Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Tim Pohlemann

Etablierung eines quantitativen Verfahrens zur Analyse der zellulären Zusammensetzung von Co-Kultur-Sphäroiden auf Basis von Kryoschnitten

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2023

vorgelegt von:
Natalie Dorst
geboren am 04.02.1988
in Homburg/Saar

Meinen Lieben

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	**1**
2. Abkürzungen	**3**
3. Zusammenfassung/ Summary	**5**
4. Einleitung	**9**
4.1 Funktion und Aufbau von Knochen	**9**
4.2 Knochenbildung	**10**
4.3 Frakturheilung	**10**
4.4 Versorgung von schweren Knochenbrüchen	**11**
4.5 Tissue Engineering	**12**
4.6 Angiogenese	**12**
4.7 Verwendete Zelltypen	**13**
4.8 Das Sphäroidmodell	**17**
4.9 Das Sphäroidmodell als Gegenstand der Forschung	**19**
4.10 Fragestellung	**21**
5. Material und Methoden	**22**
5.1 Material	**22**
5.2 Methoden	**26**
5.2.1 Zellkultur	**26**
5.2.2 Versuchsdurchführung im Überblick	**28**
5.2.3 Lebendfluoreszenzfärbung	**28**
5.2.4 Sphäroidherstellung	**32**
5.2.5 Färbung mit Kernechtrot und Einfrieren der Sphäroide	**33**
5.2.6 Schneiden und Fixieren der Sphäroide	**33**
5.2.7 Fluoreszenzmikroskopie	**35**
5.2.8 Rasterelektronenmikroskopie	**37**
5.2.9 Durchflusszytometrie	**39**
5.2.10 Dissoziation der Sphäroide	**40**
5.2.11 Statistik	**42**
6. Ergebnisse	**43**
6.1 Vorversuche zur Lebendfluoreszenzfärbung	**43**
6.2 Qualitative Beurteilung von Sphäroidschnitten	**45**
6.3 Durchmesser- und Flächenvergleich der Sphäroide	**51**
6.3.1 Durchmesser	**51**
6.3.2 Fläche	**54**
6.4 Auswertung der prozentualen Zellflächenanteile	**55**

6.5 FACS-Analyse der dissoziierten Sphäroide	**57**
7. Diskussion	**59**
7.1 Lebendfluoreszenzfärbung	**59**
7.2 Mono-Kultur- und Co-Kultur-Sphäroide	**61**
7.3 Vor- und Nachteile der Kryoschnitte	**62**
7.4 Morphologische Merkmale der Sphäroide	**63**
7.5 Vor- und Nachteile der Axiovision-Software-Auswertung	**67**
7.6 Dissoziation und FACS-Analyse	**68**
7.7 Fazit und Perspektiven	**69**
8. Literaturverzeichnis	**71**
9. Publikationen	**80**
10. Danksagung	**81**
11. Lebenslauf	**82**

2. Abkürzungen

bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BSE	Rückstreuelektronen, *engl. backscattered electrons*
CaCo	Cacodylatpuffer
CMFDA	5-Chloromethylfluorescein Diacetate
CSD	Critical Size Defect
DABCO	1,4-Diazobicyclo[2,2,2]octan
DAH	Differentialadhäsionshypothese
DAPI	4’,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extracellular matrix, *engl. Extrazelluläre Matrix*
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EDX	Energiedispersive Röntgenstrahlen-Analyse, *engl. Energy dispersive X-ray analysis*
ET	Endothelin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum, *engl. Fötales Kälberserum*
FSC	Vorwärtsstreulicht, *engl. forward scatter*
GDA	Glutardialdehyd
HDMEC	Humane dermale mikrovaskuläre endotheliale Zellen
HDMS	Hexamethyldisilazan
HDT	Hanging drop technique
HEMA	Polyhydroxyethylmethacrylat

HOB	Humane Osteoblasten
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell, *engl. Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen*
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LOT	Liquid-Overlay-Technik
MCB	Master Cell Bank
MSC	Mesenchymale Stammzellen
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
OPG	Osteoprotegrin
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered saline, *engl. Phosphat gepufferte Salzlösung*
PFA	Paraformaldehyd
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa-B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
SE	Sekundärelektronen
SMC	Smooth muscle cells
SSC	Seitwärtsstreulicht, *engl. side scatter*
TGF-R	Transforming Growth Factor-Rezeptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-R 1	Vascular endothelial growth factor-Rezeptor 1
VEGF-R 2	Vascular endothelial growth factor-Rezeptor 2

3. Zusammenfassung/ Summary

Die Versorgung von kritisch großen Knochendefekten ist immer noch eine der schwierigen Aufgaben in der Traumatologie. Nach wie vor stellen autologe Knochentransplantate den Goldstandard dar. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit autologer Knochentransplantate ist es ein Ziel des Tissue Engineering, alternative Knochenersatzmaterialien zu entwickeln. Grundsätzlich hängt der Erfolg der Versorgung mit Knochenersatzmaterialien von einer ausreichenden und schnellen Durchblutung ab, um eine adäquate Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Abfallprodukten zu gewährleisten.

Ein vielversprechender Ansatz dabei sind sogenannte Sphäroide, die schon seit Jahrzehnten in der Tumorforschung verwendet werden. Diese 3D-Zellkonstrukte stellen eine Art „Mini-Gewebe“ dar, an dem angiogenetische Prozesse erforscht werden können und die das Potential besitzen, im Rahmen des Tissue Engineering von Knochenersatzmaterialien eingesetzt zu werden. Aufgrund der intensiveren Zell-Zell-Kontakte simulieren sie die in vivo-Situation besser als 2D-Kulturen. Eine umfassende und grundlegende Charakterisierung der Sphäroide stellt eine wichtige Voraussetzung für mögliche zukünftige klinische Anwendungen dar.

Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der zellulären Zusammensetzung in Co-Kultur-Sphäroiden anhand der Auswertung von Kryoschnitten, wobei die einzelnen Zelltypen vorab mit Lebendfluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Hierdurch konnte zum einen die Verteilung der unterschiedlichen Zelltypen innerhalb des Sphäroids zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet werden sowie die Quantifizierung der zellulären Zusammensetzung. Zum anderen sollte festgestellt werden, ob es über einen bestimmten Zeitraum zu Reorganisationen im Sphäroid kommt.

Es wurden Co-Kultur-Sphäroide bestehend aus den drei Zelltypen humane dermale mikrovaskuläre endotheliale Zellen (HDMEC), normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) und humane Osteoblasten (HOB) mittels Liquid-Overlay-Technik (LOT) hergestellt. Zur Diskriminierung der drei Zelltypen wurden die drei Lebendfluoreszenzfarbstoffe CMFDA, PKH26 und CellBrite benutzt. Es wurden Sphäroide unterschiedlicher prozentualer Zusammensetzung, die jeweils aus 10.000 bzw. 50.000 Zellen bestanden, hergestellt (Gruppe I bis III). Die Sphäroide wurden anschließend für einen Tag, drei Tage oder sechs Tage inkubiert. Danach wurden sie eingefroren und Kryoschnitte angefertigt. Zum einen wurde die prozentuale Verteilung der Zellflächenanteile im Sphäroid betrachtet, zum anderen die Veränderung von Durchmesser sowie absoluter Zellfläche über die Zeit. Weiterhin wurden qualitative Beobachtungen bezüglich der Zellverteilung und Besonderheiten in der Zellorganisation innerhalb des Sphäroids durchgeführt. Die gewonnenen Daten zur Bestimmung der Zellanteile wurden nach erfolgreicher Dissoziation der Sphäroide in

Einzelzellen zusätzlich durch FACS™-Analysen (fluorescence activated cell sorting) als alternative Methode überprüft.
Durch Vermessung der Zellflächenanteile zeigte sich, dass die prozentualen Verteilungen der Zellen von Tag 1 bis Tag 6 relativ stabil blieben. Sowohl die Sphäroiddurchmesser als auch die absolute Sphäroidfläche nahmen über die Zeit ab. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Durchmessern vitaler Sphäroide und den Durchmessern der Kryoschnitte.
Bei der FACS-Analyse von dissoziierten Sphäroiden war eine deutliche Abnahme der Zahl der HDMEC bei gleichzeitiger Zunahme der Zahl der NHDF mit zunehmendem Sphäroidalter zu erkennen.
Weiterhin zeigten sich für bestimmte Zelltypen charakteristische Zellverteilungen im Sphäroid. So lagen die HDMEC sowohl in der Gruppe I als auch II flächig über das Sphäroid verteilt mit randständig etwas kompakterer Lage. Mit zunehmendem Sphäroidalter kam es bei den HDMEC zu einer leichten Zunahme zellfreier Areale. Die NHDF und die HOB zeigten in den Gruppen I und II eine ähnliche Verteilung. An Tag 1 lagen die Zellen am Rand dicht gepackt mit deutlich mehr zellfreien Bereichen zur Mitte des Sphäroids. In Gruppe III zeigten die HOB über die gesamte Zeit eine homogene Verteilung. Die HDMEC und NHDF zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster wie in den Gruppen I und II.
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Lebendfluoreszenzfärbung einige Vorteile aufweist. Die Färbung ist beim Betrachten unter dem Fluoreszenzmikroskop stabil und beeinträchtigt nicht die Vitalität der Zellen. Außerdem ist die Diskriminierung unterschiedlicher Zelltypen problemlos möglich. Auch das Anfertigen von Kryoschnitten ist wenig zeitaufwändig und relativ einfach durchführbar. Jedoch ist die Methode invasiv und hat Limitierungen. Die teilweise hohen Standardabweichungen bei der Bestimmung der Zellflächenanteile könnten durch die leicht unterschiedliche Dicke der Kryoschnitte erklärt werden. Weiterhin zeigten manche Sphäroide ein zellfreies Zentrum. Dies könnte durch Verlust von Zellen beim Schneidevorgang erklärbar sein. Daher wäre das Testen einer weiteren Schneidemethode z.B. Paraffinschnitte zum Vergleich sinnvoll. Die FACS™-Analyse von dissoziierten Sphäroiden stellt eine alternative, aber auch synergistische Methode zur Analyse der Zellflächenanteile dar. Die Dissoziationsbedingungen müssen jedoch optimal gewählt werden, da zu stringente Bedingungen die Zellvitalität negativ beeinflussen können.
Zusammenfassend stellt die Sphäroidforschung ein vielversprechendes Forschungsgebiet beispielsweise im Tissue Engineering und der Angiogeneseforschung dar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine reproduzierbare Methode zu entwickeln, um die zellulären Vorgänge im Sphäroid darzustellen und damit zur weiteren Erforschung der Sphäroide beizutragen.

Summary

The treatment of critical sized defects of bones is still one of the difficult tasks in traumatology. Autologous bone grafts still represent the gold standard. Due to the limited availability of autologous bone grafts, one goal of tissue engineering is to develop alternative bone graft substitutes. Basically, the success of tissue engineered bone grafts depends on sufficient and rapid blood flow to ensure adequate supply of oxygen and nutrients as well as removal of metabolic end products.

So-called spheroids, which have been used in tumor research for decades, are a promising approach in this regard. These 3D cell constructs represent a kind of "mini-tissue" on which angiogenic processes can be studied and which have the potential to be used in the tissue engineering of bone replacement materials. Due to the more intensive cell-cell contacts, they simulate the in vivo situation better than 2D cultures. A comprehensive and fundamental characterization of the spheroids represents an important prerequisite for possible future clinical applications.

The aim of this medical doctoral thesis was to establish a method for the quantitative determination of cellular composition in co-culture spheroids based on the evaluation of cryosections, where mono-cultures of the used cell types were stained with fluorescent dyes for living cell prior to the generation of spheroids. This allowed, on the one hand, the distribution of the different cell types within the spheroid at different time points to be observed as well as the quantification of the cellular composition. Second, to determine whether reorganizations occur in the spheroid over a period of time.

Co-culture spheroids consisting of the three cell types, human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC), normal human dermal fibroblasts (NHDF), and human osteoblasts (HOB) were prepared by liquid overlay technique (LOT). Three live fluorescent dyes, CMFDA, PKH26 and CellBrite, were used to discriminate the three cell types. Spheroids of different cellular compositions, each consisting of 10,000 or 50,000 cells, were prepared (group I to III). The spheroids were then incubated for one day, three days, or six days. They were then frozen and cryosections were made. On the one hand, the percentage distribution of cell area fractions in the spheroid was observed, and on the other hand, the change in diameter as well as absolute cell area over time. Furthermore, qualitative observations were made regarding cell distribution and peculiarities in cell organization within the spheroid. After successful dissociation of the spheroids into single cells, the data obtained for the determination of the cell area fractions were additionally verified by FACS™ (fluorescence activated cell sorting) analyses as an alternative method.

By measuring the cell area percentages, it was found that the percent distributions of the cells remained relatively stable from day 1 to day 6. Both, spheroid diameters as well as absolute

spheroid area decreased over time. There were no significant differences between vital spheroid diameters and diameters of the cryosections.
FACS™ analysis of dissociated spheroids showed a significant decrease in the number of HDMEC with a concomitant increase in the number of NHDF over time.
Furthermore, characteristic cell distributions in the spheroid were evident for certain cell types. Thus, the HDMEC in both, group I and II, were distributed over the spheroid with a somewhat more compact position at the edges. With increasing spheroid age, the HDMEC showed a slight increase in cell-free areas. The NHDF and HOB showed a similar distribution in groups I and II. On day 1, the cells were densely packed at the edge with significantly more cell-free areas toward the center of the spheroid. In group III, the HOB showed a homogeneous distribution throughout the time. The HDMEC and NHDF showed a similar distribution pattern as in groups I and II.
In conclusion, live fluorescence staining has some advantages. The staining is stable when viewed under the fluorescence microscope and does not affect the viability of the cells. In addition, discrimination of different cell types is easily possible. The preparation of cryosections is also not very time consuming and relatively easy to perform. However, the method is invasive and has limitations. The sometimes high standard deviations in the determination of cell area fractions could be explained by the slightly different thickness of the cryosections. Furthermore, some spheroids showed a cell-free center. This could be explained by loss of cells during the cutting process. Therefore, testing another cutting method e.g., kerosene sections would be useful for comparison. FACS™ analysis of dissociated spheroids represents an alternative, but also synergistic, method to analyze cell area fractions. However, dissociation conditions must be chosen optimally, as overly stringent conditions can negatively affect cell viability.
In summary, spheroid research represents a promising field of research in, for example, tissue engineering and angiogenesis research. The aim of the present work was to develop a reproducible method to visualize the cellular processes in the spheroid and thus contribute to further research on spheroids.

