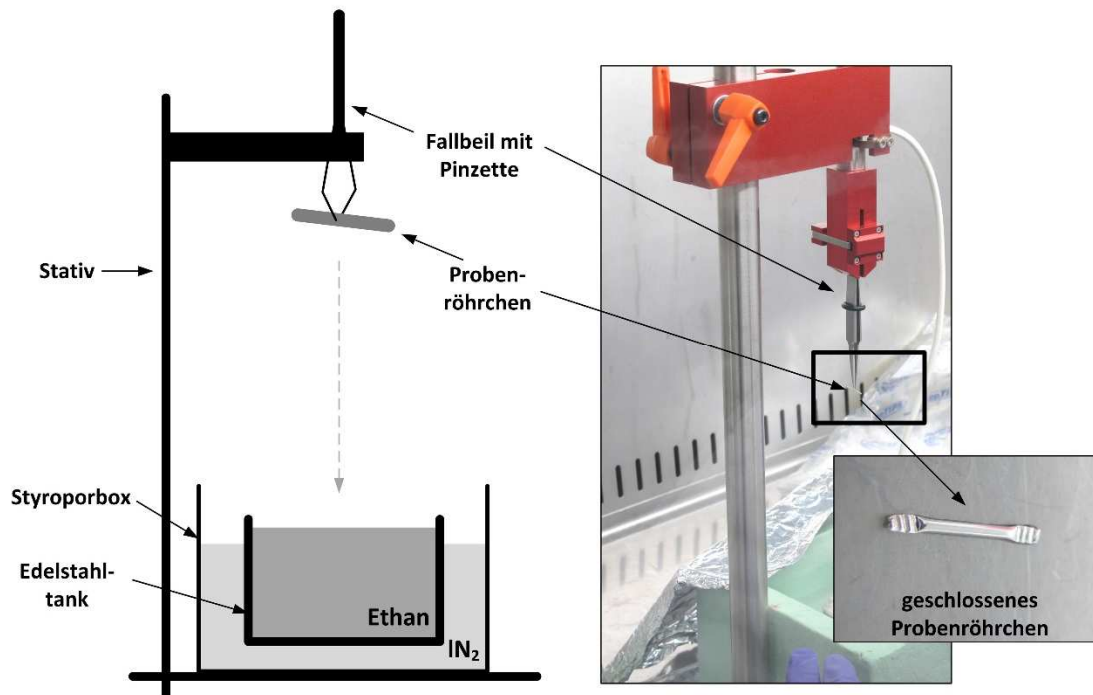


Abbildung 46: Schematische Zeichnung und Fotografie des Aufbaues zum Self Pressurized Freezing (SPF) von humanen embryonalen und induziert pluripotenten Stammzellen. Die mit Hilfe einer Zange geschlossenen Probenröhrchen werden mit einer Pinzette am Fallbeil befestigt. Wird das Fallbeil ausgelöst, taucht das Probenröhrchen in das tiefkalte Ethan und erfährt so eine optimale Abkühlung ohne Leidenfrost-Effekt.

Um den Einfluss der Prozedur auf den Erhalt der Pluripotenz bestimmen zu können, wurden Koloniefragmente der Kontrolle, sowie kryokonservierte Koloniefragmente auf Matrigel-beschichtete Standardkulturschalen ausgesät und nach 7 Tagen mit dem Pluripotenzmarker Tra-1-81 immunzytochemisch gefärbt. Repräsentative Aufnahmen der Färbungen sind in Abbildung 49 dargestellt. Die Koloniefragmente beider Stammzellensysteme waren auf Grund der mechanischen Belastung während des Prozesses stark zerfallen. Bereits in der Mediumkontrolle und der Röhrchenkontrolle verloren die Fragmente über 90% an Fläche. Die resultierenden Kolonien nach der 7-tägigen Kultivierung zeigten aber einen Pluripotenzerhalt, wenn auch die Morphologie deutlich von der Kontrollgruppe abwich.

Die Ergebnisse der hESC sind in Abbildung 47 und die der hiPSCs sind in Abbildung 48 dargestellt. In beiden Fällen ist die metabolische Aktivität und die Membranintegrität in allen analysierten Proben gleich hoch. Dieses Ergebnis täuscht jedoch über den wahren Erfolg der Methode hinweg, denn die Anwachsrate der hSCs betrug nach dem SPF nur noch um die 10%. Die Werte lagen zwar noch höher als die von Herstellern garantierte Anwachsrate, jedoch macht es keinen statistisch signifikanten Unterschied, ob die Proben in offenen oder geschlossenen Röhrchen kryokonserviert wurden. Das lässt darauf schließen, dass kein Druck aufgebaut wurde. Wegen dieses Umstandes und der schwierigen Handhabung der dünnen Röhrchen, wurde dieser Ansatz nicht weiter untersucht.

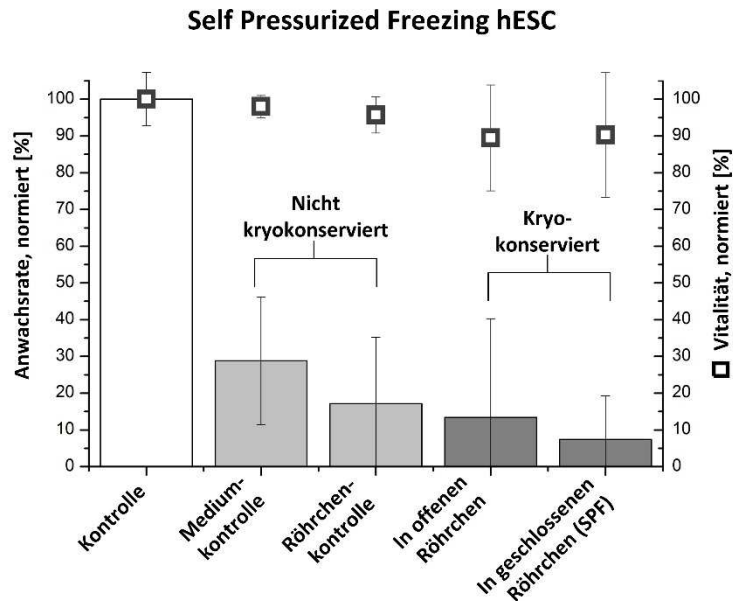


Abbildung 47: Aufgetragen ist auf der linken Y-Achse die normierte Anwachsrate der hESC-Fragmente nach der Inkubation in den entsprechenden Medien beziehungsweise nach der Kryokonservierung in offenen und geschlossenen Röhren. Auf der rechten Y-Achse ist die Vitalität der hESC-Fragmente nach FDA/EtBr-Assay aufgetragen. Die absolute Anwachsrate der Kontrolle lag bei $95,7 \pm 7,0\%$ und ihre absolute Vitalität bei $90,9 \pm 2,1\%$.

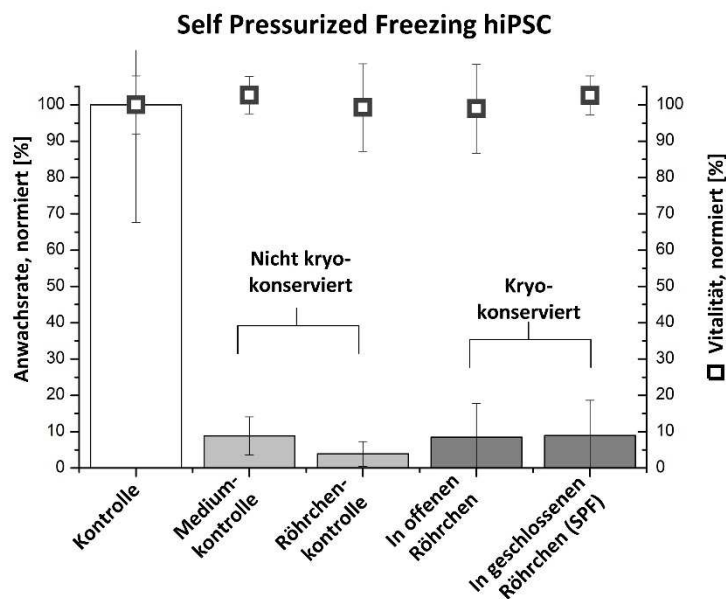


Abbildung 48: Aufgetragen ist auf der linken Y-Achse die normierte Anwachsrate der hiPSC-Fragmente nach der Inkubation in den entsprechenden Medien beziehungsweise nach der Kryokonservierung in offenen und geschlossenen Röhren. Auf der rechten Y-Achse ist die Vitalität der hiPSC-Fragmente nach FDA/EtBr-Assay aufgetragen. Die absolute Anwachsrate der Kontrolle lag bei $34 \pm 11\%$ und ihre absolute Vitalität bei $36,0 \pm 6,9\%$.

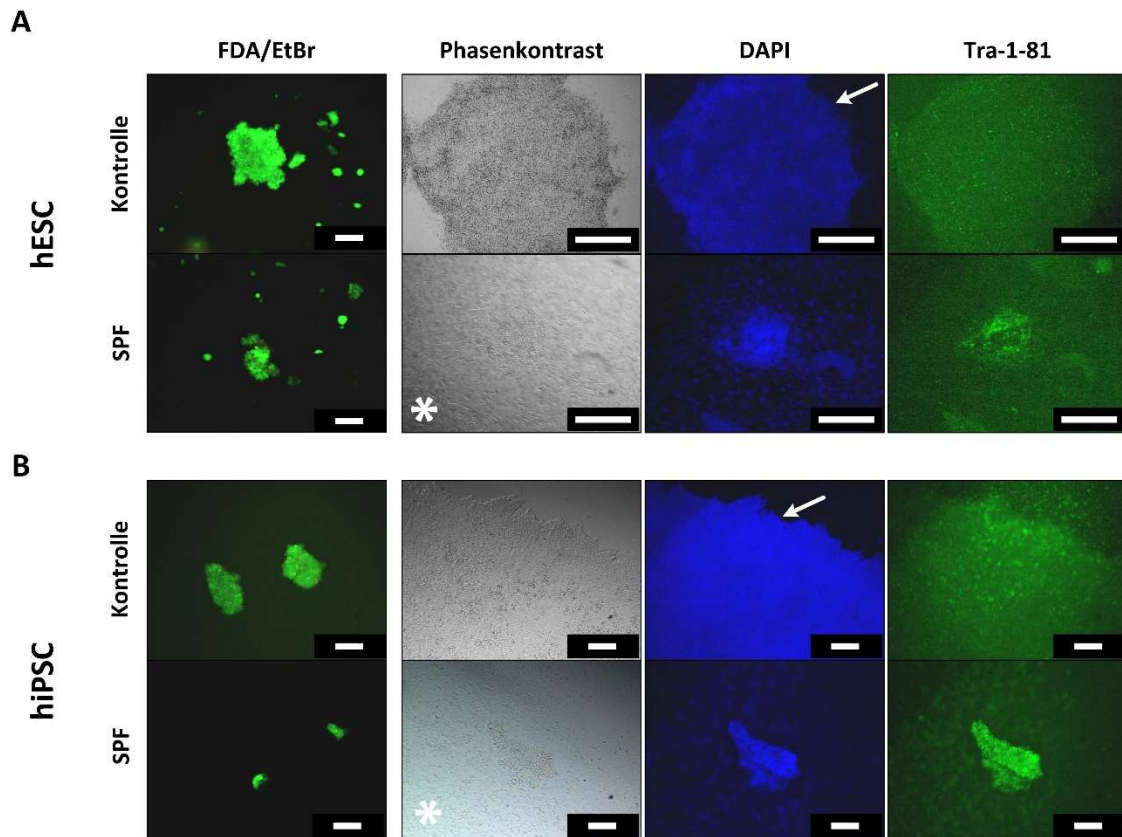


Abbildung 49: Mikroskopische Aufnahmen von A hESC- und B hiPSC-Kolonien vor und nach der Kryokonservierung mit Self Pressurized Freezing (SPF). Die FDA/EtBr-Aufnahmen zeigen die Koloniefragmente an Tag 0 bevor sie ausgesät wurden, die Balken entsprechen 100 μ m, die übrigen Aufnahmen zeigen die entsprechend proliferierten Kolonien nach 7-tägiger Standardkultivierung. Die Aufnahmen im Phasenkontrast-, DAPI- und Tra-1-81-Aufnahmen der hESC-Kolonien entsprechen 500 μ m, die entsprechenden hiPSC-Aufnahmen entsprechen 100 μ m. Ebenso entsprechen die Balken in den FDA/EtBr-Aufnahmen an Tag 0 100 μ m, N=3.

4.3.5 Vergleichende Untersuchungen zum inter- und intrazellulären Strukturerhalt nach Kryokonservierungsverfahren mit Kristallisation und Vitrifikation

In den vorangegangenen Untersuchungen zur Kryokonservierung wurde beobachtet, dass sowohl Scherkräfte durch die Verarbeitung und durch die Ausbildung von Eiskristallen, als auch chemische Einflüsse Mikrogewebe schädigen können. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es sowohl Prozeduren mit und ohne Kristallisation gibt, die relevante Zellen in ausreichendem Maße funktional kryokonservieren können. In den nachfolgend aufgeführten Experimenten wurde untersucht, inwiefern sich Zellen und Mikrogewebe schützen lassen, um funktional wieder aufgetaut werden zu können. Fokus dabei wird auf die Gerüststrukturen und Reparaturmechanismen gelegt.

Untersuchungen des Einflusses der Kryokonservierung mit Kristallisation und Vitrifikation auf Zytoskelett und DNA-Integrität in Einzelzellen

Es wurde der Erhalt der hochkonservierten Aktinstrukturen sowie die Anzahl an DNA-Strangbrüchen an murinen Fibroblasten nach Kryokonservierung mit Kristallisation und Vitrifikation untersucht. Dazu wurden die gut charakterisierten L929-Zellen mit ihrem ausgeprägten filamentären Aktingerüst zum

einen auf reinen Glasdeckgläschen und zum anderen auf mit extrazellulärer Matrix beschichteten Glasdeckgläschen bis zur Konfluenz kultiviert. 24 Stunden vor der Kryokonservierung wurde das Kulturmedium durch serumfreies Basalmedium ersetzt, um den Zellzyklus in der stationären Phase anzuhalten und Artefakte bei der DNA-Strangbruchfärbung durch mitotische Zellen auszuschließen. Zu den Zeitpunkten 0, 30 und 60min nach der Kryokonservierung wurden die adhärennten Zellen auf den Deckgläschen fixiert. Filamentäres Aktin wurde mit Bodipy FL Phalloidin (grün) und globuläres Aktin mit DNase I (rot) angefärbt, die Zellkerne wurden mit DAPI gegen gefärbt. Um den F-/G-Aktin Gehalt in den Zellen quantifizieren zu können, wurden pro unabhängigem Experiment und Ansatz von 10 mikroskopischen Aufnahmen die Intensitäten des Grün- und Rotkanals ausgewertet und ins Verhältnis gesetzt. Die auf die jeweiligen Kontrollen normierten F-/G-Aktinverhältnisse sind in Abbildung 50 A aufgetragen. Alle Werte der verschiedenen Ansätze sind bis auf die Probe SR ohne ECM 60min nach der Kryokonservierung statistisch signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle; ebenfalls zeigen die F-/G-Aktinverhältnisse in den beiden Kontrollen einen statistisch signifikanten Unterschied (t-Test, $p < 0,05$). Abbildung 50 B zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der untersuchten Zellen. Nach der Kryokonservierung mit Kristallisation verschiebt sich das Verhältnis hin zu einem höheren G-Aktin Gehalt, die Vitrifikation verschob das Verhältnis in Richtung filamentäres Aktin. Um den Einfluss der verwendeten Kryomedien zu analysieren, wurden die Zellen gemäß den Protokollen mit den jeweiligen Medien inkubiert und ohne Kryokonservierung fixiert (Abbildung 51). Dabei zeigten sich keine signifikanten Änderungen am F-/G-Aktinverhältnis nach einer Inkubation mit dem SR-Medium zur Kryokonservierung mit Kristallisation. Ebenso hatte eine Inkubation der Zellen bei 4°C keinen Effekt auf das Verhältnis. Im Gegensatz dazu konnte nach der Inkubation mit den Vitrifikationsmedien V1.1 und V2.1 ein größerer F-Aktinanteil in den Zellen beobachtet werden. Das auf die Kontrolle normierte Verhältnis stieg im Falle der Inkubation in Lösung V1.1 auf $120 \pm 22\%$ und bei anschließender Inkubation in V2.1 auf $127,4 \pm 8,7\%$.

Um zu untersuchen, ob Zellen nach der Vitrifikation nur in eine Stagnationsphase gefallen sind oder die Prozedur geeignet ist, um die Zelle als geordnete und hochstrukturierte Einheit zu erhalten, wurde zu den gleichen Zeitpunkten ebenfalls die Anzahl der DNA-Strangbrüche durch die Färbung phosphorylierter H2AX Proteine (gH2AX) untersucht. In Abbildung 52 A sind die normierten Strangbrüche pro Zellkern aufgetragen, wobei pro Ansatz der 3 unabhängigen Experimente 10 zufällig ausgewählte Zellkerne manuell ausgezählt wurden. Gezählt wurden ausschließlich Signale, die eine Größe von mehr als $0,5\mu\text{m}$ aufwiesen. Abbildung 52 B zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Zellen nach DAPI- und gH2AX-Färbung.

Die Anzahl der DNA-Strangbrüche stieg erheblich nach einer Kryokonservierung mit Kristallisation: Zum Beispiel stieg für Zellen ohne extrazelluläre Matrixproteine die Anzahl der gH2AX-Foki von $4,0 \pm 3,0$ in der Kontrolle bis zu $10,1 \pm 6,7$ Foki pro Zellkern, was in den gezeigten repräsentativen Fluoreszenzaufnahmen widerspiegelt wird (Abbildung 52). Die relativ großen Standardabweichungen von teilweise über 100% erklären sich durch die zufällige Auswahl der ausgewerteten Zellkerne, was auch Zellkerne ohne jegliches Signal einschließt. Die Differenzen in den SR-Ansätzen nach 0 und 30min sind jedoch statistisch signifikant unterschiedlich zu den jeweiligen Kontrollen (t-Test, $p < 0,05$). Nach 60min gleicht sich die Anzahl der gH2AX-Foki wieder allmählich an die Anzahl in den Kontrollen an. Die Probe SR mit ECM lässt sich bereits nicht mehr statistisch signifikant von der Kontrolle unterscheiden. Die Verwendung von ECM hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der gH2AX-Foki, die jeweiligen Ansätze unterscheiden sich statistisch nicht signifikant (beides analysiert durch t-Test, $p < 0,05$).

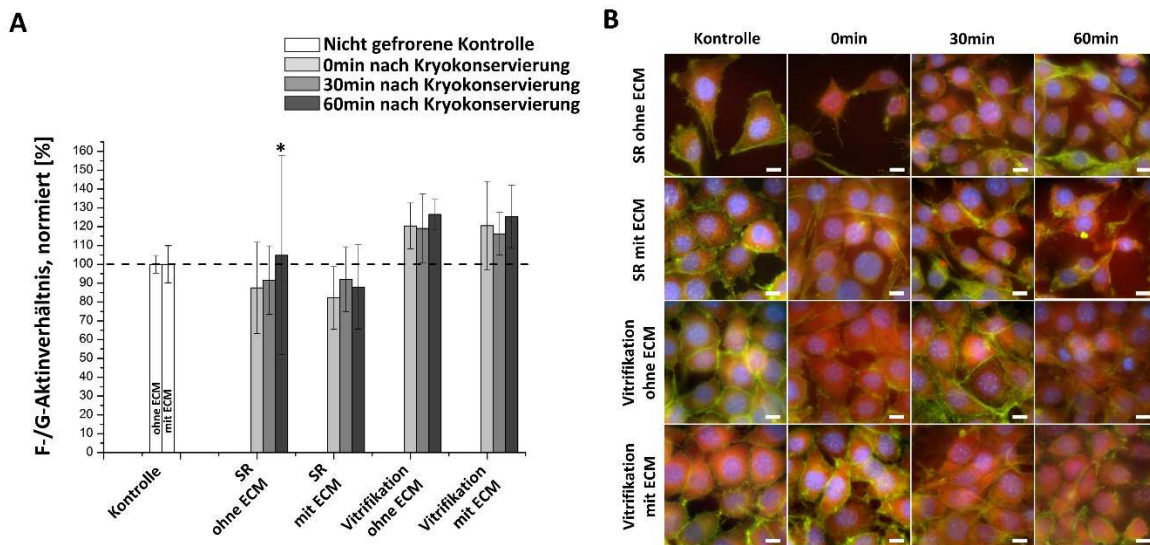


Abbildung 50: A Aufgetragen ist das Verhältnis an F- und G-Aktin in adhärenen, murinen Fibroblasten nach der Kryokonservierung im Slow-Rate-Verfahren mit Kristallisation (SR) und im Verfahren der Vitrifikation, jeweils normiert auf die nicht gefrorene Kontrolle. Des Weiteren wurde der Einfluss zusätzlicher extrazellulärer Matrixproteine (ECM) untersucht. Die absoluten Verhältnisse lagen in der Kontrolle ohne ECM bei $22,1 \pm 1,3\%$ und in der Kontrolle mit ECM bei $32,2 \pm 3,8\%$. Alle Werte (bis auf SR ohne ECM, 60min) sind signifikant unterschiedlich zu den entsprechenden Kontrollen (t-Test, $p < 0,05$). B Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von murinen Fibroblasten, deren filamentäres Aktingerüst grün und das globuläre Aktin rot angefärbt wurden. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die Balken entsprechen $5\mu\text{m}$, $N=3$.

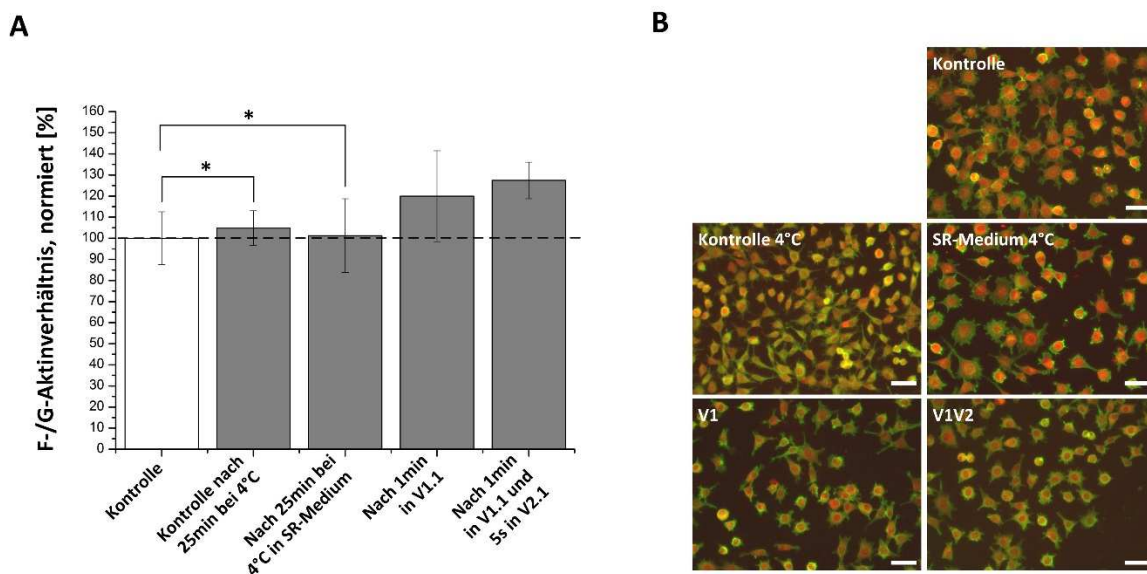


Abbildung 51: A Aufgetragen ist das Verhältnis von F- zu G-Aktin in adhärenen murinen Fibroblasten in den für die verschiedenen Kryokonservierungsprozeduren relevanten Medien. SR steht für Kryokonservierung im Slow-Rate-Verfahren, V1.1 und V2.1 sind verwendeten Vitrifikationsmedien. Das absolute Verhältnis von F-Aktin lag in der Kontrolle bei $34,6 \pm 4,3\%$. B Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von murinen Fibroblasten, deren filamentäres Aktingerüst grün und das globuläre Aktin rot angefärbt wurden. Die Balken entsprechen $50\mu\text{m}$; $N=3$.

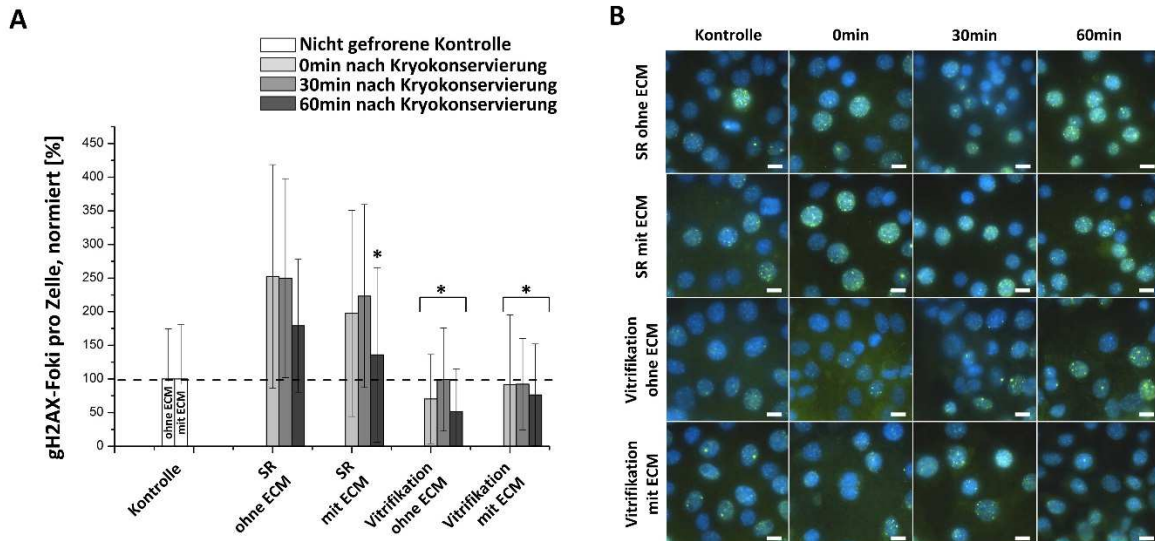


Abbildung 52: A Aufgetragen sind die normierten gH2AX-Signale pro Zelle. Die absoluten gH2AX-Signale pro Zellkern lagen in der Kontrolle ohne ECM bei $4,0 \pm 3,0$ und in der Kontrolle mit ECM bei $4,3 \pm 3,4$. Alle Werte, die mit einem Stern gekennzeichnet sind, sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich zur entsprechenden Kontrolle. Die Kontrollen untereinander sind ebenfalls statistisch nicht signifikant unterschiedlich (t-Test, $p < 0,05$). B Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen muriner Fibroblasten, deren Zellkern mit DAPI (blau) und DNA-Strangbrüche mit Anti-gH2AX-Antikörper, gekoppelt mit Alexa-Fluor-488 (grün), angefärbt wurden. Die Balken entsprechen $5\mu\text{m}$, $N=3$.

Untersuchungen des Einflusses der Kryokonservierung mit Kristallisation und Vitrifikation auf den Strukturerhalt in Herzmuskelschnitten

In den vorangegangenen Experimenten zur Kryokonservierung von adhärennten Einzelzellen und deren Untersuchung hinsichtlich des Zellgerüsts und der DNA-Strangbrüche kann man die Unterschiede zwischen den beiden Einfrierregimen Kryokonservierung mit Kristallisation und Vitrifikation erkennen. Wichtiger für neue Therapien im Kontext regenerativer und medikamentenbasierter Medizin sind jedoch Zellen im Verbund. Bestens geeignet, um den Einfluss der Nukleation in Mikrogewebe zu untersuchen sind Herzmuskelgewebe, die im Rasterelektronenmikroskop eine hochkonservierte, eindeutige und gut charakterisierte Ultrastruktur aufweisen.

Um diese zu untersuchen, wurden Schnitte ($200\mu\text{m}$) aus primärem porcinen und humanen Herzgewebe präpariert, über Nacht auf Eis in einer Organtransportlösung (Hypo Therosol®, Sigma-Aldrich, Schnellendorf) transportiert und gemäß der beschriebenen Protokolle im SR-Verfahren und im Vitrifikationsverfahren eingefroren. In beiden Fällen diente Hypo Therosol als Basalmedium für die Kryokonservierungsmedien. Zur besseren Handhabung der Schnitte zur Vitrifikation wurden diese auf einem Nylonnetz ($100\mu\text{m}$ Porengröße) in die einzelnen Lösungen und den flüssigen Stickstoff getaucht (siehe Abbildung 53). Nach dem Auftauen in einem 37°C -Wasserbad beziehungsweise den auf 37°C erwärmten Auftaulösungen wurden die Schnitte sofort fixiert, in Epoxy-Harz eingebettet und für die Block-Face-Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Photographien der einzelnen Kryokonservierungsprozeduren und repräsentative REM-Aufnahmen im Rückstreuelektronenmodus sind in Abbildung 53 gezeigt.

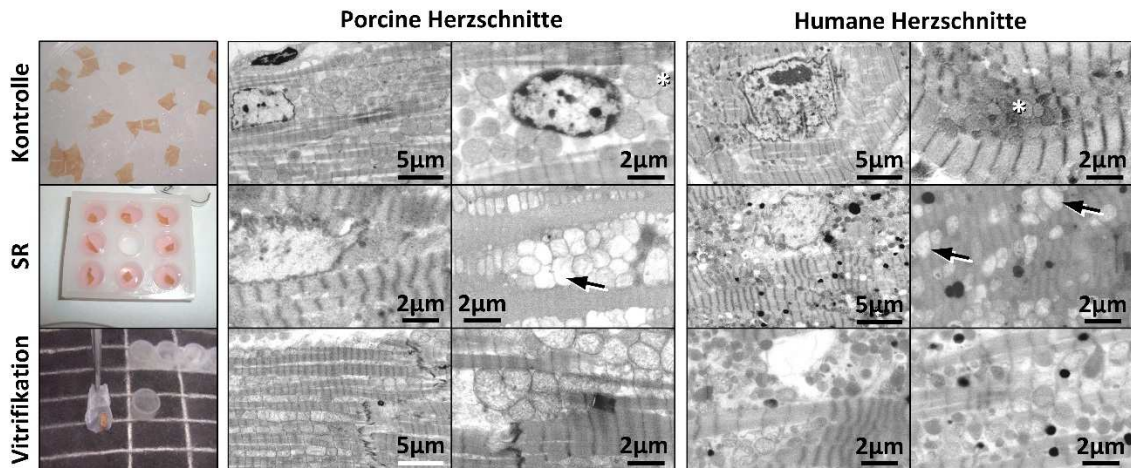


Abbildung 53: Photographien und REM Aufnahmen kryokonservierter humaner und porciner Herzschnitte im Slow-Rate-Verfahren mit Kristallisation (SR) und im Verfahren der Vitrifikation. Die Sterne in den Aufnahmen der Kontrolle markieren intakte Mitochondrien. In der Slow-Rate-Probe zeigen die Pfeile die Lyse der Mitochondrien nach Kryokonservierung mit Kristallisation, während der Strukturhalt in der vitrifizierten Probe deutlich zu erkennen ist. Es wurden pro Ansatz jeweils 3 Schnitte untersucht.

In den Aufnahmen der Kontrolle sieht man deutlich die intakte Querstreifung der Muskelzellen mit den dunklen Z-Scheiben sowie vitale Mitochondrien, die im Rückstreuemodus dunkel erscheinen und eine deutlich sichtbare Membran aufweisen. Herzschnitte, die mit dem SR-Verfahren kryokonserviert wurden, zeigen eindeutige Schäden in der Struktur, die Querstreifung der Zellen ist in Mitleidenschaft gezogen worden und die Mitochondrien wurden lysiert. Im Gegensatz dazu weisen die vitrifizierten Herzschnitte kaum Schädigungen auf, da sich vermutlich kaum bis keine Eiskristalle ausgebildet hatten.

Bildgebende Verfahren zur Untersuchung kryokonservierter Proben im tiefkalten Zustand

Bislang wurden nur aufgetaute Proben untersucht, es gibt noch keine Möglichkeit, die Beschaffenheit biologischer Proben im tiefkalten Zustand bei Lagertemperaturen in Biobanken zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer IWM in Halle eine Vorrichtung entwickelt, die es ermöglichte Proben über ein Transportsystem in gefrorenem Zustand zur Untersuchung in ein Kryo-REM zu überführen.

Das Kryo-REM ist ein Rasterelektronenmikroskop, das bei Umgebungstemperaturen unter -140°C arbeitet (Katsen-Globa et al. 2010). Das Transportsystem besteht aus einem Teflongefäß, in das ein spezieller Probenhalter eingeführt wird. Probenhalter und Probe können so während der gesamten Transportkette zur Probenkammer des Mikroskops stets in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gehalten werden (siehe Abbildung 54 A (c)). Limitierungen dieser Methode sind die Beschaffenheit der Probe und das verwendete Probenvolumen: Die zu untersuchende biologische Probe muss adhären auf Deckgläschen kryokonserviert worden sein und darf dabei nur einen minimalen Mediumfilm aufweisen. Zu viel Medium auf der Probe kann im REM nicht wegsublimiert werden, so dass die eigentliche Probe unsichtbar bleiben würde. Aus diesem Grund wurden Mikrogewebe aus murinen Fibroblasten im HD-Verfahren gezüchtet und für 24 Stunden auf Thermanox-Deckgläschen inkubiert, um eine Adhäsion zu erreichen. Anschließend wurden die Deckgläschen mit der langsamen

Kryokonservierung (SR) und der Vitrifikation kryokonserviert, wobei auf einen kleinstmöglichen Flüssigkeitsfilm vor dem eigentlichen Einfrieren geachtet wurde. Die Proben wurden in der Atmosphäre von flüssigem Stickstoff auf einen Probenhalter montiert (siehe Abbildung 54 A (d)), mit Hilfe des Transportsystems (siehe Abbildung 54 A (a, b)) in das Kryo-REM überführt und im Rückstreuelektronenmodus untersucht. Repräsentative Aufnahmen, die mit Hilfe dieses Aufbaus realisiert werden konnten, werden in Abbildung 54 B gezeigt. Vitrifizierte Mikrogewebe wiesen im Vergleich zu den mit Equilibrierungsphase kryokonservierten Proben keine sichtbaren Eiskristalle auf.

A



B

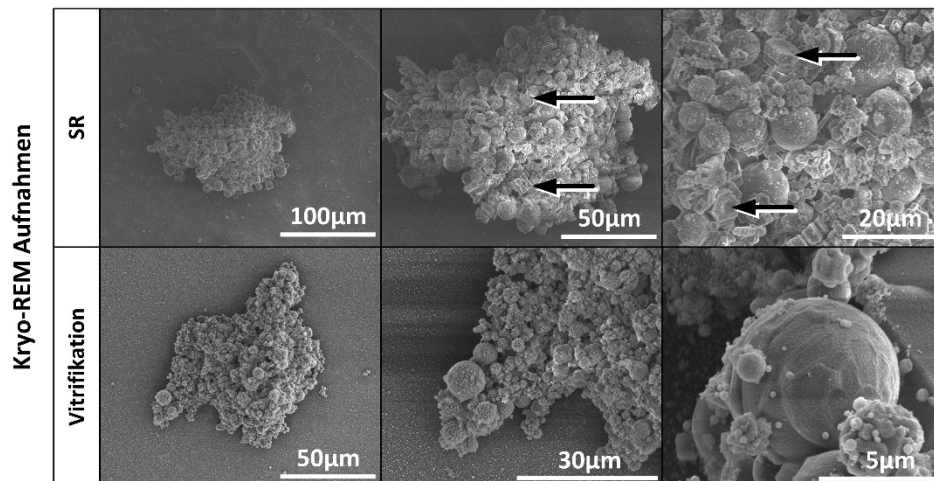


Abbildung 54: A Probenträger aus Teflon (a,b) zum Einführen kryokonservierter Proben (d) in das Kryo-Rasterelektronenmikroskop (c). B Repräsentative rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Eisbildung in kryokonservierten Mikrogeweben aus murinen Fibroblasten: In der Probe der SR-Kryokonservierungsprozedur mit Equilibrierungsphase ist im Gegensatz zur Vitrifikation eine deutliche Eisbildung zu erkennen (schwarze Pfeile zeigen hexagonale Eiskristalle), N=3.

4.4 Entwicklung von anwendungsbezogenen Automatisierungsprozeduren für medizinisch relevante Zellsysteme

Um den großen Bedarf an definierten, homogenen Mikrogeweben im Kontext regenerativer und medikamentenbasierter Medizin produzieren zu können, führt langfristig kein Weg an einer Automatisierung der Zellkultur- und Kryokonservierungsprozeduren vorbei. Es existieren bereits zahlreiche Studien zur Expansion humaner Stammzellen, die meist auf großvolumigen Batch-Bioreaktoren basieren. Da in diesen Systemen aber die Anzucht homogener Mikrogewebe von gleicher Größe nicht umsetzbar ist und die Zellen durch Rühr- oder Begasungssysteme starken Scherkräften ausgesetzt sind, fokussierte sich diese Arbeit auf das HD-System, das zur Präparation bereits in Kapitel 4.2.3 evaluiert wurde. In diesem nicht-oberflächenbasierten, massiv parallelisierbaren Ansatz konnte bisher die Produktion und Kultivierung relevanter Zellen im Kontext der regenerativen und medikamentenbasierter Therapien umgesetzt werden. Die nachfolgenden Kapitel befassen sich mit der Umsetzung der Kryokonservierung und der Applikation von Mikrogeweben aus HD-Kultivierung.

4.4.1 Etablierung einer automatisierten Produktion und Kultivierung humaner Stammzellen für regenerative und medikamentenbasierte Medizin

Der Durchbruch zur Automatisierung des hängenden Tropfens gelang durch die Verwendung von Lochplatten (HD-Platte), die auf standardisierte 96- oder 384-Wellplatten gesetzt werden können und einen senkrechten Zugang von oben ermöglichen, um Tropfen definierter Größe aufzuhängen. Um zu untersuchen, ob solche Automatisierungsprozeduren auch unabhängig von der Art verwendeter Plattformen sind, wurden für die nachfolgenden Experimente zwei voneinander unabhängige Pipettierroboter verwendet, die in Abbildung 55 dargestellt sind. Der Nanoplotter 2.1 (GeSiM mbH, Deutschland) sowie die Freedom EVO 200 Anlage (TECAN, Schweiz) wurden dazu mit handelsüblichen Pipettenspitzen (200µl Volumen) ausgestattet, die je nach Geometrie der verwendeten Lochplatten, Tropfen von 20 oder 40µl von oben in die Platten pipettierten.

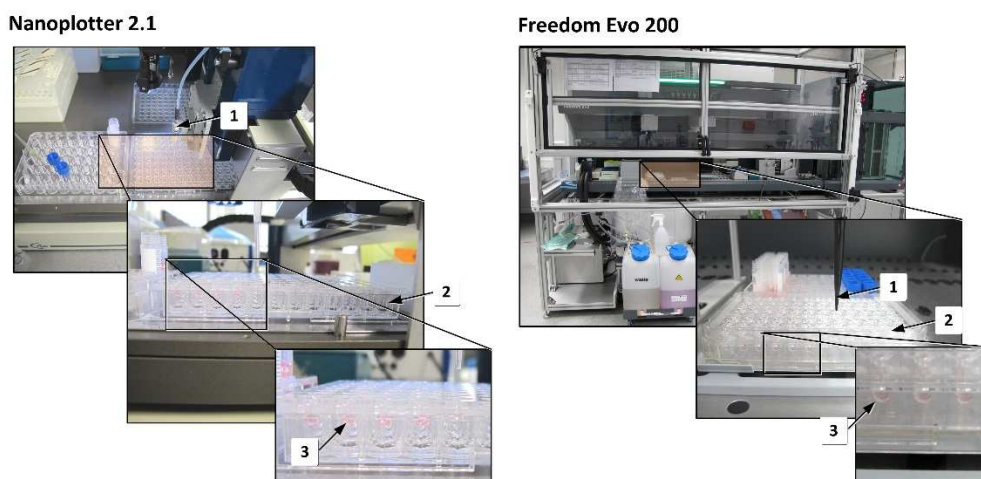


Abbildung 55: Photographien der verwendeten Pipettierrobotersysteme Nanoplotter 2.1 (GeSiM, Deutschland) und Freedom EVO 200 (TECAN, Schweiz). Über die jeweiligen Spitzen (1) können in den entwickelten Tropfenplatten (2) die gewünschten Volumina an Medien zugeführt beziehungsweise abgenommen werden.

Um verschiedene Parameter wie Tropfengröße oder Tropfenstabilität zu evaluieren, wurden kommerziell erhältliche HD-Platten (GravityPLUS™, InSphero, Schweiz; Perfecta3D® im 96- und 384-Format, 3D Biomatrix, USA) sowie eine eigenproduzierte HD-Platte charakterisiert, die sich hinsichtlich der Lochgeometrien unterschieden (siehe Abbildung 56).