4. Einleitung

4.1 Funktion und Aufbau von Knochen

Das Skelett hat vielseitige Aufgaben, wie z.B. Lasttragen, Bewegung sowie Schutz der Organe. Außerdem stellt der Knochen den größten Speicher für Kalzium im Körper dar, wodurch die Kalzium-Homöostase gewährleistet wird. Knochen besitzt, abgesehen vom Lebergewebe, die Eigenschaft ohne Narbenbildung zu verheilen. Es werden zwei Arten von Knochen unterschieden, zum einen Geflechtknochen, der nur in der Knochenentwicklung und während Reparaturprozessen auftritt und zum anderen Lamellenknochen (Kneser et al. 2006). Die Baueinheit des Lamellenknochens ist das Osteon. Dieses besteht aus dünnen Knochenlamellen, die um einen zentralen Kanal, den Havers-Kanal, angeordnet sind. Diese Lamellen bestehen aus der Knochengrundsubstanz, in die die Osteozyten eingelagert sind. Die Osteone können untereinander mittels Volkmann-Kanälen verbunden werden. Diese Volkmann-Kanäle kommunizieren miteinander, mit der Markhöhle und der Knochenhaut, dem Periost. In ihnen verlaufen die versorgenden Gefäße (Clark 2008). Weiterhin finden sich auch transkortikale Kapillaren, welche am gesamten Knochenschaft vorkommen und den Blutaustausch zwischen dem Periost und dem Knocheninneren sicherstellen (Grüneboom et al. 2019).

Der Lamellenknochen besteht aus der Substantia compacta oder Kortikalis und der Substantia spongiosa. Die Kompakta macht einen Anteil von ca. 85% des Skeletts aus und zeigt die typische Osteonen-Struktur. Die Spongiosa macht hingegen nur ca. 15% des Skeletts aus und findet sich im Inneren des Knochens. Sie ist schwammartig aus kleinen Knochenbälkchen, den sogenannten Trabekeln, aufgebaut. Zwischen diesen Trabekeln liegt das Knochenmark. Der Knochen ist außen vom Periost und innen vom Endost überzogen (Kneser et al. 2006).

Der Knochenaufbau und -umbau wird von den Osteoblasten, der Knochenabbau von den Osteoklasten vorgenommen.

Die nicht mineralisierte Knochengrundsubstanz, welche überwiegend aus Kollagen Typ 1 besteht, nennt sich Osteoid. Sie enthält weiterhin auch Osteocalcin, Glykoproteine, Proteoglykane und Sialoproteine, welche eine große Rolle in der Regulierung von Wachstum und Differenzierung von Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten spielen. Wenn Osteoblasten in der Knochengrundsubstanz eingeschlossen werden und mineralisierte Knochenmatrix bilden, werden sie zu Osteozyten. Die Osteozyten sind umschlossen von Knochen und wirken dem Abbau des Knochens durch die Osteoklasten entgegen. Die mineralisierte Knochenmatrix besteht zu großen Teilen aus Hydroxylapatit, Karbonaten und Fluoriden (Kneser et al. 2006, Creecy et al. 2021).

4.2 Knochenbildung

Man unterscheidet desmale (direkte) und enchondrale (indirekte) Ossifikation.
Bei der desmalen Ossifikation bildet sich der Knochen direkt aus embryonalem Bindegewebe, dem Mesenchym. Die Mesenchymzellen lagern sich aneinander und differenzieren zu osteogenen Vorläuferzellen. Diese Vorläuferzellen differenzieren dann zu Osteoblasten, welche zunächst nicht-mineralisierte Knochensubstanz (Osteoid) bilden. Durch die nachfolgende Aktivität der Osteoblasten wird das Osteoid kontinuierlich mineralisiert und verkalkt. Desmale Ossifikation findet embryonal bei der Bildung von Schädeldach (Os frontale, Os parietale, Os occipitale, Teile des Os temporale), des Gesichtsschädels (Teile der Mandibula und Maxilla) sowie von Teilen der Clavicula statt (Kronenberg 2003, Berendsen und Olsen 2015).
Bei der enchondralen Ossifikation entsteht der Knochen über einen Zwischenschritt. Daher nennt man diese Form der Ossifikation auch indirekte Ossifikation. Zunächst wird embryonal aus mesenchymalem Gewebe ein Knorpelmodell des späteren Knochens gebildet. Dieses Knorpelmodell wird Primordialskelett genannt und wird später durch Knochensubstanz ersetzt. Im Bereich der späteren Diaphysen bildet sich zunächst durch desmale Ossifikation die enchondrale Knochenmanschette. Nach Einwandern diverser Zellen und Einsprießen von Blutgefäßen entwickeln sich hier primäre Ossifikationszonen. Im Bereich der späteren Epiphysen entwickeln sich sekundäre Ossifikationszonen. Hierdurch entstehen zwischen den Ossifkationszonen die Epiphysenfugen, welche das Längenwachstum des Knochens ermöglichen. Durch die enchondrale Ossifikation entstehen z.B. die langen Knochen der Extremitäten. (Ducy et al. 2000, Kronenberg 2003, Berendsen und Olsen 2015).

4.3 Frakturheilung

Wird durch ein Trauma Knochen sowie das muskuloskelettale System verletzt, kommt es zur Zerstörung der Blutgefäße und damit zu Hypoxie der umliegenden Gewebe und akuter Nekrose. Durch die Blutgefäßverletzung wird die Gerinnungskaskade aktiviert, wodurch sich ein Hämatom bildet. Weiterhin werden Zytokine und Wachstumsfaktoren sezerniert, welche Osteoprogenitorzellen, Fibroblasten, mesenchymale Stammzellen sowie inflammatorische Zytokine zur Bruchstelle rekrutieren (Kanczler und Oreffo 2008). Die mesenchymalen Stammzellen wandern zusammen mit neu einwachsenden Kapillaren in die Wundregion ein. Während des Heilungsprozesses werden manche Stammzellen in Knochenvorläuferzellen und andere in endotheliale Vorläuferzellen, so genannte Angioblasten, umgewandelt (Uchida et al. 2003).

An den Frakturrändern wird das vorübergehend gebildete Granulationsgewebe durch Faserknorpel ersetzt, wodurch der weiche innere Kallus entsteht. Als letzter Schritt der Knochenheilung wird der Kallus in einen sekundären Kallus, der aus Lamellenknochen besteht, umgewandelt und die Kallusgröße der Knochengröße angepasst (Carano und Filvaroff 2003, Loeffler et al. 2018).

4.4 Versorgung von schweren Knochenbrüchen

Die Behandlung von großen Knochendefekten, sogenannten „Critical size defects“ (CSD), stellt auch heute noch eine schwierige Aufgabe in der Traumatologie dar. Es sind mehrere Definitionen des CSD bekannt. So definierten 1986 Schmitz und Hollinger den CSD als einen Knochendefekt, der in der Lebendzeit eines Individuums nicht mehr heilen wird (Schmitz und Hollinger 1986). Der CSD wird auch als ein Defekt bezeichnet, der ohne eine Intervention nicht heilen wird (Spicer et al. 2012). Als Richtwert für die Größe eines CSDs wird ein Verlust von mehr als 50 % des Knochenumfangs oder ein segmentaler Defekt von 1 bis 2 cm Größe in der Literatur angegeben (Nauth et al. 2018).
Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, solche Defekte zu versorgen (Perry 1999), jedoch stellt das spongiöse oder kortikospongiöse Autograft, also ein Transplantat aus körpereigenem Gewebe, den Goldstandard in der Behandlung dar, denn es besitzt drei für die Knochenregeneration wichtige Eigenschaften: Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenität bei gleichzeitigem minimalem Infektionsrisiko.
Osteoinduktion beschreibt die Fähigkeit einer Substanz, die Differenzierung knochenproduzierender Zellen anzuregen. Osteokonduktion bedeutet, dass ein Transplantat als Leitschiene zum Einwachsen neu gebildeten Knochens dienen kann und unter Osteogenese versteht man die Fähigkeit von Zellen oder Geweben, eigenständig Knochensubstanz zu produzieren (Albrektsson und Johansson 2001, Bernstein et al. 2009). Jedoch stellen die hohe Morbidität und die begrenzte Verfügbarkeit einen enormen Nachteil der Autografts dar (Gazdag et al. 1995, Perry 1999).
Abgesehen von autologen Transplantaten, können auch allogene Implantate, d.h. von einem anderen Individuum derselben Spezies, oder xenogene Implantate, d.h. von einem Individuum einer anderen Spezies, verwendet werden. Hier besteht ein Nachteil darin, dass eventuell Krankheiten übertragen werden können oder es zu Abstoßungsreaktionen kommen kann (Kanczler und Oreffo 2008). Weitere mögliche Transplantate stellen Keramik, demineralisierte Knochenmatrix, Knochenmark sowie Komposits dar. Als Komposit bezeichnet man die Kombination einer osteoinduktiven Matrix mit einem osteogenen oder osteoinduktivem Material (Gazdag et al. 1995). Jedoch haben alle diese Implantate geringe osteogene, osteoinduktive sowie osteokonduktive Eigenschaften und müssen daher je nach

Verwendungsgebiet aufeinander abgestimmt werden. Auch sind mechanische Eigenschaften zu beachten.
Eine weitere Möglichkeit zur Transplantatgenerierung könnte das Tissue Engineering von Knochenersatzmaterialien darstellen. Dieses scheint wissenschaftlich interessant, findet jedoch aktuell noch keine klinische Anwendung und stellt daher noch Grundlagenforschung dar.

4.5 Tissue Engineering

Tissue Engineering vereint die Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften und ist damit ein interdisziplinäres Forschungsfeld, welches sich mit der Entwicklung von Ersatzgeweben beschäftigt. Ziel ist es, die Funktion von Geweben wiederherzustellen, beizubehalten oder zu verbessern (Kneser et al. 2006). Grundlage für das Tissue Engineering von Knochenersatzmaterialien sind zum einen Gerüste (Scaffolds), die mechanische Unterstützung bieten und als primäres Substrat die Anlagerung von Zellen gewährleisten. Abgesehen davon werden auch unterschiedlichste osteogene Zellen, z.B. mesenchymale Stammzellen, Knochenmarkszellen, periostale Zellen oder Osteoblasten, sowie auch osteoinduktive Faktoren, wie z.B. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) benötigt (Kneser et al. 2006). BMPs sind mitunter die wirksamsten osteoinduktiven Faktoren. Sie gehören zu der Transforming Growth Factor- Familie (TGF) und binden an unterschiedliche Bestandteile der Extrazellulärmatrix (ECM), wie z.B. Heparinsulfat und Typ IV-Kollagen.
Einer der wichtigsten Punkte im Tissue Engineering von Knochenersatzmaterial bleibt die adäquate und schnelle Durchblutung. Kleinere Strecken von ca. 200 µm können per Diffusion überbrückt werden, das Überleben von Zellen im Inneren von größeren Zellkonstrukten ist auf Grund der suboptimalen Vaskularisierung oft schlecht (Kneser et al. 2006, Laschke et al. 2006).

4.6 Angiogenese

Sowohl im Tissue Engineering von Knochenersatzmaterialien als auch in der Skelettentwicklung und Frakturheilung, stellt die Angiogenese einen bedeutenden Prozess dar (Wenger et al. 2004).
Unter Angiogenese versteht man die Bildung von Blutgefäßen aus bereits existierenden Blutgefäßen. Davon abzugrenzen ist die Vaskulogenese, die die Bildung von Blutgefäßen aus endothelialen Progenitorzellen bezeichnet und während der Embryonalentwicklung eine große Rolle spielt. Unter Einfluss diverser Wachstumsfaktoren (z. B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) bilden sich Vorläufer der Blutzellen sowie des Endothels (Folkman und

D´Amore 1996, Risau 1997). Die endothelialen Vorläuferzellen kommen auch beim erwachsenen Menschen im Knochenmark sowie im Blut vor und werden auch durch unterschiedliche Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF, Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) zur Differenzierung und Mobilisation stimuliert (Carmeliet 2000).

Ab der späten fetalen Phase werden neue Gefäße mit Hilfe von Endothelzellen aus schon bestehenden Blutgefäßen gebildet, d.h. es erfolgt Angiogenese. Durch den Einfluss von VEGF wird die Permeabilität der Gefäßwand verstärkt, sodass Matrixproteine austreten können, um ein provisorisches Fibringerüst für auswandernde Endothelzellen zu bilden. Diese müssen sich aus ihrer Umgebung lösen, was vermutlich mit Hilfe von Angiopoietin 2, sowie einer Reihe von Proteinasen, Matrix Metalloproteasen oder Chymasen geschieht (Carmeliet 2000).

Beim Auswandern der Endothelzellen während der Angiogenese kommt es zur Spezialisierung von Tip- und Stalk-Zellen. Je eine Tip-Zelle ist an der Spitze neuer Gefäße lokalisiert und bildet lange Zellfortsätze. Dadurch bestimmt sie die Wachstumsrichtung des Gefäßes. Die Tip-Zellen werden durch parakrine Signale aus dem umgebenden Gewebe oder von verletzten Zellen oder Tumorzellen aktiviert, wenn vermehrt Sauerstoff oder Nährstoffe benötigt werden (Vakhrushev et al. 2021). Den Tip-Zellen folgen die Stalk-Zellen, welche im späteren Verlauf das Gefäßlumen bilden und proliferieren. Im Gegensatz zu den Tip-Zellen bilden sie keine Zellfortsätze aus. Beide Zelltypen werden durch VEGF in ihrem Wachstum und ihrer Migration beeinflusst (Gehardt et al. 2003, Del Toro et al. 2010).

Um die Gefäßwand zu stabilisieren, werden eine Reihe von Zelltypen benötigt, z.B. Perizyten, Fibroblasten oder Smooth Muscle Cells (SMC). Die Rekrutierung von SMCs wird durch VEGF gesteuert (Carmeliet 2000, Laschke et al. 2006).

4.7 Verwendete Zelltypen

Das Tissue Engineering stellt eine aussichtsreiche wissenschaftliche Vision zur Therapie des CSD dar. Hierbei spielen osteogenes und angiogenes Potential eine gleichermaßen wichtige Rolle. Daher ist die Etablierung eines Co-Kultur-Sphäroidmodells, bestehend aus Osteoblasten, Fibroblasten und Endothelzellen zur Erforschung von Osteogenese- und Angiogeneseprozessen von großem Interesse.

So spielen beispielweise Fibroblasten und Osteoblasten bei Knochentransplantaten eine große Rolle. Wenn die Oberfläche des Knochentransplantats hauptsächlich durch Fibroblasten besiedelt wird, kann es zur Verkapselung und dadurch zu Implantatversagen kommen (beispielsweise Mikrobewegungen durch mangelnde Osseointegration und aseptische Lockerung). Die unmittelbare Anlagerung von Osteoblasten hingegen führt zu Knochenbildung und stabiler Osseointegration. Daher wäre es von großer Bedeutung, das

Zusammenspiel zwischen Fibroblasten und Osteoblasten besser zu verstehen (Anderson 2001). Dies hat uns unter anderem dazu motiviert, in dieser Arbeit zusätzlich zu den HDMEC auch NHDF und HOB im Co-Kultur-Sphäroid zu untersuchen.
Weiterhin ist auch die Interaktion von Endothelzellen mit Osteoblasten von großer Bedeutung für das Tissue Engineering. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass HDMEC in Co-Kultur mit Osteoblasten auf Scaffolds kultiviert, in der Lage sind, Mikrokapillar-ähnliche Strukturen zu bilden, ohne, dass dafür Wachstumsfaktoren zugegeben werden müssen. In Co-Kultur sind die HDMEC außerdem dazu in der Lage, längere Zeiträume zu überleben als in Mono-Kultur (Unger et al. 2007). Diese Beobachtungen könnten zum Teil dadurch erklärt werden, dass sowohl Endothelzellen als auch Osteoblasten in Co-Kultur Wachstumsfaktoren bilden, die den jeweils anderen Zelltyp beeinflussen. So produzieren die HDMEC Wachstumsfaktoren wie BMP-2, Endothelin-1 (ET-1) oder IGF-1, welche die Proliferation von Osteoblasten sowie die Differenzierung von Knochenvorläuferzellen beeinflussen (Bouletreau et al. 2002, von Schroeder et al. 2003). Osteoblasten produzieren große Mengen an VEGF, welches Überlebensdauer, Proliferation, Differenzierung sowie das angiogene Potential der Endothelzellen in vitro steigert (Deckers et al. 2002, Furumatsu et al. 2003). Diese Effekte beruhen auf direkten Zell-Zell-Kontakten. Diese Effekte werden mit konditioniertem Medium nur deutlich reduziert hervorgerufen (Unger et al. 2007, Burguera et al. 2010).

Osteoblasten

Osteoblasten sind Zellen, die für die Knochenbildung verantwortlich sind. Der Knochen wird in einem dynamischen Prozess umgebaut, wobei Osteoblasten den Knochen auf- und Osteoklasten den Knochen abbauen. Osteoblasten sind mesenchymalen Ursprungs und differenzieren durch den Einfluss unterschiedlicher Wachstumsfaktoren, insbesondere durch den Einfluss von BMPs. Diesen Prozess nennt man osteogene Differenzierung. Mit zunehmender Bildung von Knochenmatrix werden die Osteoblasten eingeschlossen, diese Zellen nennt man dann Osteozyten. Weiterhin regen sie über den RANK/RANKL-Signalweg (Receptor activator of NF-κB/ Receptor activator of NF-κB Ligand) Monozyten zur Differenzierung zu Osteoklasten an, wodurch diese Knochen resorbieren. Durch Inhibierung von RANKL durch Osteoprotegrin (OPG) wird die Differenzierung in Osteoklasten und damit die Knochenresorption gehemmt (Caetano-Lopes et al. 2007).
Anhand einer Reihe von Zell-Modellen wie beispielweise primären Zellen unterschiedlicher Spezies oder immortalisierten Zellen (z. B. SaOs, MG-63) kann die Zellbiologie der Osteoblasten erforscht werden. Alle Modelle haben spezifische Vor- und Nachteile (Czekanska et al. 2012). Vorteile der primären humanen Zellen sind, dass sie menschlichen Ursprungs sind, wodurch sie die Situation im menschlichen Organismus besser widerspiegeln

als Zellen anderer Spezies und dass sie ihr Differenzierungspotential in vitro beibehalten. Nachteile der primären humanen Osteoblasten sind, dass ihr Proliferationskapazität in vitro begrenzt ist und dass viele Faktoren das Zellverhalten beeinflussen, wie z.B. das Alter sowie Geschlecht des Zell-Spenders, der Entnahmeort der Zellen oder allgemeine spenderspezifische Unterschiede (Notingher et al. 2004, Czekanska et al. 2012).

Primäre Zellen von Tieren haben den Vorteil, dass sie in großen Mengen aus Tieren mit denselben Eigenschaften (Alter, Geschlecht, Entnahmeort) verfügbar sind. Nachteilig wirken sich jedoch die Unterschiede zwischen den Spezies Mensch-Tier aus. Es können Zellen aus Mäusen, Ratten, Kaninchen, Schweinen oder Kühen verwendet werden (Czekanska et al. 2012).

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von Zelllinien, das bedeutet eine Zellkultur aus immortalisierten Zellen. Immortalisierte Zellen können ohne Begrenzung weiter vermehrt werden. Zelllinien bieten eine homogene Population von Zellen, spiegeln jedoch nicht vollständig das Verhalten von primären Zellen wider. Beispielsweise ist die Proliferation von malignen Zelllinien nicht-physiologisch, weil die Kontaktinhibition gestört ist (Czekanska et al. 2012).

Viele Faktoren beeinflussen das Zellverhalten in vitro. Unter anderem ist das Zellverhalten vor allem davon abhängig, ob Zellen in 2D- oder 3D-Kultur kultiviert werden. Die Interaktion der Zellen mit der ECM und dem Zytoskelett mittels Transmembranproteinen, welche notwendig ist für Proliferation, Bewegung und Zelldifferenzierung sowie der direkte Zellkontakt zu anderen Zelltypen ist in der 3D-Kultur ausgeprägter als in der 2D-Kultur (Czekanska et al. 2012, Chitcholtan et al. 2013). So konnte gezeigt werden, dass HOBs, die in direktem Zellkontakt mit HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) stehen, die Expression der alkalischen Phosphatase, welche ein Marker für die frühe osteogene Differenzierung ist, erhöhen (Steiner et al. 2012). Nicht nur direkte Zell-Zell- oder Zell-ECM-Kontakte spielen eine wichtige Rolle, sondern auch der Einfluss von Wachstumsfaktoren. So zum Beispiel erhöht VEGF die Proliferation von HOB und verstärkt in leichtem Maße die Expression von alkalischer Phosphatase (Steiner et al. 2012).

Synergetische Effekte der direkten Co-Kultivierung von Zellen bestehen auch in anderen Bereichen, z. B. wird die Apoptose, d.h. der programmierte Zelltod sowohl durch direkte als auch indirekte Co-Kultivierung von HUVEC und HOB beeinflusst. Sowohl HOB, die in direktem Kontakt mit HUVEC stehen, aber auch HOB, die nur in konditioniertem Medium wachsen, haben eine geringere Apoptoserate als solche, die in Monokultur wachsen (Steiner et al. 2012).

Fibroblasten

Fibroblasten stellen den vorherrschenden Zelltyp des Bindegewebes dar. Sie sind ebenfalls mesenchymalen Ursprungs und zu ihren Aufgaben gehört die Synthese der ECM, die Sezernierung einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren sowie die Regulation von Immun- und Entzündungsreaktionen (Hillmann et al. 1999, Cleays et al. 2020). Daher können an Fibroblasten unter anderem Prozesse, die zur Bildung und Organisation der ECM beitragen, gut erforscht werden. Interessanterweise unterscheidet sich beispielsweise die Kollagensynthese von Fibroblasten, die in 2D-Kultur wachsen zu Fibroblasten in vivo. In der 2D-Kultur wird mehr Kollagen durch die Fibroblasten gebildet als in vivo (Weber et al. 1986, Hillmann et al. 1999). Die gebildeten Kollagenfibrillen weisen in der 3D-Kultur eine parallel organisierte Struktur auf. Auch können Fibroblasten in der 3D-Kultur vermehrt Ausläufer zu benachbarten Zellen bilden, wodurch es zu intensiven Zell-Zell-Kontakten kommt (Hillmann et al. 1999).
Fibroblasten zeichnen sich nicht nur durch ihre Fähigkeit zur Bildung der ECM aus, sondern regulieren Immun- und Entzündungsreaktionen z.B. bei der Wundheilung und sind außerdem in der Lage in somatische Zellen wie beispielsweise osteogene Zellen zu differenzieren (Cleays et al. 2020). Unter Einfluss von Vitamin D kommt es zu einer verstärkten Bildung von alkalischer Phosphatase, einem Marker für osteogene Differenzierung. Dadurch nehmen sie eine wichtige Rolle im Knochen Tissue Engineering ein (Hee und Nicoll 2006).

Endothelzellen

Endothelzellen kleiden alle Blutgefäße des menschlichen Körpers aus und bilden eine strukturell und funktionell sehr heterogene Gruppe von Zellen (Augustin et al. 1994).
Große Blutgefäße sind anatomisch aus drei Schichten aufgebaut: der Tunica interna (Intima), der Tunica media (Media) und der Tunica externa/adventitia (Adventitia). Die Intima bildet die innerste Schicht der Arterien, Venen und Lymphgefäße und besteht aus einer Schicht von Endothelzellen. Diese liegen auf einer Basalmembran, die hauptsächlich aus Kollagenfibrillen und Proteinen besteht. Die Media besteht aus einer Muskelschicht, die je nach Gefäßtyp mehr oder weniger ausgeprägt ist. Die Adventitia schließlich besteht aus lockerem Bindegewebe. Bei kleinen Gefäßen, wie Kapillaren, Arteriolen und Venolen, folgt auf eine Endothelzellschicht die Basalmembran, die wiederum von Perizyten bedeckt wird. Diese spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf Stabilisierung, Funktion und Wachstum dieser kleinen Blutgefäße Die Schicht von Endothelzellen ist so dünn, dass hier Sauerstoff, Wasser und Lipide, aber auch Abfallstoffe hindurch diffundieren können (Armulik et al. 2005).

Endothelzellen sind nicht nur am Aufbau von Blutgefäßen beteiligt und bilden eine antithrombotische Blutgefäßoberfläche, sondern haben auch eine Reihe metabolischer Funktionen, wie z.B. Koagulation, Thrombolyse, Kontrolle des Gefäßtonus, Antigenpräsentation sowie Synthese von Basalmembran und Wachstumsfaktoren (Augustin et al. 1994). Außerdem bilden Endothelzellen unterschiedliche Endothelarten. In Organen, wo sie wichtige Barrierefunktionen übernehmen müssen, wie im Gehirn oder der Lunge, bilden sie ein kontinuierliches Endothel. In anderen Organen können sie fenestriertes oder diskontinuierliches Endothel ausbilden (Augustin et al. 1994).
Ein Großteil der in der Literatur beschriebenen Zell-Experimente basieren auf 2D-Kultur, jedoch verlieren die Zellen dadurch viele ihrer differenzierten Zellfunktionen, was wiederum die Erforschung dieser Funktionen sehr einschränkt. Abgesehen davon können fehlende Zell-Zell-Kontakte zur Apoptose führen, welche durch Zugabe von Wachstumsfaktoren (wie VEGF oder FGF-2) nur eingeschränkt verhindert werden kann. Wenn die Zellen jedoch die Möglichkeit haben, intensive Zell-Zell-Kontakte auszubilden, werden sie wieder für Wachstumsfaktoren empfänglich (Korff und Augustin 1998).

4.8 Das Sphäroidmodell

Zellen werden seit Jahrzehnten in 2D-Kulturen kultiviert. Sehr viele wissenschaftliche Erkenntnisse in Bezug auf die Zellbiologie konnten durch diese Art der Zellkultur erlangt werden. Wenn man die zelluläre Organisation der Zellen im Gewebe näher betrachtet, werden auch die Nachteile der 2D-Kultur offensichtlich. In Geweben stehen die Zellen in engem Kontakt zueinander oder zur ECM, wodurch sowohl direkte Zell-Zell-Kontakte als auch Zell-Matrix-Kontakte ermöglicht werden. Diese zelluläre Interaktion ist essenziell für die natürliche Funktion der Zellen (Achilli et al. 2012, Fennema et al. 2013).
Sphäroide als 3D-Zellkonstrukte stellen das in vivo Verhalten von Zellen besser dar als die 2D-Kultur. So sind in der 3D-Kultur ähnliche Genexpressionsmuster detektierbar wie in vivo (Friedrich et al. 2009). Die Möglichkeit, unterschiedliche Zellen im Sphäroid miteinander zu kombinieren, lässt die Zellkulturbedingungen denen in vivo ähneln (Breslin und O`Driscoll 2012).
Sphäroide entstehen aus Zellsuspension durch Selbstorganisations-Prozesse. Die Differentialadhäsionshypothese (DAH), welche bereits 1962 von Steinberg postuliert wurde, besagt, dass Zellen in Suspension sedimentieren und sich beim Zusammenlagern zum Sphäroid je nach Ausprägung von Oberflächenadhäsionen, energetisch günstig organisieren (Foty und Steinberg 2013).
Es werden multiple Methoden zur Sphäroidgenerierung in der Literatur beschrieben (Santini und Rainaldi 1999, Breslin und O`Driscoll 2012). Zum einen wird die Hanging drop-Methode

(HDT) angewendet (Abb. 1 A). Dabei wird ein Tropfen einer Zellsuspension auf den Deckel einer Petrischale pipettiert, welcher dann umgekehrt auf der unteren Hälfte der Petrischale platziert wird. Dadurch sedimentieren die Zellen im Tropfen, an der Grenzfläche Medium-Luft, und wachsen aneinander fest. Die HDT ist einfach durchführbar und zeigt für manche Zelllinien auch eine gute Rate an gebildeten Sphäroiden. Die Sphäroide sind dicht gepackt und variieren wenig in der Größe. Schwierigkeiten bei dieser Methode sind jedoch das begrenzte Volumen der einzelnen Tropfen, sowie die Schwierigkeit, Medium zu wechseln (Breslin und O`Driscoll 2012). Außerdem ist die Methode, Sphäroide mittels HDT herzustellen, nicht für alle Zelltypen geeignet. Es scheint schwierig zu sein, Sphäroide reproduzierbar aus HOB, NHDF oder HDMEC mittels HDT herzustellen (Metzger et al. 2011).

Darüber hinaus gibt es auch dynamische Zellkulturansätze (kontinuierliche Rühren der Zellsuspension, Bewegung des Zellkulturgefäßes in sogenannten Spinner-Flaschen). Hierdurch werden die Zellen am Festwachsen gehindert (Abb. 1 B und C). Spinner-Flaschen sind eine sehr einfache Methode, große Mengen an Sphäroiden herzustellen und ermöglichen durch einfache Mediumwechsel eine sehr lange Kulturdauer. Durch das permanente Mixen der Zellsuspension kommt es jedoch zu starken Scherkräften am Sphäroid, wodurch die Zellphysiologie negativ beeinflusst werden kann. Weiterhin ist das Herstellen von Sphäroiden gleicher Größe schwierig.

Die LOT stellt eine weitere Methode dar (Yuhas et al.1977, Santini und Rainaldi 1999, Metzger et al. 2011). Hierbei bilden sich Sphäroide durch Aufbringen der Zellsuspension auf eine mittels Agar oder Agarose beschichtete nicht-adhäsive Kulturfläche (Abb. 1 D). Eine neuere Methode ist die Beschichtung mit Polyhydroxyethylmethacrylat (HEMA) (Ivascu und Kubbies 2006). Bei den beiden einfach durchführbaren Methoden entsteht immer nur ein Sphäroid pro Well. Es können auch Sphäroide mit unterschiedlichen Zelltypen hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil der LOT ist, dass sie eine hohe Ausbeute an Sphäroiden ermöglicht, die im Bereich von 60% bis 100% bei Monokultur-Sphäroiden und 100% bei Co-Kultur-Sphäroiden liegt. Weiterhin lässt sich die Größe der Sphäroide mit nur geringer Standardabweichung einstellen und es lassen sich Sphäroide definierter zellulärer Zusammensetzung herstellen (Metzger et al. 2011).