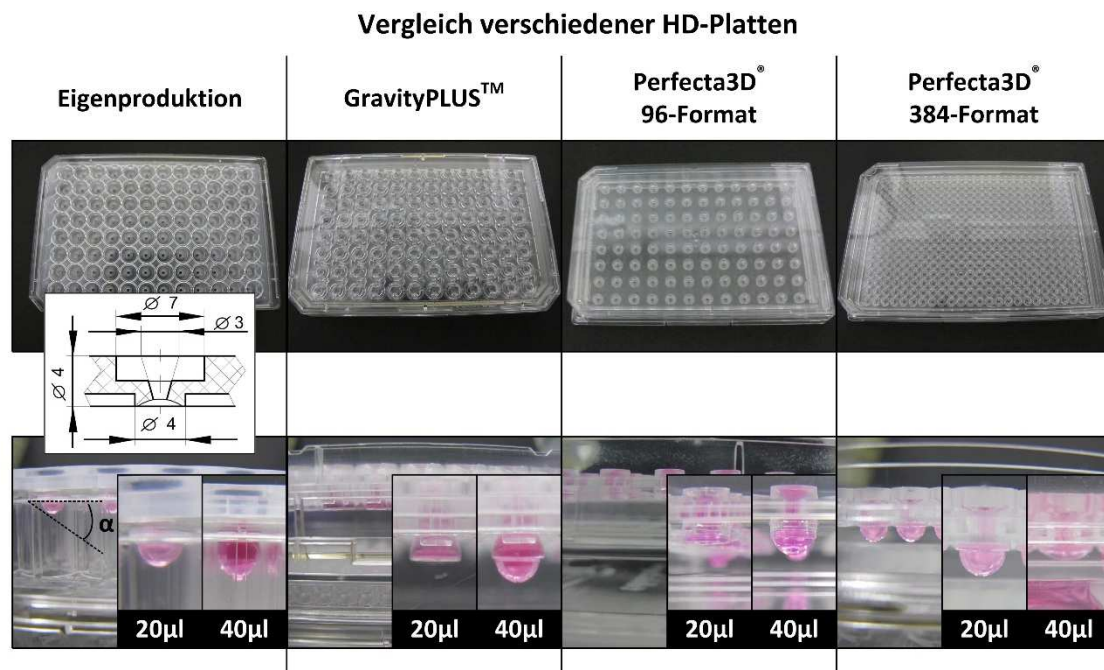


Abbildung 56: Vergleich der verschiedenen Platten zur Kultivierung im HD und Bestimmung des Kontaktwinkels α (angedeutet durch die gestrichelte schwarze Linie). Das Inlet bei den Platten der Eigenproduktion zeigt die exakte Geometrie der Poren. Die Kontaktwinkel der Tropfen in der Eigenproduktion sind $\alpha(20\mu\text{l}) = 35^\circ$, $\alpha(40\mu\text{l}) = 50^\circ$; bei der GravityPLUS-Platte $\alpha(20\mu\text{l}) = 0^\circ$ und $\alpha(40\mu\text{l}) = 40^\circ$; bei der Perfecta3D® im 96-Mikrowellformat $\alpha(20\mu\text{l}) = 0^\circ$ und $\alpha(40\mu\text{l}) = 35^\circ$; bei der Perfecta3D® im 384-Mikrowellformat $\alpha(20\mu\text{l}) = 35^\circ$, der Kontaktwinkel bei einem Volumen von $40\mu\text{l}$ kann nicht festgestellt werden, weil ein Tropfen dieser Größe Kontakt mit dem Boden hat und abfällt. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2014.

Dazu wurden die resultierenden Tropfen durch Bestimmung des Kontaktwinkels, wie in Abbildung 56 gezeigt, charakterisiert und verglichen. Mit einem Kontaktwinkel von 45° und damit dem besten Verhältnis von Oberfläche zu Volumen schnitt die GravityPLUS™ HD-Platte ab. Dieser für einen Gasaustausch günstige Winkel zeigte sich jedoch nur bei einem Tropfenvolumen von $40\mu\text{l}$. Die HDs zeigten sich in dieser Plattengeometrie als sehr stabil, sind jedoch auf Grund der gesamten Höhe der Platte nicht mikroskopierbar. Der Hersteller bietet zur Lösung dieses Problems eine zweite Platte an, in die die Tropfen überführt werden können. Dazu ist aber ein terminaler Pipettierschritt notwendig, die Proben können danach nicht wieder in die HD-Platte überführt werden, was eine Beendigung des Experimentes bedeuten würde. Die $20\mu\text{l}$ -Tropfen in der Eigenproduktion sowie in der Perfecta3D® 384er-Format HD-Platte mit Kontaktwinkel von 40° waren ebenfalls stabil und im Hinblick auf die im Kontext neuer Therapien gewünschte Miniaturisierung für weitere Experimente zu favorisieren. Im Vergleich zur Eigenproduktion stellte sich das automatisierte Setzen von HDs mit den Robotersystemen in der Perfecta3D® 384er-Format jedoch als schwierig heraus, nach Herstellerangaben sollte die Pipette dazu auch angewinkelt werden. Aus diesem Grund wurde diese HD-Platte für weitere Experimente ebenfalls ausgeschlossen.

Zur Überprüfung der Eignung einer automatisierten Prozedur zur Anzucht therapeutisch relevanter Zellen wurden die Adhäsions-basierten Zellsysteme hMSCs und hiPSCs verwendet. hMSCs da sie sich bereits in zellulären Kategorien der regenerativen Medizin bewährt haben und hiPSCs auf Grund ihrer Pluripotenz, die zur Wirkstofffindung in der medikamentenbasierten Medizin Verwendung finden können. Abbildung 57 zeigt schematisch die verschiedenen Ansätze, die zur Evaluation des automatisierten Prozesses notwendig waren. Im Falle der hMSCs wurde die Standardkultivierung in Einzelzellen auf 96-Mikrowellplatten mit flachem Boden übertragen („STD“ entspricht „2D“) und gegen die Kultivierung zum einen im hängenden Tropfen („HD“) und zum anderen in 96-Mikrowellplatten („CC“) getestet. Bei hiPSCs musste eine weitere Kontrolle eingefügt werden, da die übliche Kultivierung ein Übertragen von Koloniefragmenten vorsieht. Der Einfluss der Vereinzelung der Zellen zur definierten Zugabe wurde in der „2D“-Kontrolle untersucht. Pro Experiment und Zelltyp wurden für den „HD“-Ansatz mindestens drei 96-Mikrowellplatten (Cellstar F-bottom, Greiner, Deutschland) mit HD-Platten ausgestattet. In jedes Well wurden 85µl PBS gefüllt, um einen Evaporationsschutz zu erhalten. Für die „2D“- und „CC“-Ansätze wurden jeweils drei 96-Mikrowellplatten (Cellstar F-bottom, Greiner, Deutschland und Costar U-bottom, Corning) verwendet, jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt.

Vor dem Setzen der Tropfen mit den Pipettierroboter wurden die Zellen vereinzelt. Bei den hMSCs folgte man dazu dem Standardprotokoll, die hiPSCs wurden vor der Vereinzelung mit 0,05% Trypsin/EDTA für 1h mit 10µM ROCK-Inhibitor inkubiert, um Anoikis zu vermeiden. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau wurden die Zellen so ausgesät, dass an Tag 1 12,5 hiPSCs pro Mikroträger und 3 hMSCs pro Mikroträger adhärent waren. Die Anzahl der Mikroträger wurde auf 40 Träger pro 20µl Tropfen eingestellt, für hiPSCs wurden die Cytodex-3 Mikroträger zuvor mit Matrigel beschichtet. Beide Pipettierroboter wurden so programmiert, dass sie die Zell-Mikroträgersuspension schonend mischen, bevor acht Tropfen reihenweise in die HD-Platten pipettiert wurden. Um eine Kultivierung in solch kleinen Bioreaktoren zu ermöglichen, wurde an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt, indem zuerst in allen 96 HDs 20µl frisches Kulturmedium zugegeben und anschließend 18µl wieder abgenommen wurden. Bis der Pipettierroboter wieder beim ersten HD angelangt ist, hat sich wieder ein Gleichgewicht eingestellt und das überschüssige Medium konnte ohne Verlust der eigentlichen Probe wieder abgenommen werden. Die Differenz von 2µl Medium ist der Evaporation geschuldet, die auch durch das vorgelegte PBS in den Wells nicht ganz verhindert werden konnte.

Untersuchungen zur Plattform-Unabhängigkeit der Kultivierung im hängenden Tropfen

Abbildung 58 zeigt hiPSCs auf Matrigel-beschichteten Mikroträgern, die automatisiert kultiviert wurden. Durch die mikroskopischen Aufnahmen konnte die Adhäsion und Proliferation belegt werden (Abbildung 58). Im „CC“-Ansatz (Englisch: carrier control) ist außerdem deutlich zu erkennen, dass die Zellen nicht nur auf den beschichteten Mikroträgern, sondern ebenfalls auf dem Boden der Wellplatte haften. Wie in Abbildung 59 gezeigt wird, wiesen auch die hMSCs in allen untersuchten Konstellationen an HD-Platten und Pipettierroboter vergleichbare Adhäsion und Proliferation auf. Weder die Plattengeometrie noch die unterschiedlichen Roboter schienen einen Einfluss darauf zu haben. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen auch einen weiteren Nachteil der GravityPLUS™-Platten im Rahmen einer Automatisierung: Mit einem Lochdurchmesser von 550µm sind sie zu eng, um die dicht bewachsenen Mikroträger wieder automatisiert von oben zu ernten, die diesen Durchmesser an Tag 7

bereits deutlich überschritten. Aus diesem Grund, wie auch schon aus den zuvor genannten, wurden nachfolgende Experimente mit hiPSCs in den eigenproduzierten Lochplatten und dem Nanoplotter 2.1 durchgeführt.

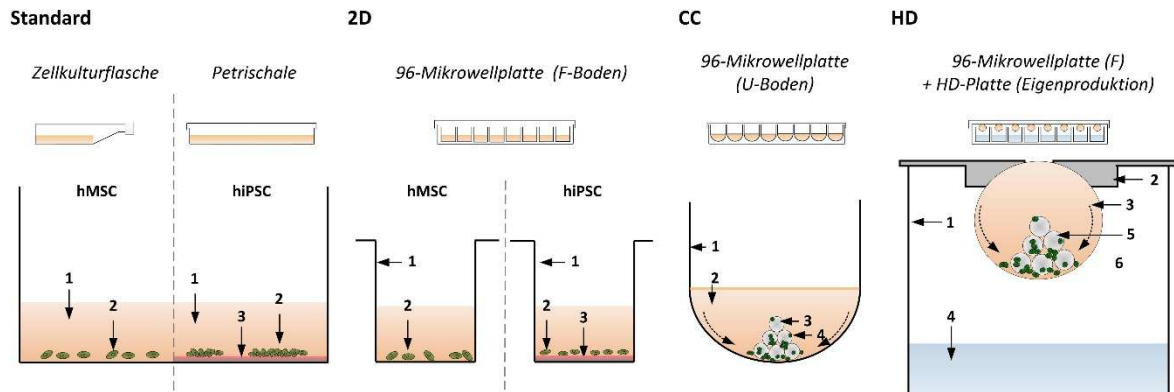


Abbildung 57: Schematische Darstellung der verschiedenen Ansätze zur Kultivierung von hMSCs und hiPSC. Als „Standard“ wird die Kultivierung von hMSCs in Kulturmedium (1) als Monolayer (2) in Zellkulturflaschen und von hiPSCs als Kolonien auf Matrigel-beschichteten (3) Petrischalen bezeichnet. Der „2D“-Ansatz bedeutet für die hMSCs, einen miniaturisierten Ansatz in Mikrowellplatten (1) mit Standardbedingungen, wohingegen es für die hiPSCs mit einer Vereinzelung (2) der Kolonien einhergeht. Der Ansatz zur 3-dimensionalen Kontrolle („CC“ für carrier control) ist für beide Zellsysteme gleich: In einer U-Boden Mikrowellplatte (1) werden die Einzelzellen (4) mit Mikroträger (3) ausgesät. Schließlich werden hMSCs und hiPSCs zusammen mit den Mikroträgern im hängenden Tropfen („HD“ für hanging drop) mit einem Pipettierroboter ausgesät. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2014.

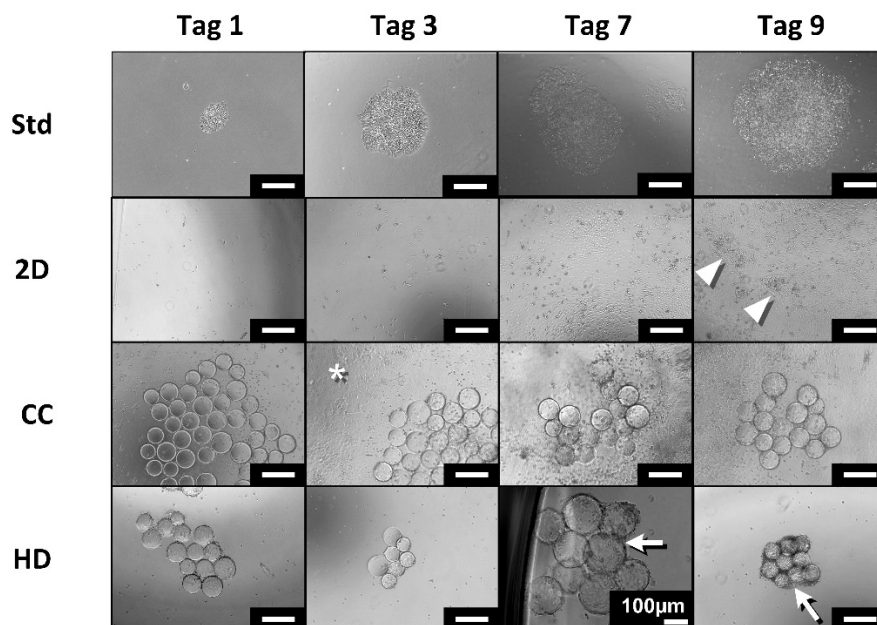


Abbildung 58: Phasenkontrast von hiPSCs kultiviert in hängenden Tropfen in den Tropfenplatten eigener Produktion, automatisiert bearbeitet mit dem Nanoplotter 2.1. Im 2D-Ansatz wachsen die einzeln ausgesäten Zellen an Tag 9 zu Kolonien nicht kontrollierbarer Größe zusammen (Dreiecke), im „CC“-Ansatz verliert man einen Teil der Zellen durch unerwünschtes Wachstum auf dem Boden der Mikrowellplatte (Stern). Im hängenden Tropfen hingegen wachsen die Zellen auf den Mikroträgern und umspannen diese (Pfeile). Die Balken entsprechen 500µm, wenn nicht anders markiert. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2014.

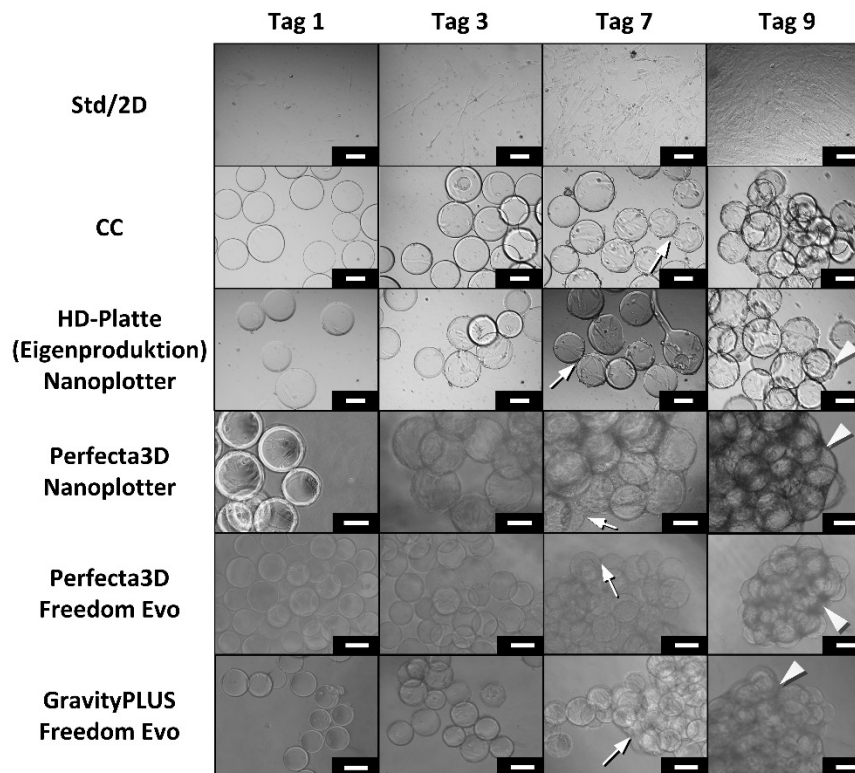


Abbildung 59: Phasenkontrastaufnahmen von hMSCs kultiviert im hängenden Tropfen an den Tagen 1, 3, 7 und 9 zeigen, dass die Kultivierung der Zellen unabhängig von der verwendeten Plattform ist. Es sind keine Unterschiede in der Proliferation oder der Morphologie der Zellen zu sehen: An Tag 1 zeigen sich adhärenente Zellen auf den Mikroträgern, an Tag 7 spannen sich die Zellen von Träger zu Träger (weiße Pfeile) und an Tag 9 wachsen die Zellen in die dritte Dimension (weiße Dreiecke). Die Unterschiede in den Aufnahmen zwischen der Eigenproduktion (HD-Platte) und den übrigen Tropfenplatten ergibt sich aus dem unterschiedlichen Volumen: Während alle anderen Tropfenplatten ein Volumen von 40µl benötigen (siehe Abbildung 52), reichen 20µl in der eigenen produzierten Platte aus. Die Balken entsprechen 100µm in den ersten 4 Reihen; die Balken in den Freedom Evo Reihen (Reihen 5 und 6) entsprechen 200µm. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2014.

Untersuchungen zum Erhalt der charakteristischen Zelleigenschaften

Um den Erhalt der Zelleigenschaften nach einer 10-tägigen Kultivierung im HD zu untersuchen, wurden die gezüchteten Mikrogewebe automatisiert geerntet und wie folgt weiter behandelt: 15 bis 20 Mikroträger wurden direkt fixiert und für die Rasterelektronenmikroskopie präpariert. Repräsentative Bilder der Mikrogewebe werden in Abbildung 60 gezeigt. Im Gegensatz zu den hMSCs zeigen die hiPSCs keine bis sehr wenige Mikrovilli, ein erstes Indiz für die erhaltene Pluripotenz: Je mehr sich Stammzellen spezialisieren, desto mehr Struktur in Form dieser Membranausstülpungen erhält ihre Oberfläche. Eine eingehendere Untersuchung der Zelleigenschaften erfolgte nach dem Ablösen der Zellen von den Mikroträgern und anschließender 7-tägiger Standardkultivierung. Sowohl hMSCs als auch hiPSCs wurden nun für eine FACS-Analyse vorbereitet, deren Ergebnisse in Abbildung 61 dargestellt sind. hMSCs wurden mit den Negativmarkern HLA-DR, CD34, CD45 und CD73 sowie den Positivmarkern CD44, CD90 und CD105 angefärbt. hiPSCs mit den Positivmarkern Oct3/4, Tra-1-81 und Nanog. Die FACS-Untersuchungen der hMSCs im „CC“-Ansatz konnten nicht durchgeführt werden, da die Zellen sich nicht ablösen ließen und somit kein Zellmaterial zur Verfügung stand.

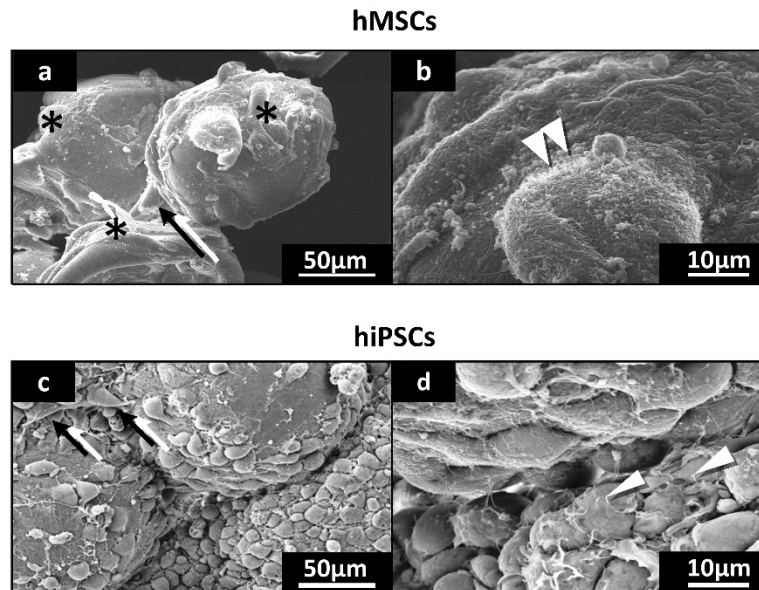


Abbildung 60: REM-Aufnahmen von hMSCs und hiPSC, gewachsen für 10 Tage auf Mikroträger. Beide Zelltypen umspannen die Mikroträger und formen Mikrogewebe (Pfeile in a und c). hMSCs breiten sich flächig über die Träger aus und zeigen die typischen Mikrovilli auf ihrer Oberfläche (Doppelpfeil in b), während hiPSCs kaum diese Oberflächenstrukturen aufzeigen (Dreiecke in d). Abbildung verändert aus Meiser et al. 2014.

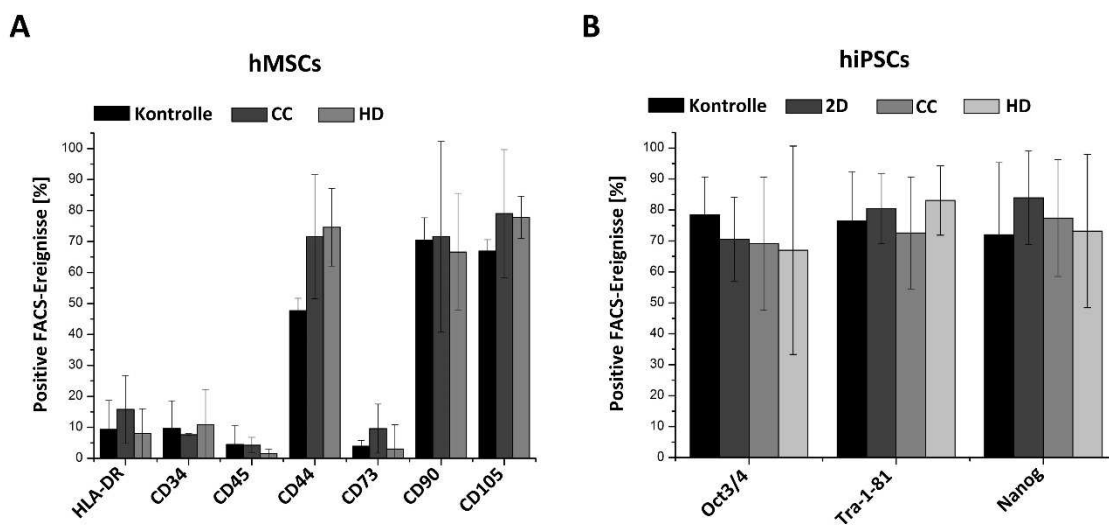


Abbildung 61: Histogramme der FACS-Ergebnisse der hMSCs und hiPSCs. Aufgezeichnet sind die positiven FACS-Ereignisse der einzelnen Marker in den verschiedenen Kultivierungsansätzen. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2014. Sowohl für hMSCs als auch für hiPSCs sind die Differenzen der Ansätze zur Kontrolle nicht signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

In allen untersuchten Proben war keine statistisch signifikante Differenz zwischen der Kontrolle und den Ansätzen „2D“, „CC“ und „HD“ festzustellen (t-Test, $p < 0,05$). Repräsentative Histogramme, die belegten, dass die automatisierte Kultivierung im HD keinen Einfluss auf die getesteten charakteristischen Zelleigenschaften hatte, werden in Abbildung 62 gezeigt.

Diese Untersuchungen zeigten, dass eine automatisierte Kultivierung relevanter Zellen im Kontext neuer Therapien im HD-Verfahren unter Erhalt der zellspezifischen Eigenschaften möglich ist.

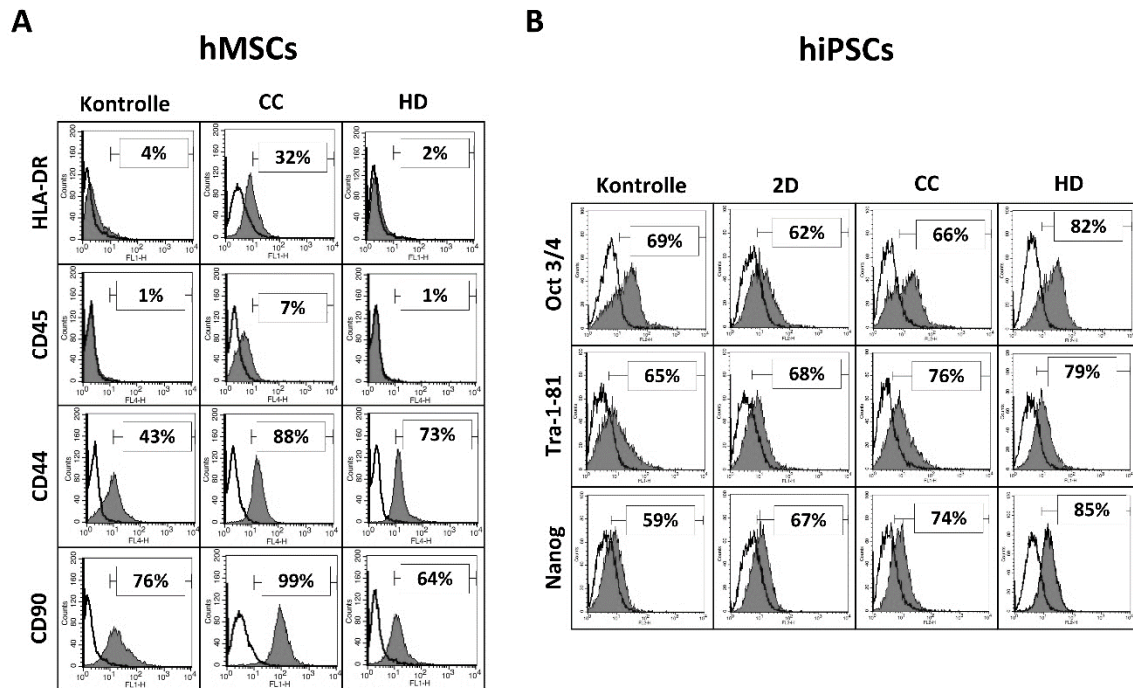


Abbildung 62: Repräsentative FACS-Ergebnisse von hMSCs (A) und hiPSCs (B) zu den in Abbildung 57 gezeigten Histogrammen. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2014. A Gezeigt werden die Negativmarker HLA-DR und CD45 sowie die Positivmarker CD44 und CD90 für die Pluripotenz von hMSCs. B gezeigt werden die Positivmarker Oct3/4, Tra-1-81 sowie Nanog für die Pluripotenz von hiPSCs.

4.4.2 Untersuchungen zum Einfluss von Pelletierverfahren zur tropfenbasierten Vitrifikation von Zellen in Suspension

Im Hinblick auf eine unmittelbare Verwendung kryokonservierter Mikrogewebe ist deren Portionierbarkeit und Transport im gefrorenen Zustand wichtig. Bis dato werden biologische Proben in Standardgefäßen, wie 1ml Kryoröhrchen (siehe Abbildung 44) oder gar in Beuteln (Blutkonserven) mit Kristallisationsverfahren eingefroren und gelagert. Benötigt man aber beispielsweise Bioimplantate zur Gewebereparatur, sind solche Proben nicht die ideale Lösung. Ein direkter Einsatz der Mikrogewebe im Empfänger ist wegen des festen Kontaktes mit dem Gefäß nicht umsetzbar. Da man aber durch Kristallisationsverfahren stets auf Gefäße beziehungsweise Oberflächen angewiesen ist, die Proben während der zeitintensiven Abkühlung halten, rückt die Vitrifikation wieder in den Fokus. Im nachfolgenden Kapitel werden tropfenbasierte Pelletierverfahren untersucht, die durch Eintropfen hohe Abkühlraten erreichen können und dabei ohne Kontakt zu künstlichen Oberflächen auskommen.

Durch diverse Vorarbeiten kristallisierten sich im Rahmen der Arbeit drei verschiedene Methoden zur tropfenbasierten Vitrifikation heraus, die in Abbildung 63 schematisch dargestellt sind. Die einfachste Methode ist das manuelle Eintropfen der Zellsuspension mittels einer Pipette in flüssigen Stickstoff (Abbildung 63 A). In diesem Fall ist das Minimalvolumen eines Tropfens auf Grund der Oberflächenspannung der Probe auf etwa 20µl limitiert; kleinere Tropfen reißen nicht definiert von der Pipette ab. Um das Endvolumen der vitrifizierten Tropfen weiter verkleinern zu können, wurde das Prinzip der kinetischen Maskierung angewendet (Abbildung 63 B). Hierbei wurden die Tropfen aus einer Fallhöhe von mindestens 20cm auf eine Gitterstruktur getropft, an der diese sich definiert in

kleinere Teiltropfen spalten und anschließend in flüssigen Stickstoff fallen. Auf Grund der Arbeiten mit hängenden Tropfen an einer Lochplatte aus Kapitel 4.4.1 lag eine weitere Methode der tropfenbasierten Vitrifikation, nämlich das Abtropfen durch überkritische Volumenerhöhung, nahe (Abbildung 63 C). Die hängenden Tropfen an dieser Platte werden durch Zugabe der entsprechenden Menge an zweiter Vitrifikationslösung so beschwert, dass diese durch die überkritische Volumenerhöhung von der Gitterstruktur abtropfen und ebenfalls in flüssigen Stickstoff fallen.

In allen Fällen könnte so die Idee umgesetzt werden, dass Tropfen vitrifizierter Zellsuspension nicht gefäßgebunden generiert werden. Damit würde die Flexibilität der einzelnen Proben erhalten bleiben und es gäbe keine störende Oberfläche, die einen ungünstigen Wärmeeintrag beim Einfrieren oder Auftauen mit sich brächte. Nachfolgend wurde die Umsetzung dieser Ansätze an verschiedenen Zellsystemen untersucht.

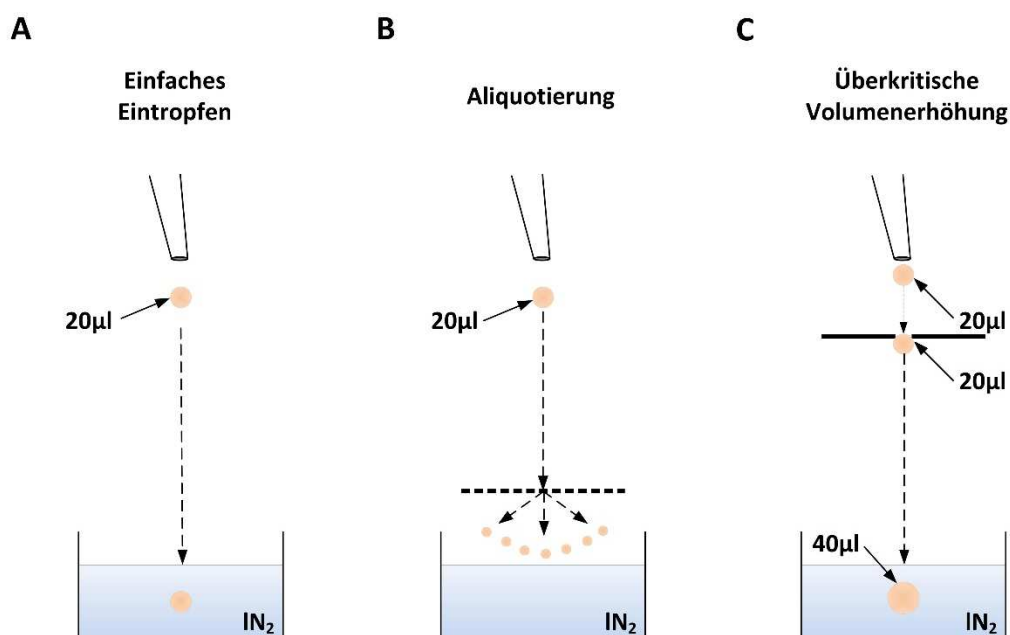


Abbildung 63: Methoden zur tropfenbasierten Vitrifikation. A zeigt die Möglichkeit durch einfaches Eintropfen in flüssigen Stickstoff. Das Minimalvolumen von $20\mu\text{l}$ kann nicht unterschritten werden, da die Flüssigkeit sonst nicht mehr allein durch ihre kinetische Energie von der Pipettenspitze abreißt. B Um das Endvolumen zu verkleinern ist es möglich den Tropfen durch Auftreffen auf eine Gitterstruktur kinetisch zu maskieren. C Mit Hilfe der Tropfenplatten, die zur automatisierten Produktion von homogenem Mikrogewebe benutzt wurden, ist es möglich auf eine Automatisierung hinzuarbeiten. Durch die Zugabe von weiteren $20\mu\text{l}$ im zweistufigen Protokoll zur Vitrifikation auf einen bereits hängenden Tropfen mit $20\mu\text{l}$ Volumen vermischen sich beide, der nun schwerere Tropfen ($40\mu\text{l}$) reißt durch die überkritische Volumenerhöhung ab und tropft in flüssigen Stickstoff.

Untersuchungen zum optimalen Arbeitsablauf der tropfenbasierten Vitrifikation

Ausgehend von dem Vitrifikationsprotokoll von Richards et al. (Richards et al. 2004) wurden zunächst die Konzentrationen an CPAs und deren Inkubationszeiten angepasst. Evaluiert wurden die metabolische Funktionalität und Membranintegrität des Modellsystems. Da das Richards-Protokoll nach einer einminütigen Inkubation in einem ersten Medium eine zweite Inkubation von nur 5 Sekunden vorsieht, wurde für die tropfenbasierte Vitrifikation von Suspensionszellen die zweite Vitrifikationslösung stärker konzentriert. Dadurch wurde eine einfache Zugabe der zweiten Lösung ermöglicht und Scherstress durch zusätzliche Zentrifugationsschritte konnten vermieden werden. Die

entsprechenden Experimente wurden mit murinen Fibroblasten durchgeführt. Dazu wurde eine Suspension mit $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml hergestellt. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und der Überstand an Kulturmedium wurde abgenommen. Im nächsten Schritt wurde das Zellpellet in 250µl Vitrifikationslösung V1.1 resuspendiert und für 1min inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Menge an Vitrifikationslösung 2 zugegeben und für 5 Sekunden inkubiert, bevor die Zellsuspension in 20µl Tropfen in flüssigen Stickstoff eingetropfte wurde. Die resultierenden vitrifizierten Tropfen an Zellsuspension konnten durch ihre einfache Portionierbarkeit einfach in mit flüssigem Stickstoff gefüllten Kryoröhrchen überführt und für mindestens 24h bei $<-160^\circ\text{C}$ gelagert werden. Aufgetaut wurden die Proben durch Überführen von maximal 5 vitrifizierten Tropfen in 10ml warmes PBS (37°C). Anschließend wurden zur Überprüfung der metabolischen Aktivität sowie der Membranintegrität FDA/EtBr-Assays durchgeführt (siehe Abbildung 64B). Die Medien von Richards et al (V1.1 und V2.1) erzielten Vitalitäten von 75%. Weiterhin wurden erhöhte CPA-Konzentrationen sowie eine Verdopplung der Inkubationszeiten untersucht. Wie in Abbildung 64 A jedoch zu sehen ist, erreichte eine leichte Erhöhung der CPAs (V1.1 und V2.1) bei den einfachen Inkubationszeiten die besten Ergebnisse.

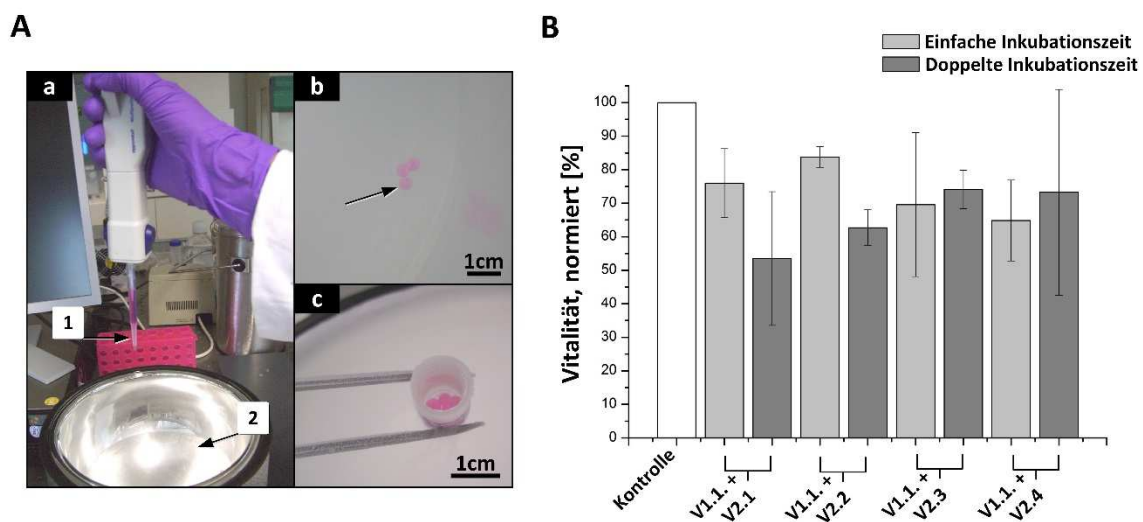


Abbildung 64: A Photographien der Arbeitsschritte zur tropfenbasierten Vitrifikation in Suspension: (a) Über eine Pipette werden jeweils 20µl Tropfen in flüssigen Stickstoff eingetropfte. Die vitrifizierten Tropfen (b) werden eingesammelt und bis zur Verwendung in Kryoröhrchen (c) gelagert. B Aufbauend auf den Medien zur Vitrifikation nach Richards et al. 2004) wurde ein zweistufiges Protokoll zur kontaktfreien Vitrifikation in Suspension entwickelt und mit der nicht gefrorenen Kontrolle verglichen. Verschiedene Konzentrationen an CPAs und Inkubationszeiten wurden an murinen Fibroblasten untersucht, um ein optimales Zusammenspiel zu finden. Die Zusammensetzungen der Vitrifikationsmedien wurden in Kapitel 3.2.4 beschrieben.

Untersuchungen zur optimalen Lagertemperatur von tropfenbasiert vitrifizierten Proben

Eine Lagerung der Proben als portionierbare, nicht gefäßgebundene vitrifizierte Tropfen bei Temperaturen um -80°C kann für die Infrastruktur im Kontext neuer Therapien einen großen Vorteil bringen. Lagerstätten mit Vorrichtungen für flüssigen Stickstoff, wären nicht notwendig und die entsprechenden Gefrierschränke müssten nicht weit entfernt von dem eigentlichen Applikationsort stehen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Lagerfähigkeit der tropfenbasiert vitrifizierten Proben mit Proben verglichen, die nach herkömmlichem Kristallisationsverfahren kryokonserviert wurden („Kryokontrolle“). Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls eine Suspension

aus murinen Fibroblasten verwendet. Die Probe für die tropfenbasierte Vitrifikation wurde wie oben beschrieben präpariert, die Zellsuspension im Kristallisationsverfahren wurde auf $1 \cdot 10^6$ Zellen in 1ml eingestellt und mit 10% DMSO versetzt. Beide Ansätze wurden jeweils bei -80°C , in der Gasphase von flüssigem Stickstoff ($<-160^\circ\text{C}$) sowie direkt im flüssigen Stickstoff (-196°C) gelagert. Nach 24h, 4 und 6 Wochen wurden die kryokonservierten Proben entnommen, aufgetaut und mit Hilfe des FDA/EtBr-Assays auf Membranintegrität und metabolische Aktivität untersucht. Die Ergebnisse werden in Abbildung 65 gezeigt: Bereits nach 1 Woche verzeichnete man einen deutlichen Verlust an Vitalität der tropfenbasiert vitrifizierten Proben auf $81,6 \pm 2,9\%$, die bei Temperaturen um -80°C gelagert wurden. Nach 4 Wochen konnten mit $1,09 \pm 0,83\%$ kaum mehr vitale Zellen aus diesen Proben gewonnen werden (schwarzer Pfeil, Abbildung 65). Für eine Langzeitlagerung der portionierbaren, kontaktfrei vitrifizierten Proben war nur die Lagerung bei Temperaturen unter -160°C erfolgreich.