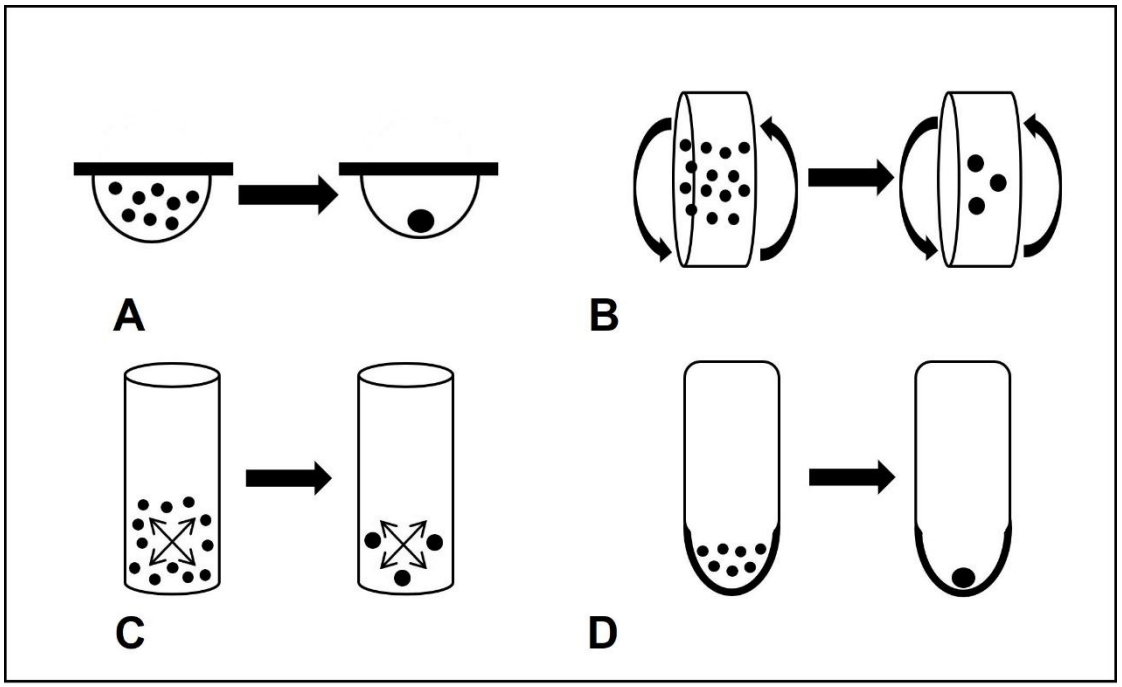

Abbildung 1: Methoden der Sphäroidherstellung
A: HDT, B und C: dynamische Zellkulturansätze, D: LOT

4.9 Das Sphäroidmodell als Gegenstand der Forschung

Sphäroide werden heute in vielen Forschungsbereichen, wie z. B. in der Tumor- und Angiogeneseforschung, der Medikamententestung oder im Tissue Engineering verwendet.

Tumorforschung

Co-Kultur-Sphäroide werden traditionell in der Tumorforschung verwendet, da sie Tumoren in vivo in mehreren Punkten ähneln. Durch die 3D-Anordnung der Zellen entsteht ein Sauerstoffgradient, der den Verhältnissen in Tumoren ähnelt (Page et al. 2012). Die Organisation der Zellen und deren Wachstumsverhalten ähneln jungen, nicht durchblutenden Tumoren, kleineren Regionen in größeren Tumoren oder Metastasen. Die Forschung mit Tumorsphäroiden konzentriert sich auf die Kontrolle der Proliferation, die Invasion in gesundes Gewebe und Metastasierung (Mueller-Klieser 1987, Dubessy et al. 2000, Kelm et al. 2003).

Angiogeneseforschung

Anhand von Endothelzellspäroiden können die für die Organfunktion essentiellen differenzierten Funktionen der Endothelzellen (Bildung der Blut-Hirn-Schranke mit

durchgehend nicht-gefenstertem Endothel, Bildung der Barriere in den renalen Glomeruli oder den endokrinen Drüsen mittels nicht-durchgehendem gefensterten Endothel oder Bildung der Sinusoide der Leber, Milz und des Knochenmarks durch nicht-durchgehendes spaltiges Endothel) erforscht werden (Garlanda und Dejana 1997, Korff und Agustin 1998). Weiterhin können anhand von Co-Kultur-Sphäroiden die Wirkung von pro- und antiangiogenen Faktoren sowie die Bildung neuer Blutgefäße, das sogenannte Sprouting untersucht werden (Heis et al. 2015).

Medikamententestung

Die Herstellung von Medikamenten ist sehr teuer und bedarf daher guter Modelle für die vorklinische Testung. 2D-Kulturmodelle spiegeln nicht die Reaktion auf Medikamente in vivo wider und Studien mit Tieren sind teuer, ethisch kontrovers diskutiert und haben wenig Vorhersagewert für die Reaktion auf die Medikamente im menschlichen Körper. Durch Etablierung der 3D-Kultur können die Nachteile der 2D-Kultur vermieden werden (Pampaloni et al. 2007). Durch gezielte Testung ist eine Aussortierung ineffektiver oder toxischer Substanzen frühzeitig möglich (Kunz-Schughart et al. 2004, Pampaloni et al. 2009). Sphäroide stellen ein ideales Bindeglied zwischen 2D in vitro und in vivo dar. Hierdurch können auch im Rahmen der 3 R-Strategie (Replace, Reduce, Refine) Tierversuche reduziert werden.

Sphäroide im Knochen Tissue Engineering

Das Knochen Tissue Engineering könnte zukünftig vor allem der Versorgung von CSDs dienen. Große Knochendefekte könnten mit Hilfe von Sphäroiden versorgt werden. Co-Kultur-Sphäroide bieten im Knochen Tissue Engineering den Vorteil, dass sie theoretisch ohne Trägermaterialien, sogenannten Scaffolds in große Defekte implantiert werden könnten, denn die Verwendung von Scaffolds hat einige Nachteile. Zum einen muss eine homogene Verteilung der Zellen auf dem gesamten Scaffold gegeben sein. Weiterhin müssen die Zellen mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Auch die Auswahl und das Design von Scaffolds stellen eine anspruchsvolle Aufgabe dar.
Sphäroide als kleine Minigewebe ähneln dem Gewebe in vivo. Beispielsweise bilden Sphäroide, die aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) bestehen, unter Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure oder Beta-Glycerophosphat Kollagen Typ 1, einen Hauptbestandteil der Knochenmatrix (Kronenberg et al. 2020). Außerdem zeigen Sphäroide bestehend aus Osteoblasten und Endothelzellen synergistische Effekte in Bezug auf Angio- und Osteogenese (Dariima et al. 2013). Sphäroide werden daher in Zukunft eine vielversprechende Rolle im Tissue Engineering spielen.

4.10 Fragestellung

Bei allen Co-Kulturansätzen ist es von großer Bedeutung, die einzelnen Zelltypen zuverlässig zu unterscheiden. HOB und NHDF sind in Zellkultur kaum zu unterscheiden. In der Literatur wird der Osteoblast sogar als differenzierter Fibroblast bezeichnet (Ducy et al. 2000). Die Lebendfluoreszenzfärbung stellt daher eine gute Methode zur Unterscheidung insbesondere von HOB und NHDF in multizellulären Sphäroiden dar (Burguera et al. 2010, Metzger et al. 2013).
Eine Analyse insbesondere der Zellverteilung und Organisationsprozesse im Sphäroid ist auf Grund der 3D-Anordnung schwierig. Paraffin- oder Kryoschnitte, konfokale Mikroskopie, Light-Sheet Mikroskopie, 2 Photonen-Mikroskopie oder die Dissoziation mit nachfolgender Durchflusszytometrie sind nur einige zum Teil eingeschränkte Methoden zur Analyse (Achilli et al. 2012).
Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, die die quantitative Analyse der Sphäroide sowie das Beobachten von Organisationsprozessen innerhalb der Sphäroide ermöglicht.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Welche Lebendfluoreszenzfarbstoffe sind geeignet und wie muss das Färbeprotokoll für die geplante Anwendung optimiert werden?
2. Wie sieht die qualitative Zellflächenverteilung der einzelnen Zelltypen im Sphäroid aus?
3. Wie verändern sich die Durchmesser und die prozentualen Zellflächenverteilungen über eine Beobachtungszeitraum von sechs Tagen?
4. Gibt es einen Unterschied zwischen der prozentualen Zellverteilung und der mittels Durchflusszytometrie (FACS™) bestimmten Verteilung?

5. Material und Methoden

5.1 Material

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Axiovision-Software	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
FacScan™	BD, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Heizplatte SP13	Medax Nagel KG, Kiel, Deutschland
Image J	NIH, Bethesda Maryland, USA
Inkubator Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryostat Cryo-Star HM 560 M	Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland
Zellkulturmikroskop Eclipse TS 100	Nikon, Tokio, Japan
Pipetten Eppendorf research 0,5-10 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe akkubetrieben, Pipetboy acu lila	VWR International, West Chester, PA, USA
Rasterelektronenmikroskop FEI XL 30 ESEM FEG	FEI Company, Hillsboro, USA
SC7640 High Resolution Sputter Coater	Quorum Technologies Ltd., Ashford, U.K.
SPSS Sigma Stat	Systat Software Inc., San Jose, USA
Sterilwerkbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taumelschüttler 3017	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Trockenschrank Model 500	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad TWB 12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Biofuge 15	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Tabelle 2: Verwendetes Verbrauchsmaterial, Hersteller und Katalognummer.

Verbrauchsmaterial	**Hersteller**	**Katalognummer**
Deckgläser 24 x 60 mm	VWR International, West Chester, PA, USA	631-1339
Deckgläser ø = 15 mm	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland	1-6286
Eppendorf-Reaktionsgefäß 2,0 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	623201
Falcon-Gefäß 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	188271
Filter FACS™ Tube	BD, Heidelberg, Deutschland	352235
Glaspasteur-Pipette	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	4518.1
HDMEC	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-12210
HOB	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-12720
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	122279
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	T734.1
NHDF	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland	C-12300
Objektträgerkasten	VWR International, West Chester, PA, USA	631-0738
Objektträger Superfrost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	2105.1
Petrischale Cellstar 60 x 15 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	628-102
Pipettenspitzen (Mikroliterpipette) 0,5-20 µl; 10-200 µl; 100-1000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	765290; 739290; 740290
Pipettenspitzen große Öffnung 1-250 µl	VWR International, West Chester, PA, USA	53503-616
Rotilabo-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	K116-1
Serologische Pipette 5 ml; 10 ml; 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	606180; 607180; 760180
Zellkulturflasche T 75; T 175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	658175; 660175

Zellkultur Multiwellplatte 12-Well; 96-Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	665180; 655180

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Hersteller und Katalognummer

Chemikalien	**Hersteller**	**Katalognummer**
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	L11-007
Agarose Type I, low EEO	Sigma Aldrich, München, Deutschland	A6013
Aluminiumsulfat ($Al_2O_{12}S_3$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3731.1
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	5169.2
Cold Water Fish Skin Gelatine (40%)	Aurion, Wageningen, Niederlande	900.033
1,4-Diazobicyclo[2,2,2]octan	Sigma Aldrich, München, Deutschland	578282
Dapi Vectashield	Axxora, Lörrach, Deutschland	VC-H-1200-L010
Diluent C	Sigma Aldrich, München, Deutschland	CGLDIL-6x10ml
DMEM	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	E15-810
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	A15-101
Glutaraldehyd	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA	16310
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	3783.1
Glycin	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland	5477.1000
HDMEC-Medium	Endothelial Growth Medium MV Supplement Mix PromoCell, Heidelberg, Deutschland	C-22020 C-39225
HOB-Medium	DMEM High-Glucose 15 % FCS PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	E15-810
Kernechtrot Nuclear Fast Red	Sigma Aldrich, München, Deutschland	N8002-5G
Kollagenase	Sigma Aldrich, München, Deutschland	C9891

Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland	8223350100
NHDF-Medium Q333	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	U15-813
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	0335.2
PBS	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland	OXOIBR0014G
Tanninsäure (1 % in A. dest)	Sigma Aldrich, München, Deutschland	T-0125
Tissue Tek O.C.T.	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland	4583
Trypanblau 0,4%	Sigma, St. Louis, MO, USA	T8154 HN00.1
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	L11-660
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	9127.1
Uranylacetat (1 % in A. dest)	Sigma Aldrich, München, Deutschland	8473

Tabelle 4: Verwendete Farbstoffe/Antikörper, Hersteller und Katalognummer

Farbstoffe/Antikörper	**Hersteller**	**Katalognummer**
Cell Brite Blue Cytoplasmic Membrane Staining Kit	Biotrend, Köln, Deutschland	30024
Cell Tracker™ Green CMFDA	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	VXC 7025
PKH 26 Red Fluorescent Cell Linker Kit	Sigma Aldrich, München, Deutschland	PKH26GL
Primärantikörper Mouse anti Human, c=10 µg/ml	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland	BBA7
Sekundärantikörper Anti-Maus IgG mit 15 nm Goldcluster	Aurion, Wageningen, Niederlande	815.022
Silver Enhancement Aurion R-GENT SE-EM	Aurion, Wageningen, Niederlande	500.033

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

Alle Zellkulturversuche wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Inkubiert wurden die Zellen bei 37°C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer CO_2-Begasung von 5% (Standard-Zellkultur-Bedingungen).
Vor Beginn der Versuche wurde jeweils eine Master Cell Bank (MCB) angelegt. Dazu wurden die vom Hersteller gelieferten Zellen in definierter Art und Weise expandiert und danach kryokonserviert. Hierdurch wurde sichergestellt, dass genügend Zellen für die Versuche vorhanden sind und die Zellkulturversuche der vorliegenden Arbeit unter reproduzierbaren und standardisierten Bedingungen durchgeführt werden konnten

Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Für die Herstellung der Sphäroide wurden HDMEC ca. drei Wochen vor dem Versuch aufgetaut und expandiert, wobei drei 75 cm²-Zellkulturflaschen (T 75) mit je 0,6 Millionen Zellen in 10 ml HDMEC-Medium (Endothelial Growth Medium MV mit Supplement-Mix) ausgesät wurden.
Das HDMEC-Medium wurde einen Tag nach dem Auftauen gewechselt, indem vorsichtig mit einer Glaspasteur-Pipette das alte Medium abgesaugt wurde und 10 ml frisches Medium dazugegeben wurden. Dadurch wurde das Dimethylsulfoxid-haltige (DMSO) Einfriermedium entfernt. Der Mediumwechsel erfolgte danach dreimal die Woche.
Die Unterkultivierung erfolgte ungefähr eine Woche später, nachdem die Zellen einen Konfluenzgrad von ca. 80% erreicht hatten (Abb. 2 A-C). Nach einmaligem Waschen mit 10 ml Phosphate buffered saline (PBS) wurden 3,5 ml Trypsin/Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) in jede Kulturflasche pipettiert, die Inkubationszeit im Inkubator bei 37°C lag je nach Dichte der Zellen bei ca. 3-4 min. Durch leichtes Klopfen unter mikroskopischer Kontrolle an die Kulturflasche ließen sich die Zellen weiter lösen. Um die Reaktion zu stoppen, wurde pro Kulturflasche 6,5 ml Medium hinzupipettiert.
Die Zellsuspension wurde bei 220 g für 4 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Nach Resuspension in 8 ml HDMEC-Medium wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurden 10 µl Trypanblau mit 10 µl Zellsuspension gemischt, wodurch sich tote Zellen deutlich blau anfärben. In jedem der acht Quadrate wurden ungefärbte lebende Zellen mäanderförmig gezählt, der Mittelwert berechnet und schließlich mit zwei (Verdünnungsfaktor) und 10.000 (Kammerfaktor) multipliziert. Dadurch erhielt man

die Zellzahl pro Milliliter und die Zellen konnten mit definierter Zellzahl ausgesät werden. Ein Medienwechsel wurde dreimal die Woche durchgeführt.
Nach zwei Wochen wurden die Zellen gepoolt, d.h. die Zellen aus mehreren Zellkulturflaschen wurden trypsiniert und gesammelt. Danach wurden sie auf neue Kulturflaschen verteilt.

Normale humane dermale Fibroblasten

Für die Herstellung der Sphäroide wurden die NHDF ca. zwei Wochen vor dem Versuch aufgetaut und kultiviert, wobei in je zwei T 75 Zellkulturflaschen 0,6 Millionen Zellen in 10 ml NHDF-Medium (Q333) ausgesät wurden (Abb. 2 D-F).
Auch hier erfolgte der erste Mediumwechsel am darauffolgenden Tag, die weiteren Mediumwechsel dreimal die Woche. Die NHDF wurden nach ca. einer Woche wie bereits beschrieben trypsiniert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Humane Osteoblasten

Die HOB wurden ca. drei Wochen vor Versuchsbeginn aufgetaut und kultiviert, wobei eine Million Zellen pro T 75 in 10 ml HOB-Medium ausgesät wurden (Abb. 2 G-I).
Die Mediumwechsel und die Unterkultivierung erfolgten analog zu den HDMEC und NHDF.

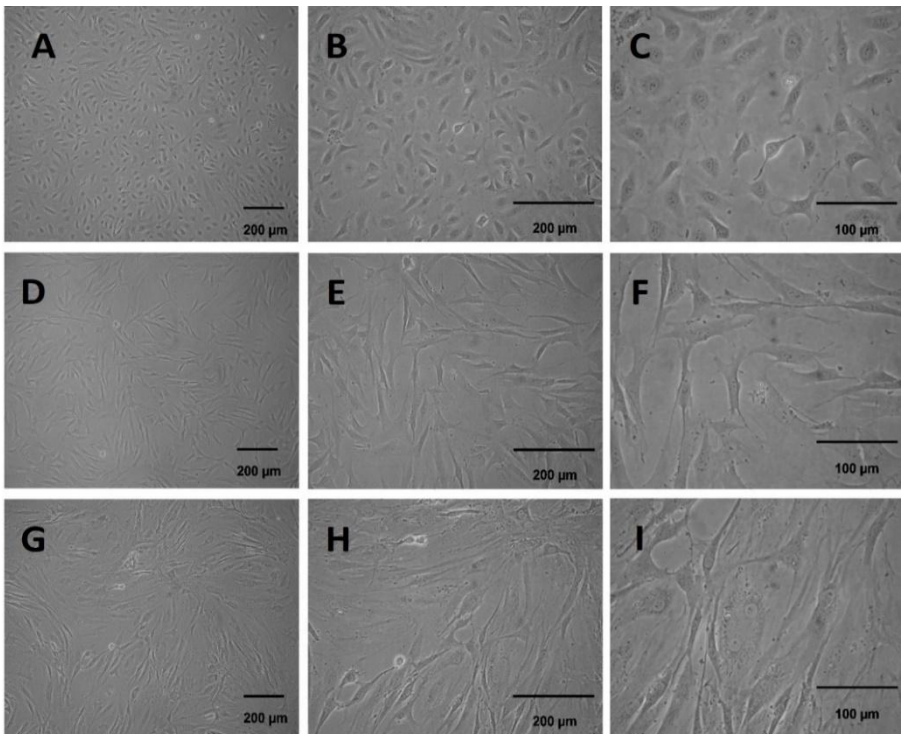

Abbildung 2:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der drei Zelltypen zur Darstellung der Zellmorphologie in der 2D-Kultur, A-C: HDMEC, D-F: NHDF, G-I: HOB

5.2.2 Versuchsdurchführung im Überblick

Für die Versuche wurden zwei Zellkulturansätze, die jeweils aus denselben drei Zelltypen bestanden, an zwei unterschiedlichen Versuchstagen verwendet (Block A und B). In jedem der beiden Zellkulturansätze wurden drei Gruppen gebildet. Diese Gruppen bestanden aus unterschiedlichen Zellkombinationen. So wurden in Gruppe I und II zwei und in Gruppe III drei unterschiedliche Zelltypen verwendet (Tab. 5). Die Zellen wurden als 2D-Monokulturen vor Generierung der Sphäroide mit Lebendfluoreszenzfarbstoffen gefärbt. In jeder Gruppe wurden Sphäroide mit unterschiedlichen Zellzahlen hergestellt (10.000 und 50.000 Zellen). Pro Größe, Tag und Kombination wurden 15 Sphäroide hergestellt. Im Folgenden wurden die Sphäroide an Tag 1, 3 und 6 in Tissue Tek eingebettet, eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Danach erfolgte an einem Kryostat die Anfertigung von 7 µm dicken Kryoschnitten und danach fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen. Es wurden jeweils 4 Sphäroide aus den Blöcken A und B für jede Gruppe und jede Größe ausgewertet. Anhand dieser Aufnahmen wurde sowohl der Sphäroiddurchmesser als auch mit Hilfe der Axiovision-Software die Zellfläche der einzelnen Zelltypen bestimmt. Weiterhin erfolgte anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Analyse der Zellverteilung und Zellmorphologie

Tabelle 5: Übersicht über die drei Versuchsgruppen mit ihrer jeweiligen Zellzahl im Sphäroid, sowie prozentualen Zelltypverteilung

Gruppe	Zellzahl	Osteoblast [%]	Fibroblast [%]	HDMEC [%]	Inkubation [Tage]
I	10.000 50.000	0	50	50	1,3,6
II	10.000 50.000	50	0	50	
III	10.000 50.000	50	25	25	

5.2.3 Lebendfluoreszenzfärbung

Fluoreszenzfarbstoffe

Der rot fluoreszierende PKH 26-Farbstoff dringt mit einer langen aliphatischen Kette in die Lipid-Regionen der Zellmembran ein. Gefärbt wird in einer iso-osmotischen Trägerlösung, dem Diluent C, welches das Überleben der Zellen sichert und gleichzeitig maximale Löslichkeit des Farbstoffes erlaubt. Der PKH-Farbstoff wird bei 551 nm angeregt und emittiert bei 567 nm.

Der grün-fluoreszierende Cell Tracker™-Farbstoff CMFDA besteht aus Chloromethyl-Derivaten von Fluorescein-Diacetat. Dieser Farbstoff ist beim Eindringen in die Zelle farblos und fluoresziert nicht. Erst durch zytosolische Esterasen der Zelle wird ein Acetatrest abgespalten und es entsteht der fluoreszierende Farbstoff, der die Zellmembran nicht mehr durchdringen kann. Angeregt wird dieser Farbstoff bei 492 nm und emittiert das Licht bei 517 nm.
Der Cell Brite-Farbstoff ist ein lipophiler Carbocyanin-Farbstoff, der mit einer langen Hydrocarbon-Kette in die Lipidschicht der Zellmembran eingelagert wird und blau fluoresziert. Angeregt wird der Cell Brite-Farbstoff bei 360 nm und emittiert bei 440 nm.

Vorversuche zur Etablierung der Lebendfluoreszenzfärbungen

Bei den Fluoreszenzfarbstoffen PKH 26 und Cell Brite wurden zahlreiche Vorversuche durchgeführt, um die Inkubationszeit und die Konzentration der Färbelösung zu optimieren. Außerdem wurde die Färbung von adhärenten Zellen versus Zellen in Suspension verglichen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Cell Tracker™-Farbstoff CMFDA war bereits im Vorfeld durch unsere Arbeitsgruppe etabliert worden.
Im Rahmen von Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe wurden auch die Färbeeffizienzen der drei Fluoreszenzfarbstoffe bestimmt.

PKH 26-Färbung

Die Lebendfluoreszenzfärbung mit dem PKH 26-Farbstoff wurde zuerst laut Herstellerprotokoll mit Zellen in Suspension in der angegebenen Konzentration durchgeführt, d.h. es wurden 4 µl PKH 26 mit 1 ml Diluent C vermischt. Danach testeten wir die Färbung in einer 1:5 Verdünnung. Auch hier wurden die Zellen in Suspension gefärbt.
In einem weiteren Vorversuch wurde die PKH 26-Färbung an adhärent wachsenden Zellen in 2 D-Kultur in Standardkonzentration sowie in der 1:5 Verdünnung getestet.
Als nächstes wurden Sphäroide bestehend aus in Adhärenz PKH-26-gefärbten Zellen hergestellt. Auch hier wurden die Standardkonzentration der Färbelösung sowie die 1:5 Verdünnung miteinander verglichen. Von diesen Sphäroiden wurden Schnitte angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert, um festzustellen, ob die Färbung gleichmäßig und ausreichend stark ist.

Cell Brite-Färbung

Die Cell Brite-Färbung ist laut Hersteller sowohl für adhärent wachsende Zellen als auch für Zellen in Suspension geeignet. Das Färbeprotokoll wurde auf Grund von Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe etwas verändert.
Zuerst wurden adhärent wachsende Zellen in 2D-Kultur mit drei verschiedenen Inkubationszeiten 10 min, 20 min und 60 min gefärbt.
Als nächstes wurden aus adhärent wachsenden, lebendfluoreszenzgefärbten Zellen Sphäroide hergestellt. Diese wurden anschließend kryokonserviert, geschnitten und dann im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Durchführung

Die Lebendfluoreszenz-Färbung diente der Differenzierung der unterschiedlichen Zelltypen in den Co-Kultur-Sphäroiden.
Die Zellen wurden zu Beginn entweder mit dem Cell Brite-Farbstoff blau, dem Cell Tracker™ Green CMFDA-Farbstoff grün oder dem PKH 26-Farbstoff rot gefärbt (Abb. 3). Danach wurden die Zellsuspensionen mit definierten Zellzahlen hergestellt und die Sphäroide nach Protokoll mittels LOT generiert.
Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf eine T75 Zellkulturflasche.
Bei der Cell Brite-Färbung wurde nach Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS die Färbelösung bestehend aus 15 µl Lösung A (DiB cell labeling solution) und 15 µl Lösung B (DiB loading buffer) zusammen mit 6 ml Medium auf die Zellen gegeben und 60 min bei Standardbedingungen im Dunkeln inkubiert. Nach Absaugen der Färbelösung wurde dreimal je 5 min mit 10 ml Medium gewaschen.
Für die CMFDA-Färbung wurde zunächst der CMFDA-Farbstoff angesetzt, indem 10,76 µl DMSO in ein Cell Tracker™ Tube gegeben wurden, dieses wurde gevortext, zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Für die Färbung wurden 2,5 µl CMFDA-Farbstoff in 10 ml kaltes serumfreies Dulbecco´s modified Eagle´s Medium (DMEM) gegeben und im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die Stammlösung hatte dadurch eine Endkonzentration von 2,5 µM. Nach Absaugen des Kulturmediums und einmaligem Waschen mit PBS wurde die Färbelösung auf die Zellen gegeben und 30 min unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit PBS und Zugabe von 10 ml frischen Mediums wurden die Zellen erneut 30 min inkubiert und danach noch einmal ein Mediumwechsel durchgeführt.
Die PKH 26-Färbung wurde im Rahmen der Optimierung der Färbung in der Standardkonzentration und in einer 1:5 Verdünnung getestet, um die optimale Konzentration zu finden. Für die Färbung in 1:5 Verdünnung wurden 12 µl Diluent C (Carrierlösung für den

Farbstoff) und 3 µl PKH 26-Farbstoff zusammengegeben, davon wiederum 6 µl in 6 ml Diluent C vermischt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden 6 ml Diluent C zusammen mit der Färbelösung auf die Zellen gegeben und 5 min inkubiert. Zum Stoppen der Färbereaktion sowie um überschüssigen Farbstoff zu binden wurden 12 ml FCS für 1 min dazugegeben. Anschließend wurde dreimal mit je 10 ml Medium gewaschen.
In der Gruppe I, bestehend aus 50% NHDF und 50% HDMEC, wurden die NHDF mit CMFDA und die HDMEC mit PKH 26 gefärbt.
In der Gruppe II, die aus 50% HOB und 50% HDMEC bestand, wurden die HOB mit CMFDA und die HDMEC wieder mit PKH 26 gefärbt.
In der Gruppe III, bestehend aus 50% HOB, 25% HDMEC und 25% NHDF, wurden die HOB mit Cell Brite, die HDMEC mit PKH 26 und die NHDF mit CMFDA gefärbt.

Tabelle 6: Zellverteilung und Farbstoffzuordnung der Gruppen I bis III

Gruppe	Zellverteilung	Farbstoffzuordnung
I	50 % NHDF 50 % HDMEC	NHDF CMFDA grün HDMEC PKH 26 rot
II	50 % HOB 50 % HDMEC	HOB CMFDA grün HDMEC PKH 26 rot
III	50 % HOB 25 % NHDF 25 % HDMEC	HOB Cell Brite blau NHDF CMFDA grün HDMEC PKH 26 rot

	Cell Brite 60'	CMFDA	PKH 26 (1:5)
Färbelösung	15 µl A + 15 µl B → 30 µl in 6 ml Medium	2,5 µl CMFDA in 10 ml kaltes DMEM → Wasserbad	12 µl Diluent + 3 µl PKH 26 → davon 6 µl in 6 ml Diluent
	Kulturmedium absaugen	Kulturmedium absaugen	Kulturmedium absaugen
	1 x 10 ml PBS	1 x 10 ml PBS	2 x 10 ml PBS 6 ml Diluent dazugeben
Zeit: 0'	Färbelösung dazugeben	Färbelösung dazugeben	
		30' Inkubation	
30'	60' Inkubation	Färbelösung absaugen 2 x 10 ml PBS 10 ml Medium dazugeben	
55'		30' Inkubation	Färbelösung dazugeben
60'			5' Inkubation
	Färbelösung absaugen	Medium absaugen	12 ml Serum 1' dazugeben absaugen
	3 x 10 ml Medium je 5'		3 x 10 ml Medium je 5'
	10 ml Medium	10 ml Medium	10 ml Medium

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Färbeprotokolle der drei verwendeten Lebendfluoreszenzfarbstoffe. Durch die Verschachtelung der 3 Färbeprotokolle (siehe Zeitachse), sind die Färbungen zum selben Zeitpunkt abgeschlossen. Angegebene Volumina für T 75

5.2.4 Sphäroidherstellung

Es wurden HDMEC der Passage 7, NHDF der Passage 5 und HOB der Passage 7 verwendet. Die Sphäroide wurden in 96-Well-Platten mittels LOT hergestellt.