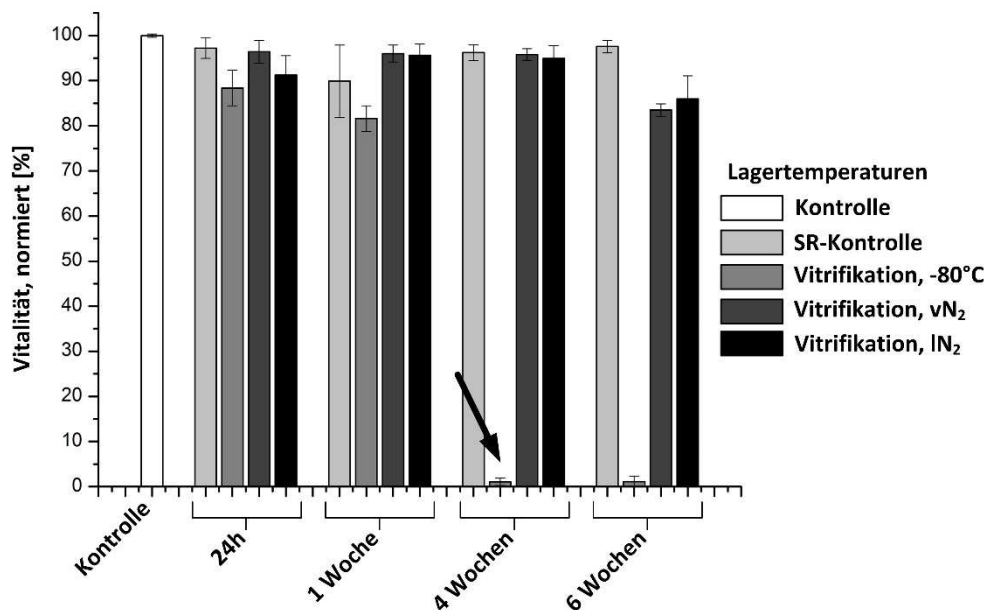


Abbildung 65: Untersuchung zur Langzeitlagerung vitrifizierter Tropfen muriner Fibroblasten bei verschiedenen Lagertemperaturen. Die Vitalität wurde über den FDA/EtBr-Assay bestimmt. Auf Grund starker Rekristallisationsprozesse ist eine Lagerung unterhalb der Glasübergangstemperatur (hier bei -80°C) ungeeignet. Die absolute Vitalität der Kontrolle betrug $90,00 \pm 0,37\%$.

Untersuchungen zur interzellulären, mechanischen Stabilität von Mikrogewebe während der Kryokonservierung

Um den Einfluss der Eiskristallbildung auf die mechanische Stabilität der Proben während der Kryokonservierung untersuchen zu können, wurden die autonom kontrahierenden Mikrogewebe aus embryonalen Herzmuskelzellen von Hühnern verwendet. Nur durch ein intaktes Aktin-Myosinskelett können die Mikrogewebe ihr Kontraktionsverhalten aufrechterhalten. Störungen dieser Strukturen durch Eiskristallbildung werden durch Funktionalitätsverlust oder -änderung sichtbar.

Zur Durchführung dieser Untersuchungen wurden die CHMCs nach Standardprotokoll zu Mikrogewebe herangezogen und an Tag 5 mittels der entsprechenden Kryokonservierung mit Kristallisation und durch tropfenbasierte Vitrifikation eingefroren. Proben, die durch das Kristallisationsverfahren mit 10% DMSO und $1^\circ\text{C}/\text{min}$ kryokonserviert wurden, wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Maximal fünf vitrifizierte Tropfen wurden in 10ml Kulturmedium (37°C) aufgetaut.

Zur Evaluation wurde die Vitalität mittels FDA/EtBr-Assay, die Kontraktionsfrequenz sowie der Anteil an kontrahierenden Aggregaten bestimmt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 66 A dargestellt, Abbildungen B und C zeigen repräsentative, mikroskopische Aufnahmen. Während die Vitalitäten aller Proben signifikant unterschiedlich zur Kontrolle sind, kann beim t-Test für die Kontraktionsfrequenz kein Unterschied in der Signifikanz festgestellt werden ($p < 0,05$). Der absolute Wert für die Vitalität der Kontrolle betrug $86,2 \pm 3,8\%$. Der Anteil an kontrahierenden Mikrogewebe ist bei den serumfrei konservierten Mikrogewebe am geringsten (38%), bei serumhaltig konservierten Geweben mit Kristallisation und den vitrifizierten Geweben liegt der Anteil mit 82% beziehungsweise 79% etwa gleich auf. Allerdings zeigten die vitrifizierten Mikrogewebe ganzheitliche Kontraktionen, wohingegen die anderen Mikrogewebe nur partiell kontrahierten (weniger als 50% der Gesamtfläche, siehe Abbildung 66 C). Betrachtet man die mikroskopischen Aufnahmen der Mikrogewebe nach Kryokonservierung mit Kristallisation, so erkennt man massive Schädigungen in der Struktur. Das zuvor dichte Netzwerk an vitalen, grün fluoreszierenden Zellen wird durch Bereiche mit toten, rot fluoreszierenden Zellen unterbrochen. Im Gegensatz dazu weisen vitrifizierte Mikrogewebe nach wie vor die engen Strukturen auf.

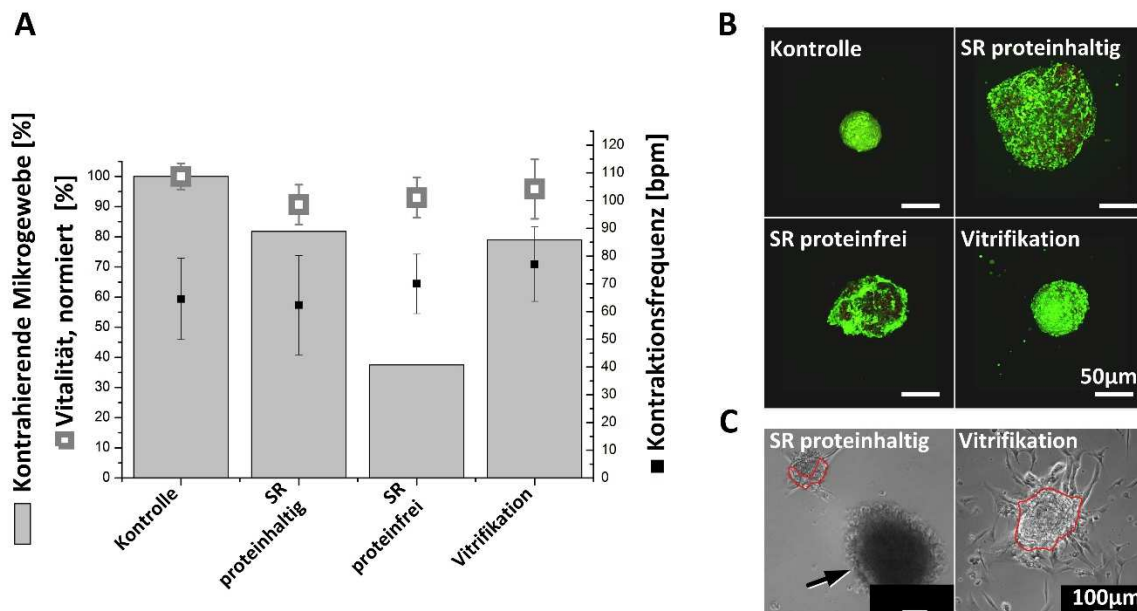


Abbildung 66: A Aufgezeichnet ist der prozentuale Anteil an kontrahierenden Mikrogeweben vor und nach den verschiedenen Kryokonservierungsprozeduren mit Kristallisation (SR proteinhaltig und SR proteinfrei) und Vitrifikation sowie die Vitalität der Mikrogewebe und deren Kontraktionsfrequenz pro Minute (in bpm für beats per minute). B Repräsentative CLSM-Aufnahmen gefärbter CHMC-Mikrogewebe (FDA/EtBr-Assay). C Repräsentative mikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast kontrahierender Mikrogewebe 24h nach Kryokonservierung mit Kristallisation und Vitrifikation. Der Pfeil deutet auf ein nicht-kontrahierendes Mikrogewebe, die roten Linien umkreisen die kontrahierenden Areale: Während vitrifizierte Mikrogewebe meist komplett kontrahieren, wiesen Mikrogewebe, die mit Kristallisation kryokonserviert wurden, häufig nur partielle Kontraktionen auf; N=3.

Untersuchungen zum Erhalt von Adhäsionskontakten der Mikrogewebe während der Kryokonservierung

Zur Untersuchung zum Erhalt von Adhäsionskontakten wurden hiPSCs verwendet, da diese auf deren Verlust mit Anoikis reagieren. Dadurch kann der Erhalt von Adhäsionskontakten leicht über die Anwachsrate der Koloniefragmente korreliert werden. Es wurde eine Suspension aus Koloniefragmenten hergestellt, die zum einen im Standardverfahren nach Herstellerangaben im Kristalli-

sationsverfahren kryokonserviert wurden. Dazu wurde eine 5cm Petrischale nach dem Standardverfahren abgelöst, in 2ml mFreSR-Medium resuspendiert und je 1ml in Standard-Kryoröhrchen mit 1°C/min bis -80°C eingefroren. Zum anderen wurde eine Zellsuspension hergestellt, die über ein 40µm Sieb von Debris getrennt wurde und auf eine Konzentration von 15 Koloniefragmenten pro 10µl eingestellt wurde. Diese wurde in 20µl Tropfen vitrifiziert, dabei wurde auch der Einfluss von proteinfreien Kryomedien, sowie die Zugabe von 10µM ROCK-Inhibitor (Y) untersucht. Um möglichst wenig Zeitverzögerung zwischen der Kontrolle und den wieder aufgetauten Proben zu haben, wurden die im Kristallisationsverfahren konservierten Zellen nach der Abkühlung auf -80°C in flüssigen Stickstoff überführt, wo sie für maximal 60min gelagert wurden. Die vitrifizierten Proben wurden sofort wieder aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden alle Koloniefragmente in Matrigel-beschichtete Kulturschalen ausgesät. Die Anwachsrate wurde nach einem Tag, die Koloniefäche nach 7 Tagen bestimmt, die Ergebnisse werden in Abbildung 67 dargestellt. Mit $15,6 \pm 3,2\%$ bei proteinhaltigen und $12,6 \pm 2,3\%$ bei proteinfreien Vitrifikationsmedien wachsen im Vergleich zur Kontrolle prozentual mehr Koloniefragmente an, als in dem Standardverfahren mit Kristallisation. Da die Differenzen zwischen den beiden Proben statistisch nicht signifikant unterschiedlich waren, wurde das therapeutisch relevantere, proteinfreie Medium noch mit 10µM ROCK-Inhibitor (Y) versetzt, um dessen Einfluss auf die Anwachsrate zu untersuchen. Durch die Zugabe von Y stieg die Anwachsrate in proteinfreiem Medium auf $24,4 \pm 5,9\%$.

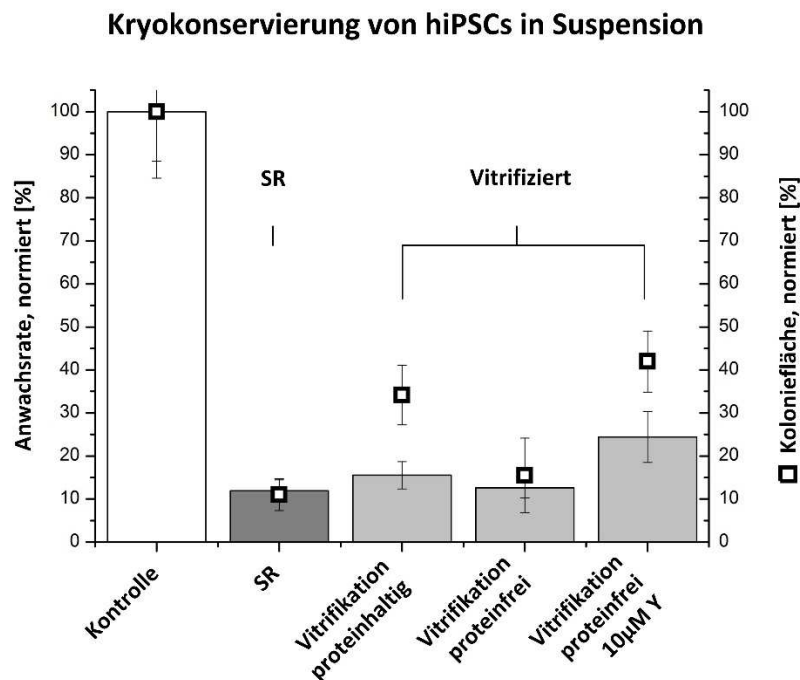


Abbildung 67: Vitrifikation von hiPSC-Koloniefragmenten in Suspension. Verglichen wurde der Einfluss von Protein und dem ROCK-Inhibitor (Y) auf die Anwachsrate und die Koloniefäche nach 7-tägiger Kultivierung. Die Anwachsrate sowie die Koloniefäche wurden auf die Kontrolle normiert, die absolute Anwachsrate der Kontrolle lag bei $30 \pm 12\%$; N=3.

Signifikant unterschiedlich zu der kryokonservierten Kontrolle im SR-Verfahren waren die Koloniefächen der proteinhaltigen und proteinfreien Vitrifikationsmedien mit 10µM Y (t-Test, $p < 0,05$). Die

Kolonien dieser Proben waren größer und morphologisch homogener als die der übrigen Proben, wie in den repräsentativen mikroskopischen Bildern in Abbildung 68 deutlich zu erkennen ist. An Tag 7 wurden die Kolonien fixiert und mit dem Pluripotenzmarker Anti-HESCA-2 und Alexa-Fluor-488 angefärbt, um die Pluripotenz nachzuweisen. Wie sowohl die mikroskopischen Aufnahmen in der Biostation CT, als auch die CLSM-Aufnahmen zeigen, wiesen sämtliche Kolonien HESCA-2 Signale auf.

Damit wurde gezeigt, dass sich die tropfenbasierte Vitrifikation zur Konservierung therapeutisch relevanter hiPSCs eignet.

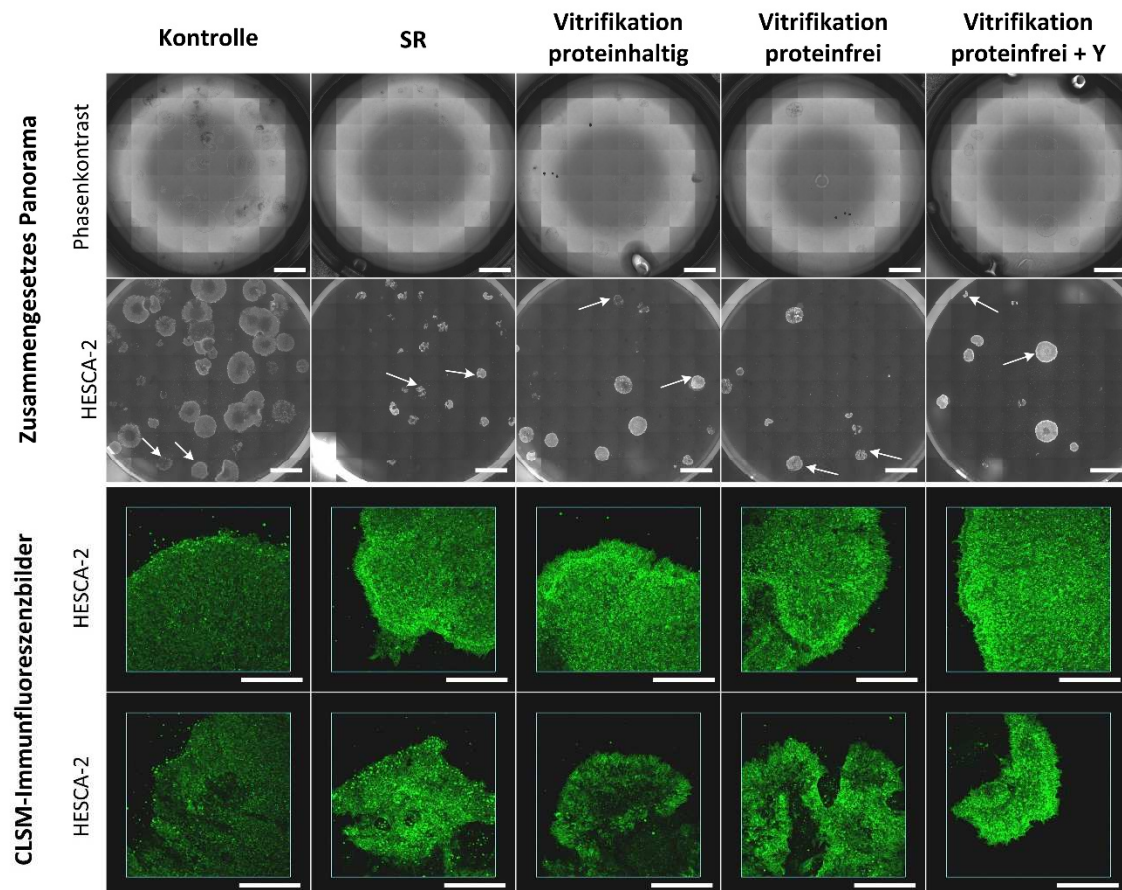


Abbildung 68: Mikroskopische Aufnahmen aufgetauter hiPSC-Fragmente nach Kryokonservierung mit Kristallisation (SR) und Vitrifikation. In den Ansätzen mit Vitrifikation wurden der Einfluss des Proteingehalts und des Zusatzes von ROCK-Inhibitor (Y) untersucht. Zur Evaluation wurden die Kolonien nach einer 7-tägigen Standardkultivierung fixiert und mit HESCA-2 (primärer Antikörper) und AlexaFluor-488 (sekundärer Antikörper) angefärbt. Die Panoramabilder der Wells einer 6-Well-Zellkulturplatte im Phasenkontrast und im grünen Fluoreszenzkanal wurden mit der Biostation CT aufgenommen, die Balken entsprechen 500µm. Die Immunfluoreszenzaufnahmen von jeweils einer morphologisch guten (obere Reihe) und morphologisch schlechten Kolonie (untere Reihe) wurden mit dem CLSM aufgenommen, die Balken entsprechen 50µm; N=3.

Untersuchungen zum Erhalt von Adhäsionskontakten der Mikrogewebe während verschiedener Arten der Vitrifikation in Suspension

Da die bisher vorgestellten Untersuchungen zur tropfenbasierten Vitrifikation in Suspension kryokonservierte Kügelchen von etwa 3mm Durchmesser bildet (Abbildung 63 A), wurde untersucht, ob durch das Prinzip einer Aliquotiereinheit (Abbildung 63 B) kleinere Kügelchen produziert werden

können, die eine Verbesserung gegenüber der herkömmlichen Kryokonservierung mit Kristallisation bringt. Abbildung 69 A zeigt wie ein 20µl-Tropfen an einem Metallgitter definiert in kleine Teiltropfen aliquotiert wurde. Ebenso wurde das Abtropfen durch überkritische Volumenerhöhung untersucht, ein im Rahmen dieser Arbeit etabliertes zweistufiges Verfahren zur tropfenbasierten Vitrifikation mit hohem Automatisierungspotenzial (Abbildung 63 C): Durch die Zugabe des zweiten Vitrifikationsmediums mit hoher CPA-Konzentration in einen bereits hängenden Tropfen, das nur für 5 Sekunden mit den Proben inkubiert werden darf, erfährt der Tropfen eine überkritische Volumenerhöhung, reißt von der HD-Platte ab und tropft in flüssigen Stickstoff (Abbildung 69 B). Zur Untersuchung zum Erhalt der Adhäsionskontakte wurden wieder hiPSC-Koloniefragmente in Suspension verwendet, die wie oben beschrieben präpariert wurden. Die resultierenden Anwachsrate werden in Abbildung 69 C dargestellt. Mit Anwachsrate um 25% relativ zur Kontrolle lagen die Werte so hoch wie in den zuvor gezeigten Untersuchungen. Wenn auch in den gefrorenen Proben (im Gegensatz zur nicht gefrorenen Kontrolle) statistisch nicht signifikant unterschiedlich, so erkennt man jedoch auch hier Tendenzen, dass die Methode der Aliquotierung in reduzierten Anwachsrate resultiert (t-Test, $p < 0,05$).

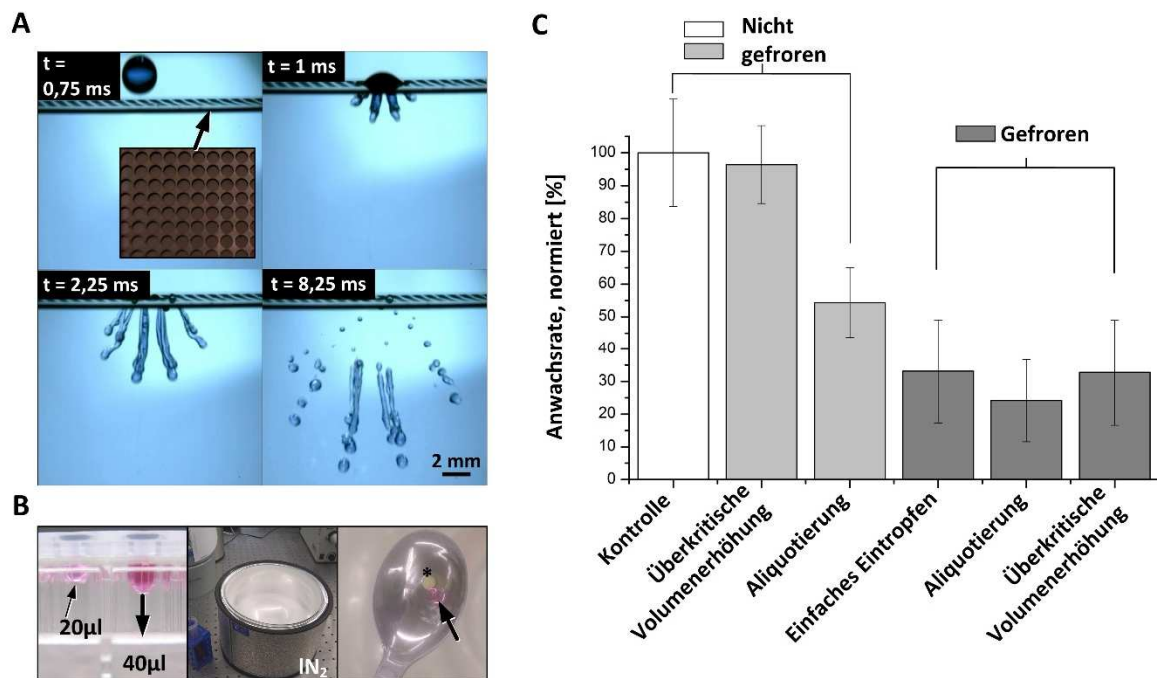


Abbildung 69: Verschiedene Arten der Vitrifikation von hiPSC-Fragmenten nach Abbildung 63. **A** Repräsentative Aufnahmen aus einem Hochgeschwindigkeitsvideo zur Veranschaulichung des Vorgangs der Aliquotierung mittels kinetischer Maskierung. Der blaue Flüssigkeitstropfen trifft nach einer gewissen Fallstrecke zum Zeitpunkt $t = 1$ ms auf eine Gitterstruktur und wird auf Grund seiner kinetischen Energie in viele Teiltropfen gespalten, die in flüssigen Stickstoff (IN_2) fallen. Abbildung verändert nach Meiser et al. 2009. **B** Fotografien zum Eintropfen über die potenzielle Energie: Die Zugabe des zweiten Vitrifikationsmediums lässt den Tropfen von der Tropfenplatte abreißen und in flüssigen Stickstoff fallen. Der Pfeil zeigt einen vitrifizierten Tropfen (transparent), der Stern markiert den nicht vitrifizierten, durch die Lichtbrechung an den kristallinen Strukturen undurchsichtigen Tropfen. **C** Aufgetragen wurde die Anwachsrate der aufgetauten hiPSC-Fragmente, normiert auf die Kontrolle. Die absolute Anwachsrate in der nicht gefrorenen Kontrolle betrug $44,5 \pm 7,3\%$; $N=3$.

4.4.3 Etablierung einer scherkraftfreien Applikationseinheit zur definierten Ablage vitrifizierter Zellen

Das Einbringen von Bioimplantaten in dysfunktionales Gewebe weist noch immer Probleme auf. Einerseits können Zellen in Suspension nicht lange am Wirkort gehalten werden, ein Großteil wird wieder ausgeschwemmt. Andererseits können oberflächenbasierte Bioimplantate erst nach mehrtägigen Kultivierungszeiten benutzt werden, um Zellen in ausreichendem Maße zu generieren. Beide Prozeduren setzen die Zellen durch zahlreiche Pipettier- oder Transportschritte starken Scherkräften aus. Hier wird erstmalig eine Methode vorgestellt, die Bioimplantate scherstressfrei zum gewünschten Zielort bringen kann. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe der tropfenbasierten Vitrifikation in Suspension kryokonserviert und über Druckluft appliziert. Die einzelnen portionierbaren Kügelchen mit den relevanten Proben dienen sozusagen als Munition. Zunächst wurden verschiedene Apparaturen aufgebaut und evaluiert (siehe Abbildung 70). In der ersten Generation der nachfolgend Eispistole genannten Apparatur wurde ein Paintballmarkierer umgebaut, so dass die Aufnahmekammer der Munition mit flüssigem Stickstoff gekühlt werden konnte (Abbildung 70 A).

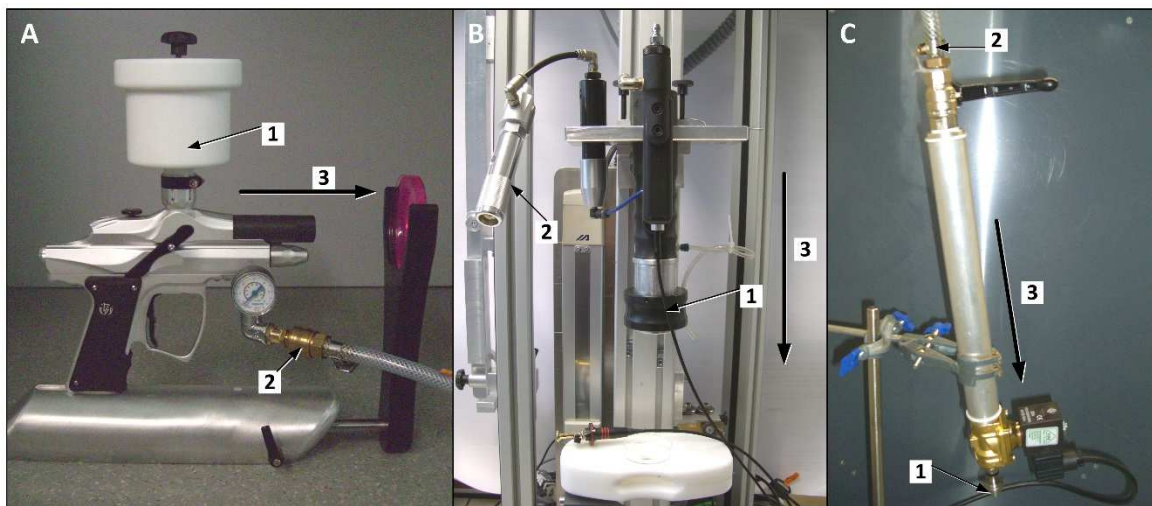


Abbildung 70: Entwicklung der Eispistole. Die jeweiligen Probenaufnahmen (1) und der Anschluss an die Druckluft (2) wurden nach und nach optimiert. Mit den schwarzen Pfeilen (3) ist jeweils die Schussrichtung eingezeichnet. A Die erste Generation basierte auf einem Paintballmarkierer. B Die 3. Generation verwendete CO₂-Kartuschen, deren Druck nicht reguliert werden konnte. C Eispistole der 5. Generation, deren Prinzip schematisch in Abbildung 71 gezeigt wird.

Nachteile dieser ersten Generation waren die horizontale Schussrichtung und die Tatsache, dass sich Bolzen und Lauf auf Grund der hohen thermischen Belastung verzogen. In einer zweiten Generation wurden noch weitere Fehlerquellen gefunden, die in der dritten Generation durch einen Edelstahlaufnahmeschacht und flexibel einsetzbare CO₂-Gaskartuschen verbessert wurden (Abbildung 70 B). Der Aufnahmeschacht sollte zugleich auch die Möglichkeit bieten, Proben durch Kryokonservierung mit Kristallisation am Halter zu fixieren. Es zeigte sich jedoch, dass die so immobilisierte Probe nicht mehr von der Oberfläche gelöst werden konnte. In der 5. Generation konzentrierte man sich wieder auf die Grundprinzipien, es wurde ein überschaubarer Aufbau angefertigt, dessen Schema in Abbildung 71 gezeigt wird. Der Druck einer Pressluftflasche wurde über einen Druckminderer auf maximal 20bar reduziert. Ein über ein Kugelhahnventil angeschlossener Zylinder diente als Zwischenspeicher der zur Applikation verwendeten Luftmenge. Über ein elektrisch auslösendes Magnetventil wurde die Luftmenge mit entsprechendem Druck durch die Edelstahlhülse

geschickt, in der sich die zu applizierende Probe befindet. Um die notwendige Kühlkette der vitrifizierten Probe nicht zu unterbrechen, werden die massiven Edelstahlhülsen in einem Stativ in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und vor der Verwendung über einen Schnellsteckverbinder mit dem Druckbehälter verbunden. Um den Verlust der Probe in der Hülse zu verhindern, wurde die Öffnung mit einem Polyamidnetz versehen, das auch bei kryogenen Temperaturen noch flexibel bleibt. Der Querschnitt der Edelstahlhülse beträgt 3mm, so dass maximal ein über einfaches Eintropfen vitrifizierter Tropfen appliziert wird und somit keine Luftmenge ungenutzt verloren geht. Durch die massive Edelstahlwand der Hülse, die bis unmittelbar vor der Applikation in flüssigem Stickstoff gelagert wurde, konnte auch die Kühlkette der Probe gewährleistet werden.

Um die Anwendbarkeit der Apparatur zu untersuchen, war es notwendig den Einfluss auf verschiedene Zelleigenschaften im Bezug zu den unterschiedlichen Therapieansätzen zu evaluieren. Aus diesem Grund wurden murine Fibroblasten, CHMCs und hiPSCs untersucht.

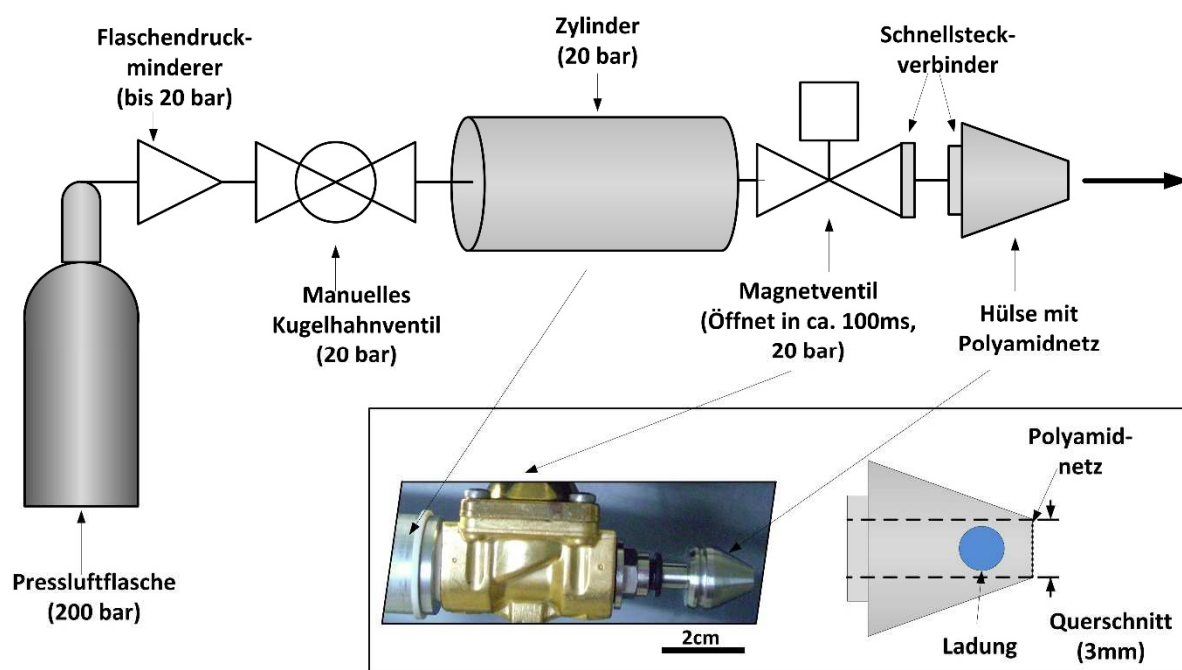


Abbildung 71: Schematische Zeichnung des Prinzips der Eispistole, 5. Generation. Der Druck einer Pressluftflasche wurde über einen Druckminderer auf 20bar reduziert. Ein Zylinder speichert die zur Applikation verwendete Luftmenge eines eingestellten Druckes. Über das elektrische Auslösen eines Magnetventils wird die Probe, die in der massiven Edelstahlhülse mit Polyamidnetz gelagert wurde, appliziert. Die Hülse wird unmittelbar vor der Applikation über einen Schnellsteckverbinder auf die Eispistole gesteckt und bis dahin in flüssigem Stickstoff gekühlt.

Untersuchungen zum Einfluss des Druckes auf metabolische Aktivität und Membranintegrität vitrifizierter Proben

Es wurde zunächst untersucht welchen Einfluss die Erhöhung des Druckes auf die applizierte Probe hat. Dazu wurden vitrifizierte Tropfen aus einer Zellsuspension von murinen Fibroblasten hergestellt, wie sie bereits in Kapitel 4.4.2 verwendet wurden. Je 3 kryokonservierte Tropfen (20µl) wurden pro unabhängigem Experiment zum einen direkt in 10ml PBS (37°C) aufgetaut oder mit 2, 4, 6, 8 und 10bar aus 10cm Entfernung in ein mit 10ml PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen appliziert. In allen Fällen wurden die Zellen mit 1000rpm abzentrifugiert, in 1ml Kulturmedium aufgenommen und anschließend mit FDA/EtBr-gefärbt, um die metabolische Aktivität und die Membranintegrität zu untersuchen. Die

Ergebnisse des FDA/EtBr-Assays werden in Abbildung 72 dargestellt. Ab einem angelegten Druck von 4bar sinkt die Vitalität der Proben statistisch signifikant von $88,4 \pm 7,9\%$ in der kryokonservierten Kontrolle relativ zur nicht gefrorenen Kontrolle zu $55 \pm 25\%$ bei angelegten 10 bar ab (t-Test, $p < 0,05$). Das Anlegen eines Druckes von 2bar reichte aus, um einen vitrifizierten Tropfen aus einem Abstand von etwa 10cm 5mm weit in 10% Agarose zu positionieren.

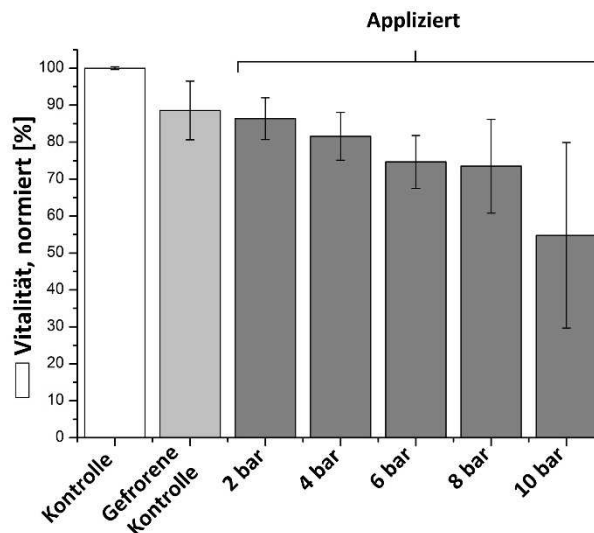


Abbildung 72: Vitalität applizierter muriner Fibroblasten bei verschiedenen Drücken, bestimmt durch den FDA/EtBr-Assay. Die Vitrifikation wurde über einfaches Eintropfen (siehe Abbildung 63) realisiert, der absolute Wert der Kontrolle lag bei $99,30 \pm 0,41\%$; $N=3$.

Untersuchungen zum Einfluss des Druckes auf das Zytoskelett vitrifizierter Proben

Wie bereits die Untersuchungen zur Kryokonservierung autonom kontrahierender Herzmuskelzellen zeigte, ist eine Konservierung des Zytoskeletts entscheidend für den Erhalt der Funktionalität von Zellen im Hinblick auf neue Therapien. Aus diesem Grund wurden zur Applikation mit der Eispistole vitrifizierte Tropfen aus einer Suspension von Mikrogewebe aus embryonalen Herzzellen von Hühnchen (CHMCs) hergestellt. Wie zuvor bereits gezeigt wurde (siehe Abbildung 66), spielen für den Erhalt der mechanischen Funktion die metabolische Aktivität und Membranintegrität nur eine untergeordnete Rolle. Aus diesem Grund wurden die CHMC-Mikrogewebe nach der Applikation mit 2bar in frischem Kulturmedium in Mikrowellschalen ausgesät und für 5 Tage beobachtet. Evaluiert wurden der prozentuale Anteil der kontrahierenden Mikrogewebe sowie die Kontraktionsfrequenz. Die Ergebnisse werden in Abbildung 73 dargestellt. Im direkten Vergleich mit der ebenfalls kryokonservierten Kontrolle variierte der Anteil an kontrahierenden Mikrogeweben nach der Applikation mit 2bar um weniger als 15%. Außer 30min nach der Applikation wiesen die Kontraktionsfrequenzen der untersuchten Mikrogeweben keine statistisch signifikanten Differenzen auf (t-Test, $p < 0,05$). Unmittelbar nach der Applikation kontrahierten die Mikrogewebe deutlich schneller als die Mikrogewebe in der Kontrollgruppe, was sich jedoch 3h nach der Applikation bereits wieder anglich. Sowohl beim prozentualen Anteil der kontrahierenden Mikrogewebe, wie auch bei deren Kontraktionsfrequenz zeigte sich stets die gleiche Tendenz. Vergleicht man die repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen der wieder ausgesäten Mikrogeweben in Abbildung 73 B, konnten in

beiden Fällen 30min nach dem Auftauen kompakte, sphärische Gewebe gefunden werden, die wieder auf der Oberfläche adhärten.

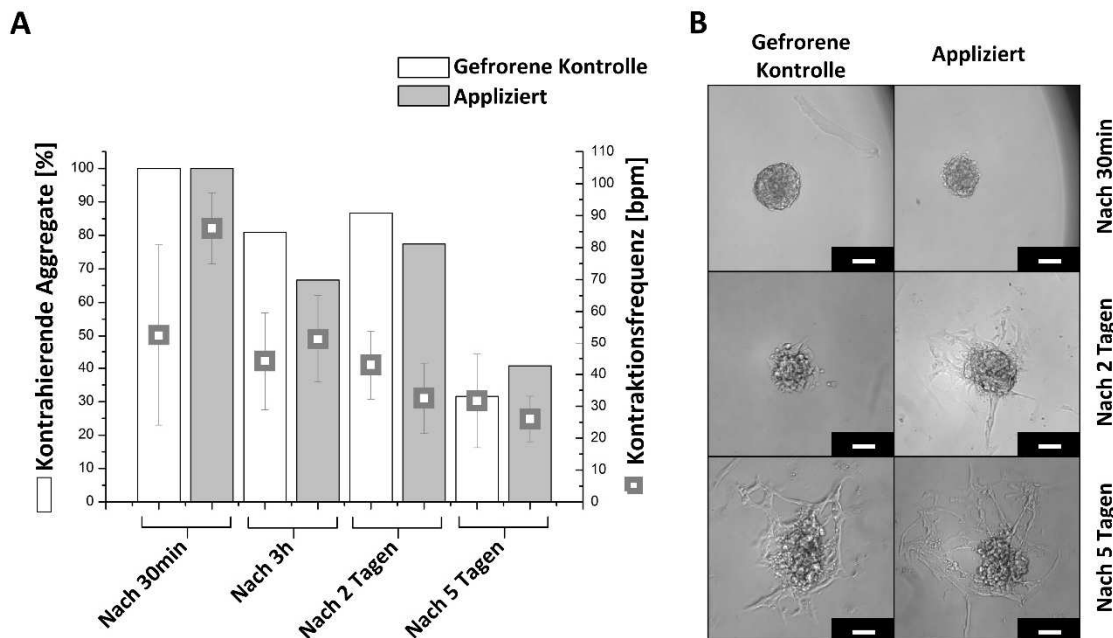


Abbildung 73: A Prozentualer Anteil und Kontraktionsfrequenz kontrahierender CHMC-Aggregate zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation vitrifizierter Tropfen mit 2bar. B Repräsentative Aufnahmen applizierte CHMC-Aggregate.

Untersuchungen zum Einfluss des Druckes auf die Adhäsionskontakte vitrifizierter Proben

Wie bereits zuvor erwähnt, ist die Fähigkeit zur Ausbildung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten entscheidend für eine erfolgreiche Anwendung von Mikrogeweben im Kontext neuer Therapien für die regenerative, wie auch zur Weiterentwicklung der medikamentenbasierten Medizin. Deshalb wurde die druckbasierte Applikation kryobiologisch immobilisierter Mikrogewebe auch an hiPSCs evaluiert, die sehr sensibel auf fehlende Adhäsionskontakte reagieren. Da auch in diesem Fall bereits gezeigt wurde, dass weder die metabolische Aktivität, noch die Membranintegrität entscheidend für das Ausbilden der Kontakte sind, wurden die bei 2, 4 und 6 bar applizierten hiPSCs im Hinblick auf ihre Anwachsrate untersucht. Dazu wurden Suspensionen mit hiPSC-Mikrogewebe mit der Prozedur des einfachen Eintropfens vitrifiziert, in der Kryokontrolle in Medium (37°C) aufgetaut und in den applizierten Proben mit 2, 4 und 6bar aus einer Entfernung von 10cm in Zentrifugenröhrchen mit warmem Medium aufgetaut. Mit einer Anwachsrate von $10 \pm 11\%$ bei der mit 4bar applizierten Probe, zeigten die hiPSC-Mikrogewebe einen Einbruch der Anwachsrate im Vergleich zur gefrorenen Kontrolle ($32 \pm 22\%$). Beide Werte wurden auf die Anwachsrate in der nicht gefrorenen Kontrolle normiert. Bei dem Vergleich applizierter Proben untereinander konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (t-Test, $p < 0,05$). Die Ergebnisse werden in Abbildung 74 dargestellt.

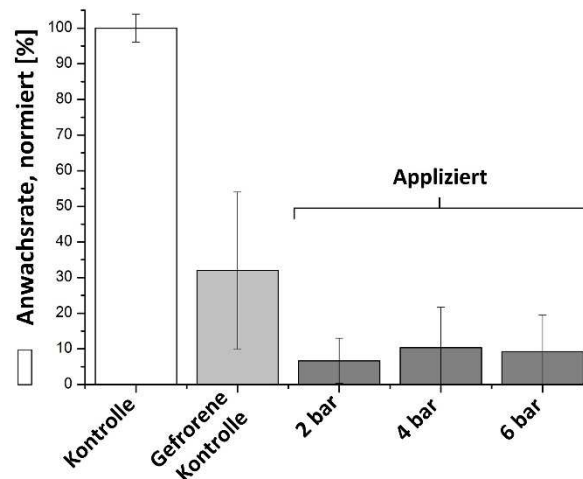


Abbildung 74: Anwachsrate der nicht gefrorenen und gefrorenen Kontrollen (vitrifiziert) und die Anwachsrate der bei verschiedenen Drücken applizierten hiPSC-Mikrogewebe. Die absolute Anwachsrate der Kontrolle betrug $50,9 \pm 2,0\%$; $N=3$.

Eine Möglichkeit, den Erfolg applizierter vitrifizierter hiPSC-Tropfen zu erhöhen, lag nach den Untersuchungen im hängenden Tropfen auf der Hand. Durch die Vitrifikation adhärenter hiPSCs im Tropfen, sollte der Parameter des Anoikis-Stresses von den hiPSCs genommen werden. Im Vorfeld wurden die hiPSCs aus der Standardkultivierung nach dem Protokoll zur adhärenter Kultivierung im hängenden Tropfen gemäß Kapitel 4.4.1 angesetzt. Nach einer 7-tägigen Kultivierung wurden die Mikrogewebe durch einfaches Eintropfen vitrifiziert. Da die Mikrogewebe zu diesem Zeitpunkt bereits eine Größe erreichten, die diese mit dem bloßen Auge sichtbar machte, konnte pro $20\mu\text{l}$ -Tropfen ein Mikrogewebe in die Pipette aufgenommen und vitrifiziert werden. Neben der Kryokontrolle, bei der die Tropfen sofort wieder aufgetaut wurden, wurden ebenfalls jeweils mindestens 4 Tropfen pro unabhängigem Experiment bei 2bar appliziert. Da in diesem Fall eine Auswertung über die Anwachsrate hinfällig ist wurde die Vitalität der aufgetauten hiPSC-Mikrogewebe über einen FDA/EtBr-Assay bestimmt und den Erhalt ihrer Pluripotenz durch eine Anti-HESCA-2-Färbung untersucht. Die Ergebnisse und repräsentative mikroskopische Aufnahmen werden in Abbildung 75 gezeigt. Sowohl in der nicht-applizierten, als auch in den druckbasiert-applizierten Proben, konnten nach dem Auftauen vitale Mikrogewebe wiedergefunden werden. Sowohl unmittelbar nach dem Auftauen, als auch nach einer Kultivierungsdauer von weiteren 24h, lagen die Vitalitäten gleich auf (keine statistisch signifikanten Unterschiede gemäß t-Test, $p < 0,05$). Ebenso zeigten sich in beiden Proben Signale des Pluripotenzmarkers Anti-HESCA-2.

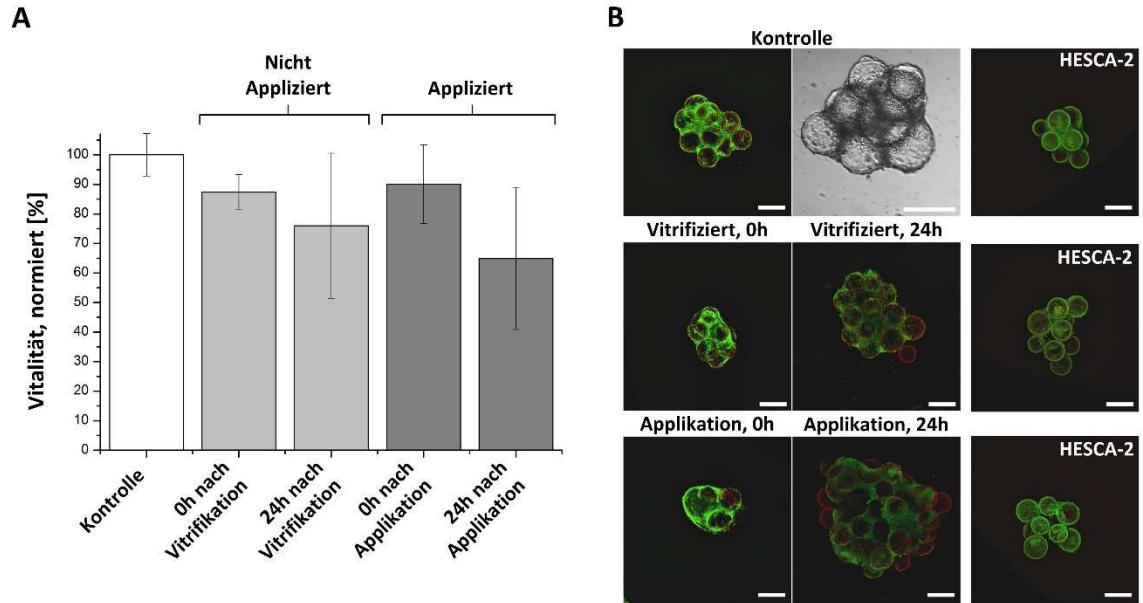


Abbildung 75: A Vitalität der nicht gefrorenen und vitrifizierten hiPSC-Mikrogewebe, bestimmt durch den FDA/EtBr-Assay. Die Proben wurden bei 2bar appliziert. B Repräsentative CLSM Aufnahmen nach FDA/EtBr-Assay der applizierten hiPSC-Fragmenten und HESCA-2-Immunfluoreszenzfärbung nach 24h. Die Balken entsprechen in allen Aufnahmen 200 μ m; N=3.

5 Diskussion

Noch immer halten sich die Anwendungen allogener oder xenogener Zellsysteme für regenerative Therapien in Grenzen und die meisten Untersuchungen zur Toxizität neuer Wirkstoffe und Produkte werden weiterhin in Tiermodellen ausgeführt (Leist et al. 2012). Gründe dafür sind zum einen die strengen und dennoch notwendigen Regularien für klinische Studien und zum anderen die zahlreichen, nicht eindeutig definierten Einsatzgebiete zellulärer Mikrogewebe für die Anwendung im Kontext neuer Therapien.

In der Zusammenfassung aller Ergebnisse dieser Arbeit konnte ein Algorithmus zur Protokollentwicklung und Methodenwahl für Arbeitsabläufe im Kontext neuer Therapien abgeleitet werden, in dem auf die anwendungs- und zellspezifischen Eigenschaften Rücksicht genommen wird. Der Algorithmus wird in Abbildung 76 dargestellt und wurde in vier Hauptschritte unterteilt:

- i. Gewinnung von Zellmaterial aus verschiedenen Quellen
- ii. Aufbereitung des Zellmaterials zu funktionalen Einheiten hinsichtlich der späteren Anwendungsgebiete
- iii. Kryokonservierung unter Berücksichtigung des Funktionalitätserhalts
- iv. Anwendungsbezogene Applikation mit Automatisierungspotenzial für regenerative und medikamentenbasierte Therapien.

Jeder dieser Hauptschritte endet mit dem Erreichen eines stabilen, charakterisierbaren Zellstatus. Ausschlaggebend für alle konzeptionellen Arbeiten zur Entwicklung eines Arbeitsablaufes im Kontext neuer Therapien ist die finale Anwendung der Zellen. Beginnend mit dem ersten Schritt, der Auswahl des geeigneten Zelltyps, muss entschieden werden, welche Zellquellen in Frage kommen (Kapitel 4.1).

Im zweiten Schritt, der Expansion und Präparation des gewählten Zelltyps, muss entschieden werden, ob sie einzeln oder als dreidimensionale Mikrogewebe verwendet werden. Müssen die Zellen vor einer eventuellen Immunabwehr durch Einschlussimmobilisierung geschützt werden? Brauchen sie artifizielle Gerüststrukturen, um ihre zellspezifischen Charakteristiken zu erhalten oder um ihre Funktionalität zu entwickeln (Kapitel 4.2)?

Aktueller Stand der Technik hinsichtlich der Lagerung biologischer Proben unter Funktionalitätserhalt ist die Kryokonservierung von Zellsuspension in standardisierten Kryoröhrchen oder Beuteln. Bevor therapeutisch relevante Zellen in neuen Therapien verwendet werden, müssen sie aufgetaut und in der Regel mit Standardkultivierungsmethoden wieder expandiert werden. Erst danach werden die Zellen in die benötigte Form gebracht, wie zum Beispiel auf eine flächige Gerüststruktur zur Regeneration dysfunktionaler Haut. Die Fragestellung, die in diesem Arbeitsschritt häufig außer Acht gelassen wird, ist die nach geeigneteren Gefäßen zur Kryokonservierung oder gar nach Methoden, bei denen ganz auf Gefäße verzichtet werden kann (Kapitel 4.3).

Hinsichtlich der Bioimplantation für die regenerative Medizin oder Testsystemen für die medikamentenbasierte Medizin ist stets auf größtmögliche Homogenität und Sterilität der Proben zu achten. Dazu sind Automatisierungsprozeduren zu erwägen, die eine gleichbleibende Qualität und einen hohen Durchsatz gewährleisten können. Insbesondere für Anwendungen im Kontext von Bioimplantationen in der regenerativen Medizin sind Prozeduren entscheidend, die sowohl minimalinvasiv, als auch scherkraftreduziert sind (Kapitel 4.4).

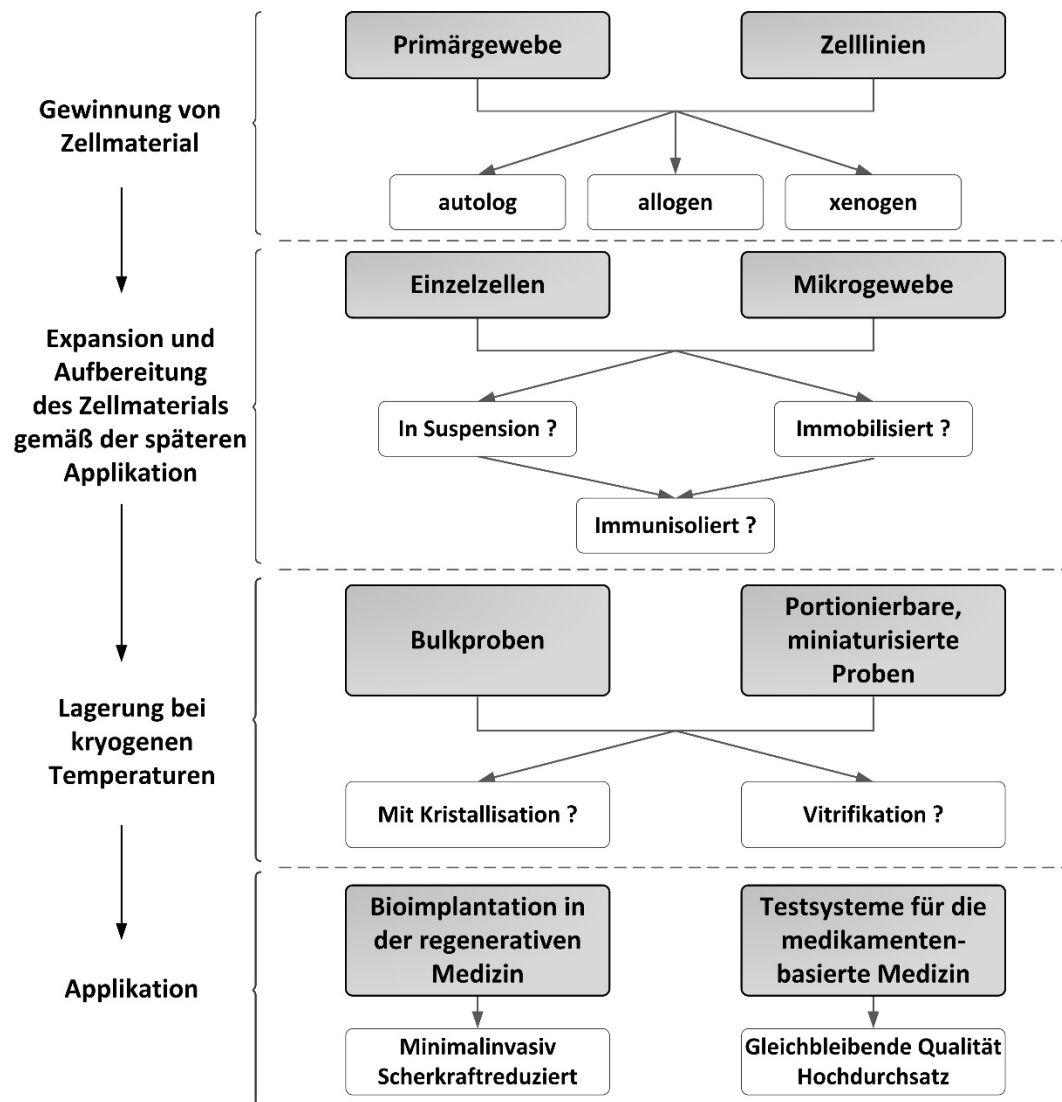


Abbildung 76: Flussdiagramm zur Präparation komplexer Zellsysteme im Kontext neuer Therapien. Zur ständigen Verbesserung der Arbeitsabläufe muss stets geprüft werden, welche Teilbereiche man durch Automatisierungsschritte standardisieren kann, um die Qualität der biologischen Produkte zu verbessern.

Gibt es den einen optimalen Zelltyp im Kontext neuer Therapien?

Betrachtet man das Flussdiagramm in Abbildung 76, zeichnet sich ab, dass es den einen optimalen Zelltyp gar nicht geben kann, da zu viele unterschiedliche Voraussetzungen für die einzelnen Anwendungen erfüllt werden müssen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Zellpanel aus relevanten Zelltypen und entsprechenden zellulären Modellsystemen sowie eines physikalischen Mikrogewebemodells für die drei Kategorien neuer zellbasierter Therapien entwickelt (Kapitel 4.1).

Zielt man beispielsweise auf den Kontext der metabolischen Therapie (Kategorie 1) ab, ist es wichtig Zellsysteme zu verwenden, deren Metabolismus die gewünschten therapeutischen Faktoren zur Verfügung stellt. Da Diabetes die weltweit am häufigsten auftretende Stoffwechselerkrankung ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit Insulin-sekretierende RIN-m Zellen als Modellsystem verwendet, die im HD-Verfahren zu Mikrogeweben gezüchtet wurden, um in Morphologie und Größe den nativen LHIs zu entsprechen (Abbildung 13). Die Funktionalität dieser Zellsysteme wurde über die Aktivität des kompletten Metabolismus (FDA-Färbung) ermittelt, ihr Strukturerehalt über mikroskopische

Aufnahmen und Untersuchungen auf den Erhalt der Membranintegrität (EtBr-Färbung). Um mechanische Belastungen während immunisierender Verkapselungsprozesse zu untersuchen, wurden elastische Alginatkugeln als physikalisches Modellsystem für Mikrogewebe verwendet (Abbildung 17). Auf Grund ihrer Geometrie und Strömungseigenschaften vermeiden sie Artefakte in den durchgeführten Analysen, die durch verschiedene Schwerpunkte natürlich gewachsener Mikrogewebe entstehen können.

In der strukturellen Kategorie (Kategorie 2) wurden Herzmuskelzellen aus dem Huhn als Modellsystem für primäres Herzgewebe etabliert (Abbildung 16). Im Gegensatz zu primären Gewebeschnitten weisen die Mikrogewebe aus Herzmuskelzellen autonome Kontraktionen auf, die hervorragend geeignet sind, um Schädigungen an Zell-Zellverbindungen während einzelner Präparationsschritte aufzuzeigen (Abbildung 66). Die Limitierung bei diesem Zellmodell ist die fehlende Vaskularisierung der *in vitro* gezüchteten Mikrogewebe, die zu einer Unterversorgung an Sauerstoff führen kann.

Für die zelluläre Kategorie (Kategorie 3) wurde mit den murinen Fibroblasten (L929) ein gut charakterisiertes Zellsystem ausgewählt, dessen Zytoskelett hoch konserviert ist und grundlegend untersucht wurde. An diesen Zellen lassen sich Einflüsse der Zellpräparation im Verlauf neuer zellbasierter Therapien sehr gut untersuchen. Sie dienen als Modellsystem für adulte mesenchymale Stammzellen, da beide Zelltypen einzellbasiert und adhärent wachsen (Abbildung 23 und Abbildung 51). Mesenchymale Stammzellen sind multipotent, können sich also innerhalb ihres Keimblattes in Knochen-, Knorpel-, Sehnen- oder Fettzellen spezialisieren. Sie spielen eine große Rolle in der Wundheilung von Geweben, wo sie inflammatorische Prozesse durch die Sekretion der Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und IL-4 minimieren und Zellen des Empfängerorganismus durch das Sekretieren von Wachstumsfaktoren stimulieren (Maxson et al. 2012). Die Proliferation nimmt jedoch mit zunehmendem Alter der Zellen ab (Caplan 1991).

Die hier verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen aus der Nabelschnur zeichnen sich durch ihr geringes Alter sowie durch den Umstand aus, dass sie nicht-invasiv gewonnen werden können. *In vitro* zeigt dieses Zellsystem, speziell unter hypoxischen Bedingungen, jedoch eine gesteigerte Proliferationsrate, was einen weiteren Vorteil zur Verwendung dieses Zellsystems hinsichtlich der Expansion im Kontext neuer Therapien bedeutet (Hass et al. 2011). Durch ihre Multipotenz eignen sich die adulten Stammzellen also für ein breiteres Anwendungsgebiet, ihr kürzlich entdecktes Potenzial zur Transdifferenzierung in Zelltypen eines anderen Keimblattes lässt hoffen, dass sich dieses Potenzial noch erweitern und gezielt steuern lässt. Dieses spannende Forschungsgebiet steht allerdings noch am Anfang (Ladewig et al. 2013): Bereits gelungen ist eine Reprogrammierung von α -Zellen zu β -Zellen durch die Manipulation der Histonmethylierung nach epigenetischen Analysen (Bramswig et al. 2013) sowie die Generierung von neuronalen Progenitorzellen aus epithelartigen Zellen aus humanem Urin durch ein episomales Transportersystem für Transkriptionsfaktoren (Wang et al. 2013).

Ein aussichtsreicher Kandidat für die optimale Zellquelle sind hESCs; ein Zellsystem das auf Grund der hohen Telomeraseaktivität theoretisch unbegrenzt teilbar ist und in alle Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren kann. Dadurch können diese Zellen als Grundbausteine für neue Therapien in der regenerativen Medizin oder als Modellsysteme zur Wirkstoffforschung in der medikamentenbasierten Medizin eingesetzt werden (Brafman 2012). Ein Anwendungsbeispiel zurzeit ist die Applikation von Hepatozyten aus differenzierten hESCs in Tierversuchen zur Erforschung von Leberkrankheiten (Basma et al. 2009). Die Pluripotenz der hESCs scheint dieses Zellsystem zu einem hochpotenten Allheilmittel

für alle notwendigen Bereiche in der medizinischen Forschung zu machen. Jedoch nur auf den ersten Blick. Eine Bioimplantation undifferenzierter hESCs resultiert in der Ausbildung von Teratoma-Karzinomen, eine Eigenschaft, die sogar dazu benutzt wird, die Pluripotenz dieses komplexen Zellsystems nachzuweisen (Seeger et al. 2007). Da zurzeit weder die Differenzierungswege komplett aufgeklärt sind und auch noch keine Protokolle vorliegen, die eine zu 100% abgeschlossene Differenzierung aller Zellen in einem Reaktionsgefäß garantieren, scheint die klinische Anwendung von hESCs, beziehungsweise von Zellen die aus hESCs gewonnen wurden, als sehr kritisch. Nicht zuletzt ist das ethische Problem der Gewinnung von hESCs ein weiteres Hindernis, da hierbei Blastozysten erforscht werden.

Die bahnbrechende Entdeckung der Möglichkeit zur Reprogrammierung adulter somatischer Zellen zu hiPSCs schien wenigstens eine Lösung für letzteres Problem darzustellen. Sie wachsen wie hESCs adhären und koloniebasiert (Abbildung 11) und können ebenfalls in sämtliche Zelltypen aus allen drei Keimblättern differenziert werden (Fujiwara et al. 2011; Kang und Gao 2012). Damit besitzen auch sie ein großes Potenzial für die regenerative und medikamentenbasierte Medizin. hiPSCs wurden im Rahmen dieser Arbeit als Modellsystem für hESCs genutzt, da sie vergleichbare DNA-Methylierung und Genexpressionslevel aufweisen, wodurch ihre Pluripotenz belegt wurde (Bock et al. 2011). Andere Untersuchungen konnten jedoch Belege für Unterschiede zwischen hiPSCs und hESCs feststellen, so dass diese Diskussion um die Vergleichbarkeit zurzeit kontrovers geführt wird (Hussein et al. 2011; Yamanaka 2012). Ein grundlegendes Problem in dieser Diskussion ist jedoch, dass durch die Möglichkeit in jedem Labor eigene hiPSCs herzustellen, generell eine Vergleichbarkeit der Untersuchungen kaum möglich ist. Ebenso fragwürdig ist es ob hESCs überhaupt als „Goldstandard“, sprich als Referenz, für hiPSCs gelten können (Bilic und Ispisua Belmonte 2012; Yamanaka 2012). Als gesichert gilt aber, dass Effizienz und Eigenschaften der hergestellten hiPSCs auf das verwendete Ausgangsmaterial zurückzuführen ist (Huang 2010), wodurch die Möglichkeit zur Generation krankheitsspezifischer Zelllinien gegeben ist (Itzhaki et al. 2011).

Von allen bisher genannten Quellen sind hiPSCs also diejenigen Zellen, die sämtliche potenzielle Anwendungsgebiete am breitesten und mit den wenigsten Nachteilen abdecken. Allerdings geht die Verwendung dieses adhären und koloniebasierten Zellsystems mit schwierigen Kultivierungsbedingungen einher. Wie auch für hESCs ist noch immer nicht geklärt, welche Stoffe zur Aufrechterhaltung der pluripotenten Eigenschaften notwendig sind. Xenogene Feederzellen sind zwar effizient in der Ausschüttung relevanter Zytokine, aber für Anwendungen in neuen Therapien zu vermeiden.

Des Weiteren konnten aktuelle Untersuchungen belegen, dass Integrin-vermittelte Zelladhäsion einen Einfluss auf den Pluripotenzerhalt hat (Hongisto et al. 2012). Aus diesem Grund ist es auch wichtig, die Beschaffenheit der Wachstumsfläche nicht zu vernachlässigen: Matrigel wird neben Feederzellen als Goldstandard in der Kultivierung von hSCs eingesetzt wird (Serra et al. 2012), enthält chargenabhängig verschiedene Konzentrationen an Wachstumsfaktoren wie TGF- β , EGF, oder bFGF (Vukicevic et al. 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hiPSCs scherstressempfindlich sind und bereits nach wenigen Pipettierschritten irreversibel soweit zerfallen, dass die Koloniegröße unter den hier bestimmten kritischen Mindestdurchmesser von 40 μ m fällt (Abbildung 14 und Abbildung 15). Eine weitere Schwierigkeit der hiPSCs wird erkennbar, wenn man die erreichten absoluten Anwachsrate der hiPSC-Fragmente in den hier durchgeführten Kontrollen betrachtet: Zwischen den einzelnen

Experimenten dieser Arbeit zeigen sich deutliche Unterschiede, obwohl sie stets mit der gleichen Linie unter gleichen Rahmenbedingungen durchgeführt wurden (zum Beispiel in Abbildung 67: $30 \pm 12\%$ und Abbildung 69: $44,5 \pm 7,3\%$).

Welchen Effekt haben miniaturisierte Kultivierungsformen auf die Vitalität und zellspezifischen Charakteristika von Zellen?

Wie auch für die Transplantation von ganzen Organen herrscht für die zellbasierten Therapieansätze ein Materialmangel, der mit Standardkultivierungsmethoden in Zellkulturflaschen und -schalen nicht zu bewältigen ist (Lode et al. 2008; Raggi und Berardi 2012). Beispielsweise wurden in einer klinischen Studie zur Behandlung der Graft-versus-Host-Reaktion (GvHD, graft-versus-host-disease) den Patienten $0,4$ bis $9 \cdot 10^6$ mesenchymale Stammzellen pro kg Körpergewicht appliziert (Le Blanc et al. 2008). Üblicherweise erreicht man (abhängig vom Zelltyp) eine Zellmenge von etwa $5 \cdot 10^6$ Zellen in einer Zellkulturflasche mit der standardisierten Wachstumsfläche von 75cm^2 . Somit bräuchte man zwischen 6 und 135 solcher Flaschen für einen durchschnittlichen erwachsenen Patienten mit 75kg Körpergewicht. Zahlreiche Studien untersuchten daher bereits skalierbare, in der Regel gerührte Bioreaktoransätze für humane Stammzellen (Kehoe et al. 2009). Für hESCs konnten so zum Beispiel eine 45-fache Vervielfältigung erreicht werden (Lock und Tzanakakis 2009).

Ist denn also die im Rahmen dieser Arbeit angestrebte Miniaturisierung der Kultivierungsformen kontraproduktiv für den stetig wachsenden Bedarf an Zellen in neuen Therapien? Auch hier ist es wieder wichtig, sich auf die potenziellen Anwendungen zu beziehen: Zur Bioimplantation von Mikrogeweben im Kontext regenerativer Medizin oder zur Untersuchung neuer Wirkstoffe an patienten- und krankheitsspezifischen Modellsystemen in der medikamentenbasierten Medizin ist die Homogenität der Proben und damit ihre Qualität entscheidend. Insbesondere Stammzellen ändern ihr Verhalten nach der Beschaffenheit ihrer unmittelbaren Umgebung. Xie und Spradling führten dazu den Begriff der Stammzellnische ein, die direkt von Zellen aber auch der umgebenden Matrix gebildet wird (Xie und Spradling 2000) und das Schicksal der Zelle reguliert und kontrolliert (Powell 2005). Die Adhäsion der Stammzellen über Cadherine und Intergrine in den Nischen ist hierbei entscheidend für den Erhalt der Proliferation (Chen et al. 2013). Ebenso entscheidend ist die Art der Kultivierung (Abbott 2003): Im humanen Brustkrebsmodell konnte gezeigt werden, dass eine dreidimensionale und somit physiologischere Kultivierung zu morphologischen wie funktionalen Änderungen im Vergleich zu einer zweidimensionalen Kultivierung führt (Weaver et al. 1997). Untersuchungen der Zellpolarität zeigten, dass eine dreidimensionale Organisation der Zellen im pankreatischen Epithelium notwendig ist, um eine ausreichende Menge an endokrinen Zellen zu generieren (Cortijo et al. 2012). In den standardisierten Kultivierungsmethoden unter Verwendung von Zellkulturflaschen oder großvolumigen Bioreaktoren sind solche Nischen beziehungsweise eine homogene, dreidimensionale Kultivierung nicht kontrollierbar. Miniaturisierte Ansätze können hier Abhilfe schaffen (Brafman 2012; Figallo et al. 2007; Kobel und Lutolf 2010) und reduzieren auch den Kostenfaktor, da ein günstigeres Verhältnis von Wachstumsfläche zu Volumen erreicht wird und somit teure Verbrauchsmaterialien, wie Differenzierungsfaktoren, reduziert werden können (Archer und Williams 2005; Meiser et al. 2013c).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals vergleichende Untersuchungen mit drei verschiedenen Methoden mikrofluidischer Bioreaktoren im Hinblick auf die Anzucht von funktionalen Mikrogeweben und Adhäsion durchgeführt (Kapitel 4.2.3). Im Hinblick auf die spätere Applikation möglichst

homogener funktionaler Einheiten sowie durch die beteiligten Grenzflächen, erwies sich der hängende Tropfen als optimaler mikrofluidischer Bioreaktor. Die Vor- und Nachteile dieser und weiterer Kultivierungsformen werden in Abbildung 81 dargestellt.

Der erste Ansatz, der hier untersucht wurde, ist die Anzucht homogener Mikrogewebe im mikrofluidischen Verbund. Dabei wurde das Prinzip der Mikrotiterplatte, die es standardmäßig im 96er- oder 384er-Format gibt weiter miniaturisiert. Auf Kulturgefäßen mit Glasboden wurden mit einer Stempeltechnik UV-adhäsive Kammern mit einem Durchmesser von 250µm aufgebracht (Markovitz-Bishitz et al. 2010), in denen Mikrogewebe aus L929 und CHMC kultiviert wurden (siehe Abbildung 26). Während das Prinzip der Mikrokammern sich sehr gut eignet, um Untersuchungen an Einzelzellen durchzuführen (Afrimzon et al. 2010; Deutsch et al. 2010), zeigte sich doch, dass selbst nach einer Beschichtung der Oberfläche mit Poly-HEMA eine Adhäsion der Zellen zu den Kammerwänden nicht verhindert werden konnte. Auf den ersten Blick wirkte sich dieser Umstand zwar nicht schädlich auf die offensichtliche Funktionalität kontrahierender Mikrogewebe aus Herzmuskelzellen auf, aber solche Interaktionen mit artifiziellen Oberflächen können unerwünschte Konsequenzen mit sich bringen (Jakab et al. 2010), wie zum Beispiel Untersuchungen von *in vitro* konstruierten Arterien zeigten (Dahl et al. 2007). Ein weiterer Nachteil dieser statischen Mikrokammern, neben den nicht-physiologischen Oberflächen sind die Problematiken beim Variieren der Mikroumgebung aufgrund des mikrofluidischen Verbundes (Brafman 2012), da sämtliche Kompartimente über das Medium verbunden waren. Auch das Entnehmen der Mikrogewebe zur weiteren Verwendung stellte ein Problem dar, da es häufig ohne den Einsatz von Enzymen nicht möglich war (Abbildung 58).

Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit in einem nächsten Schritt fluide Mikrobioreaktoren in sterilen Schläuchen aus Teflon realisiert und evaluiert, die das unerwünschte Wachstum auf den Kulturgefäßen verhindern und getrennte mikrovolumige Kompartimente realisieren (Abbildung 27). Über eine Kompartimentierungs-sonde wurden Segmente aus hESC-Fragmentsuspension mit Hilfe eines inerten Trägermediums abgetrennt und konnten für 9 Tage kultiviert werden. Innerhalb dieser Segmente (etwa 100µl Volumen) wurden die hESC-Fragmente auf sphärischen Mikroträger kultiviert, um die notwendige Wachstumsfläche aus der Standardkultivierung zu simulieren. Da in dem hier verwendeten, geschlossenen System der fluiden Mikrobioreaktoren noch kein Mediumwechsel umzusetzen war, sank die über FACS-Analyse ermittelte Pluripotenz der hESCs nach dem 3. Tag, wohingegen die Vitalität mit mehr als 90% über den gesamten Zeitraum gleichbleibend hoch war (Abbildung 28 und Abbildung 29). Vermutlich sind in den miniaturisierten Segmenten von 100µl nach dem dritten Tag die Zytokine verbraucht, die hESCs zum Erhalt der Pluripotenz benötigen. Der Gasaustausch in diesen geschlossenen Systemen ist auch durch die Verwendung von Perfluordecalin (PFD) als inertes Trägermedium und potenter Sauerstofftransporter nicht optimal, da die Fläche eines fluiden Mikrobioreaktors nur an den Enden Kontakt zum PFD aufnehmen kann. Auch konnten die einzelnen Segmente nicht separat angesteuert werden, so dass die Mikroumgebung nicht kontrollierbar beziehungsweise variierbar war. Nach der Ernte verunreinigten feinste Tröpfchen des Trägermediums die Suspension, die sich nicht rückstandslos entfernen ließen. Ebenso konnten keine homogenen Mikrogewebe kultiviert werden: Bei der Herstellung der H9-Fragmente können auf Grund der Prozedur, die in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurde, keine definierten Größen hergestellt werden. Ebenso konnte die Suspension mit Hilfe des Magnetrührers nicht ausreichend in Schwebe gehalten werden, so dass die Anzahl an Zellen und Mikroträgern pro Segment nicht definierbar war, was zu einer inhomogenen Größenverteilung der Mikrogewebe führte (Abbildung 29).

Um homogene Mikrogewebe herzustellen, hat sich die HD-Technologie bewährt (Kelm und Fussenegger 2004), was auch im Rahmen dieser Arbeit anhand der Untersuchungen zur Kultivierung von hiPSCs gezeigt werden konnte (Kapitel 4.2.3). Die daraus resultierenden dreidimensionalen Mikrogewebe, jedes definiert angesetzt in einem einzelnen Mikrobioreaktor mit kontrollierbarer Mikroumgebung, gelten als Goldstandard für Hochdurchsatztechnologien in der Diagnostik und für Toxikologiestudien (Bhadriraju und Chen 2002; Heuer et al. 1993; Markovitz-Bishitz et al. 2010). Vorteile dieser Technologie sind der optimale Gasaustausch, das sehr gute Wachstumsoberfläche-zu-Volumen-Verhältnis und die vollständige Kontrolle der Mikroumgebung. Aus diesen Gründen wird die HD-Technologie als Routine zur Differenzierung von Stammzellen genutzt (Boheler et al. 2002; Chen et al. 2011; Hescheler et al. 1997). Ausgangspunkt hierfür ist die Anzucht homogener Mikrogewebe im HD zu Embryoid Bodies, die anschließend in einer standardisierten, üblicherweise adhärennten zweidimensionalen Kultur entsprechenden Differenzierungsfaktoren ausgesetzt werden. Nachteile der HD-Technologie sind der hohe Arbeitsaufwand und die schwierige Handhabung der HDs, die auf Deckelinnenseiten von Petrischalen pipettiert werden, die zur Kultivierung wieder invertiert werden. Neben der HD-Technologie werden zum Beispiel auch gerührte oder statische Bioreaktoren zur EB-Bildung eingesetzt, in denen aber weder die resultierende EB-Größe noch die Mikroumgebung kontrolliert werden kann (Kurosawa 2007). Zwar sind die Differenzierungswege noch immer nur unzureichend aufgeklärt, jedoch scheint die Größe der EBs (Park et al. 2007) sowie die eingesetzte Zellzahl (Chen et al. 2011) eine entscheidende Rolle für die Art der Differenzierung zu spielen. Ebenso werden heterogene Ausgangsbedingungen bezüglich der EB-Größe auch für die Ineffizienz von Differenzierungen verantwortlich gemacht (Mohr et al. 2010).

Ein erstes Hindernis zur Generierung homogener Mikrogewebe aus Stammzellen ist die Vereinzelung der Zellen, die koloniebasiert auf Feederzellen oder extrazellulären Matrixproteinen wie MG wachsen. Durch den unspezifischen enzymatischen Verdau zur Vereinzelung werden sowohl Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Kontakte sowie Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Kontakte zerstört, was einen Vitalitätsverlust zur Folge hat. Ein Grund dafür ist die Anoikis, ein programmierten Zelltod der durch den Verlust von Adhäsionskontakten vermittelt wird (Chiarugi und Giannoni 2008; Frisch und Francis 1994; Wang et al. 2009). Durch die Zugabe des Inhibitors der Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK) kann die Anoikis-Signalkaskade unterbrochen werden, womit die Überlebensrate erhöht wird und eine Vereinzelung der Stammzellen möglich ist (Ohgushi und Sasai 2011; Watanabe et al. 2007). Die Untersuchungen zur Kultivierung von hiPSCs mit der HD-Technologie belegten den positiven Effekt des ROCK-Inhibitors auf die Bildung von EBs (Abbildung 30).

Weiterhin zeigten die Analysen, dass die Effizienz der Technologie auch über den Zusatz des extrazellulären Matrixproteins Fibronektin erhöht werden kann. Die RGD-Sequenzen auf Fibronektin bieten zusätzliche Adhäsionspunkte für $\alpha 5 \beta 1$ - und $\alpha V \beta 3$ -Integrine auf Zellen, womit Anoikis ebenfalls reduziert werden kann. Ebenso entscheidend ist aber auch der Einsatz eine Mindestmenge an vitalen Zellen: Die Bildung von EBs mit 200 Zellen pro Tropfen ($1 \cdot 10^4$ Zellen/ml) scheitert zu 100%, wohingegen 2000 eingesetzte Zellen ($1 \cdot 10^5$ Zellen/ml) zu 80% in der Bildung von EBs resultieren. Eine weitere Erhöhung der Zellzahl zeigte keinen Einfluss auf die Effizienz (Abbildung 30), so dass vermutlich gesichert sein muss, dass sich eine Mindestmenge an vitalen Zellen findet, um eine Art Gewebekeim zu bilden.

Im Gegensatz zu Differenzierungsansätzen, die in der Regel mit der Generierung von EBs beginnen, benötigen hSC-Mikrogewebe zum Erhalt ihrer Pluripotenz, beispielsweise für Wirkstofftests, eine Wachstumsoberfläche. In weiteren Untersuchungen wurde daher die Verwendung von MG-

beschichteten Mikroträgern in der HD-Technologie evaluiert, deren Potenzial dadurch deutlich erweitert werden würde. Auch hier wurden ROCK-Inhibitor und Fibronektin verwendet und ihr Einfluss auf die Anzahl der angewachsenen Zellen untersucht (Abbildung 31).

Die Resultate aus den EB-Versuchen konnten bestätigt werden, so dass der Erfolg der Technologie vermutlich sowohl von der Unterdrückung der Anoikis durch ROCK-Inhibierung, dem Zusatz an extrazellulären Matrixproteinen sowie der ausreichenden Bereitstellung an Zell-Zell-Kontakten zwischen vitalen Zellen abhängt. Abbildung 77 zeigt ein im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes Modell zur benötigten Mindestzellzahl bei der Generierung von Mikrogewebe aus hiPSCs.

Die Ergebnisse zeigten also, dass allein Zell-Matrix-Kontakte zum Überleben der hiPSCs nicht ausreichen, wie es auch aus aktuellen Studien zur einzelzellbasierten Kultivierung von hiPSCs hervorgeht (Miyazaki et al. 2012). Bedenkt man die Scherstresssensibilität der hiPSCs, die in Kapitel 4.1.2 belegt wurde, so wird deutlich, dass dieses komplexe Zellsystem vorsichtig zu handhaben ist. Wie bereits für hESCs belegt werden konnte (Groeber 2008), gibt es auch für hiPSCs eine Mindestgröße für eine erfolgreiche Kultivierung. Die Ergebnisse in Abbildung 14 belegen, dass ein Mindestdurchmesser von 40µm benötigt wird, um die besten Anwachsrate von hiPSC-Fragmenten zu ermöglichen. Das bedeutet, dass eine Einzelzellsuspension aus hiPSCs neben einer ausreichenden Anzahl vitaler Zellen auch ein ausreichendes Verhältnis an vitalen zu toten Zellen aufweisen muss: Können sich nicht ausreichend viele vitale hiPSC zu einem Gewebekeim von etwa 40µm Durchmesser finden, sterben die Zellen vermutlich durch Anoikis ab.

Im Falle der adhären HD-Technologie durch die Verwendung von Mikroträgern zeigte sich, dass es ebenfalls wichtig ist, ein optimales Angebot an Wachstumsfläche zur Verfügung zu stellen: Ein Überangebot verhindert vermutlich, wie auch die räumliche Trennung vitaler Zellen durch tote, den benötigten Zell-Zell-Kontakt zum Ausbilden eines Gewebekeims (Abbildung 31).

Im Vergleich zur zweidimensionalen Standardkultivierung begünstigt die miniaturisierte Kultivierung im hängenden Tropfen den Zell-Zell-Kontakt durch die gravitationsbedingte Agglomeration der Zellen an der Tropfenunterseite und erlaubt die Kontrolle der Mikroumgebung (siehe auch Abbildung 81).