Dazu wurde eine sterile 1%ige Agarose-Lösung hergestellt. Agarose 1% wurde in deionisiertem Wasser (dH_2O) kurz in der Mikrowelle bis zur vollständigen Verflüssigung, wenn keine Schlieren mehr zu sehen waren aufgekocht und dann je 50 µl in die Kavitäten einer Zellkulturplatte 96-Well pipettiert. Die Agarose wurde ca. 1,5 - 2 Stunden ausgekühlt.

Die vor der Sphäroidherstellung fluoreszenzgefärbten Zellen wurden nach Standardprotokoll trypsiniert und gezählt und die Zellzahl/ml sowie die Gesamt-Zellzahl bestimmt. Danach wurden die Zellsuspensionen für die unterschiedlichen Gruppen (I-III) hergestellt und je 100 µl

pro Well pipettiert. Die Platten wurden dann entweder einen Tag, drei Tage oder sechs Tage unter Standard-Zellkulturbedingungen inkubiert.
Pro Gruppe und Tag wurde eine 96-Well-Platte verwendet, in die dann die Sphäroidgrößen 10.000 und 50.000 pipettiert wurden. Die Zellsuspension wurde immer für 15 Sphäroide pro Gruppe, Tag und Größe angesetzt.

5.2.5 Färbung mit Kernechtrot und Einfrieren der Sphäroide

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Sphäroide mit Kernechtrot gefärbt, um sie später beim Schneiden im Kryoblöckchen besser identifizieren zu können. Durch die Färbung mit Kernechtrot sind die Sphäroide als rötliche Punkte im gefrorenen Tissue Tek besser zu sehen.

Kernechtrot:

- 44,4 g $Al_2O_{12}S_3$ * H_2O
- 0,5 g Kernechtrot
- 20 ml NaN_3 (0,04%)
- H_2O ad 500 ml

→ auf höchster Hitzestufe rühren, bis sich alles gelöst hat und filtrieren

Die Sphäroide wurden vorsichtig mit speziellen 200 µl Pipettenspitzen, die eine größere Öffnung besitzen als herkömmliche 200 µl Pipettenspitzen, aus ihren Kavitäten pipettiert und für 30 Minuten in Kernechtrot bei Dunkelheit bei RT inkubiert und danach in PBS gewaschen. Das Einfriermedium Tissue Tek wurde in den Deckel eines 2 ml Eppendorfgefäßes gefüllt, sodass der Boden bedeckt war. Danach wurden pro Deckel 6 bis 8 Sphäroide hinein pipettiert und dann vorsichtig mit Tissue Tek bedeckt.
Jedes Eppendorfgefäß wurde mit einer langen Pinzette vorsichtig in flüssigen Stickstoff getaucht, bis das gesamte Tissue Tek komplett durchgefroren war. Danach wurde das Blöckchen aus dem Deckel herausgedrückt und in einer beschrifteten Einbettkassette bei -80°C bis zum Schneiden gelagert.

5.2.6 Schneiden und Fixieren der Sphäroide

Die Sphäroide wurden an einem Kryostat Cryo-Star HM 560 M geschnitten (Abb. 4 A).
Hierzu wurden die Sphäroidblöckchen in einer mit Eis gefüllten Styroporbox transportiert. Im Kryostat wurden die Blöckchen mit Tissue Tek an Objekttellern fixiert und eingespannt (Abb. 4 B). Dann wurde der Schnittstrecker, der zum Aufnehmen der Schnitte notwendig ist und das

Messer befestigt. Hierbei musste die Oberkante des Messers mit der roten Linie im Kryostat abschließen und ein Schneidewinkel von 10° eingehalten werden. Als Objekttemperatur musste -20°C, als Messertemperatur -25°C eingestellt sein. Danach wurden 7 µm dünne Schnitte angefertigt (Abb. 4 C). Diese Schnitte wurden mit einem leicht angekühlten Superfrost® Objektträger aufgenommen, die Lage mit einem wasserfesten Stift auf der Unterseite markiert, kurz auf einer Wärmplatte angetrocknet und dann 5 Minuten in PFA (Paraformaldehyd) 4 % in PBS fixiert. Anschließend wurden die Objektträger in dH_2O 5 min gewaschen und dann in Eindeckmedium eingedeckt. Die Zweifach-Kombinationen wurden mit DAPI (4′,6-Diamidin-2-phenylindol), die Dreifach-Kombination mit einem DAPI-freien Eindeckmedium eingedeckt. DAPI ist ein interkalierender Farbstoff, der sich in die DNA einlagert, wodurch die Zellkerne blau gefärbt werden.
Danach wurden die Schnitte mit einem 24 x 60 mm Deckgläschen bedeckt und bis zum Mikroskopieren am nächsten Tag bei +4°C in einem Objektträgerkasten gelagert.

DAPI-freies Eindeckmedium Antifade:

- 2 g DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)
- 90 ml Glycerol

→ bei 60 - 70°C im Wasserbad lösen

- 1 M TRIS ad 10 ml, pH 7
- 100 µl Natriumazid (20% in A.dests.o.)

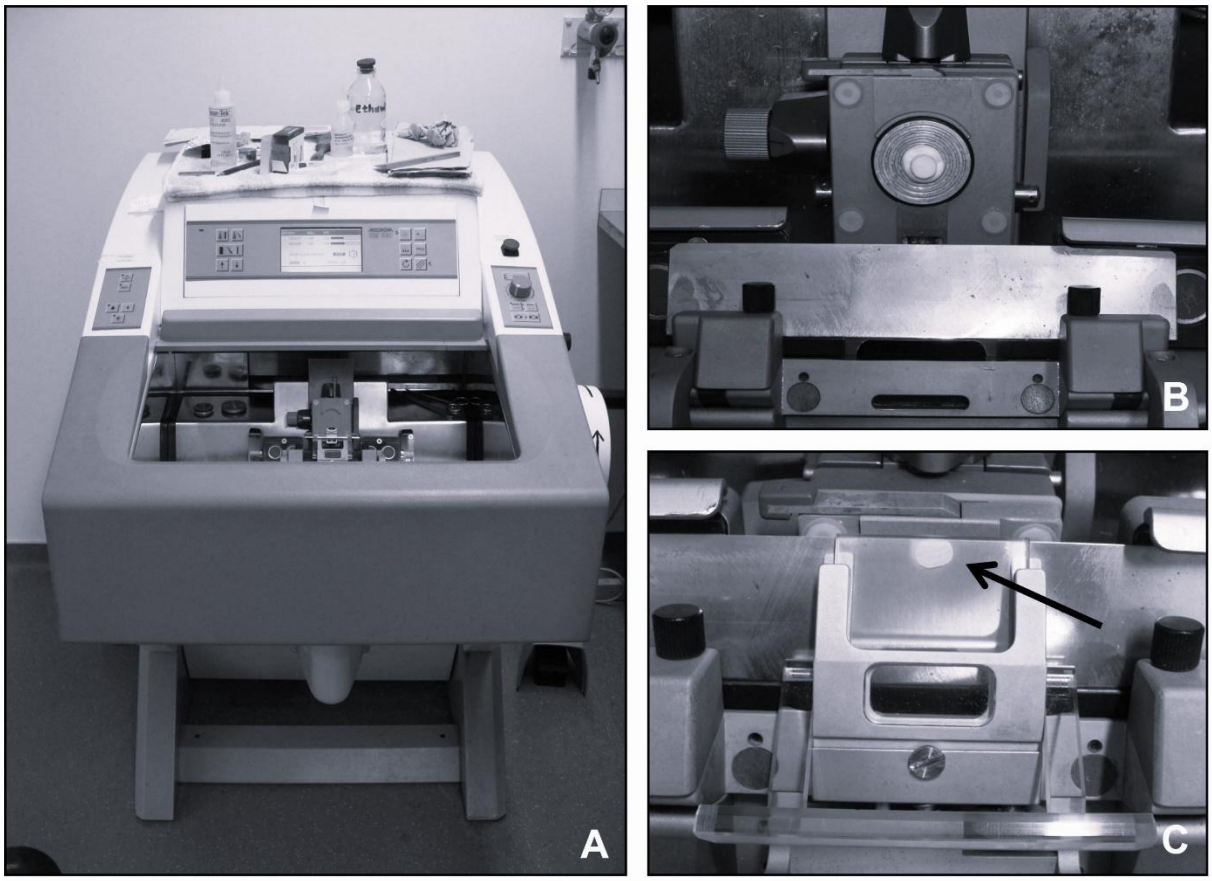

Abbildung 4:
A: Kryostat B: eingespanntes Tissue Tek-Blöckchen und eingespanntes Messer C: Schnitt unter dem Schnittstrecker (Pfeil)

5.2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Zum Mikroskopieren und Auswerten wurde ein Axioskop von Zeiss verwendet.
Als Lichtquelle fungiert eine Quecksilberhochdrucklampe (Abb. 5 A 1), aus der das Licht durch einen Anregungsfilter (Abb. 5 A 2a) geleitet wird. Dadurch wird die für die Anregung der Fluoreszenz notwendige Wellenlänge herausgefiltert. Das Licht wird dann auf einen dichroischen Spiegel geleitet (Abb. 5 A 2b), wodurch es um 90° abgelenkt wird. Der Spiegel besitzt eine so genannte kritische Wellenlänge. Dadurch kann er kurzwelliges Licht reflektieren und langwelliges Emissionslicht durchlassen. Dies hat zur Folge, dass das kurzwellige Anregungslicht reflektiert und durch das Objektiv (Abb. 5 A 3) zum Objekt (Abb. 5 A 4) geleitet wird, das langwellige Fluoreszenzlicht hingegen durch den dichroischen Spiegel durch einen Emissionsfilter (Abb. 5 A 2c) geleitet wird. Dieser filtert die Anregungsfrequenz heraus und leitet nur das Fluoreszenzlicht durch das Okular (Abb. 5 A 5) hindurch zum Auge des Betrachters (Abb. 5 A 6). Das Okular vergrößert das Bild zehnfach. Der Anregungsfilter, der

dichroische Filter sowie der Emissionsfilter sind in einem Filterwürfel verbaut. Dadurch gibt es spezifische Filterwürfel für Anregungs- und Emissionswellenbereiche unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (Abb. 5 A 2).

Bei Bedarf kann eine monochromatische Kamera (AxioCam MRm) an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossen werden, mit der mehrdimensionale Bilder aufgenommen werden können, bei denen die Farbe je Kanal nachträglich von der Software zugewiesen wird. Die Aufnahmen können später mit Hilfe der Axiovision-Software ausgewertet werden.

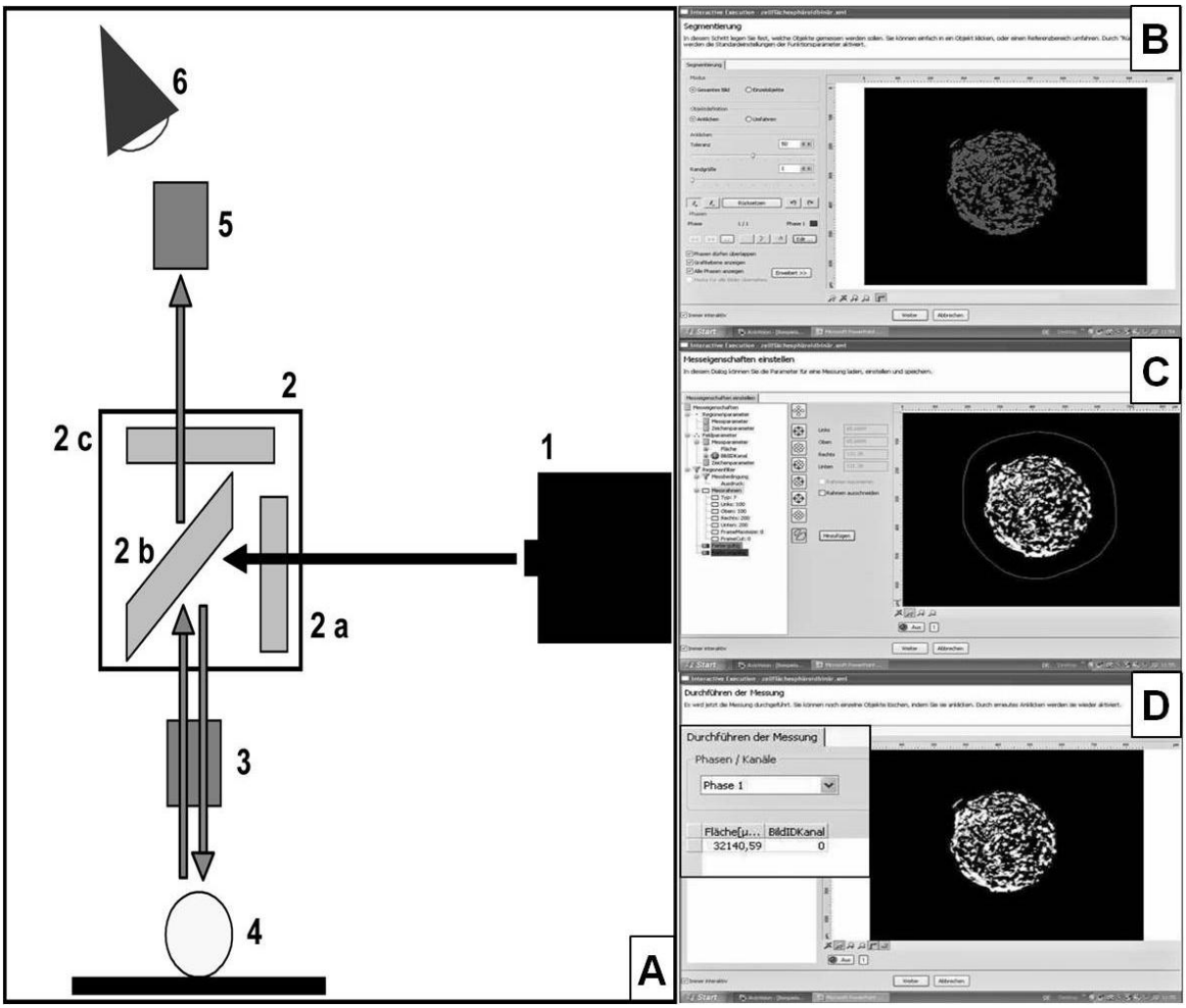

Abbildung 5: A: schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops, 1: Quecksilberhochdrucklampe, 2: Filterwürfel (2 a: Anregungsfilter, 2 b: dichroischer Filter, 2 c: Emissionsfilter), 3: Objektiv, 4: Objekt, 5: Okular, 6: Betrachter B-D : Screenshots der semiautomatisierten Messung eines Kanals eines Sphäroidschnitts mit Hilfe der Axiovision-Software B: automatische Markierung der Zellfläche eines Sphäroids C: manuelle Festlegung des Messrahmens D: Ergebnis der Messung in µm²