Kann eine zentrale Immobilisierung in einer durch Eintropfen polymerisierten Alginatkapsel erreicht werden und welche Kräfte wirken dabei auf das Bioimplantat?

Das Eintropfen von Flüssigkeiten auf fluide oder feste Oberflächen wird bereits seit Anfang des vorigen Jahrhunderts untersucht (Worthington 1908), die Produktion von immobilisierenden Kapseln aus biokompatiblen, ionotropen Hydrogelen durch Eintropfen in ein Fällbad ist allerdings ein Spezialfall und von entscheidender Bedeutung im Kontext metabolischer Therapien. Es ist noch immer Stand der Technik zur Produktion von immobilisierenden Kapseln, wodurch die Bioimplantate im Inneren der Kapseln mechanischem Stress ausgesetzt werden, der unerwünschte Effekte auf die Transplantate haben kann (Papoutsakis 1991) und bislang nicht näher quantifiziert wurde. Ebenso setzt durch den

Kontakt des Hydrogels mit den mehrwertigen Kationen im Fällbad ein Polymerisationsprozess ein, der durch bisher beschriebene Ansätze, die rein die resultierenden Oberflächen analysieren, nicht abgebildet werden kann (Jung und Hutchings 2012; Lohse et al. 2004; Manzello und Yang 2002). Alginat ist eine nicht-Newtonsche Flüssigkeit, deren Viskosität sich während des Vernetzungsprozesses mit den mehrwertigen Kationen im Fällbad ändert (Siew et al. 2005; Storz et al. 2009) und bedarf daher

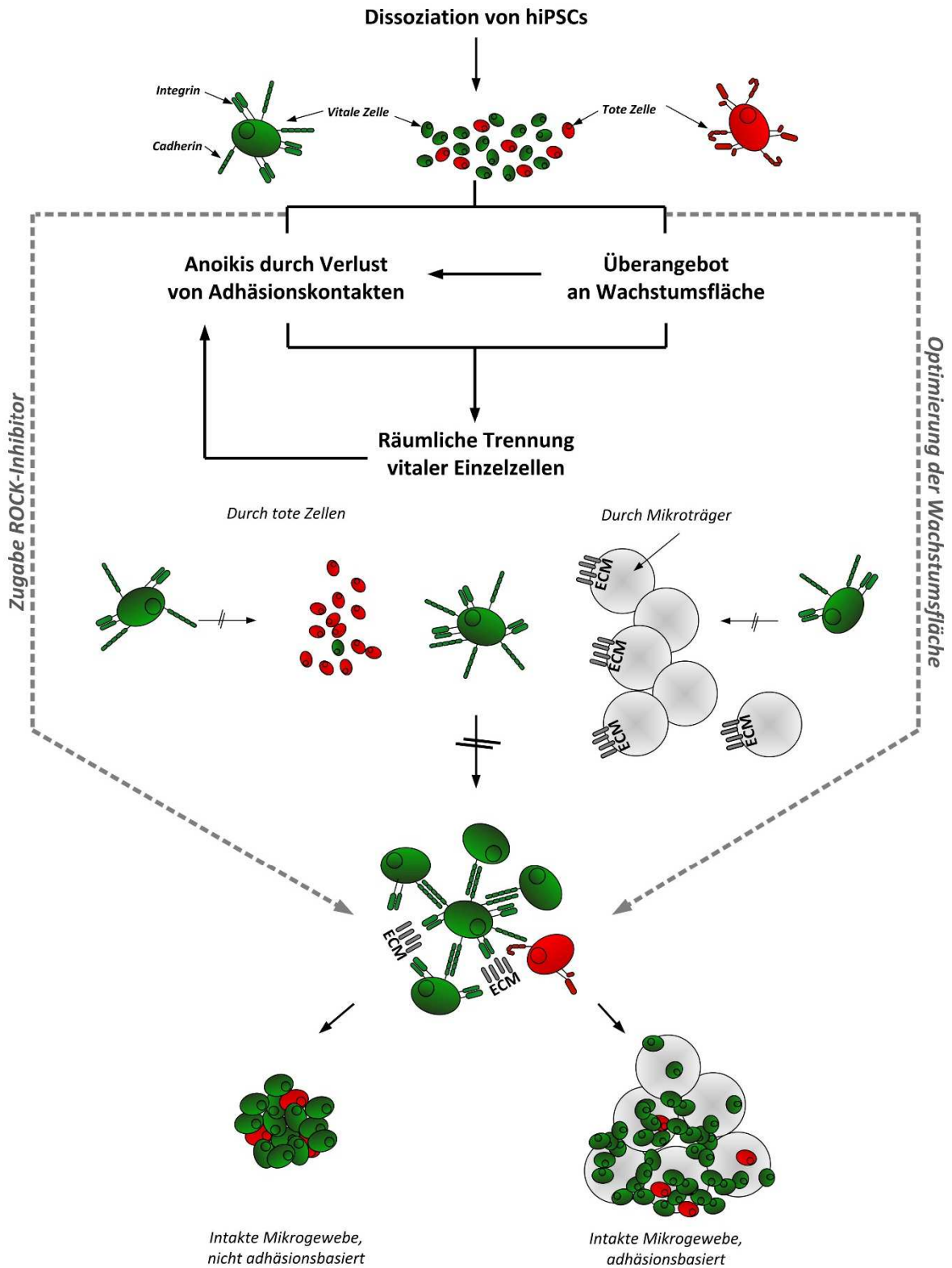


Abbildung 77: Schematische Darstellung der benötigten Mindestzellzahl für eine erfolgreiche Generierung von EBs (nicht adhären) und Mikrogeweben (adhären) auf sphärischen Mikroträgern aus hiPSC. Durch die ROCK-Inhibierung und die Optimierung der Wachstumsfläche kann dem induzierten Zelltod durch Anoikis entgegengewirkt werden. Wichtig ist die räumliche Trennung vitaler Zellen durch bereits abgestorbene Einzelzellen oder ein Überangebot an Wachstumsfläche zu verhindern.

einer Echtzeit-Evaluation des Polymerisationsprozesses. Durch die Bestimmung des horizontalen Kapseldurchmessers an dessen breitester Stelle (Deformationsmethode) konnte in früheren Arbeiten bereits gezeigt werden, dass Parameter wie die Fallhöhe der Alginatsuspension, die Alginatkonzentration und die Beladung der Kapseln einen Einfluss auf die Kapseldeformation haben und damit direkt auf das Bioimplantat wirken (Ehrhart 2008; Meiser 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Versuchsaufbau etabliert, bestehend aus einer Hochgeschwindigkeitskamera und einem Spiegelsystem, der es erstmalig erlaubt sowohl den Polymerisationsprozess der Hydrogelkapsel, wie auch die Raumkurve des eingeschlossenen Bioimplantat in der vernetzenden Kapsel zu beobachten und zu evaluieren (Kapitel 4.2.2). Dabei konnte mit der zur Verfügung stehenden Kamera eine zeitliche Auflösung von 1000 Aufnahmen pro Sekunde und eine räumliche Auflösung nahe der Einzelzellebene von 45µm pro Bildpunkt erreicht werden (Abbildung 17).

In den hier gezeigten Untersuchungen stellte sich heraus, dass ebenso die Algenspezies charakteristische Auswirkungen auf den Polymerisationsprozess hinterlässt (Abbildung 18 A). Alginat, extrahiert aus der Braunalge *Lessonia nigrescens* (*L.n.*) hat einen höheren Anteil an linearen Mannuronsäureketten (Percival et al. 1983) und weist eine höhere Viskosität auf. Alginat aus *Lessonia trabeculata* (*L.t.*) enthält mehr helikale Polysaccharidketten aus Gularonsäure (Venegas et al. 1993) und stellt sich in den Untersuchungen als weniger viskos, mit stärkeren Ausdehnungen am Einschlagsmaximum und der Relaxationsspitze, dar (Meiser et al. 2013a).

Der mechanische Stress durch die Kapselausdehnung kann in dem vorliegenden Prozess durch die Erhöhung der Alginatviskosität erreicht und durch therapeutisch relevante Zusätze beeinflusst werden (Abbildung 18). Da Alginat ein Naturprodukt ist, unterliegen die Anteile der beiden Polysaccharide Schwankungen: Der G-Gehalt wurde in Untersuchungen von kommerziell erhältlichem Alginat mit 22% in *L.n.* und 49% in *L.t.* angegeben; der M-Gehalt mit 40% in *L.n.* und 25% in *L.t.* (Myrvold und Onsøyen 2003). Die hier verwendeten, ultrahochviskosen Alginate aus eigener Produktion, deren Aufreinigung auf den Erhalt der langkettigen Polysaccharide ausgelegt ist, zeichnet sich durch 60% M-Gehalt in *L.n.* und 90% G-Gehalt in *L.t.* aus (Zimmermann et al. 2005). Mit der Deformationsmethode wurden ebenfalls die Zusätze HSA und Poloxamer untersucht, die zum einen die Überlebensrate nach Kryokonservierung verbessern und zum anderen Zellen durch die Unterstützung ihrer Membran scherstressresistenter machen (al-Rubeai et al. 1993; Ramirez und Mutharasan 1990; Schneider et al. 2003; Schneider und Klein 2011). Der Zusatz von 1% Poloxamer reduziert die horizontale Ausdehnung der Kapseln während des Eintropfvorganges, vermutlich durch Erhöhung der Viskosität und reduziert somit die Scherkräfte auf die Bioimplantat (Abbildung 18 B).

Die Position der Bioimplantate im Kapselinneren ist entscheidend für den Erfolg von Bioimplantationen: Dezentrale Positionen resultieren auf Grund der Gradientenbildung in einer inhomogenen Versorgung der Bioimplantate hinsichtlich Nährstoffen und Gas. Zudem bergen periphere Positionen die Gefahr der Immunantwort im Empfängergewebe (de Groot et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, mit der erstmalig Raumkurven einschlussimmobilisierter Bioimplantate während des Polymerisationsprozesses analysiert werden konnten (Abbildung 19). Die dazu durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Bioimplantatposition zeigen deutlich, dass es einen Bereich der Kapsel um den Mittelpunkt gibt, in dem kein Bioimplantat immobilisiert wird („No-Go-Area“, Abbildung 20). Durch die Trägheit werden alle Bioimplantate in die untere Hälfte der Kapsel gedrängt und dort auf Grund der einsetzenden Polymerisation gehalten. In

Alginatekapseln von geringerer Viskosität erfahren die Bioimplantate geringere Reibungskräfte und bewegen sich mehr. Da sich diese Kapseln aber auch während des Eintropfens und beginnender Polymerisation stärker ausdehnen, bleiben die Bioimplantate in den peripheren Bereichen der Kapsel.

Mit der hier entwickelten Trajektorienmethode können Geschwindigkeit und Beschleunigung von Bioimplantaten während des Polymerisationsprozesses ermittelt und Wege aufgezeigt werden wie mögliche schädliche Einflüsse während des Prozesses minimiert werden können. Es konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass eine symmetrische, kurzzeitige Deformation der umschließenden Kapsel auftritt, die zu einer Beschleunigung einschlussimmobilisierter Bioimplantate führt. Es wurden Geschwindigkeiten von bis zu 7900mm/s berechnet, die sowohl von der Hydrogelkonzentration als auch von der Zusammensetzung des Hydrogels abhängen (Abbildung 21). Diese auftretenden Strömungsgeschwindigkeiten liegen, verglichen mit andern technischen Methoden zur Zellmanipulation, im schädigenden Bereich für scherstressempfindliche Zellsysteme und werden weiter unter genauer diskutiert (Tabelle 4, Seite 124). Die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Bioimplantatmodelle in den hier verwendeten Alginatelösungen zeigten zwar erhöhte Werte in der 0,5% Lösung, Unterschiede in der Beschleunigung können aber vernachlässigt werden. Die Ergebnisse bezüglich der „No-Go-Area“ zeigten, dass eine zentrale Positionierung der Bioimplantate durch Eintropfen nicht möglich ist. Die Methode könnte eingesetzt werden, um ungünstige Kapseln oder gar Leerkapseln, die ein unnötiges Implantationsvolumen bedeuten, die im Empfängergewebe schlecht abtransportiert werden können, zu identifizieren und aus dem Prozess heraus zu schleusen. Um die Gefahr der Immunantwort bei peripheren Bioimplantaten zu beheben, wurden bereits erfolgreich Ansätze zur ionotropen Beschichtung der Kapseln mit einer oder mehreren weiteren Alginatschichten durchgeführt (Ehrhart et al. 2013).

Welchen Effekt haben die Kultivierungsdauer und Elastizität der Oberfläche auf adhäsionsbasierte Kryokonservierungsprozeduren mit Kristallisation?

Ebenso wie die Kontakte der Zellen untereinander spielen auch artifizielle Gerüststrukturen eine Rolle beim Erhalt der Funktionalität von therapeutisch relevanten Zellen, wie zum Beispiel Hydrogele (Huang et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Wachstum von hMSCs auf Gelatine-Alginate-Gerüststrukturen quantitativ, mit einem auf Laserscanningmikroskop-Aufnahmen basierenden Algorithmus, ausgewertet (Kapitel 4.2.2, Abbildung 23). Der Algorithmus ermöglicht statistisch signifikante Aussagen zur Vitalität und zur absoluten Zellzahl adhärenter Zellsysteme in dreidimensionalen, porösen Strukturen (Abbildung 24), so dass eine standardisierte Anwendung dieser Bioimplantate mit gleichbleibend hoher Qualität gewährleistet werden kann.

Für den Einsatz solcher Bioimplantate, die zum Beispiel bereits für Haut- oder Hornhautregeneration eingesetzt werden, ist eine Kryokonservierung ebendieser Konstrukte zur Vorratshaltung und ständigen Einsatzbereitschaft wünschenswert. Entsprechende Mikrogewebe sollten nach Bedarf aufgetaut und appliziert werden, ohne langwierige weitere Kultivierungs- oder Expansionsschritte. Allerdings sind die mechanischen Belastungen der Probe durch die Eiskristallbildung während der Kryokonservierung zu groß, so dass Adhäsionskontakte in der Regel nicht aufrecht erhalten werden können und die Proben ihre Funktionalität verlieren (Hornung et al. 1996; Malpique et al. 2012). Die Voraussetzungen für eine ideale Gerüststruktur im Kontext neuer Therapien, die auf einen direkten Kontakt zwischen Bioimplantat und Empfänger angewiesen sind (Hannachi et al. 2009), sind

Biokompatibilität, Porengröße und Abbaubarkeit (Bose et al. 2012) sowie adäquate mechanische Eigenschaften, die auch eine Kryokonservierung ermöglichen.

Durch die Verwendung von Kryogelen aus einem Gemisch aus Gelatine und Alginat, konnten hMSCs adhären in einem dreidimensionalen, biokompatiblen Konstrukt kryokonserviert werden (Kapitel 4.3.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss der Kultivierungsdauer vor einer adhären Kryokonservierung auf deren Erfolg untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Dauer einen entscheidenden Einfluss auf die Anzahl und Qualität der rückgewonnenen Zellen hat (Katsen-Globa et al. 2014): Anhand der Ergebnisse konnte eine optimale Kultivierungsdauer von 2h vor der Kryokonservierung für hMSCs bestimmt werden. Im Vergleich zu den weiteren analysierten Kultivierungszeiträume, konnte eine Wiederfindungsrate von $99,8 \pm 1,3\%$ erzielt werden. Während eine Kultivierungsdauer von 0,5h nicht ausreichte, um stabile Zell-Matrix-Kontakte auszubilden, waren zu intensive Zell-Matrix-Kontakte ebenso wenig förderlich für eine Erholung der Zellen (Abbildung 32). Nach nur 0,5h Kultivierungsdauer und der anschließenden Kryokonservierung sowie des Auftauprozesses reichten die verbliebenen Zell-Matrixkontakte nicht aus die Zellen auf der Oberfläche zu halten. Auch durch so wenige und sanfte Waschschriffe wie möglich zum Ersetzen des Kryomediums durch frisches Kulturmedium lösen sich die Zellen ab und es wurden nach 24h Erholungszeit nur 41% vitale Zellen wiedergefunden (Tabelle 3, Seite 64). Durch die 24h-Kultivierungsdauer vor der Kryokonservierung hatte das Zytoskelett der Zellen mehr Zeit zu versteifen, die Zellen erscheinen sehr flach (Abbildung 35). Durch diese Versteifung können vermutlich die osmotischen Unterschiede und der mechanischen Stress während des Einfrierprozesses nicht ausgeglichen werden und die Zellen lösen sich durch mechanische Spannungen vom Substrat oder weisen Schäden in ihrer Plasmamembran auf (Abbildung 35). In beiden Fällen sinkt die Zahl der Zellen, die sich nach der Konservierung erholten, deutlich (Tabelle 3, Seite 64).

Die Rolle, die das Zytoskelett in der Regulation des Zellvolumens spielt ist wohl bekannt (Pedersen et al. 2001) und seine Bedeutung in der Kryokonservierung durch schnelle Reparaturmechanismen mit überschüssigem Membranmaterial nach der typischen osmotisch bedingten Schrumpfung der Zelle wird bereits diskutiert (Ragoonanan et al. 2010). Die Kultivierungsdauer von 2h vor der Kryokonservierung räumte den hMSCs vermutlich die optimale Zeitspanne ein, um eine adäquate Steifheit des Zytoskeletts zu erreichen und die geeignete Anzahl an Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Kontakten auszubilden.

Anhand der hier durchgeführten Untersuchungen konnte ein Modell zum Kultivierungsoptimum vor adhärenter Kryokonservierung mit Kristallisation erstellt werden, das in Abbildung 78 dargestellt ist.

Die Tatsache, dass eine adhären Kryokonservierung überhaupt so erfolgreich umgesetzt werden kann hängt von der gewählten Oberfläche ab. Üblicherweise werden Zellen auf starren Plastikoberflächen kultiviert und durch die entstehenden thermischen Spannungen bei einer Kryokonservierung regelrecht von der Oberfläche abgesprengt (Malpique et al. 2009). Alginat-Kryogele sind bekannt für ihre Elastizität und die Fähigkeit Wasser aufzunehmen und durch ihre weiten Poren stellen sie keine Diffusionsbarrieren für CPAs dar (Singh et al. 2010; Tripathi et al. 2009; Zimmermann et al. 2005). Untersuchungen, die einen proportionalen Zusammenhang zwischen der Steifheit der Wachstumsoberfläche und der Steifheit des Zytoskeletts zeigen (Tee et al. 2011), lassen vermuten, dass elastischere Oberflächen auch elastischere Zellen zur Folge haben. Vermutlich hatten hMSCs, die im Rahmen dieser Arbeit auf elastischen Kryogelen kultiviert wurden, ein ausreichend flexibles Zytoskelett für eine erfolgreiche Kryokonservierung. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführten Untersuchungen wurde ein Modell entwickelt, wie eine elastische Wachstumsoberfläche Zellschäden durch die Eiskristallbildung während der Kryokonservierung dämpfen oder sogar verhindern kann (siehe Abbildung 79).

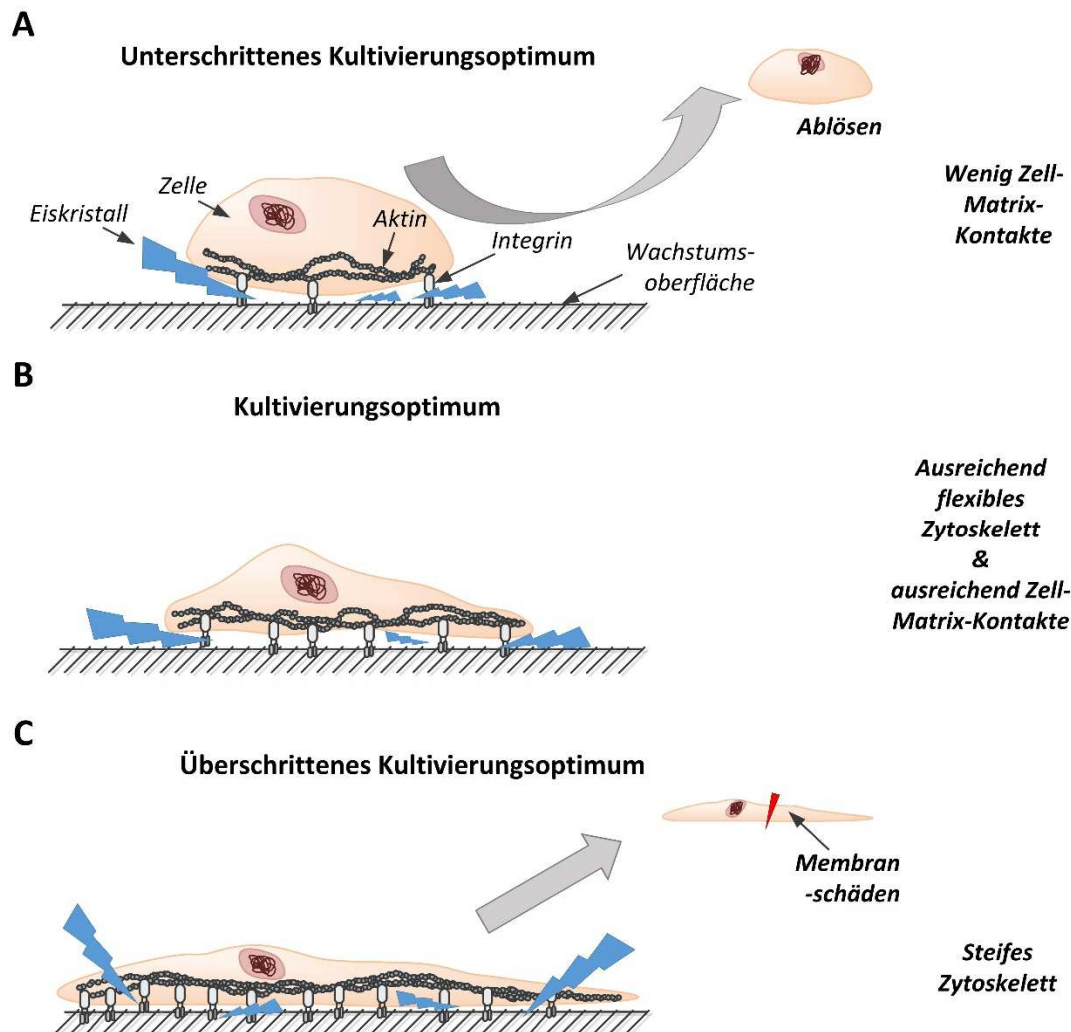


Abbildung 78: Schematische Darstellung des Einflusses der Kultivierungsdauer vor der adhärennten Kryokonservierung auf Kryogelen. A Bei unterschrittenem Kultivierungsoptimum haben die Zellen kaum Integrin-vermittelte Adhäsionskontakte ausgebildet. Entstehende Eiskristalle und Fluidik während des Auftauprozesses können die noch runden Zellen leicht von der Oberfläche ablösen. B Das Kultivierungsoptimum ist erreicht, wenn sich ausreichend Zell-Matrix-Kontakte gebildet haben und das Zytoskelett der Zellen noch flexibel genug ist, um osmotische Vorgänge während der Kryokonservierung auszugleichen. C Ein überschrittenes Kultivierungsoptimum resultiert in Membranschäden durch Eiskristalle und osmotische Rupturen, die durch das steife Zytoskelett nicht ausgeglichen werden können.

Durch das Zusammenspiel der optimierten Kultivierungsdauer und dem elastischen Substrat, wie es schematisch in Abbildung 78 und Abbildung 79 gezeigt wird, konnten Mikrogewebe aus hMSCs auf Kryogelen generiert und erfolgreich kryokonserviert werden, die als fertige Bausätze für regenerative Therapien, wie zum Beispiel für Knochen- oder Hautregeneration, geeignet sind. Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Morphologie der Zellen nach der Kryokonservierung (Abbildung 37) zeigten mit steigender Kultivierungsdauer vor der Kryokonservierung einen steigenden Anteil an sternförmigen Zellen. Neueste Untersuchungen weisen auf einen Zusammenhang der Morphologie von hMSCs und der Richtung ihrer Differenzierbarkeit hin (Kilian et al. 2010). Demnach differenzieren

hMSCs mit sternförmiger Morphologie am ehesten in Richtung Osteoblasten, was für die spätere Verwendung der Zellen entscheidend sein könnte: In Therapien zur Regeneration von Knochen sollte also eine verlängerte Kultivierungsdauer in Betracht gezogen werden, um die Integration der Bioimplantate zu optimieren. Ebenso konnte bereits belegt werden, dass die Steifheit der Oberfläche einen Einfluss auf die Differenzierbarkeit hat und ebenfalls in zukünftige Untersuchungen miteinbezogen werden sollte (Wingate et al. 2012).

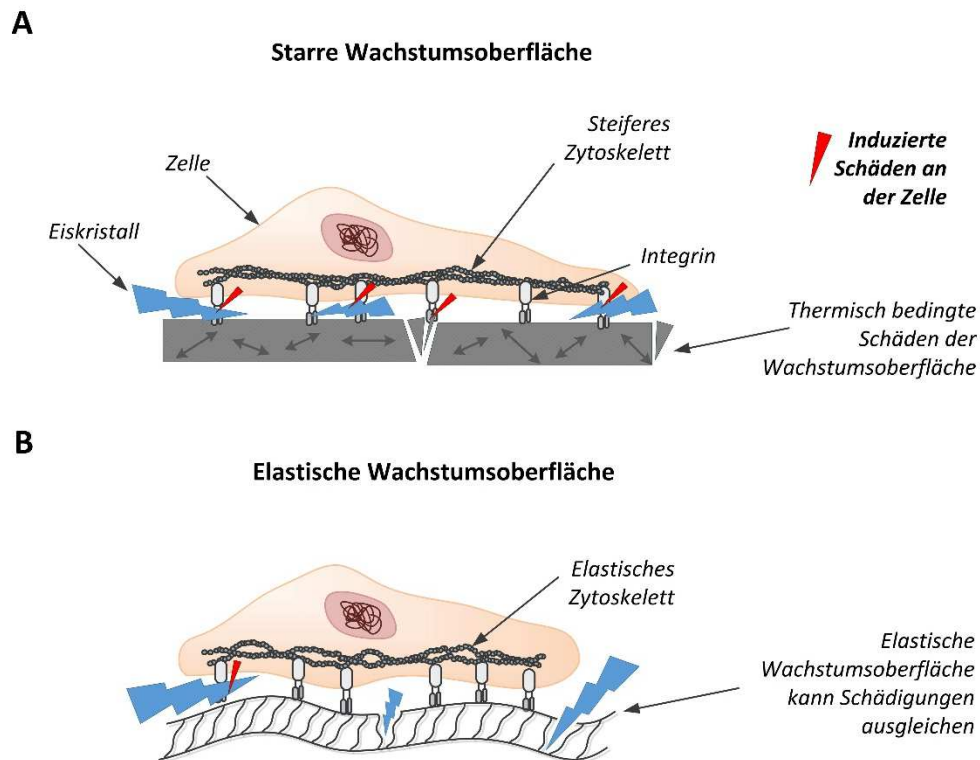


Abbildung 79: Schematische Darstellung des Einflusses einer Wachstumsoberfläche während der Kryokonservierung. **A** Eine starre Wachstumsoberfläche unterliegt thermischen Spannungen und kann reißen. Die entstehenden Brüche im Material können die adhärennten Zellen schädigen und Eiskristalle heben die Zelle von der Oberfläche ab. **B** Auf elastischen Wachstumsoberflächen bleibt das Zytoskelett von Zellen ebenfalls in einem elastischeren Zustand. Diese Umstände führen zu einem Ausgleich schädigender Wirkungen durch Eiskristallbildung und thermische Spannungen seitens der Oberfläche und der Zellen während der Kryokonservierung.

Welche Effekte haben adhäsionsbasierte Kryokonservierungsprozeduren mit und ohne Kristallisation auf Zytoskelett und DNA-Integrität?

Wie die Untersuchungen der oberflächenbasierten Kryokonservierung von hMSCs auf Gelatine-Alginat-Kryogele zeigten, spielt das Zytoskelett eine entscheidende Rolle bei der Kryokonservierung. Studien zur Vitrifikation mit adhärennten hESCs legen nahe, dass die Kryokonservierung ohne Eiskristallbildung die physikalischen Stressfaktoren auf die Zellen reduzieren kann (Beier et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine erfolgreiche, adhärennte Vitrifikation von hiPSCs gezeigt, die koloniebasiert auf Plastikdeckgläsern kultiviert wurden (Kapitel 4.3.2). Durch das vierstufige Protokoll zur Vitrifikation und zum schonenden Auftauen konnten die zellspezifischen Eigenschaften (Abbildung 39) sowie die vitale Restfläche zu mehr als 95% (Abbildung 40) nach der Kryokonservierung erhalten werden.

Da das Zytoskelett einen besonderen Einfluss in der Kryokonservierung adhärenter Zellen zu haben scheint, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Verhältnis von filamentärem und globulärem Aktin bestimmt, dessen dynamische Regulation für die Zellmigration, -adhäsion oder auch -teilung entscheidend ist (Heng und Koh 2010; Stricker et al. 2010; Yamada 1983). Die Untersuchungen wurden an murinen Fibroblasten durchgeführt, die im Gegensatz zu den hiPSCs größer sind und problemlos als Einzelzellen kultiviert werden können. Da für einen Einsatz kryokonservierter Zellen in neuen Therapien der Erhalt an DNA-Integrität von entscheidender Bedeutung ist, wurde diese im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht.

Es wurden erstmals vergleichende Untersuchungen zum Erhalt des Zytoskeletts und der an der DNA induzierten Schäden bei verschiedenen Kryokonservierungsprozeduren mit und ohne zusätzlich bereitgestellten Adhäsionsproteinen durchgeführt (Kapitel 4.3.5). Vergleicht man die Zellen, die direkt auf dem Deckglas wuchsen mit denen, die ECM als Wachstumsfläche nutzen konnten, so enthielten letztere mehr filamentäres Aktin ($22,1 \pm 1,3\%$ zu $32,2 \pm 3,8\%$ F-/G-Aktinverhältnis). Die Abweichungen nach den verschiedenen Kryokonservierungsprozeduren blieben aber relativ zur Kontrolle gleich. Demnach intensivieren die extrazellulären Matrixproteine auf der Oberfläche die Ausbildung filamentärer Aktinstrukturen durch das Bereitstellen von Adhäsionspunkten, an denen die für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte verantwortlichen Membranproteine verankert sind. Nach der Kryokonservierung mit Kristallisation verschiebt sich das Verhältnis hin zum globulären Aktin; die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die filamentären Aktinstrukturen nach der Vitrifikation überwiegen (siehe Abbildung 50). Das Ergebnis ist konsistent mit den Untersuchungen von Felipe-Perez et al., die eine Abnahme an F-Aktin in Bullenspermien nach der Kryokonservierung nachweisen konnten und mit Ergebnissen von de las Heras et al, die eine Zunahme an G-Aktin in Schafbockspermien nach Kryokonservierung beobachteten (de las Heras et al. 1997; Felipe-Perez et al. 2012). Das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete verschobene Verhältnis hin zu F-Aktin bei einer Vitrifikation lässt sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Rizoli et al. erklären, die eine Zunahme an F-Aktin in Granulozyten beobachteten, durch das osmotisch bedingte Ausbilden von Stressfasern (Rizoli et al. 2000). Die verwendeten Medien zur Vitrifikation sind mit 3477mOsm und 6753mOsm deutlich höher osmolar als das 1723mOsm Kryomedium im Kristallisationsverfahren (Beier 2008) und setzen die Zellen einem dementsprechend größeren osmotischen Druck aus. Zwar sind die Inkubationszeiten vor der Vitrifikation und beim Auftauen relativ kurz (1min 5s und 6min) aber die Aktin-Polymerisationsrate beträgt 10 Molekülen pro Sekunde (Pollard und Mooseker 1981) und gab den Zellen wahrscheinlich schon genügend Zeit mit der hier verwendeten Methode detektierbare Stressfasern auszubilden. Nach 1min werden 600 Monomere zu F-Aktin polymerisiert, was etwa der Länge von $1,5\mu\text{m}$ entspricht (Smith et al. 2007). Damit lässt sich der erhöhte F-Aktin-Anteil bereits nach der Inkubation mit dem Vitrifikationsmedium V1.1 vor der Kryokonservierung erklären (Abbildung 51), die auch nach dem Auftauen noch detektierbar war (Abbildung 50). Es widerspricht allerdings der Zunahme des F-Aktinsignals in hESCs nach Kryokonservierung mit Kristallisation, die von Xu et al. (2010) beobachtet wurde und lässt darauf schließen, dass die Reaktion zelltypspezifisch ist und dahingehend genauer untersucht werden muss.

Im Falle der Kryokonservierung mit Kristallisation brechen vermutlich Teile des filamentären Aktins durch mechanische Schädigungen aus dem Zytoskelett heraus und werden durch Dehydratisierung denaturiert, so dass diese abgebaut und ersetzt werden müssen. Das bedeutet, dass die Zellen nach diesem Kryokonservierungsprotokoll mehr Energie für die De- und Repolymerisationen von Aktin aufwenden müssen (Pedersen et al. 2001). Durch das verwendete Kryomedium mit 10% DMSO setzt

die Kristallisation der Probe bei etwa -20°C ein (Daten nicht gezeigt). Die Möglichkeit, dass der Depolymerisationsprozess des Zytoskeletts während dieser relativ langen Inkubationszeit der Zellen im Kryomedium (etwa 25min bei einer Kühlrate von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ beginnend bei 4°C) vor der eigentlichen Kryokonservierung beim Kristallisationsverfahren beginnt, konnte durch die Kontrollexperimente in Abbildung 51 ausgeschlossen werden. Um dies zu simulieren, wurden die Zellen für 25min im Kryomedium bei 4°C inkubiert. Anschließend konnten keine statistisch signifikanten Änderungen des F-/G-Aktinverhältnisses festgestellt werden.

Dass die Schäden der Eiskristallbildung sich nicht rein auf die Zell-Matrix-Kontakte auswirken, konnte zudem durch Untersuchungen an primären Gewebeschnitten aus porcinem und humanem Herz gezeigt werden. Die hochauflösenden REM-Aufnahmen (Abbildung 53) zeigen deutlich den Verlust der strukturellen intrazellulären Integrität. Die typische Querstreifung der kontraktiven Aktin-Myosinfilamente ist auch nach der Vitrifikation noch deutlich zu erkennen und intakt, ebenso wie die typische Morphologie der Mitochondrien. Im Gegensatz dazu zeigten die Gewebeschnitte, die mit einem Kristallisationsverfahren kryokonserviert wurden, deutliche strukturelle Schäden, insbesondere an den Mitochondrien. Diese Ergebnisse decken sich mit denen vorangegangener Untersuchungen von Amir et al. an kryokonservierten Herzgewebeschnitten der Ratte (Amir et al. 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die Unterschiede zwischen der Kryokonservierung mit Kristallisation und Vitrifikation in hochauflösenden Aufnahmen bei kryogenen Temperaturen sichtbar gemacht (Kapitel 4.3.5). Durch die Entwicklung eines geeigneten Probentransportgefäßes und einer speziellen Probenpräparation ist es gelungen, kryokonservierte Proben in eine tiefkalte REM-Kammer zu überführen und die kryokonservierte Probe direkt zu untersuchen. Während in der Probe, die nach einem Kristallisationsverfahren kryokonserviert wurde, deutliche Eiskristalle zu sehen sind, konnten in der vitrifizierten Probe keinerlei Eiskristalle beobachtet werden (Abbildung 54).

Zusammen mit den Untersuchungen zum F-/G-Aktinverhältnis wurde in dieser Arbeit erstmalig vergleichende Untersuchungen über die Auswirkungen verschiedener Kryokonservierungsprozeduren auf die DNA-Integrität getätigt. Um solche Schädigungen zu visualisieren, wurden die kryokonservierten Zellen nach dem Auftauen auf das phosphorylierte Histon H2AX untersucht. Die Phosphorylierung des Histons H2AX zu gH2AX wurde zuerst als Antwort auf Doppelstrangbrüche (DSBs) nach ionisierender Strahlung entdeckt, tritt aber auch nach anderen Schädigungsmechanismen, wie zum Beispiel Hitze (Takahashi et al. 2004), auf. Die phosphorylierten H2AX-Foki sind bereits 1min nach der Schädigung nachweisbar und verlaufen proportional zur Höhe der Belastung (Rogakou et al. 1998). DSBs sind hochpotente Verursacher von Genotoxizität oder Tod einer Zelle und für einen therapeutischen Nutzen kategorisch auszuschließen. In höheren eukaryotischen Zellen kann ein einzelner, fehlerhaft reparierter DSB den programmierten Zelltod einleiten (Christmann et al. 2003).

Hauptsächlich durch Forschung an Spermienzellen im Rahmen der Reproduktionsmedizin, ist bereits bekannt, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die DNA-Integrität schädigen und dass die ROS-Zunahme während der Kryokonservierung der wahrscheinlichste Grund für DNA-Veränderungen oder DNA-Brüche sind (Aitken und De Iuliis 2010; Box et al. 2001; Valcarce et al. 2013). Während in der Kryobiologie die beim Einfrieren entstehenden physikalischen Schädigungen seit Jahrzehnten stark beforscht werden, steht die Aufklärung der biochemischen Folgen dieser Prozesse jedoch noch am Anfang (Thomson et al. 2009). Die bisher veröffentlichten Arbeiten zu diesen möglichen Schädigungsmechanismen unterscheiden sich in den untersuchten Zellmodellen, den verwendeten CPAs, den Kryokonservierungsprozeduren und den Evaluationsmethoden, so dass sie sich nicht

unmittelbar miteinander vergleichen lassen: Untersuchungen an humanen Spermien zeigten, dass natürlich vorkommende Antioxidantien durch osmotisch bedingte Membranschäden nach der Kryokonservierung ausgeschleust werden (Donnelly et al. 2001). Damit entsteht ein Überschuss an ROS, was zu einer Peroxidation der Chromatinlipide und anschließend zu DNA-Schäden führt. Die Zugabe von Katalase, einem Enzym das das ROS Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser umsetzt, reduzierte die DNA-Schäden nach Kryokonservierung von Pferdespermien (Baumber et al. 2003). Ebenso konnte die Zugabe des natürlichen Radikalfängers Genistein, das die Lipidperoxidation inhibiert, DNA-Schäden nach der Kryokonservierung humaner Spermien reduzieren (Thomson et al. 2009). Zudem konnte bereits ein direkter Zusammenhang zwischen einem intrazellulären Überschuss an ROS und ausgelöster Apoptose bereits gezeigt werden (Xu et al. 2010).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass sich die Anzahl der gH2AX-Foki nach der Vitrifikation nicht veränderte und die Proben nach der Kryokonservierung mit Kristallisation teilweise allerdings mehr als doppelt so viele Foki aufwiesen. Basierend auf der Tatsache, dass die Foki nicht homogen über alle Zellkerne verteilt sind und zufällig Zellkerne ausgezählt wurden, ergab sich die relativ hohe Standardabweichung. Betrachtet man aber die repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen, erkennt man dass die Anzahl der gH2AX-Foki in den Proben, die mit Kristallisation kryokonserviert wurden deutlich anstieg (Abbildung 52). Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Untersuchungen von Peng et al., die Fibroblasten und Epithelzellen nach Kryokonservierung untersuchten (Peng et al. 2008). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass während der Vitrifikation vermutlich weniger ROS entstehen, die Apoptose auslösen können und die DNA-Integrität negativ beeinflussen. Ein möglicher Grund für die verringerten DNA-Schäden in den vitrifizierten Proben ist eventuell die höhere Konzentration an DMSO in den Vitrifikationsmedien, da DMSO ein Antioxidans für Hydroxyl-Radikale ist (Rauen und de Groot 1998).

Die in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Untersuchungen verschiedener Kryokonservierungsprozeduren sind konsistent mit den aktuellen Erklärungsmodellen zu den Vermittlern der Apoptose während der Kryokonservierung mit Kristallisation (Xu et al. 2010) und zu den vermutlichen Signalwegen, die zu DNA-Schäden bei der Kryokonservierung führen (Thomson et al. 2009). Die Modelle wurden in Abbildung 80 zusammengeführt und ergänzt: Mit der Depolymerisation von filamentärem F-Aktin, resultierend aus der Kryokonservierung mit Kristallisation, steigt die Anzahl der DSBs an. Dieser Anstieg wurde vermutlich sowohl durch die Aktivierung von Endonukleasen während der Apoptose als auch durch die Erhöhung der ROS-Konzentration ausgelöst. Die strukturellen Schäden, die in den hochauflösenden REM-Aufnahmen der Herzschnitte beobachtet wurden, zeigen deutlich die Zerstörung der Mitochondrien bei der Kryokonservierung mit Kristallisation unmittelbar nach dem Auftauen (Abbildung 53). Dadurch kann direkt Cytochrom c freigesetzt werden, was zum einen direkt zu Apoptose (Taylor et al. 2004b) und zum anderen zu einer Erhöhung der ROS-Konzentration führt (Cui et al. 2000). Bereits bekannt ist ebenfalls, dass eine Änderung des Verhältnisses von F- zu G-Aktin Apoptose auslösen kann (Bishop und Hall 2000). Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass die DNA-Schäden mit der Depolymerisation von Aktin in der Kryokonservierung mit Kristallisation einhergehen: Je höher der G-Aktinegehalt, desto mehr DSB konnten detektiert werden, während die Polymerisation durch Ausbilden der Stressfasern nach der Vitrifikation nicht im Zusammenhang mit DNA-Schädigungen zu stehen scheint. Nach der Vitrifikation blieb die Anzahl der durch gH2AX-Färbung detektierten DSB gleich zur Kontrolle.

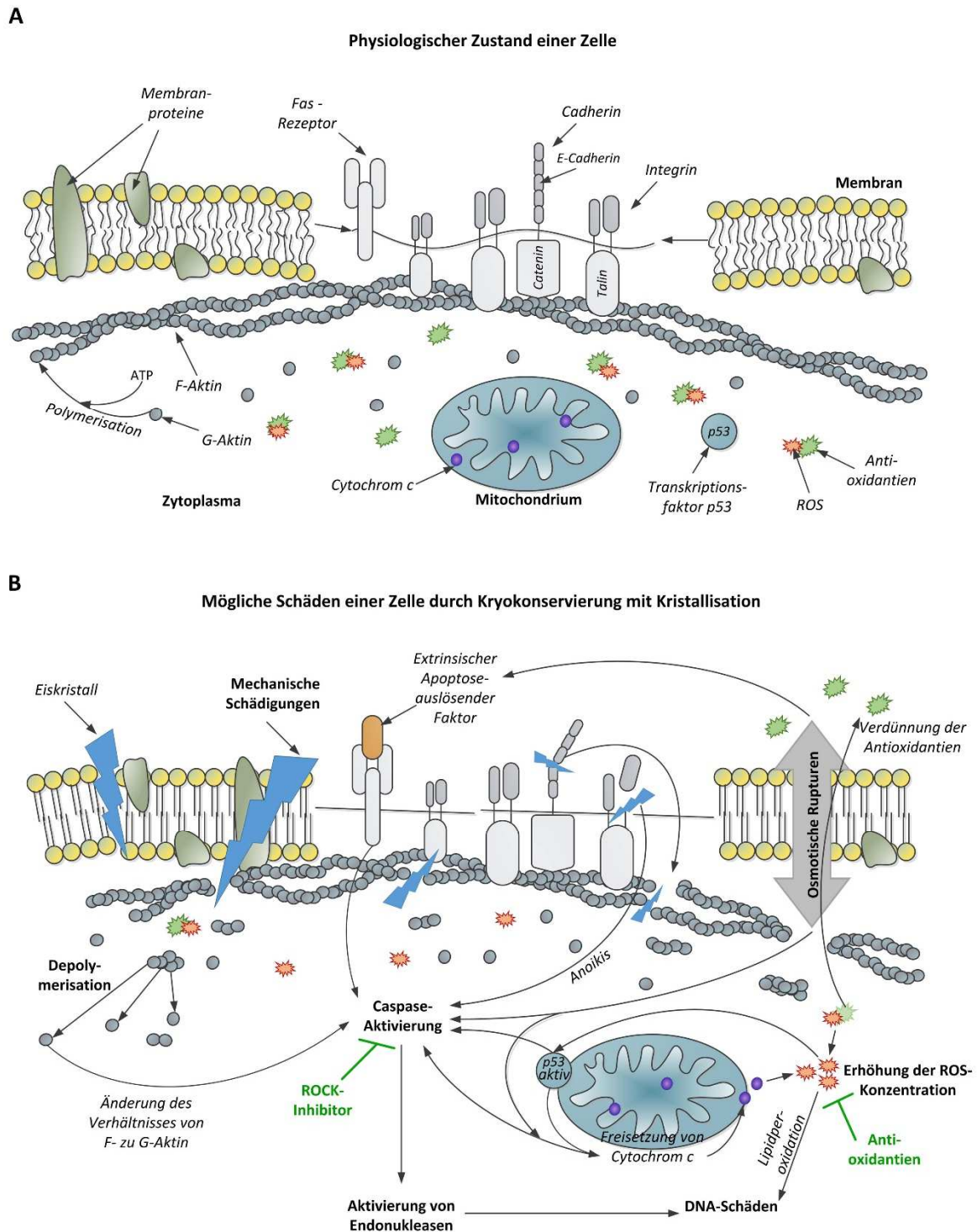


Abbildung 80: A Schematische Zeichnung einer intakten Zelle im physiologischen Zustand. Bei erfolgreicher Vitrifikation bleibt diese Struktur erhalten. B Erweitertes Modell von Xu et al. 2010 und Thomson et al. 2009 zu möglichen Auswirkungen von Eiskristallbildung während eines Kryokonservierungsprozesses adhärenter Zellen: Neben den mechanischen Schädigungen und den osmotisch bedingten Rupturen kann durch den Verlust von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakt Anoikis ausgelöst werden. Durch Verdünnung der Antioxidantien im Zytoplasma wird die Peroxidation von Chromatinlipiden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nicht verhindert und es folgt der Verlust an DNA-Integrität. Durch die Verschiebung zu einem höheren G-Aktin-Gehalt nach der Kryokonservierung mit Kristallisation wird vermutlich ebenfalls die Caspase-Aktivierung der Apoptose ausgelöst, die wiederum über die Freisetzung von Cytochrom c zur Erhöhung der ROS-Konzentration führt. Um DNA-Schäden nach einer Kryokonservierung zu vermeiden, muss der Pfad der Caspase-Aktivierung und der Pfad der Lipidperoxidation durch ROS-Erhöhung inhibiert werden.

Beobachtet man die Erholung der Zellen 30 und 60min nach der Kryokonservierung mit Kristallisation, so sieht man, dass die Reparaturmechanismen zur Behebung der DSB einsetzen, denn die Anzahl der detektierten gH2AX-Foki gleicht sich wieder dem Niveau in der Kontrolle an (Abbildung 52). Zur Reparatur gibt es zwei mögliche Mechanismen, die fehlerfreie homologe Rekombination (HR) und das fehlerbehaftete Non-Homologous-End-Joining (NHEJ), deren Einsatz nach dem vorliegenden Zellzyklus bestimmt wird. HR tritt in der Regel in der späten S-Phase und G2-Phase ein, wohingegen NHEJ hauptsächlich in der G0/G1-Phase des Zellzyklus auftritt (Johnson und Jasin 2000; Takata et al. 1998). Um DNA-Schäden in kryokonservierten Zellen vorzubeugen, müssen also sowohl die Caspase-Aktivierung durch die Zugabe von ROCK-Inhibitoren wie die Zugabe von Antioxidantien zur Verhinderung der Lipidperoxidation beachtet werden. Für zukünftige Untersuchungen zu den biochemischen Schädigungsmechanismen nach Kryokonservierung sollten dementsprechend Medien in Betracht gezogen werden, denen Antioxidantien wie Glutathion oder Vitamin E und ROCK-Inhibitoren wie Y-27632 oder Fasudil zugesetzt werden.

Welche Effekte haben Miniaturisierung und die Entwicklung portionierbarer Proben für die Kryokonservierung?

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neuartige mikrofluidische Systeme zur modularen, automatisierbaren Kryokonservierung in Mikrovolumen etabliert und an verschiedenen therapeutisch relevanten Zellsystemen evaluiert (Kapitel 4.3.3). Durch die Miniaturisierung ergeben sich zum einen Vorteile für die Einfrierprozedur an sich und zum anderen für die Handhabung der Proben: Sie können nun nach Bedarf portioniert und teilweise oder ganz aufgetaut werden. Als Zellsystem wurden Langerhans-Inseln ausgewählt, die wenig scherstressempfindlich sind. Die Untersuchungen zum optimalen Medium und der optimalen CPA-Konzentration zeigten, dass Mikrogewebe aus RIN-m-Zellen ein geeignetes Modellsystem für die nativen LHIs sind: Beide lassen sich in serumfreien Medium mit 7% DMSO am besten kryokonservieren (Abbildung 41) und der Einfluss der Miniaturisierung (25µl und 70µl Volumen) resultiert nicht in einer geringeren Vitalität als der Vergleich mit der Kryokonservierung in standardisierten Kryoröhrchen (1ml Volumen).

Da hESCs über drei Tage in Schläuchen ohne Verlust ihrer zellspezifischen Eigenschaften kultiviert werden konnten (Abbildung 28), wurde versucht das Prinzip der schlauchbasierten Mikrobioreaktoren zur Kryokonservierung umzusetzen, um eine Automatisierung für Hochdurchsatzverfahren zu erreichen. Bei der Durchführung traten allerdings unvorhergesehene Schwierigkeiten auf. Die Kryokonservierung von LHIs, RIN-m Mikrogeweben und Mikrogewebe aus Kolonkarzinomen schnitt deutlich schlechter ab als die miniaturisierte Kontrolle in 30-Wellsubstraten (25µl Volumen, Abbildung 43). Durch den geringen Innendurchmesser der Schläuche und des Mikrochips und dem hohen Proteingehalt in Zellsuspensionen traten relativ häufig temporäre Blockaden durch Adsorption auf. So entstanden lokal erhöhte Drücke und dementsprechend Verzögerungen in dem mikrofluidischen System, so dass die Zudosierung des CPAs im Mikrochip entweder das Zellsuspensionskompartiment verfehlte oder aufgrund der Druckschwankungen zu viel oder zu wenig CPA injizierte, wodurch die Effizienz der Kryokonservierung suboptimal war. Der Einfluss auf die Strömungsgeschwindigkeit wird weiter unten diskutiert (Tabelle 4, Seite 124). Ebenso wie bei den Untersuchungen zur Kultivierung von hESCs in Kompartimenten (Abbildung 27) konnte auch hier das Trägermedium PFD nicht rückstandslos entfernt werden.

Um eine automatisierte Miniaturisierung dennoch zu etablieren, wurde ein modulares mikrofluidisches System etabliert (Abbildung 44). Die Zellsuspension wurde in einer Mischflasche gerührt, in die das CPA schrittweise über eine Spritzenpumpe zugegeben wurde, um den Zellen ausreichend Zeit für die Volumenregulation zu geben. Anschließend wurden die Zellen über Schläuche in neuartige, miniaturisierte MST-Kryoröhrchen überführt und mit definierter Kühlrate kryokonserviert. Im Vergleich zu den Standardkryoröhrchen zeigten die Zellsysteme auch keine statistisch signifikanten Unterschiede mehr hinsichtlich ihrer Vitalität. Native LHs konnten mit serumfreien Medien nach der Kryokonservierung mit Vitalitäten über 80% wiedergefunden werden.

Zum ersten Mal wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Versuchsaufbau evaluiert, der eine Kryokonservierung in geschlossenen, gasdichten Röhrchen durch Vitrifikation ermöglichen sollte (Kapitel 4.3.4). Das Prinzip des Self Pressurized Freezing, das im Laufe dieser Arbeit von Leunissen und Yi entwickelt wurde, wurde hier zum ersten Mal an den therapeutisch relevanten hiPSCs und hESCs untersucht. Dazu werden die Zellsuspensionen in ein dünnes Metallröhrchen gefüllt, das an beiden Enden geschlossen und sehr schnell abgekühlt wird. Durch dieses schnelle Abkühlen unter den Schmelzpunkt wird ein Teil des Wassers vermutlich in hexagonales Eis umgewandelt; durch die Ausdehnung baut sich in der abgeschlossenen Kavität Druck auf, der die Vitrifikation der Proben unterstützt (Leunissen und Yi 2009). Verwendet wurde ein von Mazur entwickeltes Kryomedium (Mazur und Seki 2011), das relativ hohe Konzentrationen an CPAs aufweist (10% EG, 10,7% AA) und wie die hier verwendeten Vitrifikationsmedien auch nicht-membrangängige CPAs (0,5M Sucrose, 30% Ficoll 70) enthält. Die Anwachsrate der hESCs und hiPSCs zeigten jedoch keinen positiven Effekt dieser Art der Kryokonservierung. Da kein Unterschied zwischen offenen und geschlossenen Röhrchen erkennbar war, konnte vermutlich kein Druck in den Röhrchen aufgebaut werden. Mit einer absoluten Anwachsrate von 95,7% vor der Kryokonservierung sind hESCs um ein Vielfaches weniger empfindlich für auftretenden Schädigungen als hiPSCs es sind (Abbildung 47 und Abbildung 48). Die Anwachsrate der kryokonservierten hiPSCs und hESCs weisen eine hohe Standardabweichung auf, liegen trotzdem über der vom Hersteller (WiCell Research Institute) garantierten 0,1-1% Ausbeute. Vermutlich wird durch die schnelle Abkühlrate und das verwendete hochosmolare Kryomedium, sowohl in den geschlossenen, als auch in den offenen Röhrchen, eine Vitrifikation erreicht. Allerdings ist die Durchführung der miniaturisierten Kryokonservierung in Röhrchen sehr umständlich und auch für den Zellen mechanisch sehr belastend: Die rückgewonnenen Koloniefragmente sind deutlich kleiner und zeigen selbst nach 7-tägigen Wachstum kaum Proliferation (Abbildung 49).

Können homogene Mikrogewebe unter Erhalt ihrer zellspezifischen Charakteristiken automatisiert generiert werden?

Die Mikroumgebung von Zellen bestimmt durch physikalische und chemische Signale deren Schicksal (Figallo et al. 2007). Um diese Umgebung möglichst exakt definieren zu können, stellen automatisierbare, miniaturisierte Ansätze die beste Möglichkeit dar. Die Kontrolle von pH-Wert, gelöstem Sauerstoffgehalt oder Wachstumsfaktoren können in großvolumigen Bioreaktoren nur begrenzt definiert eingestellt werden (King und Miller 2007; Rodrigues et al. 2011) oder benötigen hohe Turbulenzen zum Beispiel durch Gaseintrag, der die Zellen hohen Scherstressbelastungen aussetzt (Croughan et al. 1989; Lakhota und Papoutsakis 1992).

Es gibt zahlreiche Optionen der Miniaturisierung, wie zum Beispiel automatisierte Herstellung von Mikrogeweben aus hESCs durch ventilgesteuerte Drucker (Faulkner-Jones et al. 2013). Jedoch sind

nicht alle miniaturisierten Ansätze geeignet zur Automatisierung: Insbesondere Kultivierungen in mikroskaligen Kavitäten haben häufig noch ausreichend Adhäsionspotenzial zur biologischen Probe, so dass diese unerwünschte Zell-Matrix-Kontakte mit unvorhersehbaren Folgen ausbilden können, was auch in dieser Arbeit zur Kultivierung in Mikrowells substraten beobachtet wurde (Abbildung 26). Mikrofluidische Ansätze bieten für die moderne Medizin eine Alternative und entscheidende Vorteile, wie zum Beispiel Kosteneffizienz (Lee et al. 2007). Die zu verwendeten Flussraten können mitunter hohe Scherkräfte ausüben (Cimetta et al. 2009), die scherstresssensitive Zellen, wie beispielsweise die hiPSCs (Abbildung 15), nicht vertragen oder die sogar in Differenzierungen enden (Yuan et al. 2013). Sowohl nach der Kultivierung in Mikrowells substraten als auch in schlauchbasierten Mikrofluidiksystemen, ist es nahezu unmöglich die Proben weiter zu verwenden, da sie aus dem Kultivierungssystem nicht wieder rückgewonnen werden können. Ebenso problematisch ist die Kultivierung mit der Standard-HD-Technologie. Erst die Möglichkeit zur Zugänglichkeit für Pipettierroboter von oben erlaubt es, alle Vorteile der Technologie zu nutzen und gleichzeitig eine Automatisierung zu erreichen (Hsiao et al. 2012a; Hsiao et al. 2012b; Leist et al. 2012; Zimmermann et al. 2008). Die Vor- und Nachteile verschiedener Kultivierungsmethoden, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert und evaluiert wurden, sind in Abbildung 81 dargestellt.

Erstmalig wurde gezeigt, dass eine vollständige Automatisierung der Kultivierungsmethode „hängender Tropfen“ für hiPSCs und hMSC auf Mikroträgern durch Verwendung von Pipettierroboter und Lochplatten möglich ist (Kapitel 4.4.1). Durch Verwendung von Lochplatten mit verschiedenen Geometrien und Pipettierroboter mit unterschiedlichen Flussraten konnte die Plattform-unabhängigkeit dieser automatisierten Technologie belegt werden (Meiser et al. 2014). Zum ersten Mal wurden automatisierte Medienwechsel im hängenden Tropfen realisiert, die eine 10-tägige Kultivierung humaner Stammzellen ermöglichten (Abbildung 58 und Abbildung 59). Im Falle der hiPSCs konnte durch die Verwendung von Matrigel-beschichteten Mikroträgern und den Einsatz des ROCK-Inhibitors Y-27632 die zellspezifischen Eigenschaften erhalten werden. Die mikroskopischen Aufnahmen von hMSCs auf sphärischen Mikroträgern im Phasenkontrast zeigten sich vergleichbar mit denen aus anderen Studien (Frauensschuh et al. 2007). Der Erhalt der Multi- beziehungsweise Pluripotenz wurde durch FACS-Analysen belegt und zeigte, dass die untersuchten zellspezifischen Eigenschaften nicht signifikant von der Standardkultivierung abweichen (Abbildung 61), was auch durch die REM-Aufnahmen belegt werden konnte (Abbildung 60). Die hochaufgelösten Zellmembranen wiesen, in Übereinstimmung mit anderen Studien, zellspezifisch viele Mikrovilli bei den multipotenten hMSCs und wenige bis keine Mikrovilli bei den pluripotenten hiPSCs auf (Fu et al. 2010; Nelson et al. 2009). Die miniaturisierte Kontrolle in Mikrowells substraten zeigte auch hier wieder deutlich den Nachteil dieses Ansatzes: Beide Zelltypen adhärten zum Teil auf den Oberflächen der Mikrowellstrukturen, die für eine Kultivierung in Suspension bestimmt sind (Abbildung 58). Die hMSCs konnten sogar durch wiederholte enzymatische Verdauung nicht wieder aus den Kavitäten herausgelöst werden. Durch den realisierten Medienwechsel während der Kultivierung im HD, konnten Mängel an Nährstoffen und Zytokinen zur Aufrechterhaltung der zellspezifischen Eigenschaften vermieden werden und durch den Einsatz der Mikroträger im hängenden Tropfen, wie er bereits im nicht-automatisierten Modus beschrieben wurde (Schulz et al. 2012), eignet sich die HD-Technologie sogar zur Umsetzung von schwierigen Differenzierungsansätzen (siehe Ausblick).

	Kultivierungsformen	Vorteile	Nachteile
Standard-kultivierung		<ul style="list-style-type: none"> Einfaches Monitoring 	<ul style="list-style-type: none"> 2D Schlechtes WF/V-Verhältnis (hoher Medienverbrauch) Keine Kontrolle der Mikro-Umgebung
Bioreaktor		<ul style="list-style-type: none"> 3D Großes Volumen Große Wachstumsfläche Schaltbare Adhäsion 	<ul style="list-style-type: none"> Schlechtes WF/V-Verhältnis Keine Kontrolle der Mikro-Umgebung Mechanische Belastung
Mikrowellplatten		<ul style="list-style-type: none"> 3D Einfaches Monitoring Günstiges WF/V-Verhältnis (geringer Medienverbrauch) Leichte Kontrolle der Mikro-Umgebung 	<ul style="list-style-type: none"> Schwieriges Handling in kleinen Kavitäten Verdunstungsprobleme Zellen kommen stets in Kontakt mit artifiziellen Oberflächen
Schlauchbasierte Kultivierung		<ul style="list-style-type: none"> 3D Günstiges WF/V-Verhältnis (geringer Medienverbrauch) Kein unerwünschter Kontakt mit Oberflächen 	<ul style="list-style-type: none"> Schwieriges Handling, daher schwierige Kontrolle der Mikro-Umgebung Mögliche Kontamination mit Trägermedien Monitoring möglich, aber schwierig
Standard Hanging Drop		<ul style="list-style-type: none"> 3D Günstiges WF/V-Verhältnis (geringer Medienverbrauch) Optimaler Gasaustausch Kein unerwünschter Kontakt mit Oberflächen 	<ul style="list-style-type: none"> Schwieriges Handling, daher schwierige Kontrolle der Mikro-Umgebung Verdunstungsprobleme Monitoring möglich, aber schwierig
Automatisierter Hanging Drop		<p>Zusätzlich zum Standard HD:</p> <ul style="list-style-type: none"> Einfache Kontrolle der Mikro-Umgebung Schaltbare Adhäsion durch Zugabe von Mikroträgern zu individuellen Zeitpunkten 	<ul style="list-style-type: none"> Verdunstungsprobleme Monitoring möglich, aber schwierig

Abbildung 81: Schematische Darstellung der verschiedenen Kultivierungsformen im Vergleich mit der Standardkultivierung, die im Kontext neuer Therapien in Frage kommen. Ihre jeweiligen Vor- und Nachteile werden stichpunktartig aufgelistet (WF/V-Verhältnis = Wachstumsfläche-zu-Volumen-Verhältnis). Um in fluiden Ansätzen adhärenen Zellsystemen Wachstumsfläche anzubieten, können künstliche Oberflächen mitgeführt werden, die hier als sphärische Mikroträger dargestellt sind. Ebenso vorstellbar sind offene Gerüststrukturen, wie zum Beispiel Kryogele, die entsprechend klein genug sind. Abbildung verändert aus Meiser et al. 2013d.

Im Rahmen dieser Arbeit kristallisierte sich zunehmend heraus, dass die notwendigen Schritte zur Präparation von Zellsystemen für neue Therapien, diese durch hohe Flussraten belasten. Insbesondere die scherstressempfindlichen hiPSCs reagieren durch Zerfall, wie es bei den hier durchgeführten Untersuchungen zur optimalen Fragmentgröße (Kapitel 4.1.2) und dem Self Pressurized Freezing (Kapitel 4.3.4) gezeigt wurde. Um diesen Einfluss zu quantifizieren, wurden die Volumenströme sowie die resultierenden Strömungsgeschwindigkeiten der in dieser Arbeit untersuchten Methode zur

Zellpräparation berechnet (Tabelle 4). Es konnte belegt werden, dass Automatisierungsprozeduren Zellen geringeren Belastungen aussetzen als manuelle Pipettierschritte. Je nach verwendeten Geräten kann manuelles Pipettieren beziehungsweise Injizieren in kürzester Zeit Strömungsgeschwindigkeiten von 1990mm/s bis 14154mm/s erreichen, je nach Querschnitt des verwendeten Materials. Im Gegensatz dazu wiesen die automatisierten Prozeduren Strömungsgeschwindigkeiten von 13 bis 764mm/s auf. Weitere Vorteile der automatisierten Techniken sind ihre Reproduzierbarkeit und die Möglichkeit, Volumenströme zellspezifisch anzupassen.

Tabelle 4: Berechnung der Strömungsgeschwindigkeiten im Rahmen dieser Arbeit verwendeter Techniken. Werte, die mit einem Stern (*) gekennzeichnet sind, mussten geschätzt werden. Der Wert für das Pelletierverfahren wurde aus Meiser et al. 2009 entnommen.

	Durchmesser der verwendeten Geräte [mm]	Volumenstrom Q [μ l/s]	Strömungsgeschwindigkeit c [mm/s]
Manuelles Pipettieren (Kapitel 4.1.2)	d = 0,8	1000*	1990
Manuelles Injizieren (Kapitel 4.1.2)	d = 0,3	1000*	14154
Schlauchbasierte Kultivierung (Kapitel 4.2.3)	d = 2,4	2400	530
Schlauchbasierte Kryokonservierung (Kapitel 4.3.3)	d = 0,5	300	382
	d = 0,25* (Blockade)	300	1529
Self Pressurized Freezing (Kapitel 4.3.4)	d = 0,3	100*	353
Automatisierte Kultivierung mit dem Nanoplotter 2.1 (Kapitel 4.4.1)	d = 0,5	10 (Tropfen setzen)	13
		100 (Resuspendieren)	130
Automatisierte Kultivierung mit der TECAN-Anlage (Kapitel 4.4.1)	d = 0,5	50 (Tropfen setzen)	63
		600 (Resuspendieren)	764
Einschlussimmobilisierung in 0,5% Alginatkapseln (Kapitel 4.2.1)	n.a.	n.a.	7900
Einschlussimmobilisierung in 0,7% Alginatkapseln (Kapitel 4.2.1)	n.a.	n.a.	7500
Pelletierverfahren mit Aliquotiereinheit (Kapitel 4.4.2)	n.a.	n.a.	4600

Durch die Berechnung der Strömungsgeschwindigkeiten kann auch belegt werden, dass die Blockade-Probleme bei den Untersuchungen zur schlauchbasierten Kryokonservierung nicht allein eine fehlerhafte Zugabe des CPAs zur Folge haben, sondern zusätzlich eine höhere mechanische Belastung. Nimmt man beispielsweise eine Verengung des Schlauches um 50% durch Proteinablagerungen an, so steigt die Strömungsgeschwindigkeit um ein Vierfaches auf 1529mm/s an. Der umgekehrt proportionale Zusammenhang zwischen der Fließgeschwindigkeit und dem Rohrquerschnitt ist als Venturi-Effekt bekannt und ein grundsätzliches Problem in der Mikrofluidik proteinhaltiger Medien.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Einschlussimmobilisierung in Hydrogelkapseln, wurde erstmalig die Strömungsgeschwindigkeit quantifiziert, die auf die Bioimplantate wirkt (4.2.1). Mit maximalen Werten von 7900 mm/s am Einschlagsmaximum liegen diese im Bereich möglicher Schädigungen. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass der Prozess optimiert werden kann, indem die Kapseldeformation durch visköseres Alginat oder viskositätserhöhende Zusätzen wie zum Beispiel Poloxamer minimiert werden kann.

Welchen Effekt haben Pelletierverfahren zur tropfenbasierten Vitrifikation auf Vitalität und Funktionalität biologischer Proben?

Embryonale sowie induziert pluripotente Stammzellen sind bekanntermaßen schlecht zu konservieren. Insbesondere in Kryokonservierungsprozeduren mit Kristallisation treten Schädigungen auf, da die entstehenden Eiskristalle Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte schädigen und infolgedessen Anoikis-Kaskaden gestartet werden. Wie Kapitel 4.3.2 zeigte, konnte mit der Vitrifikation adhärenter hiPSCs eine erfolgreiche Kryokonservierung durchgeführt werden. Routinemäßig werden hESCs in dünnen Kapillaren (sogenannte straws) mit Prozeduren der Vitrifikation durchgeführt, deren mehrstufiges Protokoll allerdings sehr umständlich zu handhaben ist (Richards et al. 2004). Der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Ansatz des Self Pressurized Freezing (SPF) in dünnen Aluminiumröhrchen zeigte zwar angewachsene Koloniefragmente nach der Kryokonservierung, jedoch blieb, wie bereits diskutiert, der erwartete Effekt aus und die Morphologien der rückgewonnenen hiPSC- und hESC-Kolonien wichen von denen in der Standardkultivierung deutlich ab (Kapitel 4.3.4). Wenn auch die Ausbeute in beiden Prozeduren höher lag als beim Standard-Kryokonservierungsverfahren des Herstellers, so sind beide auf Grund der Handhabung und dem dadurch fehlenden Automatisierungspotenzial wenig geeignet, um den stetig steigenden Bedarf an kryokonserviertem biologischem Material zu bedienen (Li et al. 2008; Li und Ma 2012).

Um diesen Anspruch erfüllen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein zweistufiges Protokoll zur tropfenbasierten Vitrifikation therapeutisch relevanter Zellen im Hinblick auf den Erhalt der zellspezifischen Charakteristiken untersucht (Kapitel 4.4.2). Dieses Pelletierverfahren erlaubt es miniaturisierte und portionierbare, kryokonservierte Proben herzustellen, die nicht an Gefäße gebunden sind (Pegg et al. 1982). Durch die Verwendung einer Aliquotiereinheit („kinetische Maske“, Abbildung 63 B) ist eine Volumenreduktion der resultierenden Tropfen möglich (Meiser et al. 2009), was schnellere Kühl- und Auftauraten begünstigt. Durch die Verwendung der Lochplatten aus Kapitel 4.4.1 zur automatisierten Kultivierung im „hängenden Tropfen“ und überkritischen Volumenerhöhungen konnte das Automatisierungspotenzial dieses tropfenbasierten Vitrifikationsverfahrens an hiPSCs aufgezeigt werden (Abbildung 63 C): Die Vergrößerung des Volumens führt zum Abreißen des Tropfens und das schnelle Eintreffen in flüssigen Stickstoff vermeidet längere Inkubationszeiten im zytotoxischen Vitrifikationsmedium

Um geeignete Medien und Inkubationszeiten zur tropfenbasierten Vitrifikation zu etablieren, wurden zunächst Untersuchungen an L929-Zellen durchgeführt. Die an diesem Zellsystem etablierte Prozedur wurde in den nachfolgenden Schritten auf Mikrogewebe aus CHMCs angewendet, um die Konservierung der Funktion zu evaluieren. Die in Suspension vitrifizierten wie auch die mit einem Kristallisationsverfahren kryokonservierten Mikrogewebe erzielten einen Anteil an kontrahierenden Geweben von etwa 80% (Abbildung 66). Betrachtet man allerdings die mikroskopischen Aufnahmen der kryokonservierten Mikrogewebe, so zeigt sich, dass die vitrifizierten Proben eine deutlich bessere

Integrität zeigten und auch als Einheit kontrahierten, wohingegen die mit dem Kristallisationsverfahren kryokonservierten Mikrogewebe nur partiell kontrahierten. Anhand der Fluoreszenzaufnahmen erkennt man deutlich, dass die Zell-Zell-Kontakte der vitrifizierten Probe und der Kontrolle enger sind. Vermutlich wurden weder die Ionenkanäle zur Signalübertragung, noch der kontraktile Apparat durch Eiskristallbildung und den daraus entstehenden Schäden gestört. Im Gegensatz dazu ist die Kontraktilität in den mit Kristallisation kryokonservierten Proben eingestellt oder stark reduziert. Der Metabolismus ist aber auch in diesen Zellen noch intakt, wie der angewendete FDA/EtBr-Assay zeigt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit denen zur Aufrechterhaltung der Ultrastruktur in kardialen Gewebeschnitten nach Vitrifikation (Abbildung 53) sowie den Ergebnissen zum Erhalt des Zytoskeletts bei Fibroblasten, die bereits diskutiert wurden.

Zusammen mit den Untersuchungen der tropfenbasierten Vitrifikation bei hiPSC-Mikrogeweben wurde im Rahmen dieser Arbeit auch erstmalig der Einfluss xenofreier Vitrifikationsmedien evaluiert, da diese durch ihre definierte chemische Zusammensetzung klare Vorteile für therapeutische Anwendungen bringen und durch einen geringeren Proteingehalt auch für mikrofluidische Technologien interessant sind. Die grundsätzliche Durchführbarkeit der Kryokonservierung von hiPSCs mit xenofreien Medien wurde bereits nachgewiesen (Holm et al. 2010). Ebenso konnten bereits positive Effekte bei der Zugabe des ROCK- Inhibitors zu Kryomedien für hSCs nachgewiesen werden (Gauthaman et al. 2010; Katkov et al. 2011; Martin-Ibanez et al. 2008; Stroh et al. 2002), was ebenfalls in die Untersuchungen aufgenommen und umgesetzt wurde (Abbildung 67). Durch die Hemmung der Caspase-Kaskade, die zum programmierten Zelltod führt, konnte eine Steigerung der Anwachsrate auf über 20% relativ zur Kontrolle erreicht werden. Im Vergleich zu den anderen kryokonservierten Ansätzen resultierte die tropfenbasierte Vitrifikation mit zugesetztem ROCK-Inhibitor in klar abgegrenzten Kolonien mit undifferenzierter Morphologie. Durch immunzytochemische Färbungen konnte der Erhalt der zellspezifischen Eigenschaften in allen kryokonservierten Proben nachgewiesen werden (Abbildung 68).

Um die entwickelten Arten der tropfenbasierten Vitrifikation weitergehend zu untersuchen, wurde das scherstressempfindliche Zellsystem hiPSC verwendet. Sowohl die Prozedur mit Aliquotiereinheit wie auch die überkritische Volumenerhöhung resultierten in Anwachsrate über 20% relativ zur Kontrolle. Wenn auch in den kryokonservierten Proben nicht statistisch signifikant, so erkennt man Tendenzen einer schlechteren Anwachsrate nach der kinetischen Maskierung, die vermutlich von der erhöhten mechanischen Belastung durch das Zerteilen der Tropfen am Gitter herrühren (Abbildung 69). Deutlicher ist dieser Einbruch der Anwachsrate in der Kontrolle zu erkennen und auch die Strömungsgeschwindigkeit zeigt mit 4600m/s eine relativ hohe Belastung für Zellen (Tabelle 4, Seite 124).

Welchen Effekt hat eine druckbasierte Applikation portionierbarer, kryokonservierter Proben auf deren Vitalität und Funktionalität?

Ein noch immer aktuelles Problem in der zellbasierten Medizin ist zum einen die exakte Positionierung der Bioimplantate am Wirkort. Insbesondere die Applikation in bewegtes Gewebe, wie zum Beispiel das Herz, stellt Operateure vor eine Herausforderung (Wollert et al. 2004). Zum anderen ist der Verbleib implantierter Zellen am Wirkort problematisch, der Prozess des sogenannten „Homings“ in bestimmten Bereichen von Organismen ist hochkomplex und bislang nur in Teilen aufgeklärt (Karp und Leng Teo 2009). Bleibt man am kardialen Beispiel, so werden Zellsuspensionen in den betroffenen

Bereich injiziert, wobei die Zellen durch die hohen Strömungsgeschwindigkeiten starken Belastungen ausgesetzt werden (Tabelle 4, Seite 124) und stets ein Großteil an Zellen ungenutzt wieder ausgeschwemmt wird (Dimmeler et al. 2005). Ebenfalls wird eine relativ große Menge an Flüssigkeit in den Organismus eingebracht, der bei Therapien mit aufgetauten Zellen hohe Konzentrationen an CPAs enthält, die oftmals nicht ausgewaschen werden und mit Nebenwirkungen in Verbindung gebracht werden (Calmels et al. 2003; Windrum et al. 2005).

Es wurde eine druckbasierte Applikationseinheit für kryobiologisch pelettierte Zellsuspension aus Kapitel 4.4.2. aufgebaut und deren Einfluss auf therapeutisch relevante Zellen untersucht. Die zu Grunde liegende Idee ist eine gezielte, scherstressfreie Applikation kryokonservierter Proben mittels Druckluft (Fuhr und Zimmermann 2008). Dadurch kann ein sehr schneller Transfer der Bioimplantate minimalinvasiv und lokal definiert in ein Zielgewebe realisiert werden, ohne Zwischenschritte und der Verwendung großer Volumina. Dazu wurden experimentelle Aufbauten („Eispistolen“) umgesetzt, die nach und nach verbessert und den Anforderungen entsprechend modifiziert wurden (Abbildung 70).

Zur prinzipiellen Machbarkeitsstudie wurden murine Fibroblasten nach dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll tropfenbasiert vitrifiziert und mit verschiedenen Drücken appliziert (Abbildung 72). Bei einem angelegten Druck ab 4bar verringerte sich die Vitalität der rückgewonnenen Zellen statistisch signifikant. Vermutlich wurde durch den Energieeintrag der Erschütterungen und die mechanischen Kräfte eine Nukleation in der vitrifizierten Probe ausgelöst, die sich negativ auf die Überlebensraten auswirkten (Wowk 2010).

Um den Funktionalitätserhalt näher zu untersuchen, wurde das für die strukturelle Kategorie identifizierte Modellsystem der autonom kontrahierenden Mikrogewebe verwendet. Die Aufrechterhaltung des kontraktile Apparates ist für eine Anwendung dieses Zelltyps entscheidend (Hein et al. 2000). Wie die Ergebnisse mit den murinen Fibroblasten vermuten ließen, zeigte sich kein Unterschied zwischen den bei 2bar applizierten Mikrogeweben und der gefrorenen Kontrolle (Abbildung 73). Von einer Zugabe des ROCK-Inhibitors in die verwendeten Kryomedien wurde für diesen Zelltyp abgesehen, da diese dadurch inhibierte Kinase eine entscheidende Rolle in der Kontraktion von Muskelzellen spielt (Riento und Ridley 2003). Die Vitrifikation konservierte das Zytoskelett und die Zell-Zell-Kontakte in ausreichendem Maße, um die autonomen Kontraktionen auch nach der Applikation aufrechtzuerhalten.

Im Gegensatz dazu reduzierte sich die Anwachsrate vitrifizierter hiPSC-Mikrogewebe nach der druckbasierten Applikation deutlich im Vergleich zur nicht applizierten Kontrolle (Abbildung 74). Vermutlich sind auch hier die Membranproteine der scherstressempfindlichen hiPSCs durch den Energieeintrag insofern beeinträchtigt worden, dass keine Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Kontakte mehr ausgebildet werden konnten und Anoikis eingeleitet wurde.

Der nächste Schritt wurde als logische Konsequenz in Zusammenfassung aller Ergebnisse dieser Arbeit durchgeführt: Um die erfolgreiche Konservierung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte von hiPSC-Fragmenten auf die Vitrifikation in Suspension zu übertragen, wurden die Techniken, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt und evaluiert wurden kombiniert. Zunächst wurden hiPSC automatisiert mit der HD-Technologie auf für sieben Tage auf sphärischen Mikroträgern kultiviert (nach Kapitel 4.4.1). Anschließend wurden die Mikrogewebe tropfenbasiert vitrifiziert (nach Kapitel 4.4.2) und druckbasiert bei 2bar appliziert (Kapitel 4.4.3). Da eine Evaluierung anhand der Anwachsrate im Falle der adhärenz vitrifiziert und applizierten Mikrogewebe nicht ausführbar war, wurden die Proben mit Hilfe des

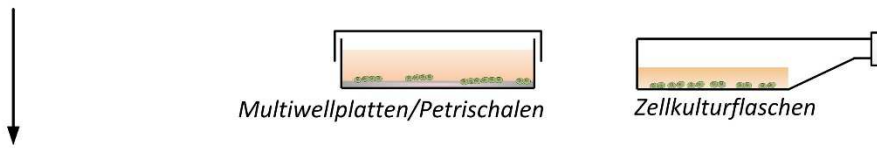
FDA/EtBr-Assays und immunzytochemischen Färbungen untersucht (Abbildung 75). Die repräsentativen CLSM-Aufnahmen der Mikrogewebe zeigen deutlich, dass die Adhäsion der hiPSCs auf den sphärischen Mikroträgern auch nach der druckbasierten Applikation konserviert werden konnte.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bezüglich der Gewinnung, Aufbereitung, Kryokonservierung und Applikation von therapeutisch relevanten Zellen, wurden Schädigungsmechanismen aufgezeigt und untersucht. Die daraus abgeleiteten und entwickelten Optimierungen und Möglichkeiten des Arbeitsablaufes, können als Leitfaden zur anwendungsbezogenen Konzeption neuer Therapien dienen.

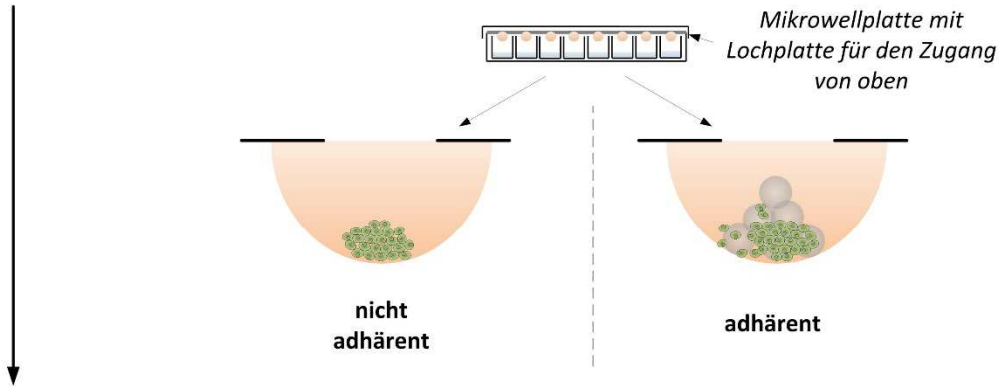
Ausblick

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass es bei der Vorbereitung für neue Therapien der regenerativen und medikamentenbasierten Medizin zahlreiche Parameter gibt, die es zu definieren und zu beachten gilt, um eine gleichbleibend hohe Qualität zu sichern. Es zeigte sich, dass zahlreiche Schritte bereits automatisierbar sind oder ein hohes Maß an Automatisierungspotenzial besitzen. Dadurch können aktuelle, komplexe Arbeitsabläufe automatisiert umgesetzt werden, wie zum Beispiel die Generierung von Kardiomyozyten aus embryonalen Stammzellen (Boheler et al. 2002; Wobus und Boheler 2005): Nach der Dissoziation der pluripotenten Stammzellen werden diese mit der HD-Technologie für zwei Tage zu EBs kultiviert, die anschließend in eine Suspensionskultur überführt werden, um ausreichend Medium zur Verfügung zu stellen. Zwischen Tag 5 und 7 werden die EBs auf einer gelatinisierten Oberfläche ausplattiert. Nach weiteren 7 Tagen in adhärenter Kultivierung ist die Differenzierung abgeschlossen. Sie hängt maßgeblich von der Ausgangszellzahl, den Zusätzen (Wachstumsfaktoren, Zytokine etc.), den verwendeten Zelllinien sowie dem Zeitpunkt der Ausplattierung ab. Alle genannten Schritte können mit Hilfe der hier untersuchten Methoden mit hohem Automatisierungspotenzial abgebildet werden, wie es in Abbildung 82 dargestellt wird. Aus der Standardkultivierung in Petrischalen oder Zellkulturflaschen können die relevanten Zelltypen herausgelöst und automatisiert in Lochplatten pipettiert werden, um entweder kontaktfrei oder adhäsionsbasiert in einer definierten Umgebung proliferieren zu können und Mikrogewebe zu bilden. Durch die Möglichkeit zu jeder Zeit jeden der einzelnen Tropfen ansteuern zu können, können gewünschte Wachstumsflächen auch während einer laufenden Kultivierung zugegeben werden. Dabei ist man nicht auf sphärische Mikroträger limitiert, es besteht auch die Möglichkeit Kryogele mit modifizierten Porengrößen oder zellspezifischen Oberflächen einzubringen. Über die entwickelte Methode der Vitrifikation durch überkritische Volumenerhöhung können die einzelnen Tropfen automatisiert in flüssigen Stickstoff abgetropft werden. Ebenso vorstellbar ist die automatisierte Zugabe von CPAs in die Bioreaktoren mit anschließender computergestützter langsamen Kryokonservierung mit Kristallisation. Dadurch könnte der Prozess der Generierung patientenspezifischer, homogener Mikrogewebe bis hin zur Kryokonservierung in speziell definierten Formaten komplett automatisiert durchgeführt werden, um in gleichbleibender Qualität der medikamentenbasierten oder regenerativen Medizin zur Verfügung zu stehen.