Auswertung

Es wurden jeweils 4 Sphäroide aus den Blöcken A und B für jede Gruppe und jede Größe ausgewertet. Die Schnitte sollten möglichst nahe an der Äquatorebene vermessen werden. Die Größe der Sphäroide in den unterschiedlichen Gruppen war in Vorversuchen bereits an lebenden Sphäroiden von unserer Arbeitsgruppe bestimmt worden. Es wurde eine maximale Abweichung der Sphäroidgröße der Kryoschnitte von der Lebendgröße von plus/minus 15% festgelegt. Diese Größenangaben ermöglichten es uns, die Äquatorebene des Sphäroids am Kryoschnitt zu identifizieren. Es wurden Reihenschnitte jedes Sphäroids angefertigt.
Am Fluoreszenzmikroskop wurden diejenigen Schnitte ausgewählt, die im definierten Größenbereich um den Äquator lagen. Dieser Schnitt wurde mit Hilfe der Axiocam dokumentiert und nur der automatische Belichtungsmodus gewählt. Das Bild wurde weder vom Programm noch von Hand nachbearbeitet, um Fehler durch die Nachbearbeitung auszuschließen und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu garantieren.
Pro Farbe wurde je ein Bild mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Dadurch entstanden in Gruppe I und II pro Sphäroid zwei Bilder und in Gruppe III drei Bilder.
Jedes Bild wurde mit Hilfe der Image-J-Software standardisiert in ein binäres Bild umgewandelt, wodurch es nur noch aus weißen und schwarzen Flächen bestand. Die weißen Flächen entsprachen dem Sphäroid, die durch die Axiovision-Software markiert werden konnten.
Es wurde ein spezielles Messprogramm von mir programmiert, wodurch die markierten Zellflächen in den einzelnen Kanälen semiautomatisch vermessen werden konnten.
Im ersten Schritt wurde die weiße Fläche im Bild durch das Programm markiert (Abb. 5 B). Damit diese markierte Fläche gemessen wurde, musste man manuell einen Messrahmen festlegen (Abb. 5 C). Innerhalb dieses Messrahmens wurde die markierte Zellfläche gemessen und von der Axiovision-Software in µm² angegeben (Abb. 5 D). Dieser Vorgang wurde für jeden Kanal wiederholt, maximal also dreimal pro Bild/Schnitt. Die Werte wurden dann in ein Excel-Sheet übertragen, sodass am Ende zum einen die absoluten Zellflächenanteile sowie die prozentualen Zellflächenanteile angegeben werden konnten.

5.2.8 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wird ein Elektronenstrahl zeilenweise über das Präparat geführt (Abb. 6 A). Der Elektronenstrahl wird mit Hilfe von Feldemission erzeugt, d.h. es werden durch ein ausreichend starkes elektrisches Feld Elektronen aus einer Kathode gelöst (Abb. 6 B). Um Wechselwirkungen mit Atomen der Luft zu verhindern, herrscht im REM ein Hoch-Vakuum. Daher müssen die Proben vakuumbeständig sein. Außerdem müssen sie

elektrisch leitfähig sein, um überhaupt im REM dargestellt werden zu können und um Aufladungseffekte zu verhindern. Der Elektronenstrahl wird mit Hilfe von Magnetspulen auf einen Punkt geleitet (Abb. 6 C). Durch Wechselwirkungen mit der Probe entstehen unterschiedliche Signale, die mit Hilfe von Detektoren aufgezeichnet werden können. Die Elektronen, die aus dem primären Elektronenstrahl auf die Probe treffen bilden die Oberfläche der Probe ab. Man nennt sie Sekundärelektronen. Dies sind niederenergetische Elektronen, die durch die Primärelektronen mittels Streuung ausgelöst werden. Sie werden vom Sekundärelektronen-Detektor (SE-Detektor) erfasst und geben damit Auskunft über die Topografie der Probe (Abb. 6 E). Die Primärelektronen, die von der Probe zurückgestreut werden sind die sogenannten Rückstreuelektronen, engl. backscattered electrons (BSE). Diese werden vom BSE-Detektor erfasst und liefern Aussagen zu Materialunterschieden oder der chemischen Zusammensetzung der Probe (Abb. 6 F). Durch Anregung von Elektronen in der Probe wird Energie in Form eines Röntgenquants frei. Diese Röntgenquanten werden mit dem EDX-Detektor erfasst. Dies geschieht mittels der sogenannten energiedispersiven Röntgenstrahlen-Analyse, engl. Energy dispersive X-ray analysis (EDX). Hiermit können Aussagen zur elementaren Zusammensetzung getroffen werden (Abb. 6 G).

Zur Darstellung der Zellmorphologie sowie Zell-Zell-Kontakte mittels Filopodien wurden REM-Bilder von allen Sphäroiden aller Gruppen angefertigt. Dazu mussten die Sphäroide erst fixiert und anschließend fürs REM fixiert werden. Zuerst wurden die Sphäroide zweimal mit PBS gewaschen, danach bei Raumtemperatur (RT) 10 min unter Bewegung in 2% Glutaraldehyd (GDA) in 0,1 M Cacodylat-Puffer pH 7,4 (CaCo) fixiert und dann dreimalig mit CaCo gewaschen. Danach folgte die Inkubation in Osmium-Tetroxid (1% in 0,2 M Caco-Puffer) für 1 h bei RT unter Bewegung im Dunkeln und viermaliges Waschen in A. dest. für je 10 min. Außerdem wurden zwei weitere Inkubationen durchgeführt, um den Kontrast der Proben zu verbessern. Zum einen die Inkubation in Tanninsäure und zum anderen in Uranylacetat.

Danach folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe, gefolgt von einer Inkubation für 15 min bei RT der Sphäroide in einer 1:1 Mischung von 100% Ethanol und Hexamethyldisilazan (HMDS). Dann wurden die Sphäroide nochmals 15 min in reinem HMDS über Nacht unter dem Abzug inkubiert. In einem letzten Schritt wurden sie auf einen Carbonhalter aufgebracht, mit Gold beschichtet (Sputtering), d.h. gesputtert und anschließend im REM analysiert.

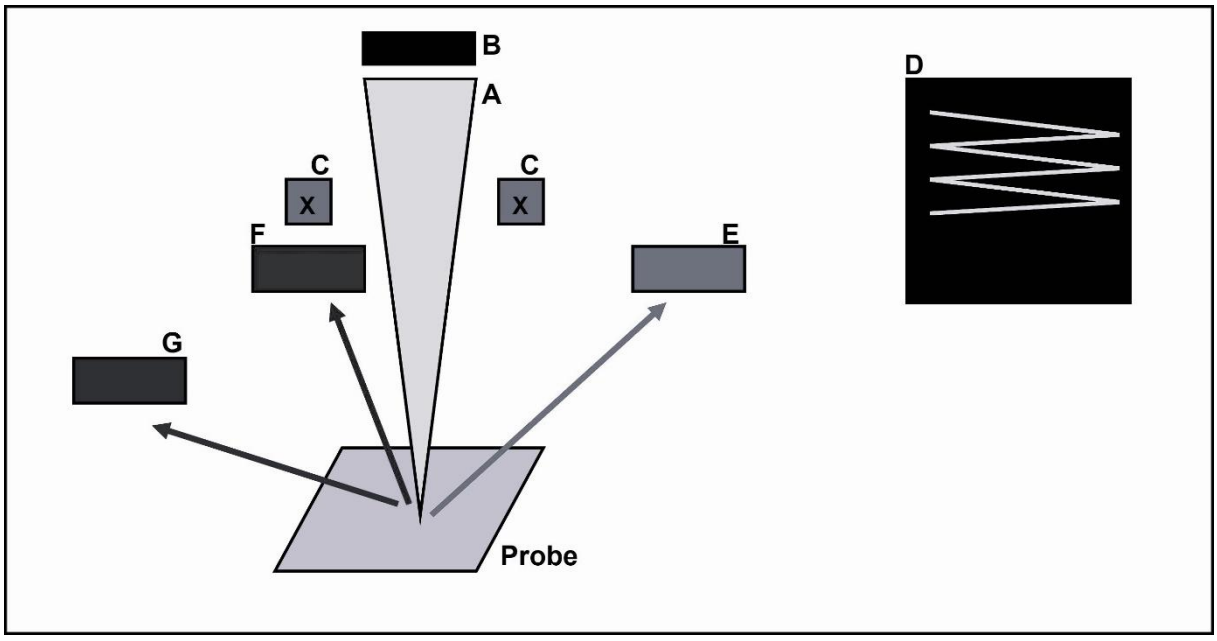

Abbildung 6: schematische Darstellung des REM, A: Elektronenstrahl, B: Kathode, C: Magnetspulen, D: Bildschirm, E: SE-Detektor, F: BSE-Detektor, G: EDX-Detektor

5.2.9 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (fluorecence activated cell sorting FACS™) wurde durchgeführt, um mit Hilfe einer weiteren Methode den prozentualen Anteil der unterschiedlichen Zelltypen zu bestimmen. Dadurch sollte die Bestimmung der Zellflächenanteile mittels Axiovision-Software mit einer zweiten Methode überprüft werden. Dieser Versuch wurde von uns exemplarisch an zehn 50.000er-Sphäroiden der Gruppe I durchgeführt. Die Daten aus den FACS™-Versuchen sollten mit den Ergebnissen aus der Vermessung der Axiovision-Software verglichen werden. Um den prozentualen Anteil der Zellen zu messen, wurden die unterschiedlichen Zelltypen ebenfalls lebendfluoreszenzgefärbt und danach Sphäroide nach bekanntem Protokoll hergestellt. Die Sphäroide wurden einen, drei oder sechs Tage unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurden die Sphäroide mit Hilfe von Enzymen in die unterschiedlichen Zellen dissoziiert.
Die Messungen der einzelnen Zelltypen wurden an einem FACscan™ von BD (Abb. 7) mit Hilfe der Cellquest-Software durchgeführt.

Aufbau des FACS™

Die Zellen werden durch eine Mikroküvette an einem 488 nm Argon-Laser vorbeigeführt. Das Fluoreszenzsignal oder Streulicht wird mit Hilfe unterschiedlicher Filter zu verschiedenen Detektoren geleitet. Dadurch können eine Reihe von Informationen über die Zellen gesammelt

werden. Je nachdem wie komplex oder groß die Zelle ist, ändert sich die Menge des gestreuten Lichts. Unterschieden werden ein Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC) und ein Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC). Der FSC ist ein Maß für das Zellvolumen, der SSC wird von der Zellgröße, der Struktur des Zellkerns, der Granularität der Zelle sowie der Vesikelmenge in der Zelle beeinflusst.

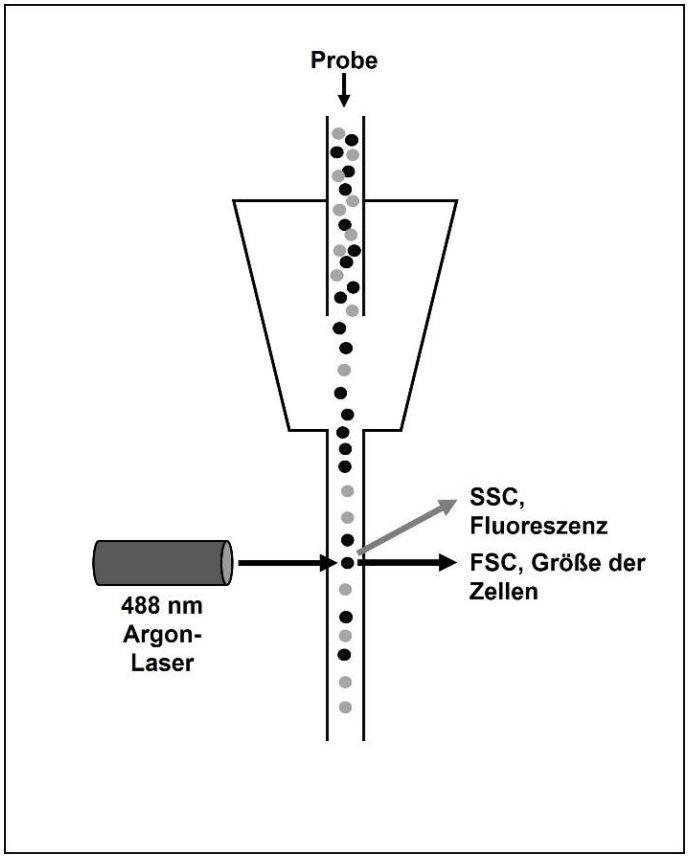

Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines FACscan™ von BD

5.2.10 Dissoziation der Sphäroide

Da die FACS™-Messung eine Einzellsuspension voraussetzt mussten die Sphäroide dissoziiert werden. Es wurden exemplarisch zehn Sphäroide mit 50.000 Zellen aus Gruppe I dissoziiert.

Zunächst wurden die NHDF mit CMFDA fluoreszenzgefärbt, die HDMEC blieben ungefärbt. Danach erfolgte die Herstellung der Sphäroide wie unter 5.2.4 beschrieben. Die Inkubationsdauer betrug auch hier ein, drei und sechs Tage.

Für die Dissoziation wurden jeweils 10 Sphäroide pro Ansatz in einer 60 mm Petrischale mit PBS gesammelt und danach in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Pro Tag wurden 2 Ansätze verwendet (n = 2). Das Eppendorf-Gefäß wurde 2 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.

Für die Dissoziation der Sphäroide wurden je nach Alter der Sphäroide unterschiedliche Enzymkombinationen und Inkubationszeiten verwendet (Tab. 7). Die Dissoziation wurde bei 37°C und unter ständigem Rütteln im Eppendorf-Thermomixer durchgeführt.

Tabelle 7: Inkubationsdauer und verwendete Enzymkombinationen bei der Dissoziation von Sphäroiden an Tag 1, Tag 3 und Tag 6. Sphäroidgröße 50.000 Zellen, 50% NHDF und 50% HDMEC

Sphäroidalter	Inkubationsdauer	Enzyme
d 1	30 min	300 µl Accutase
d 3	30 min	300 µl Accutase + 128,6 µl Kollagenase
d 6	40 min	300 µl Accutase + 128,6 µl Kollagenase

Nach erfolgter Inkubationsdauer wurde die Zellsuspension zehnmal resuspendiert und in eine 48-Well-Platte überführt. Hier wurde die Vollständigkeit der Dissoziation beurteilt. Bei vollständiger Dissoziation in Einzelzellen wurden 25 µl der Zellsuspension mit 25 µl Trypanblau gefärbt und der Anteil der toten Zellen sowie das Vorhandensein von Dubletten und Aggregaten bestimmt.