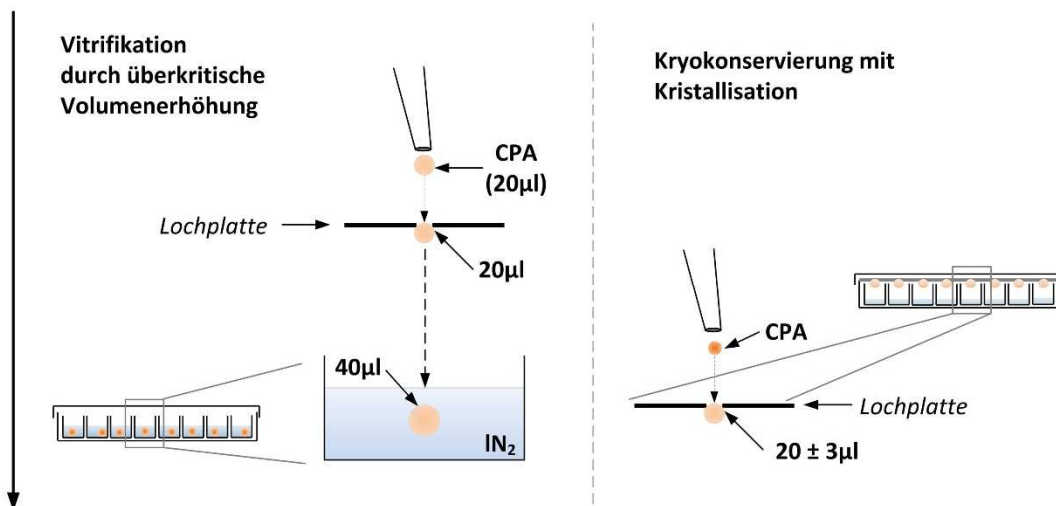
Standardkultivierung



Automatisierte HD-Technologie



Tropfenbasierte Kryokonservierung



Anwendung

Regenerative Medizin



Medikamentenbasierte Medizin

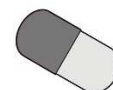


Abbildung 82: Schematische Zeichnung eines automatisierten Gesamtworkflows zur Generierung homogener Mikrogewebe im Kontext neuer Therapien für die regenerative und medikamentenbasierte Medizin. Durch den Übergang zur automatisierten HD-Technologie besteht die Möglichkeit automatisierte Medienwechsel durchzuführen und zu jedem Zeitpunkt zellspezifische Wachstumsflächen zuzufügen. Ebenso können automatisch Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren zugefügt werden, wodurch aktuelle, komplexe Differenzierungsprotokolle adaptiert werden können.

6 Literatur

1. Abbott, A. 2003. 'Cell culture: biology's new dimension', *Nature*, 424 (6951): 870-2.
2. Aboelsoud, N. H. 2010. 'Herbal medicine in ancient Egypt', *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (2): 082-6.
3. Acker, J. P. & Croteau, I. M. 2004. 'Pre- and post-thaw assessment of intracellular ice formation', *Journal of Microscopy*, 215: 131-8.
4. Acker, J. P., Elliott, J. A. & McGann, L. E. 2001. 'Intercellular ice propagation: experimental evidence for ice growth through membrane pores', *Biophys J*, 81 (3): 1389-97.
5. Acker, J. P., Larese, A., Yang, H., Petrenko, A. & McGann, L. E. 1999. 'Intracellular ice formation is affected by cell interactions', *Cryobiology*, 38 (4): 363-71.
6. Afrimzon, E., Zurgil, N., Shafran, Y., Ehrhart, F., Namer, Y., Moshkov, S., Sobolev, M., Deutsch, A., Howitz, S., Greuner, M., Thaele, M., Meiser, I., Zimmermann, H. & Deutsch, M. 2010. 'The individual-cell-based cryo-chip for the cryopreservation, manipulation and observation of spatially identifiable cells. II: Functional activity of cryopreserved cells', *BMC Cell Biol*, 11: 83.
7. Aitken, R. J. & De Lullis, G. N. 2010. 'On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa', *Mol Hum Reprod*, 16 (1): 3-13.
8. al-Rubeai, M., Emery, A. N., Chalder, S. & Goldman, M. H. 1993. 'A flow cytometric study of hydrodynamic damage to mammalian cells', *J Biotechnol*, 31 (2): 161-77.
9. Alon, U. 2007. 'Network motifs: theory and experimental approaches', *Nat Rev Genet*, 8 (6): 450-61.
10. Amir, G., Rubinsky, B., Kassif, Y., Horowitz, L., Smolinsky, A. K. & Lavee, J. 2003. 'Preservation of myocyte structure and mitochondrial integrity in subzero cryopreservation of mammalian hearts for transplantation using antifreeze proteins--an electron microscopy study', *Eur J Cardiothorac Surg*, 24 (2): 292-6; discussion 6-7.
11. Archer, R. & Williams, D. J. 2005. 'Why tissue engineering needs process engineering', *Nat Biotechnol*, 23 (11): 1353-5.
12. Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. 2002. 'Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)', *Circulation*, 106 (24): 3009-17.
13. Baker, D. E., Harrison, N. J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H. D., Shaw, P. J., Heath, P. R., Holden, H. & Andrews, P. W. 2007. 'Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo', *Nat Biotechnol*, 25 (2): 207-15.
14. Baker, H. 1972. 'The intracellular pressure of Nitella in hypertonic solutions and its relationship to freezing injury', *Cryobiology*, 9 (4): 283-8.
15. Basma, H., Soto-Gutierrez, A., Yannam, G. R., Liu, L., Ito, R., Yamamoto, T., Ellis, E., Carson, S. D., Sato, S., Chen, Y., Muirhead, D., Navarro-Alvarez, N., Wong, R. J., Roy-Chowdhury, J., Platt, J. L., Mercer, D. F., Miller, J. D., Strom, S. C., Kobayashi, N. & Fox, I. J. 2009. 'Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes', *Gastroenterology*, 136 (3): 990-9.
16. Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J. & Meyers, S. A. 2003. 'Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa', *J Androl*, 24 (4): 621-8.
17. Beelen, D. W., Ottinger, H., Mytilineos, J. & Mueller, C. 2011. 'Deutsches Register für Stammzelltransplantationen Jahresbericht 2011': Deutsches Register für Stammzelltransplantationen.
18. Beier, A. F., Schulz, J. C., Dorr, D., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J. & Zimmermann, H. 2011. 'Effective surface-based cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification', *Cryobiology*, 63 (3): 175-85.
19. Beier, A. F., Schulz, J. C. & Zimmermann, H. 2013. 'Cryopreservation with a twist - towards a sterile, serum-free surface-based vitrification of hESCs', *Cryobiology*, 66 (1): 8-16.
20. Beier, A. F. J. 2008. Neue Methoden in der Kryokonservierung humaner embryonaler Stammzellen: Oberflächenbasierte Vitrifikation, Diplomarbeit, Lehrstuhl für Biotechnologie unter der Leitung von Prof. U. Zimmermann, Julius-Maximilians Universität Würzburg.
21. Bergin, E., Levine, J. S., Koh, J. S. & Lieberthal, W. 2000. 'Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism', *Am J Physiol Renal Physiol*, 278 (5): F758-68.
22. Bhadriraju, K. & Chen, C. S. 2002. 'Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing', *Drug Discov Today*, 7 (11): 612-20.
23. Bhatia, H., Sharma, R., Dawes, J. & Khillan, J. S. 2012. 'Maintenance of feeder free anchorage independent cultures of ES and iPS cells by retinol/vitamin A', *J Cell Biochem*, 113 (9): 3002-10.
24. Bilic, J. & Izpisua Belmonte, J. C. 2012. 'Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart?', *Stem Cells*, 30 (1): 33-41.
25. Bishop, A. L. & Hall, A. 2000. 'Rho GTPases and their effector proteins', *Biochem J*, 348 Pt 2: 241-55.
26. Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., Ziller, M., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Gnirke, A., Eggan, K. & Meissner, A. 2011. 'Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines', *Cell*, 144 (3): 439-52.
27. Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V. & Wobus, A. M. 2002. 'Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes', *Circ Res*, 91 (3): 189-201.

28. Bose, S., Roy, M. & Bandyopadhyay, A. 2012. 'Recent advances in bone tissue engineering scaffolds', *Trends Biotechnol*, 30 (10): 546-54.
29. Box, H. C., Dawidzik, J. B. & Budzinski, E. E. 2001. 'Free radical-induced double lesions in DNA', *Free Radic Biol Med*, 31 (7): 856-68.
30. Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R. & Young, R. A. 2005. 'Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells', *Cell*, 122 (6): 947-56.
31. Brafman, D. A. 2012. 'Bioengineering of stem cell microenvironments using high-throughput technologies', *J Bioengineer Biomedical Sci*, S5:004.
32. Bramswig, N. C., Everett, L. J., Schug, J., Dorrell, C., Liu, C., Luo, Y., Streeter, P. R., Naji, A., Grompe, M. & Kaestner, K. H. 2013. 'Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming', *J Clin Invest*, 123 (3): 1275-84.
33. Brockbank, K. G., Song, Y. C., Khirabadi, B. S., Lightfoot, F. G., Boggs, J. M. & Taylor, M. J. 2000. 'Storage of tissues by vitrification', *Transplant Proc*, 32 (1): 3-4.
34. Burridge, K. & Wennerberg, K. 2004. 'Rho and Rac take center stage', *Cell*, 116 (2): 167-79.
35. Calmels, B., Houze, P., Hengesse, J. C., Ducrot, T., Malenfant, C. & Chabannon, C. 2003. 'Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing', *Bone Marrow Transplant*, 31 (9): 823-8.
36. Caplan, A. I. 1991. 'Mesenchymal stem cells', *J Orthop Res*, 9 (5): 641-50.
37. Carrel, A. 1912. 'The Nobel Prize in Physiology or Medicine', In *in recognition of his work on vascular suture and the transplantation of blood vessels and organs*: The Nobel Foundation.
38. Carrera-Bastos, P., Fontes-villalba, M., O'Keefe, J. H., Lindeberg, S. & Cordain, L. 2011. 'The western diet and lifestyle and diseases of civilization', *Research Reports in Clinical Cardiology*, 2: 15-35.
39. Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L. & Smith, A. 2007. 'Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development', *Nature*, 450 (7173): 1230-4.
40. Chambers, I. & Smith, A. 2004. 'Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells', *Oncogene*, 23 (43): 7150-60.
41. Chen, M., Lin, Y. Q., Xie, S. L., Wu, H. F. & Wang, J. F. 2011. 'Enrichment of cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells by optimizing the hanging drop method', *Biotechnol Lett*, 33 (4): 853-8.
42. Chen, S., Lewallen, M. & Xie, T. 2013. 'Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation', *Development*, 140 (2): 255-65.
43. Chen, T., Bhowmick, S., Sputtek, A., Fowler, A. & Toner, M. 2002. 'The glass transition temperature of mixtures of trehalose and hydroxyethyl starch', *Cryobiology*, 44: 301-6.
44. Chiarugi, P. & Giannoni, E. 2008. 'Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells', *Biochem Pharmacol*, 76 (11): 1352-64.
45. Christmann, M., Tomicic, M. T., Roos, W. P. & Kaina, B. 2003. 'Mechanisms of human DNA repair: an update', *Toxicology*, 193 (1-2): 3-34.
46. Cimetta, E., Figallo, E., Cannizzaro, C., Elvassore, N. & Vunjak-Novakovic, G. 2009. 'Micro-bioreactor arrays for controlling cellular environments: design principles for human embryonic stem cell applications', *Methods*, 47 (2): 81-9.
47. Clegg, J. S., Seitz, P., Seitz, W. & Hazlewood, C. F. 1982. 'Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis', *Cryobiology*, 19 (3): 306-16.
48. Cortijo, C., Gouzi, M., Tissir, F. & Grapin-Botton, A. 2012. 'Planar cell polarity controls pancreatic Beta cell differentiation and glucose homeostasis', *Cell Rep*, 2 (6): 1593-606.
49. Croughan, M. S., Sayre, E. S. & Wang, D. I. 1989. 'Viscous reduction of turbulent damage in animal cell culture', *Biotechnol Bioeng*, 33 (7): 862-72.
50. Cui, J., Holmes, E. H., Greene, T. G. & Liu, P. K. 2000. 'Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain', *FASEB J*, 14 (7): 955-67.
51. Dahl, S. L., Rhim, C., Song, Y. C. & Niklason, L. E. 2007. 'Mechanical properties and compositions of tissue engineered and native arteries', *Ann Biomed Eng*, 35 (3): 348-55.
52. Daley, G. Q. 2012. 'The promise and perils of stem cell therapeutics', *Cell Stem Cell*, 10 (6): 740-9.
53. Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Lin, J. K., Farzadfar, F., Khang, Y. H., Stevens, G. A., Rao, M., Ali, M. K., Riley, L. M., Robinson, C. A., Ezzati, M. & Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating, G. 2011. 'National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants', *Lancet*, 378 (9785): 31-40.
54. Das, A. K. & Pal, R. 2010. 'Induced pluripotent stem cells (iPSCs): the emergence of a new champion in stem cell technology-driven biomedical applications', *J Tissue Eng Regen Med*, 4 (6): 413-21.
55. Davila, J. C., Cezar, G. G., Thiede, M., Strom, S., Miki, T. & Trosko, J. 2004. 'Use and application of stem cells in toxicology', *Toxicol Sci*, 79 (2): 214-23.
56. Davis, R. P., van den Berg, C. W., Casini, S., Braam, S. R. & Mummery, C. L. 2011. 'Pluripotent stem cell models of cardiac disease and their implication for drug discovery and development', *Trends Mol Med*, 17 (9): 475-84.
57. de Groot, M., Schuurs, T. A. & van Schilfgaarde, R. 2004. 'Causes of limited survival of microencapsulated pancreatic islet grafts', *J Surg Res*, 121 (1): 141-50.

58. de las Heras, M. A., Valcarcel, A., Perez, L. J. & Moses, D. F. 1997. 'Actin localization in ram spermatozoa: effect of freezing/thawing, capacitation and calcium ionophore-induced acrosomal exocytosis', *Tissue Cell*, 29 (1): 47-53.
59. Deutsch, M., Afrimzon, E., Namer, Y., Shafran, Y., Sobolev, M., Zurgil, N., Deutsch, A., Howitz, S., Greuner, M., Thaele, M., Zimmermann, H., Meiser, I. & Ehrhart, F. 2010. 'The individual-cell-based cryo-chip for the cryopreservation, manipulation and observation of spatially identifiable cells. I: methodology', *BMC Cell Biol*, 11: 54.
60. Dimmeler, S., Zeiher, A. M. & Schneider, M. D. 2005. 'Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair', *J Clin Invest*, 115 (3): 572-83.
61. Dimos, J. T., Griswold-Prenner, I., Grskovic, M., Irion, S., Johnson, C. & Vaisberg, E. 2011. 'Induced Pluripotent Stem Cells as Human Disease Models', *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 46: 369-83.
62. Donnelly, E. T., McClure, N. & Lewis, S. E. 2001. 'Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity', *Fertil Steril*, 76 (5): 892-900.
63. Drewitz, M., Helbling, M., Fried, N., Bieri, M., Moritz, W., Lichtenberg, J. & Kelm, J. M. 2011. 'Towards automated production and drug sensitivity testing using scaffold-free spherical tumor microtissues', *Biotechnol J*, 6 (12): 1488-96.
64. Eaton, S. B., Konner, M. & Shostak, M. 1988. 'Stone agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective', *The American journal of medicine*, 84 (4): 739-49.
65. Ehrhart, F. 2008. Untersuchungen zur Kryokonservierung und Einschlussimmobilisierung therapeutisch relevanter Zellsysteme, Dissertation, Universität des Saarlandes.
66. Ehrhart, F., Mettler, E., Bose, T., Weber, M. M., Vasquez, J. A. & Zimmermann, H. 2013. 'Biocompatible coating of encapsulated cells using ionotropic gelatin', *PLoS One*, 8 (9): e73498.
67. Ehrhart, F., Schulz, J. C., Katsen-Globa, A., Shirley, S. G., Reuter, D., Bach, F., Zimmermann, U. & Zimmermann, H. 2009. 'A comparative study of freezing single cells and spheroids: towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours', *Cryobiology*, 58 (2): 119-27.
68. Eiselleova, L., Peterkova, I., Neradil, J., Slaninova, I., Hampl, A. & Dvorak, P. 2008. 'Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells', *Int J Dev Biol*, 52 (4): 353-63.
69. Eisenstein, M. 2010. 'iPSCs: One cell to rule them all?', *Nat Methods*, 7 (1): 81-5.
70. Elliott, R. B., Escobar, L., Tan, P. L., Muzina, M., Zwain, S. & Buchanan, C. 2007. 'Live encapsulated porcine islets from a type 1 diabetic patient 9.5 yr after xenotransplantation', *Xenotransplantation*, 14 (2): 157-61.
71. Fahy, G. M., MacFarlane, D. R., Angell, C. A. & Meryman, H. T. 1984. 'Vitrification as an approach to cryopreservation', *Cryobiology*, 21 (4): 407-26.
72. Fahy, G. M., Saur, J. & Williams, R. J. 1990. 'Physical problems with the vitrification of large biological systems', *Cryobiology*, 27 (5): 492-510.
73. Faulkner-Jones, A., Greenhough, S., J, A. K., Gardner, J., Courtney, A. & Shu, W. 2013. 'Development of a valve-based cell printer for the formation of human embryonic stem cell spheroid aggregates', *Biofabrication*, 5 (1): 015013.
74. Felipe-Perez, Y. E., Valencia, J., Juarez-Mosqueda Mde, L., Pescador, N., Roa-Espitia, A. L. & Hernandez-Gonzalez, E. O. 2012. 'Cytoskeletal proteins F-actin and beta-dystrobrevin are altered by the cryopreservation process in bull sperm', *Cryobiology*, 64 (2): 103-9.
75. Figallo, E., Cannizzaro, C., Gerecht, S., Burdick, J. A., Langer, R., Elvassore, N. & Vunjak-Novakovic, G. 2007. 'Micro-bioreactor array for controlling cellular microenvironments', *Lab Chip*, 7 (6): 710-9.
76. Fong, C. Y., Gauthaman, K. & Bongso, A. 2010. 'Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle', *J Cell Biochem*, 111 (4): 769-81.
77. Franks, F., Mathias, S. F., Galfre, P., Webster, S. D. & Brown, D. 1983. 'Ice nucleation and freezing in undercooled cells', *Cryobiology*, 20 (3): 298-309.
78. Frauenschuh, S., Reichmann, E., Ibold, Y., Goetz, P. M., Sittlinger, M. & Ringe, J. 2007. 'A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells', *Biotechnol Prog*, 23 (1): 187-93.
79. Friedler, S., Giudice, L. C. & Lamb, E. J. 1988. 'Cryopreservation of embryos and ova', *Fertil Steril*, 49 (5): 743-64.
80. Frisch, S. M. & Francis, H. 1994. 'Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis', *J Cell Biol*, 124 (4): 619-26.
81. Frisch, S. M. & Screaton, R. A. 2001. 'Anoikis mechanisms', *Curr Opin Cell Biol*, 13 (5): 555-62.
82. Fu, J., Wang, Y. K., Yang, M. T., Desai, R. A., Yu, X., Liu, Z. & Chen, C. S. 2010. 'Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates', *Nat Methods*, 7 (9): 733-6.
83. Fuhr, G. R. & Zimmermann, H. 2008. 'Vorrichtung und Verfahren zur Deposition von biologischem Material in einem Zielsubstrat': Fraunhofer Gesellschaft zur Foerderung der angewandten Forschung e.V. Patent Nr. WO 2008092619 A2.
84. Fujiwara, M., Yan, P., Otsuji, T. G., Narazaki, G., Uosaki, H., Fukushima, H., Kuwahara, K., Harada, M., Matsuda, H., Matsuoka, S., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., Ikeda, T., Sakata, R., Mummery, C. L., Nakatsuji, N., Yamanaka, S., Nakao, K. & Yamashita, J. K. 2011. 'Induction and enhancement of cardiac cell differentiation from mouse and human induced pluripotent stem cells with cyclosporin-A', *PLoS One*, 6 (2): e16734.
85. Fuller, B. & Paynter, S. 2004. 'Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine', *Reprod Biomed Online*, 9 (6): 680-91.
86. Fuller, B. J. 2004. 'Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state', *Cryo Letters*, 25 (6): 375-88.

87. Gauthaman, K., Fong, C. Y., Subramanian, A., Biswas, A. & Bongso, A. 2010. 'ROCK inhibitor Y-27632 increases thaw-survival rates and preserves stemness and differentiation potential of human Wharton's jelly stem cells after cryopreservation', *Stem Cell Rev*, 6 (4): 665-76.
88. George, J. C. 2010. 'Stem cell therapy in acute myocardial infarction: a review of clinical trials', *Transl Res*, 155 (1): 10-9.
89. Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Franco, S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Huffman, M. D., Kissela, B. M., Kittner, S. J., Lackland, D. T., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Magid, D., Marcus, G. M., Marelli, A., Matchar, D. B., McGuire, D. K., Mohler, E. R., Moy, C. S., Mussolino, M. E., Nichol, G., Paynter, N. P., Schreiner, P. J., Sorlie, P. D., Stein, J., Turan, T. N., Virani, S. S., Wong, N. D., Woo, D. & Turner, M. B. 2013. 'Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association', *Circulation*, 127 (1): e6-e245.
90. Gonzalez, F., Boue, S. & Izpisua Belmonte, J. C. 2011. 'Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte', *Nat Rev Genet*, 12 (4): 231-42.
91. Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M. A., Kiskinis, E., Lee, J. H., Loh, Y. H., Manos, P. D., Montserrat, N., Panopoulos, A. D., Ruiz, S., Wilbert, M. L., Yu, J., Kirkness, E. F., Izpisua Belmonte, J. C., Rossi, D. J., Thomson, J. A., Eggen, K., Daley, G. Q., Goldstein, L. S. & Zhang, K. 2011. 'Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells', *Nature*, 471 (7336): 63-7.
92. Groeber, F. K. 2008. Kryokonservierung immobilisierter Zellen: Entwicklung von biophysikalisch und technologisch optimierter Protokolle für therapeutisch relevante Zellen, Diplomarbeit, Lehrstuhl für Biotechnologie unter der Leitung von Prof. U. Zimmermann, Julius-Maximilians Universität Würzburg.
93. Grossmann, J. 2002. 'Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"', *Apoptosis*, 7 (3): 247-60.
94. Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B. & Daley, G. Q. 2011. 'Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery', *Nat Rev Drug Discov*, 10 (12): 915-29.
95. Gumbiner, B. M. 1996. 'Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis', *Cell*, 84 (3): 345-57.
96. Gurdon, J. B. & Yamanaka, S. 2012. 'The Nobel Prize in Physiology or Medicine', In *For the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent*: The Nobel Foundation.
97. Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C. W., Meissner, A., Cassady, J. P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L. C., Townes, T. M. & Jaenisch, R. 2007. 'Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin', *Science*, 318 (5858): 1920-3.
98. Hannachi, I. E., Yamato, M. & Okano, T. 2009. 'Cell sheet technology and cell patterning for biofabrication', *Biofabrication*, 1 (2): 022002.
99. Hass, R., Kasper, C., Bohm, S. & Jacobs, R. 2011. 'Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC', *Cell Commun Signal*, 9: 12.
100. Hein, S., Kostin, S., Heling, A., Maeno, Y. & Schaper, J. 2000. 'The role of the cytoskeleton in heart failure', *Cardiovasc Res*, 45 (2): 273-8.
101. Heng, Y. W. & Koh, C. G. 2010. 'Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle', *Int J Biochem Cell Biol*, 42 (10): 1622-33.
102. Hescheler, J., Fleischmann, B. K., Lentini, S., Maltsev, V. A., Rohwedel, J., Wobus, A. M. & Addicks, K. 1997. 'Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis', *Cardiovasc Res*, 36 (2): 149-62.
103. Heuer, J., Bremer, S., Pohl, I. & Spielmann, H. 1993. 'Development of an in vitro embryotoxicity test using murine embryonic stem cell cultures', *Toxicol In Vitro*, 7 (4): 551-6.
104. Holm, F., Strom, S., Inzunza, J., Baker, D., Stromberg, A. M., Rozell, B., Feki, A., Bergstrom, R. & Hovatta, O. 2010. 'An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells', *Hum Reprod*, 25 (5): 1271-9.
105. Hongisto, H., Vuoristo, S., Mikhailova, A., Suuronen, R., Virtanen, I., Otonkoski, T. & Skottman, H. 2012. 'Laminin-511 expression is associated with the functionality of feeder cells in human embryonic stem cell culture', *Stem Cell Res*, 8 (1): 97-108.
106. Hornung, J., Muller, T. & Fuhr, G. 1996. 'Cryopreservation of anchorage-dependent mammalian cells fixed to structured glass and silicon substrates', *Cryobiology*, 33 (2): 260-70.
107. Hsiao, A. Y., Tung, Y. C., Kuo, C. H., Mosadegh, B., Bedenis, R., Pienta, K. J. & Takayama, S. 2012a. 'Micro-ring structures stabilize microdroplets to enable long term spheroid culture in 384 hanging drop array plates', *Biomed Microdevices*, 14 (2): 313-23.
108. Hsiao, A. Y., Tung, Y. C., Qu, X., Patel, L. R., Pienta, K. J. & Takayama, S. 2012b. '384 hanging drop arrays give excellent Z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids', *Biotechnol Bioeng*, 109 (5): 1293-304.
109. Huang, G., Wang, L., Wang, S., Han, Y., Wu, J., Zhang, Q., Xu, F. & Lu, T. J. 2012. 'Engineering three-dimensional cell mechanical microenvironment with hydrogels', *Biofabrication*, 4 (4): 042001.
110. Huang, G. T. 2010. 'Induced Pluripotent Stem Cells-A New Foundation in Medicine', *J Exp Clin Med*, 2 (5): 202-17.
111. Hussein, S. M., Batada, N. N., Vuoristo, S., Ching, R. W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C., Lundin, K., Mikkola, M., Trokovic, R., Peitz, M., Brustle, O., Bazett-Jones, D. P., Alitalo, K., Lahesmaa, R., Nagy, A. & Otonkoski, T. 2011. 'Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency', *Nature*, 471 (7336): 58-62.

112. Ilic, D. 2009. 'Latest developments in stem cell research and regenerative medicine', *Regen Med*, 4 (1): 11-25.
113. Ilic, D. 2012. 'Industry Update: Latest developments in stem cell research and regenerative medicine', *Regen Med*, 5 (4): 607-15.
114. Ilic, D. 2013. 'Industry update: Latest developments in stem cell research and regenerative medicine', *Regen Med*, 8 (4): 397-403.
115. Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., Boulos, M. & Gepstein, L. 2011. 'Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells', *Nature*, 471 (7337): 225-9.
116. Jacobsohn, D. A. & Vogelsang, G. B. 2007. 'Acute graft versus host disease', *Orphanet J Rare Dis*, 2: 35.
117. Jaenisch, R. & Young, R. 2008. 'Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming', *Cell*, 132 (4): 567-82.
118. Jakab, K., Norotte, C., Marga, F., Murphy, K., Vunjak-Novakovic, G. & Forgacs, G. 2010. 'Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells', *Biofabrication*, 2 (2): 022001.
119. Johnson, R. D. & Jasin, M. 2000. 'Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells', *EMBO J*, 19 (13): 3398-407.
120. Jopling, C., Boue, S. & Izpisua Belmonte, J. C. 2011. 'Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12 (2): 79-89.
121. Jung, S. & Hutchings, I. M. 2012. 'The impact and spreading of a small liquid drop on a non-porous substrate over an extended time scale', *Soft Matter*, 8: 2686-96.
122. Kang, L. & Gao, S. 2012. 'Pluripotency of induced pluripotent stem cells', *J Anim Sci Biotechnol*, 3 (1): 5.
123. Karp, J. M. & Leng Teo, G. S. 2009. 'Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details', *Cell Stem Cell*, 4 (3): 206-16.
124. Katkov, I., Kan, N. G., Cimadamore, F., Nelson, B., Snyder, E. Y. & Terskikh, A. V. 2011. 'DMSO-Free Programmed Cryopreservation of Fully Dissociated and Adherent Human Induced Pluripotent Stem Cells', *Stem Cells Int*, 2011: 981606.
125. Katsen-Globa, A., Meiser, I., Petrenko, Y. A., Ivanov, R. V., Lozinsky, V. I., Zimmermann, H. & Petrenko, A. Y. 2014. 'Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds', *J Mater Sci Mater Med*, 25 (3): 857-71.
126. Katsen-Globa, A., Meiser, I., Pütz, D., Cismak, A., Heilmann, A. & Zimmermann, H. 2010. 'Looking through the ice: quality control of cryopreserved cells and tissues with cryo focus ion beam scanning electron microscopy', *Cryo-2010 41th Annual Meeting of the Society for Cryobiology Bristol*, *Cryobiology* 61 (3): 393-4.
127. Katsen-Globa, A., Pflüger, S., Zwanzig, M., Fiedler, S., Howitz, S. & Zimmermann, H. 2005. 'Cell cryopreservation on nanostructured surfaces: block-face scanning electron microscopic method for studying of the cell-substrate interface', *Focus on Microscopy (FOM) 2005 Jena*, Proceedings.
128. Katsen, A. D., Vollmar, B., Mestres-Ventura, P. & Menger, M. D. 1998. 'Cell surface and nuclear changes during TNF-alpha-induced apoptosis in WEHI 164 murine fibrosarcoma cells. A correlative light, scanning, and transmission electron microscopical study', *Virchows Arch*, 433 (1): 75-83.
129. Kehoe, D. E., Jing, D., Lock, L. T. & Tzanakakis, E. S. 2009. 'Scalable stirred-suspension bioreactor culture of human pluripotent stem cells', *Tissue Eng Part A*, 16 (2): 405-21.
130. Kelm, J. M. & Fussenegger, M. 2004. 'Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly', *Trends Biotechnol*, 22 (4): 195-202.
131. Kelm, J. M. & Fussenegger, M. 2010. 'Scaffold-free cell delivery for use in regenerative medicine', *Adv Drug Deliv Rev*, 62 (7-8): 753-64.
132. Khan, M., Narayanan, K., Lu, H., Choo, Y., Du, C., Wiradharma, N., Yang, Y. Y. & Wan, A. C. 2013. 'Delivery of reprogramming factors into fibroblasts for generation of non-genetic induced pluripotent stem cells using a cationic bolaamphiphile as a non-viral vector', *Biomaterials*, 34 (21): 5336-43.
133. Kilian, K. A., Bugarija, B., Lahn, B. T. & Mrksich, M. 2010. 'Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (11): 4872-7.
134. Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., McKinney-Freeman, S., Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jaenisch, R., Weissleder, R., Orkin, S. H., Weissman, I. L., Feinberg, A. P. & Daley, G. Q. 2010. 'Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells', *Nature*, 467 (7313): 285-90.
135. King, J. A. & Miller, W. M. 2007. 'Bioreactor development for stem cell expansion and controlled differentiation', *Curr Opin Chem Biol*, 11 (4): 394-8.
136. Klepetko, W., Laufer, G. & Kocher, A. 2004. 'Thoracic transplantation and stem cell therapy', *Eur J Cardiothorac Surg*, 26 Suppl 1: S57-8; discussion S8.
137. Kobel, S. & Lutolf, M. 2010. 'High-throughput methods to define complex stem cell niches', *Biotechniques*, 48 (4): ix-xxii.
138. Korber, C., Scheiwe, M. W., Boutron, P. & Rau, G. 1982. 'The influence of hydroxyethyl starch on ice formation in aqueous solutions', *Cryobiology*, 19 (5): 478-92.
139. Krenning, G., Zeisberg, E. M. & Kalluri, R. 2010. 'The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis', *J Cell Physiol*, 225 (3): 631-7.

140. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. 2010. 'The essence of senescence', *Genes Dev*, 24 (22): 2463-79.
141. Kuleshova, L. L. & Lopata, A. 2002. 'Vitrification can be more favorable than slow cooling', *Fertil Steril*, 78 (3): 449-54.
142. Kuleshova, L. L., MacFarlane, D. R., Trounson, A. O. & Shaw, J. M. 1999. 'Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes', *Cryobiology*, 38 (2): 119-30.
143. Kurosawa, H. 2007. 'Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells', *J Biosci Bioeng*, 103 (5): 389-98.
144. Ladewig, J., Koch, P. & Brustle, O. 2013. 'Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14 (4): 225-36.
145. Laino, C. 2011. 'Diabetes Rates Double Since 1980', WebMD, LLC.
146. Lakhotia, S. & Papoutsakis, E. T. 1992. 'Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: Experiments and modeling', *Biotechnol Bioeng*, 39 (1): 95-107.
147. Langer, R. & Vacanti, J. P. 1993. 'Tissue engineering', *Science*, 260 (5110): 920-6.
148. Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J. V., Lee, S., Barrero, M. J., Ku, S., Martynova, M., Semechkin, R., Galat, V., Gottesfeld, J., Izpisua Belmonte, J. C., Murry, C., Keirstead, H. S., Park, H. S., Schmidt, U., Laslett, A. L., Muller, F. J., Nievergelt, C. M., Shamir, R. & Loring, J. F. 2011. 'Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture', *Cell Stem Cell*, 8 (1): 106-18.
149. Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M. E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R. M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., Ringden, O., Developmental Committee of the European Group for, B. & Marrow, T. 2008. 'Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study', *Lancet*, 371 (9624): 1579-86.
150. Lee, P. J., Ghorashian, N., Gaige, T. A. & Hung, P. J. 2007. 'Microfluidic System for Automated Cell-based Assays', *JALA Charlottesville Va*, 12 (6): 363-7.
151. Leist, M., Lidbury, B. A., Yang, C., Hayden, P. J., Kelm, J. M., Ringeissen, S., Detroyer, A., Meunier, J. R., Rathman, J. F., Jackson, G. R., Stolper, G. & Hasiwa, N. 2012. 'Novel technologies and an overall strategy to allow hazard assessment and risk prediction of chemicals, cosmetics, and drugs with animal-free methods', *ALTEX*, 29 (4): 373-88.
152. Leistner, D. M., Fischer-Rasokat, U., Honold, J., Seeger, F. H., Schachinger, V., Lehmann, R., Martin, H., Burck, I., Urbich, C., Dimmeler, S., Zeiher, A. M. & Assmus, B. 2011. 'Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy', *Clin Res Cardiol*, 100 (10): 925-34.
153. Leunissen, J. L. & Yi, H. 2009. 'Self-pressurized rapid freezing (SPRF): a novel cryofixation method for specimen preparation in electron microscopy', *J Microsc*, 235 (1): 25-35.
154. Li, Q., Fan, Y., Sun, X. & Yu, Y. 2013. 'Generation of induced pluripotent stem cells from human amniotic fluid cells by reprogramming with two factors in feeder-free conditions', *J Reprod Dev*, 59 (1): 72-7.
155. Li, R. & Gundersen, G. G. 2008. 'Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9 (11): 860-73.
156. Li, T., Zhou, C., Liu, C., Mai, Q. & Zhuang, G. 2008. 'Bulk vitrification of human embryonic stem cells', *Hum Reprod*, 23 (2): 358-64.
157. Li, Y. & Ma, T. 2012. 'Bioprocessing of cryopreservation for large-scale banking of human pluripotent stem cells ', *BioResearch Open Access*, 1 (5): 205-14.
158. Li, Y. S., Haga, J. H. & Chien, S. 2005. 'Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells', *J Biomech*, 38 (10): 1949-71.
159. Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., Downes, M., Yu, R., Stewart, R., Ren, B., Thomson, J. A., Evans, R. M. & Ecker, J. R. 2011. 'Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells', *Nature*, 471 (7336): 68-73.
160. Liu, B. L. & McGrath, J. J. 2005a. 'Effects of freezing on the cytoskeleton, focal adhesions and gap-junctions in murine osteoblast cultures', *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 5: 4896-9.
161. Liu, B. L. & McGrath, J. J. 2005b. 'Ice formation of vitrification solutions for cryopreservation of tissues', *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 7: 7501-4.
162. Lock, L. T. & Tzanakakis, E. S. 2009. 'Expansion and differentiation of human embryonic stem cells to endoderm progeny in a microcarrier stirred-suspension culture', *Tissue Eng Part A*, 15 (8): 2051-63.
163. Lode, A., Bernhardt, A. & Gelinsky, M. 2008. 'Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation', *J Tissue Eng Regen Med*, 2 (7): 400-7.
164. Lohse, D., Bergmann, R., Mikkelsen, R., Zeilstra, C., van der Meer, D., Versluis, M., van der Weele, K., van der Hoef, M. & Kuipers, H. 2004. 'Impact on soft sand: void collapse and jet formation', *Phys Rev Lett*, 93 (19): 198003.
165. Lozinsky, V. I., Simenel, I. A. & Chebyshev, A. V. 1994. 'Method for the preparation of porous material': Russisches Patent Nr. 2,035,476.
166. Luyet, B. J. & Gehenio, P. M. 1940. *Life and death at low temperatures*, 1 edn., Normandy Missouri: Biodynamica.

167. Lysaght, M. J. & Hazlehurst, A. L. 2004. 'Tissue engineering: the end of the beginning', *Tissue Eng*, 10 (1-2): 309-20.
168. Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K. & Hochedlinger, K. 2007. 'Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution', *Cell Stem Cell*, 1 (1): 55-70.
169. Malpique, R., Ehrhart, F., Katsen-Globa, A., Zimmermann, H. & Alves, P. M. 2009. 'Cryopreservation of adherent cells: strategies to improve cell viability and function after thawing', *Tissue Eng Part C Methods*, 15 (3): 373-86.
170. Malpique, R., Tostoes, R., Beier, A. F., Serra, M., Brito, C., Schulz, J. C., Bjorquist, P., Zimmermann, H. & Alves, P. M. 2012. 'Surface-based cryopreservation strategies for human embryonic stem cells: a comparative study', *Biotechnol Prog*, 28 (4): 1079-87.
171. Manzello, S. L. & Yang, J. C. 2002. 'An experimental study of a water droplet impinging on a liquid surface', *Experiments in Fluids*, 32: 580-9.
172. Markovitz-Bishitz, Y., Tauber, Y., Afrimzon, E., Zurgil, N., Sobolev, M., Shafran, Y., Deutsch, A., Howitz, S. & Deutsch, M. 2010. 'A polymer microstructure array for the formation, culturing, and high throughput drug screening of breast cancer spheroids', *Biomaterials*, 31 (32): 8436-44.
173. Marston, W. A. 2004. 'Dermagraft, a bioengineered human dermal equivalent for the treatment of chronic nonhealing diabetic foot ulcer', *Expert Rev Med Devices*, 1 (1): 21-31.
174. Marston, W. A., Hanft, J., Norwood, P., Pollak, R. & Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study, G. 2003. 'The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial', *Diabetes Care*, 26 (6): 1701-5.
175. Martin-Ibanez, R., Unger, C., Stromberg, A., Baker, D., Canals, J. M. & Hovatta, O. 2008. 'Novel cryopreservation method for dissociated human embryonic stem cells in the presence of a ROCK inhibitor', *Hum Reprod*, 23 (12): 2744-54.
176. Mason, C., Brindley, D. A., Culme-Seymour, E. J. & Davie, N. L. 2011. 'Cell therapy industry: billion dollar global business with unlimited potential', *Regen Med*, 6 (3): 265-72.
177. Mason, C. & Dunnill, P. 2008. 'A brief definition of regenerative medicine', *Regen Med*, 3 (1): 1-5.
178. Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M. S. & Niwa, H. 2007. 'Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells', *Nat Cell Biol*, 9 (6): 625-35.
179. Maxson, S., Lopez, E. A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A. & Leroux, M. A. 2012. 'Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair', *Stem Cells Transl Med*, 1 (2): 142-9.
180. Maysnar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J. C., Yakir, B., Clark, A. T., Plath, K., Lowry, W. E. & Benvenisty, N. 2010. 'Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells', *Cell Stem Cell*, 7 (4): 521-31.
181. Mazur, P. 1965. 'The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells', *Ann N Y Acad Sci*, 125 (2): 658-76.
182. Mazur, P. 2004. 'Principles of Cryobiology', In *Life in the frozen state*, eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson: CRC Press.
183. Mazur, P., Leibo, S. P. & Chu, E. H. 1972. 'A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells', *Exp Cell Res*, 71 (2): 345-55.
184. Mazur, P. & Seki, S. 2011. 'Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196 degrees C at 95 degrees to 70,000 degrees C/min and warmed at 610 degrees to 118,000 degrees C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification', *Cryobiology*, 62 (1): 1-7.
185. Meiser, I. 2007. Neue Verfahren zur positionierenden Immobilisierung von lebenden Zellen mit hoher therapeutischer Relevanz, Masterarbeit, Universität des Saarlandes.
186. Meiser, I., Müller, S. C., Ehrhart, F., Shirley, S. G. & Zimmermann, H. 2013a. 'A new validation method for clinical grade micro-encapsulation: quantitative high speed video analysis of alginate capsule', *Microsystem Technologies*.
187. Meiser, I., Primavessy, D. A. A., Beier, A. F. J., Gastrock, G., Lemke, K., Zimmermann, H. & Neubauer, J. C. 2013b. 'Segmentierte, geschlossene Mikrobioreaktoren für Hochdurchsatzapplikationen humaner embryonaler Stammzellen', *Mikrosystemtechnik Kongress 2013 Aachen Proceedings*.
188. Meiser, I., Sébastien, I., Lorig, H., Katsen-Globa, H., Gastrock, G., Courtney, A., De Sousa, P., Zimmermann, H. & Neubauer, J. C. 2014. 'Towards an automated miniaturized platform-independent screening system based on 3D cultivation of human stem cells in hanging drops', *PLoS One*, eingereicht.
189. Meiser, I., Sébastien, I. & Neubauer, J. C. 2013c. 'Automatisierungsansätze zur Generierung, Expansion und Anwendung humaner induziert pluripotenter Stammzellen für die regenerative Medizin', *Biospektrum*, 19 (5): 523-6.
190. Meiser, I., Shirley, S. G. & Zimmermann, H. 2009. 'Kinetic masks: a new approach and device for dispersing biologically relevant fluids', *Microsystem Technologies*, 15 (9): 1407-16.
191. Meryman, H. T. 1974. 'Freezing injury and its prevention in living cells', *Annu Rev Biophys Bioeng*, 3 (0): 341-63.
192. Meryman, H. T. 2007. 'Cryopreservation of living cells: principles and practice', *Transfusion*, 47 (5): 935-45.
193. Minambres, R., Guasch, R. M., Perez-Arago, A. & Guerri, C. 2006. 'The RhoA/ROCK-1/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes', *J Cell Sci*, 119 (Pt 2): 271-82.
194. Mines, C. 2010. 'IT for sustainability will drive the next wave of corporate evolution', blogs.forrester.com/chris_mines/10-11-18-it_for_sustainability_will_drive_the_next_wave_of_corporate_evolution, aufgerufen am 11.11.2013.

195. Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K. & Kawase, E. 2012. 'Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells', *Nat Commun*, 3: 1236.
196. Mohr, J. C., Zhang, J., Azarin, S. M., Soerens, A. G., de Pablo, J. J., Thomson, J. A., Lyons, G. E., Palecek, S. P. & Kamp, T. J. 2010. 'The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells', *Biomaterials*, 31 (7): 1885-93.
197. Muldrew, K. 2008. 'The salting-in hypothesis of post-hypertonic lysis', *Cryobiology*, 57 (3): 251-6.
198. Muldrew, K., Acker, J. P., Elliott, J. A. W. & McGann, L. E. 2004. 'The water to ice transition: Implications for living cells', In *Life in the frozen state*, eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson: CRC Press.
199. Muldrew, K. & McGann, L. E. 1990. 'Mechanisms of intracellular ice formation', *Biophys J*, 57 (3): 525-32.
200. Mullen, S. F. & Critser, J. K. 2007. 'The science of cryobiology', *Cancer Treat Res*, 138: 83-109.
201. Myrvold, R. & Onsøyen, E. 2003. 'Alginates', *FMC-Biopolymer*: fmcbiopolymer.com/Portals/Pharm/Content/Docs/Alginates.pdf, aufgerufen am 12.0.2007.
202. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. & Yamanaka, S. 2008. 'Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts', *Nat Biotechnol*, 26 (1): 101-6.
203. Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A., Yamada, S., Perez-Terzic, C., Ikeda, Y. & Terzic, A. 2009. 'Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells', *Circulation*, 120 (5): 408-16.
204. Ninagawa, N., Murakami, R., Isobe, E., Tanaka, Y., Nakagawa, H. & Torihashi, S. 2011. 'Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits', *Differentiation*, 82 (3): 153-64.
205. Ohgushi, M. & Sasai, Y. 2011. 'Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states', *Trends Cell Biol*, 21 (5): 274-82.
206. Orive, G., Gascon, A. R., Hernandez, R. M., Igartua, M. & Luis Pedraz, J. 2003. 'Cell microencapsulation technology for biomedical purposes: novel insights and challenges', *Trends Pharmacol Sci*, 24 (5): 207-10.
207. Papaliagkas, V., Anagianaki, A., Anagianakis, G. & Ilionidis, G. 2007. 'The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals', *Hippokratia*, 11 (3): 108-13.
208. Papoutsakis, E. T. 1991. 'Fluid-mechanical damage of animal cells in bioreactors', *Trends Biotechnol*, 9: 427-37.
209. Park, J., Cho, C. H., Parashurama, N., Li, Y., Berthiaume, F., Toner, M., Tilles, A. W. & Yarmush, M. L. 2007. 'Microfabrication-based modulation of embryonic stem cell differentiation', *Lab Chip*, 7 (8): 1018-28.
210. Patel, D. M., Shah, J. & Srivastava, A. S. 2013. 'Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine', *Stem Cells Int*, 2013: 496218.
211. Pedersen, S. F., Hoffmann, E. K. & Mills, J. W. 2001. 'The cytoskeleton and cell volume regulation', *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 130 (3): 385-99.
212. Pegg, D. E., Diaper, M. P., Scholey, S. E. & Coombs, R. R. 1982. 'Droplet freezing of antibody-linked indicator red cells of sheep, ox, and human origin', *Cryobiology*, 19 (6): 573-84.
213. Peng, L., Wang, S., Yin, S., Li, C., Li, Z., Wang, S. & Liu, Q. 2008. 'Autophosphorylation of H2AX in a cell-specific frozen dependent way', *Cryobiology*, 57 (2): 175-7.
214. Pera, M. F. 2011. 'Stem cells: The dark side of induced pluripotency', *Nature*, 471 (7336): 46-7.
215. Pera, M. F., Reubinoff, B. & Trounson, A. 2000. 'Human embryonic stem cells', *J Cell Sci*, 113 (Pt 1): 5-10.
216. Percival, E. E., Venegas Jara, M. & Weigel, H. 1983. 'Carbohydrates of the brown seaweed *Lessonia nigrescens*', *Phytochemistry*, 22 (6): 1429-32.
217. Phinney, D. G. & Prockop, D. J. 2007. 'Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views', *Stem Cells*, 25 (11): 2896-902.
218. Pollard, T. D. & Cooper, J. A. 1986. 'Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions', *Annu Rev Biochem*, 55: 987-1035.
219. Pollard, T. D. & Mooseker, M. S. 1981. 'Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores', *J Cell Biol*, 88 (3): 654-9.
220. Powell, K. 2005. 'Stem-cell niches: it's the ecology, stupid!', *Nature*, 435 (7040): 268-70.
221. Raggi, C. & Berardi, A. C. 2012. 'Mesenchymal stem cells, aging and regenerative medicine', *Muscles Ligaments Tendons J*, 2 (3): 239-42.
222. Ragoonanan, V., Hubel, A. & Aksan, A. 2010. 'Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses', *Cryobiology*, 61 (3): 335-44.
223. Ramirez, O. T. & Mutharasan, R. 1990. 'The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress', *Biotechnol Bioeng*, 36 (9): 911-20.
224. Rasmussen, D. H., Macaulay, M. N. & MacKenzie, A. P. 1975. 'Supercooling and nucleation of ice in single cells', *Cryobiology*, 12 (4): 328-39.
225. Rauen, U. & de Groot, H. 1998. 'Cold-induced release of reactive oxygen species as a decisive mediator of hypothermia injury to cultured liver cells', *Free Radic Biol Med*, 24 (7-8): 1316-23.
226. Richards, M., Fong, C. Y., Tan, S., Chan, W. K. & Bongso, A. 2004. 'An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells', *Stem Cells*, 22 (5): 779-89.
227. Riento, K. & Ridley, A. J. 2003. 'Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 (6): 446-56.
228. Risler, T. 2011. 'Cytoskeleton and Cell Motility', In *Encyclopedia of Complexity and System Science*, ed. R.A. Meyers, New York: Springer.

229. Rizoli, S. B., Rotstein, O. D., Parodo, J., Phillips, M. J. & Kapus, A. 2000. 'Hypertonic inhibition of exocytosis in neutrophils: central role for osmotic actin skeleton remodeling', *Am J Physiol Cell Physiol*, 279 (3): C619-33.
230. Robinton, D. A. & Daley, G. Q. 2012. 'The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy', *Nature*, 481 (7381): 295-305.
231. Rodrigues, C. A., Fernandes, T. G., Diogo, M. M., da Silva, C. L. & Cabral, J. M. 2011. 'Stem cell cultivation in bioreactors', *Biotechnol Adv*, 29 (6): 815-29.
232. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. 1998. 'DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139', *J Biol Chem*, 273 (10): 5858-68.
233. Salaway, T. & Ilic, D. 2008. 'Logistics of stem cell isolation, preparation and delivery for heart repair: concerns of clinicians, manufacturers, investors and public health', *Regen Med*, 3 (1): 83-91.
234. Schmitz-Rode, T. 2011. 'Positionspapier Bioimplantate: Biologische, biologisierte und biofunktionalisierte Implantate', ed. T. Schmitz-Rode.
235. Schneider, S., Feilen, P., Cramer, H., Hillgärtner, M., Brunnenmeier, F., Zimmermann, H., Weber, M. M. & Zimmermann, U. 2003. 'Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways', *J Microencapsul*, 20 (5): 627-36.
236. Schneider, S. & Klein, H. H. 2011. 'Preserved insulin secretion capacity and graft function of cryostored encapsulated rat islets', *Regul Pept*, 166 (1-3): 135-8.
237. Schöler, H. R. 2003. 'Das Potential von Stammzellen', *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 56 (10).
238. Schulz, J. C., Stumpf, P. S., Katsen-Globa, A., Sachinidis, A., Hescheler, J. & Zimmermann, H. 2012. 'First steps towards the successful surface-based cultivation of human embryonic stem cells in hanging drop systems', *Eng. Life Sci.*: 1618-2863.
239. Seeger, F. H., Tonn, T., Krzossok, N., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. 2007. 'Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction', *Eur Heart J*, 28 (6): 766-72.
240. Segers, V. F. & Lee, R. T. 2008. 'Stem-cell therapy for cardiac disease', *Nature*, 451 (7181): 937-42.
241. Serra, M., Brito, C., Correia, C. & Alves, P. M. 2012. 'Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application', *Trends Biotechnol*, 30 (6): 350-9.
242. Sethe, S., Scutt, A. & Stolzing, A. 2006. 'Aging of mesenchymal stem cells', *Ageing Res Rev*, 5 (1): 91-116.
243. Si-Tayeb, K., Noto, F. K., Sepac, A., Sedlic, F., Bosnjak, Z. J., Lough, J. W. & Duncan, S. A. 2010. 'Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors', *BMC Dev Biol*, 10: 81.
244. Siew, C. K., Williams, P. A. & Young, N. W. 2005. 'New insights into the mechanism of gelation of alginate and pectin: charge annihilation and reversal mechanism', *Biomacromolecules*, 6 (2): 963-9.
245. Singh, D., Nayak, V. & Kumar, A. 2010. 'Proliferation of myoblast skeletal cells on three-dimensional supermacroporous cryogels', *Int J Biol Sci*, 6 (4): 371-81.
246. Smith, D., Ziebert, F., Humphrey, D., Duggan, C., Steinbeck, M., Zimmermann, W. & Kas, J. 2007. 'Molecular motor-induced instabilities and cross linkers determine biopolymer organization', *Biophys J*, 93 (12): 4445-52.
247. Souders, C. A., Bowers, S. L. & Baudino, T. A. 2009. 'Cardiac fibroblast: the renaissance cell', *Circ Res*, 105 (12): 1164-76.
248. Souza, G. R., Molina, J. R., Raphael, R. M., Ozawa, M. G., Stark, D. J., Levin, C. S., Bronk, L. F., Ananta, J. S., Mandelin, J., Georgescu, M. M., Bankson, J. A., Gelovani, J. G., Killian, T. C., Arap, W. & Pasqualini, R. 2010. 'Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation', *Nat Nanotechnol*, 5 (4): 291-6.
249. Statistisches-Bundesamt 2012. 'Statistisches Jahrbuch 2012 - Gesellschaft und Staat', In *Jahrbuch 2012*.
250. Steponkus, P. L. 1984. 'Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation', *Annu Rev Plant Physiol*, 35: 543-84.
251. Storey, K. B. & Storey, J. M. 1984. 'Biochemical adaption for freezing tolerance in the wood frog', *J Comp Physiol B*, 155: 29-36.
252. Storz, H., Müller, K. J., Ehrhart, F., Gomez, I., Shirley, S. G., Gessner, P., Zimmermann, G., Weyand, E., Sukhorukov, V. L., Forst, T., Weber, M. M., Zimmermann, H., Kulicke, W. M. & Zimmermann, U. 2009. 'Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates', *Carbohydr Res*, 344 (8): 985-95.
253. Strauer, B. E. & Steinhoff, G. 2011. '10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice', *J Am Coll Cardiol*, 58 (11): 1095-104.
254. Stricker, J., Falzone, T. & Gardel, M. L. 2010. 'Mechanics of the F-actin cytoskeleton', *J Biomech*, 43 (1): 9-14.
255. Stroh, C., Cassens, U., Samraj, A., Sibrowski, W., Schulze-Osthoff, K. & Los, M. 2002. 'The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells', *FASEB J*, 16 (12): 1651-3.
256. Sugden, P. H. & Clerk, A. 1998. 'Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy', *J Mol Med (Berl)*, 76 (11): 725-46.
257. Suh, M. R., Lee, Y., Kim, J. Y., Kim, S. K., Moon, S. H., Lee, J. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., Yoon, H. S., Moon, S. Y., Kim, V. N. & Kim, K. S. 2004. 'Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs', *Dev Biol*, 270 (2): 488-98.
258. Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N. & Suemori, H. 2007. 'Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc', *Oncogene*, 26 (38): 5564-76.
259. Sun, W. Q. 1999. 'State and phase transition behaviors of quercus rubra seed axes and cotyledonary tissues: relevance to the desiccation sensitivity and cryopreservation of recalcitrant seeds', *Cryobiology*, 38 (4): 372-85.

260. Tabar, V., Tomishima, M., Panagiotakos, G., Wakayama, S., Menon, J., Chan, B., Mizutani, E., Al-Shamy, G., Ohta, H., Wakayama, T. & Studer, L. 2008. 'Therapeutic cloning in individual parkinsonian mice', *Nat Med*, 14 (4): 379-81.
261. Takahashi, A., Matsumoto, H., Nagayama, K., Kitano, M., Hirose, S., Tanaka, H., Mori, E., Yamakawa, N., Yasumoto, J., Yuki, K., Ohnishi, K. & Ohnishi, T. 2004. 'Evidence for the involvement of double-strand breaks in heat-induced cell killing', *Cancer Res*, 64 (24): 8839-45.
262. Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. 'Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors', *Cell*, 126 (4): 663-76.
263. Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A. & Takeda, S. 1998. 'Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells', *EMBO J*, 17 (18): 5497-508.
264. Taylor, M. J. & Pegg, D. E. 1983. 'The effect of ice formation on the function of smooth muscle tissue stored at -21 or -60 degrees C', *Cryobiology*, 20 (1): 36-40.
265. Taylor, M. J., Song, Y. C. & Brockbank, G. M. 2004a. 'Vitrification in Tissue Preservation: New Developments', In *Life in the frozen state*, eds. B.J. Fuller, N. Lane and E.E. Benson: CRC Press.
266. Taylor, S. L., Weng, S. L., Fox, P., Duran, E. H., Morshedi, M. S., Oehninger, S. & Beebe, S. J. 2004b. 'Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality', *Mol Hum Reprod*, 10 (11): 825-34.
267. Tee, S. Y., Fu, J., Chen, C. S. & Janmey, P. A. 2011. 'Cell shape and substrate rigidity both regulate cell stiffness', *Biophys J*, 100 (5): L25-7.
268. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Jr., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. 1957. 'Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy', *N Engl J Med*, 257 (11): 491-6.
269. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. 1998. 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts', *Science*, 282 (5391): 1145-7.
270. Thomson, L. K., Fleming, S. D., Aitken, R. J., De Lullis, G. N., Zieschang, J. A. & Clark, A. M. 2009. 'Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis', *Hum Reprod*, 24 (9): 2061-70.
271. Toner, M., Cravalho, E. G. & Karel, M. 1990. 'Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells', *J Appl Phys*, 67: 1582-93.
272. Tonn, T., Schächinger, V., Assmus, B., Seifried, E., Dimmeler, S. & Zeiher, A. M. 2007. 'Stammzellen nach Myokardinfarkt - was ist gesichert?!', *Hämotherapie*, 9: 4-12.
273. Torgerson, R. R. & McNiven, M. A. 1998. 'The actin-myosin cytoskeleton mediates reversible agonist-induced membrane blebbing', *J Cell Sci*, 111 (Pt 19): 2911-22.
274. Tripathi, A., Kathuria, N. & Kumar, A. 2009. 'Elastic and macroporous agarose-gelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering', *J Biomed Mater Res A*, 90 (3): 680-94.
275. Tsukiyama, T., Asano, R., Kawaguchi, T., Kim, N., Yamada, M., Minami, N., Ohinata, Y. & Imai, H. 2011. 'Simple and efficient method for generation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible factors and an EOS reporter system', *Genes Cells*, 16 (7): 815-25.
276. Tuch, B. E., Hughes, T. C. & Evans, M. D. 2011. 'Encapsulated pancreatic progenitors derived from human embryonic stem cells as a therapy for insulin-dependent diabetes', *Diabetes Metab Res Rev*, 27 (8): 928-32.
277. Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, C. M. & Hu, W. S. 2005. 'Culture systems for pluripotent stem cells', *J Biosci Bioeng*, 100 (1): 12-27.
278. Valcarce, D. G., Carton-Garcia, F., Riesco, M. F., Herraes, M. P. & Robles, V. 2013. 'Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes crucial for fertilization and early embryo development', *Andrology*, 1 (5): 723-30.
279. Venegas, M., Matsuhira, B. & Edding, M. E. 1993. 'Alginate Composition of Lessonia-Trabeculata (Phaeophyta, Laminariales) Growing in Exposed and Sheltered Habitats', *Botanica Marina*, 36 (1): 47-51.
280. Vukicevic, S., Kleinman, H. K., Luyten, F. P., Roberts, A. B., Roche, N. S. & Reddi, A. H. 1992. 'Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components', *Exp Cell Res*, 202 (1): 1-8.
281. Wang, L., Wang, L., Huang, W., Su, H., Xue, Y., Su, Z., Liao, B., Wang, H., Bao, X., Qin, D., He, J., Wu, W., So, K. F., Pan, G. & Pei, D. 2013. 'Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine', *Nat Methods*, 10 (1): 84-9.
282. Wang, X., Lin, G., Martins-Taylor, K., Zeng, H. & Xu, R. H. 2009. 'Inhibition of caspase-mediated anoikis is critical for basic fibroblast growth factor-sustained culture of human pluripotent stem cells', *J Biol Chem*, 284 (49): 34054-64.
283. Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schlaeger, T. M. & Rossi, D. J. 2010. 'Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA', *Cell Stem Cell*, 7 (5): 618-30.
284. Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Muguruma, K. & Sasai, Y. 2007. 'A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells', *Nat Biotechnol*, 25 (6): 681-6.

285. Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C. & Bissell, M. J. 1997. 'Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies', *J Cell Biol*, 137 (1): 231-45.
286. Wernig, M., Zhao, J. P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O. & Jaenisch, R. 2008. 'Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105 (15): 5856-61.
287. Windrum, P., Morris, T. C., Drake, M. B., Niederwieser, D., Ruutu, T. & Subcommittee, E. C. L. W. P. C. 2005. 'Variation in dimethyl sulfoxide use in stem cell transplantation: a survey of EBMT centres', *Bone Marrow Transplant*, 36 (7): 601-3.
288. Wingate, K., Bonani, W., Tan, Y., Bryant, S. J. & Tan, W. 2012. 'Compressive elasticity of three-dimensional nanofiber matrix directs mesenchymal stem cell differentiation to vascular cells with endothelial or smooth muscle cell markers', *Acta Biomater*, 8 (4): 1440-9.
289. Wobus, A. M. & Boheler, K. R. 2005. 'Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy', *Physiol Rev*, 85 (2): 635-78.
290. Wolfe, J. & Bryant, G. 2001. 'Cellular Cryobiology: thermodynamic and mechanical effects', *International Journal of Refrigeration*, 24: 438-50.
291. Wollert, K. C., Meyer, G. P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A. & Drexler, H. 2004. 'Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial', *Lancet*, 364 (9429): 141-8.
292. Wood, T. H. & Rosenberg, A. M. 1957. 'Freezing in yeast cells', *Biochim Biophys Acta*, 25 (1): 78-87.
293. Worthington, A. M. 1908. *A study of splashes*, London, New York, Bombay, Calcutta: Longmans, Green, and Co.
294. Wowk, B. 2010. 'Thermodynamic aspects of vitrification', *Cryobiology*, 60 (1): 11-22.
295. Xie, T. & Spradling, A. C. 2000. 'A niche maintaining germ line stem cells in the Drosophila ovary', *Science*, 290 (5490): 328-30.
296. Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D. & Carpenter, M. K. 2001. 'Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells', *Nat Biotechnol*, 19 (10): 971-4.
297. Xu, C., Jiang, J., Sottile, V., McWhir, J., Lebkowski, J. & Carpenter, M. K. 2004. 'Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth', *Stem Cells*, 22 (6): 972-80.
298. Xu, X., Cowley, S., Flaim, C. J., James, W., Seymour, L. & Cui, Z. 2010. 'The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells', *Biotechnol Prog*, 26 (3): 827-37.
299. Yamada, K. M. 1983. 'Cell surface interactions with extracellular materials', *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 761-99.
300. Yamanaka, S. 2012. 'Induced pluripotent stem cells: past, present, and future', *Cell Stem Cell*, 10 (6): 678-84.
301. Yamanaka, S. & Blau, H. M. 2010. 'Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches', *Nature*, 465 (7299): 704-12.
302. Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I. & Thomson, J. A. 2009. 'Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences', *Science*, 324 (5928): 797-801.
303. Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I. & Thomson, J. A. 2007. 'Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells', *Science*, 318 (5858): 1917-20.
304. Yuan, L., Sakamoto, N., Song, G. & Sato, M. 2013. 'High-level Shear Stress Stimulates Endothelial Differentiation and VEGF Secretion by Human Mesenchymal Stem Cells', *Cellular and Molecular Bioengineering*, 6 (2): 220-9.
305. Zimmermann, H., Fuhr, G. R., Gastrock, G. & Metze, J. 2008. 'Verfahren und Vorrichtung zur Tropfenmanipulation': Fraunhofer Gesellschaft zur Foerderung der angewandten Forschung e.V. und Institut fuer Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. Patent Nr. WO 2008/125347 A1.
306. Zimmermann, H., Hillgärtner, M., Manz, B., Feilen, P., Brunnenmeier, F., Leinfelder, U., Weber, M., Cramer, H., Schneider, S., Hendrich, C., Volke, F. & Zimmermann, U. 2003. 'Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging', *Biomaterials*, 24 (12): 2083-96.
307. Zimmermann, H., Katsen, A. D., Ihmig, F. R., Durst, C. H., Shirley, S. G. & Fuhr, G. R. 2004. 'First steps of an interdisciplinary approach towards miniaturised cryopreservation for cellular nanobiotechnology', *IEE Proc Nanobiotechnol*, 151 (4): 134-8.
308. Zimmermann, H., Shirley, S. G. & Zimmermann, U. 2007. 'Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future', *Curr Diab Rep*, 7 (4): 314-20.
309. Zimmermann, H., Zimmermann, D., Reuss, R., Feilen, P. J., Manz, B., Katsen, A., Weber, M., Ihmig, F. R., Ehrhart, F., Gessner, P., Behringer, M., Steinbach, A., Wegner, L. H., Sukhorukov, V. L., Vasquez, J. A., Schneider, S., Weber, M. M., Volke, F., Wolf, R. & Zimmermann, U. 2005. 'Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation', *J Mater Sci Mater Med*, 16 (6): 491-501.
310. Zimmermann, U., Thurmer, F., Jork, A., Weber, M., Mimietz, S., Hillgärtner, M., Brunnenmeier, F., Zimmermann, H., Westphal, I., Fuhr, G., Noth, U., Haase, A., Steinert, A. & Hendrich, C. 2001. 'A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation', *Ann N Y Acad Sci*, 944: 199-215.

7 Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Zimmermann, Institutsleiter und Leiter der Hauptabteilung Biophysik und Kryotechnologie des Fraunhofer IBMT für die Bereitstellung dieses spannenden Themas. Seine stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung bei der Entwicklung neuer Ideen und der strategischen Konzeption der Arbeit haben maßgeblich zum Gelingen beigetragen.

Herr Prof. Dr. E. Heinzle, Leiter des Lehrstuhls für Technische Biochemie an der Universität des Saarlandes danke ich sehr für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit.

Herr Prof. Dr. G. R. Fuhr, Institutsleiter des Fraunhofer IBMT, danke ich für die Möglichkeit der Ausführung dieser Arbeit am IBMT.

Frau Dr. J. C. Neubauer danke ich für viele fachliche Diskussionen im Bereich der pluripotenten Stammzellen.

Ich danke Frau Dr. A. Katsen-Globa für die Durchführung der REM-Aufnahmen und ihre Unterstützung bei der Interpretation.

Frau H. Lorig, M. Sc. danke ich für die Zuarbeit im Bereich der automatisierten Zellkultur im hängenden Tropfen mit mesenchymalen Stammzellen. Frau I. Sébastien, M. Sc. danke ich für die Umsetzung der entwickelten Protokolle auf dem Zellkulturroboter TECAN. Den von mir betreuten Studentinnen und Studenten danke ich: Frau S. C. Müller, B. Sc. für systematischen Untersuchungen in der entwickelten Trajektorienmethode, Herrn D. A. A. Primaveßy, B. Sc. für die Durchführung der schlauchbasierten Kultivierung embryonaler Stammzellen, Frau N. Doncheva, B. Sc. für systematische Untersuchungen der Kryomedien zur entwickelten kontaktfreien Vitrifikation und Herrn A. Schulz, M. Sc. sowie Herrn T. Breyer danke ich für die Durchführung der Zytoskelettfärbungen.

Ich danke den Kooperationspartnern aus dem BMBF-Verbundprojekt „µCryolab“ (16SV2385): Herr Dr. J. Metze und Dipl.-Ing. S. Wiedemeier vom Institut für Bioprozess- und Analysenmesstechnik e.V. (Heilbad Heiligenstadt, Thüringen) für die Bereitstellung der mikrofluidischen Anlage und gemeinsame Experimente. Frau PD Dr. K. David der Indivumed GmbH (Hamburg) sowie Herrn Prof. Dr. M. M. Weber und E. Mettler, M. Sc., Dipl.-Ing. von der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz für Endokrinologie und Stoffwechselerkrankungen (Mainz, Rheinland-Pfalz) danke ich für die Bereitstellung primären Zellmaterials.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. M. Deutsch, Frau Dr. E. Afrimzon und Frau Y. Shafran, M. Sc. vom Kooperationspartner Jerome Schottenstein Center der Bar-Ilan University (Ramat-Gan, Israel) aus dem BMBF-Verbundprojekt „BioDisc3: i3C“ (0315029A) für die Bereitstellung der Mikrowellsubstrate zur Kultivierung von Zellen im mikrofluidischen Verbund.

Des Weiteren danke ich den Kooperationspartnern Herr Prof. Dr. H. Gögelein und Herr Dr. R. Bogdan von Sanofi-Aventis Deutschland GmbH Abteilung Cardiovascular Diseases (Frankfurt, Hessen), Herrn Prof. Dr. H. Terlau, Herr Dr. J. Wenzel, Herr M. Brandenburger vom Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck (Lübeck, Schleswig-Holstein) aus dem BMBF-Verbundprojekt „Organotypische menschliche Herzkulturen“ (01GG0709) für die Bereitstellung primärer Herzgewebeschnitte.

Herrn Dr. G. Gastrock und Frau Dr. K. Lemke vom Projektpartner Institut für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e.V. (Heilbad, Heiligenstadt, Thüringen) im EU-Projekt „HYPERLAB“ (FP7-223011) danke ich für die Bereitstellung der mikrofluidischen Anlage zur schlauchbasierten Zellkultivierung.

Herr Prof. Dr. A. Heilmann und Herr Dipl.-Ing. A. Cismak vom Projektpartner Fraunhofer Institut für Werkstoffmechanik IWM Abteilung Grenzflächen- und Oberflächentechnologie (Halle (Saale), Sachsen-Anhalt) aus dem BMBF-Verbundprojekt „Kryoelektronenmikroskopie“ (03FPF00016) danke ich für die Aufnahmen kryokonservierter Proben am Elektronenmikroskop mit Kryo-Transferkammer.

Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr M. Grabenbauer, Frau Dr. H. Han und Dipl.-Biol. J. Hübinger des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie (Dortmund, Nordrhein-Westfalen) für die Bereitstellung der Anlage zum Self Pressurized Freezing und gemeinsame Experimente bedanken.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets unterstützt haben und deren Tür für mich immer offen stand.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig 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

.....
(Ina Meiser)

Veröffentlichte Arbeiten

Artikel in Fachzeitschriften (peer-reviewed)

1. Meiser I, Sébastien I, Lorig H, Katsen-Globa H, Gastrock G, Courtney A, De Sousa P, Zimmermann H, Neubauer JC (2013) Towards an automated miniaturized platform-independent screening system based on 3D cultivation of human stem cells in hanging drops. *PLoS One*, *Eingereicht*.
2. Katsen-Globa A, Meiser I*, Petrenko YA, Ivanov RV, Lozinsky VI, Zimmermann H, Petrenko AY (2014) Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 25:857-871.

**äquivalent zum Erstautor*

3. Meiser I, Müller SC, Ehrhart F, Shirley SG, Zimmermann H (2013) A new validation method for clinical grade micro-encapsulation: quantitative high speed video analysis of alginate capsule. *Microsystem Technologies*. Online veröffentlicht am 17.10.2013, DOI: 10.1007/s00542-013-1935-4
4. Afrimzon E, Zurgil N, Shafran Y, Ehrhart F, Namer Y, Moshkov S, Sobolev M, Deutsch A, Howitz S, Greuner M, Thaele M, Meiser I, Zimmermann H, Deutsch M (2010) The individual-cell-based cryo-chip for the cryopreservation, manipulation and observation of spatially identifiable cells. II: Functional activity of cryopreserved cells. *BMC Cell Biol* 11: 83.
5. Deutsch M, Afrimzon E, Namer Y, Shafran Y, Sobolev M, Zurgil N, Deutsch A, Howitz S, Greuner M, Thaele M, Zimmermann H, Meiser I, Ehrhart F (2010) The individual-cell-based cryo-chip for the cryopreservation, manipulation and observation of spatially identifiable cells. I: methodology. *BMC Cell Biol* 11: 54.
6. Meiser I, Shirley SG, Zimmermann H (2009) Kinetic masks: a new approach and device for dispersing biologically relevant fluids. *Microsystem Technologies* 15: 1407-1416.

Artikel in Fachzeitschriften (nicht peer-reviewed)

1. Meiser I, Sébastien I, Neubauer JC (2013) Automatisierungsansätze zur Generierung, Expansion und Anwendung humaner induziert pluripotenter Stammzellen für die regenerative Medizin. *BIOspektrum* 19: 523-526.

Konferenzbeiträge

1. Meiser I, Primavessy DAA, Beier AFJ, Gastrock G, Lemke K, Zimmermann H, Neubauer JC (2013) Segmentierte, geschlossene Mikrobioreaktoren für Hochdurchsatzapplikationen humaner embryonaler Stammzellen. Beitrag zum Mikrosystemtechnik Kongress 2013 Aachen (Nordrhein-Westfalen), 14.-16.10.2013.
2. Meiser I, Gepp MM, Katsen-Globa A, Ehrhart F, Zimmermann H (2012) Automatisierte iPS-Kultur zur Durchführung von Hochdurchsatz-Untersuchungen in 2D und 3D Umgebung. Posterbeitrag zum Partnering Day e:ToP in Berlin (Berlin), 09.11.2012.
3. Meiser I, Lorig H, Gepp MM, Gastrock G, Lemke K, Schulz JC, Zimmermann H (2012) Automatisierte, oberflächenbasierte Kultivierung humaner Stammzellen in miniaturisierten Bioreaktoren. Beitrag zum 16 Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für die

Lebenswissenschaften" in Heilbad Heiligenstadt (Thüringen), Tagungsband ISBN 978-3-00-039458-4: 55-62, 24.-26.09.2012

4. Katsen-Globa A, Meiser I, Pütz D, Cismak A, Heilmann A, Zimmermann H (2010) Looking through the ice: quality control of cryopreserved cells and tissues with cryo focus ion beam scanning electron microscopy. Beitrag zum Cryo-2010 41th Annual Meeting of the Society for Cryobiology in Bristol (England), Cryobiology 61(3):393-394, 17.-20.07.2010.
5. Meiser I, Gepp MM, Kleer S, Katsen-Globa A, Zimmermann H, Ehrhart F (2010) Thin alginate membranes produced by micro-contact printing for tissue engineering. Beitrag zur 44. DGMT Jahrestagung BMT 2010 in Rostock (Mecklenburg-Vorpommern), Tagungsprogramm: 36-38, 05.-08.10.2010.
6. Meiser I, Katsen-Globa A, Wiedemeier S, Kofanova O, Mettler E, Metze J, Weber MM, Zimmermann H (2010) Cryopreservation of artificial and natural pancreatic islets in microsystem-based cryosubstrates. Beitrag zum Cryo-2010 41th Annual Meeting of the Society for Cryobiology in Bristol (England), Cryobiology 61(3):408, 17.-20.07.2010.
7. Metze J, Wiedemeier S, Meiser I, Katsen-Globa A, Zimmermann U, Zimmermann H, Weber MM, Mettler E, Kromminga A, Danzebrink R, David K, Howitz S, Forst T (2010) Nutzung der mikrosystemtechnik für diagnostische Ansätze bei der Diabetesmedikamentenfindung und zur Individualtherapie in der Onkologie. Beitrag zur 10. Chemnitzer Fachtagung Mikrosystemtechnik in Chemnitz (Sachsen), Tagungsband ISBN 978-3-0003-2052-1, 20.10.2010.
8. Wiedemeier S, Grodrian A, Metze J, Meiser I, Katsen-Globa A, Zimmermann H, Zimmermann U, Mettler E, Weber MM, David K (2010) Mikrosysteme für die Medizintechnik und Biotechnologie - durch Nanoliter zur optimierten Kryokonservierung. Beitrag zum 2. GMM Workshop Mikro-Nano-Integration in Erfurt (Thüringen) GMM-Fachbericht 63 ISBN: 978-3-8007-3216-6, 03.-04.03.2010.
9. Meiser I, Müller SC, Zimmermann H, Ehrhart F (2009) Quantitative 3D high speed video analysis of capsule formation during encapsulation processes. Beitrag zum World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering in München (Bayern), IFMBE Proceedings 25(10): 204-207, 07.-12.09.2009.
10. Schulz, JC, Groeber FK, Beier AFJ, Meiser I, Ehrhart F, Zimmermann U, Zimmermann H (2009) Methods for encapsulation and storage of human stem cells in three dimensional alginate aggregates. Beitrag zum World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering in München (Bayern), IFMBE Proceedings 25(10): 222-225, 07.-12.09.2009.
11. Meiser I, Wiedemeier S, David K, Kofanova O, Sébastien I, Weyand E, Metze J, Weber MM, Zimmermann H, Katsen-Globa A (2009) Entwicklung und Evaluierung einer mikrosystembasierten Anlage zur Kryokonservierung von multizellulären Aggregaten. Beitrag zum MikroSystemTechnik Kongress 2009 in Berlin (Berlin), Tagungsband ISBN 978-3-8007-3183-1: 372-375, 12.-14.10.2009.
12. Gepp, MM, Ehrhart, F, Meiser, I, Zimmermann, H (2009): u-Contact-Printing und Piezo-Non-Contact Printing - Zwei Methoden zur Strukturierung von Oberflächen für biotechnologische Anwendungen. Beitrag zum 17. Neues Dresdner Vakuumtechnisches Kolloquium in Dresden (Sachsen), Tagungsband ISBN 978-3-9812550-1-0: 20-24, 21.-22.10.2009.
13. Meiser I, Ehrhart F, Zimmermann H (2008) „Ice Gun“: Vorrichtung zur kontaktfreien Implantation gefrorener lebender Zellen in Geweben für die Medizin. Posterbeitrag zum 2. Dresdner Medizintechnik Symposium in Dresden (Sachsen), 01.-03.12.2008.
14. Meiser I, Müller SC, Gepp MM, Zimmermann H, Ehrhart F (2008) Quantitative High speed video analysis of biopolymer encapsulated cells while capsule formation. Beitrag zur 4th European

- Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering in Antwerpen (Belgien), Tagungsband ISBN 978-3-540-89208-3: 2255-2258, 23.-27.11.2008.
15. Meiser I, Schulz J, Ehrhart F, Shirley SG, Zimmermann H (2008) Dispersing relevant fluids by "kinetic masking" and its applications. Posterbeitrag zur European BioPerspectives 2008 in Hannover (Niedersachsen), 07.-09-10.2008.
 16. Ehrhart F, Meiser I, Graf C, Shirley SG, Zimmermann H, Müller K, Sukhourukov V, Zimmermann U (2007) High speed video analysis of μ -capsule formation for life science applications. Beitrag zum MikroSystemTechnik Kongress 2007 in Dresden (Sachsen), 15.-17.10.2007.
 17. Meiser I, Shirley SG, Zimmermann H, Ehrhart F (2007) Quantitative High Speed Video Analysis to embedding-immobilization with alginates. Beitrag zur 41. DGMT Jahrestagung BMT 2007 in Aachen (Nordrhein-Westfalen), 26.-29.09.2007.
 18. Meiser I, Shirley SG, Baunach JJS, Ehrhart F, Climaco M, Zimmermann H (2007) Kinetic Masks: A new approach and device to metering of biologically relevant fluids. Beitrag zur 41. DGMT Jahrestagung BMT 2007 in Aachen (Nordrhein-Westfalen), 26.-29.09.2007.
 19. Meiser I, Shirley SG, Zimmermann U, Zimmermann H, Ehrhart F (2007) Quantitative high speed video analysis to embedding-immobilization with alginates. Beitrag zum 12 Leipziger Workshop 2007 in Leipzig (Sachsen), Tagungsband ISBN 1552-4922: 530, 19.-21.04.2007.

Vorträge

1. Meiser I, Lorig H, Gepp MM, Gastrock G, Lemke K, Schulz JC, Zimmermann H (2012) Automatisierte, oberflächenbasierte Kultivierung humaner Stammzellen in miniaturisierten Bioreaktoren. Vortrag anlässlich des 16 Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für die Lebenswissenschaften" in Heilbad Heiligenstadt (Thüringen), 24.-26.09.2012.
2. Meiser I, Gepp MM, Kleer S, Katsen-Globa A, Zimmermann H, Ehrhart F (2010) Thin alginate membranes produced by micro-contact printing for tissue engineering. Vortrag anlässlich der 44. DGMT Jahrestagung BMT 2010 in Rostock (Mecklenburg Vorpommern), 05.-08.10.2010.
3. Meiser I, Shirley SG, Baunach JJS, Ehrhart F, Climaco M, Zimmermann H (2007) Kinetic Masks: A new approach and device to metering of biologically relevant fluids. Vortrag anlässlich der 41. DGMT Jahrestagung BMT 2007 in Aachen (Nordrhein-Westfalen), 26.-29.09.2007.