Danach wurden die Proben für die durchflusszytometrische Messung vorbereitet. Dazu wurden die dissoziierten Sphäroide aus der 48-Well-Platte in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß transferiert. Die Well-Platte wurde mit 700 µl PBS gewaschen und das PBS in das Eppendorf-Gefäß dazugegeben. Dieses wurde 2 Minuten bei 400 g zentrifugiert und das Pellet in 350 µl PBS resuspendiert.

Bevor die Zellsuspension im FACS™ gemessen werden konnte, musste sie filtriert werden, um mögliche Verstopfungen im FACS™ durch größere Zellaggregate zu vermeiden. Dazu wurden spezielle Filter FACS™ Tubes vorbereitet. Dies sind spezielle FACS™ Röhrchen mit einer Kappe, in die ein Netz mit einer Maschenweite von 35 µm eingearbeitet ist. Zuerst wurde dieses Netz mit 50 µl PBS benetzt und anschließend die Zellsuspension pipettiert. Danach wurde das Filter FACS™ Tube bei 220 g für 2 Minuten zentrifugiert. Das Netz wurde anschließend nochmals mit 100 µl PBS benetzt und das Filter FACS™ Tube erneut bei 220 g für 2 Minuten zentrifugiert.

5.2.11 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Sigma Stat durchgeführt.
Zur statistischen Testung der prozentualen Zellflächenanteile an den unterschiedlichen Tagen und im Vergleich mit dem initialen stöchiometrischen Verhältnis wurde eine One way ANOVA durchgeführt.
Beim Vergleich der Durchmesser der Kryoschnitte und der am lebenden Sphäroid oder vitalen Sphäroid gemessenen Durchmesser kam ein ungepaarter t-Test zur Verwendung, analog beim Vergleich der Größen zwischen Axiovision und manuell gemessenen Werten. Eine statistische Signifikanz bestand bei $p<0,05$. Im Text sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

6. Ergebnisse

6.1 Vorversuche zur Lebendfluoreszenzfärbung

In dieser Arbeit wurden die drei verwendeten Zelltypen (HDMEC, NHDF und HOB) mit drei verschiedenen Lebendfluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Zwei dieser Farbstoffe, der PKH 26- und der Cell Brite-Farbstoff, wurden im Rahmen dieser Arbeit in Vorversuchen getestet und die Färbemethode optimiert, sowie für alle drei Färbungen die Färbeeffizienz bestimmt.

PKH 26-Färbung

Nach Durchführung der PKH 26-Färbung an Zellen in Suspension in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration (Standardkonzentration) zeigten sich beim Betrachten der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop rot fluoreszierende Kristalle und ungleichmäßig, stark punktuell gefärbte Zellen.
Mit dem Ziel, eine Kristallbildung zu vermeiden, wurde die PKH 26-Färbung in einer 1:5 Verdünnung an Zellen in Suspension durchgeführt. Hierbei zeigte sich erwartungsgemäß eine geringere Färbeintensität. Kristalle wie sie in der Standardkonzentration vorkamen, waren nicht zu beobachten.
Da wir zur Sphäroidherstellung adhärente Zellen färben, wurde die Färbung danach an adhärent wachsenden Zellen durchgeführt. Auch hier wurden die Standardkonzentration und die 1:5 Verdünnung miteinander verglichen. Hier sah man in beiden Konzentrationen eine gleichmäßige Färbung ohne Kristallbildung. Daraus schlussfolgerten wir, dass die PKH 26-Färbung auch für adhärent wachsende Zellen geeignet ist.
Der nächste Vorversuch bestand darin, Sphäroide bestehend aus adhärent gefärbten Zellen herzustellen und danach Schnitte der Sphäroide in Bezug auf die Fluoreszenz zu analysieren. Hier zeigte sich bei der Standardkonzentration eine sehr starke gleichmäßige Färbung. In der 1:5 Verdünnung war die Färbung der Zellen im Sphäroid im Gegensatz zur 2D-Kultur immer noch stark und auch gleichmäßig. Daher entschieden wir uns, für unsere Versuche die 1:5 Verdünnung des PKH-26-Farbstoffes zu verwenden.

Cell Brite-Färbung

Bei der Cell Brite-Färbung wurden adhärente HOB gefärbt. Laut Herstellerprotokoll muss die Inkubationszeit je nach Anwendungsgebiet individuell in Vorversuchen bestimmt werden. Um das Färbeprotokoll an die anderen beiden Färbeprotokolle anzupassen, testeten wir 10, 20 und 60 min Inkubationszeit. Bei allen drei Inkubationszeiten war das Färbeergebnis in der 2D-

Kultur diffus und wenig abgrenzbar. Nach 10 und 20 min war eine nur sehr schwache Färbung zu erkennen. Wir entschieden uns für eine Inkubationszeit von 60 min, weil hier das Färbeergebnis am besten war.
Als nächstes wurden Sphäroide aus adhärent gefärbten Zellen hergestellt, um die Färbung im Sphäroidschnitt zu beurteilen. In den mikroskopierten Schnitten dieser Sphäroide zeigte sich die Cell Brite-Färbung stärker als in der 2D-Kultur.
Wir entschieden uns auf Grund dieser Ergebnisse für die Färbung von adhärenten Zellen mit einer Inkubationszeit von 60 min.

CMFDA-Färbung

Bei der CMFDA-Färbung wurden ebenfalls adhärente Zellen gefärbt. Laut Protokoll des Herstellers können sowohl adhärente Zellen als auch Zellen in Suspension gefärbt werden. Auch bei dieser Färbung sollen laut Hersteller die Inkubationszeiten sowie Färbekonzentrationen je nach Zelltyp und Anwendungsgebiet in Vorversuchen bestimmt werden. Wir hatten in unserer Arbeitsgruppe das Färbeprotokoll für diesen Farbstoff bereits optimiert. Nach zweimal 30 min Inkubationszeit wurde ein sehr gleichmäßiges Färbeergebnis sowohl bei Zellen in 2D-Kultur als auch im Sphäroidschnitt erreicht.

Färbeeffizienzen

Die Färbeeffizienzen betrugen für die HDMEC, die mit dem PKH 26-Farbstoff gefärbt wurden, 97,8 ± 4,6%, für NHDF, die mit dem CMFDA-Farbstoff gefärbt wurden, 99,8 ± 0,8% und für die mit dem Cell Brite-Farbstoff gefärbten HOB 95,2 ± 8,7% (Abb. 8 A-C).

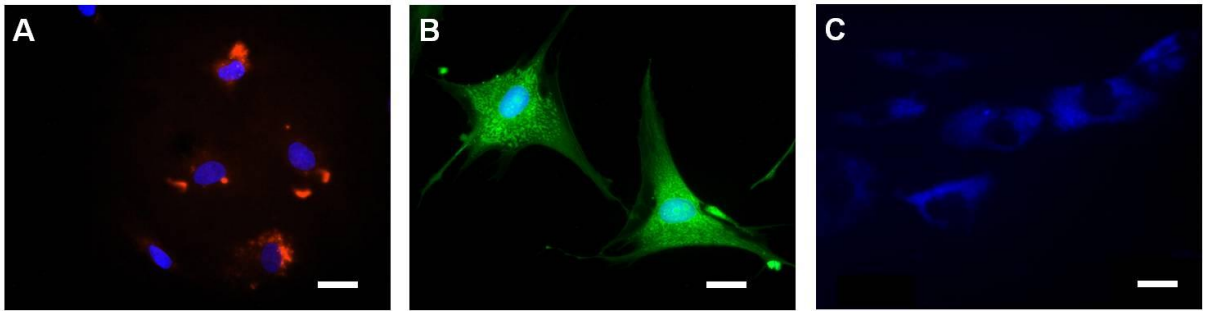

Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von lebendfluoreszenzgefärbten Zellen in 2D-Kultur. Die Zellkerne sind mit Dapi gegengefärbt (A, B). A: HDMEC mit PKH 26 gefärbt, B: NHDF mit CMFDA gefärbt, C: HOB mit CellBrite gefärbt. Maßstabsbalken 100 µm

6.2 Qualitative Beurteilung von Sphäroidschnitten

Gruppe I: 50% NHDF und 50% HDMEC

Im Zellkultur-Bild der Sphäroide der Gruppe I, hatten die Sphäroide eine kompakte und runde Form. Weiterhin war zu erkennen, dass keine Zellen um das Sphäroid herum an der Agarose festgewachsen waren (Abb. 9 A).
Auch im REM zeigten die Sphäroide eine kompakte, runde und klar abgegrenzte Form (Abb. 9 B). Weiterhin waren die Einzelzellen deutlich zu erkennen sowie eine Vielzahl von Filopodien. Diese sind ein Hinweis auf intensive Zell-Zell-Kontakte (Abb. 9 C).
In den Fluoreszenzschnitten war an Tag 1 zu beobachten, dass die NHDF am Rand des Sphäroids sehr eng zusammenlagen. Unterhalb dieses Randes sah man ein NHDF-freies Areal. In der Mitte des Sphäroides lagerten sich die NHDF wieder eng aneinander (Abb. 10 A und 11 A).
Mit der Zeit kam es innerhalb des Sphäroids zu Umlagerungsprozessen, sodass die Zellen gleichmäßiger im Sphäroid verteilt waren als an Tag 1 (Abb. 10 B und 11 B). Diese Beobachtung war bei den 10.000er-Sphäroiden deutlicher als bei den 50.000er-Sphäroiden. Zum Teil zeigte sich eine zwiebelschalenartige Anordnung der Zellen (Abb. 10 C).
Die HDMEC waren an Tag 1 im Gegensatz zu den NHDF flächig angeordnet und über das gesamte Sphäroid verteilt, wenn auch zu beobachten war, dass sie am Rand, genau wie die NHDF, enger beisammen lagen (Abb. 10 D und 11 D).
Die Verteilung der HDMEC veränderte sich über die Zeit nicht so stark wie die der NHDF. Man konnte beobachten, dass sich die HDMEC an Tag 3 und 6 leicht innerhalb des Sphäroids zusammen lagerten und dadurch der flächige Eindruck von Tag 1 etwas verloren ging (Abb. 10 E, F und 11 E, F).
Insgesamt war bei den 50.000er-Sphäroiden die Ausbildung von Endothelzell-freien Arealen deutlicher zu erkennen als bei den 10.000er-Sphäroiden.

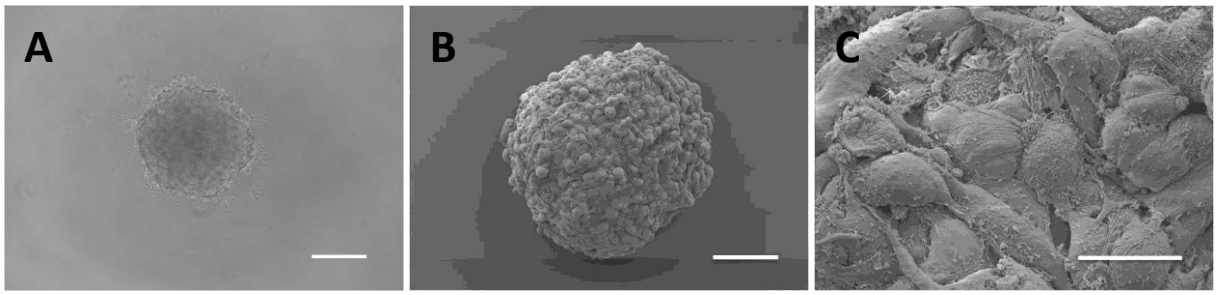

Abbildung 9: A: Lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast) eines 10.000er-Sphäroids Tag 1 bestehend aus 50% NHDF und 50% HDMEC; B und C: REM-Aufnahmen eines 10.000er-Sphäroids bestehend aus 50% NHDF und 50% HDMEC; SE-Detektor. A: Maßstabsbalken 200 µm, B: Maßstabsbalken 100 µm, C: Maßstabsbalken 20 µm

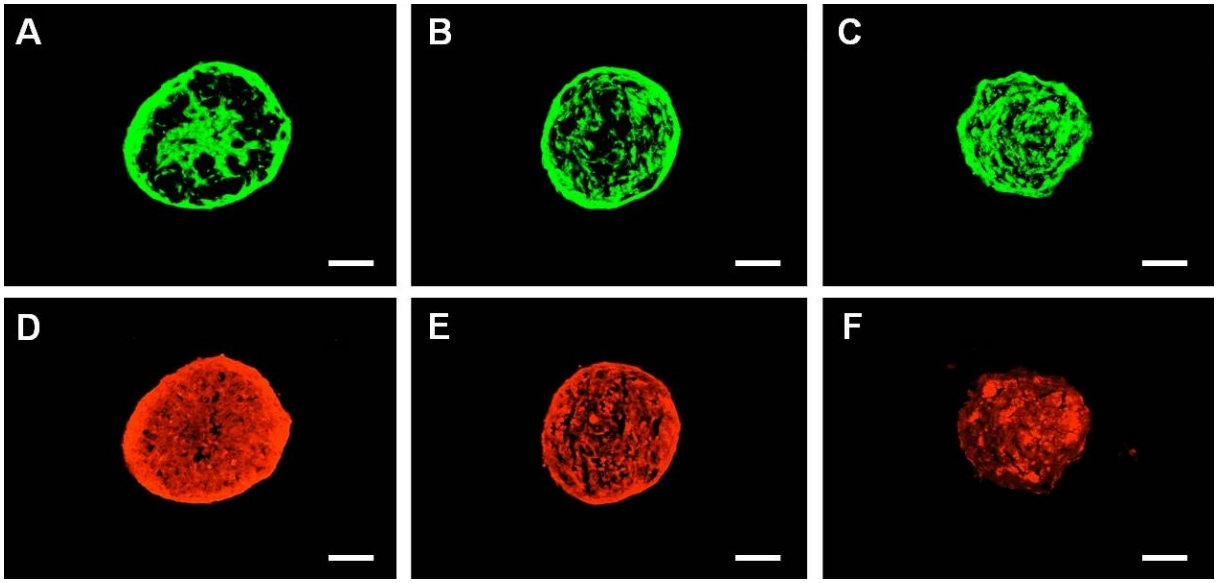

Abbildung 10:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme beispielhaft ausgewählter Kryoschnitte von Sphäroiden (10.000 Zellen) der Gruppe I. NHDF (A-C) sind mit CMFDA, HDMEC (D-F) mit PKH26 gefärbt. Dargestellt sind jeweils für die Tage 1, 3 und 6 die einzelnen Fluoreszenzkanäle des gleichen Schnittes. (A, D) d 1, (B, E) d 3, (C, F) d 6. Maßstabsbalken 100 µm

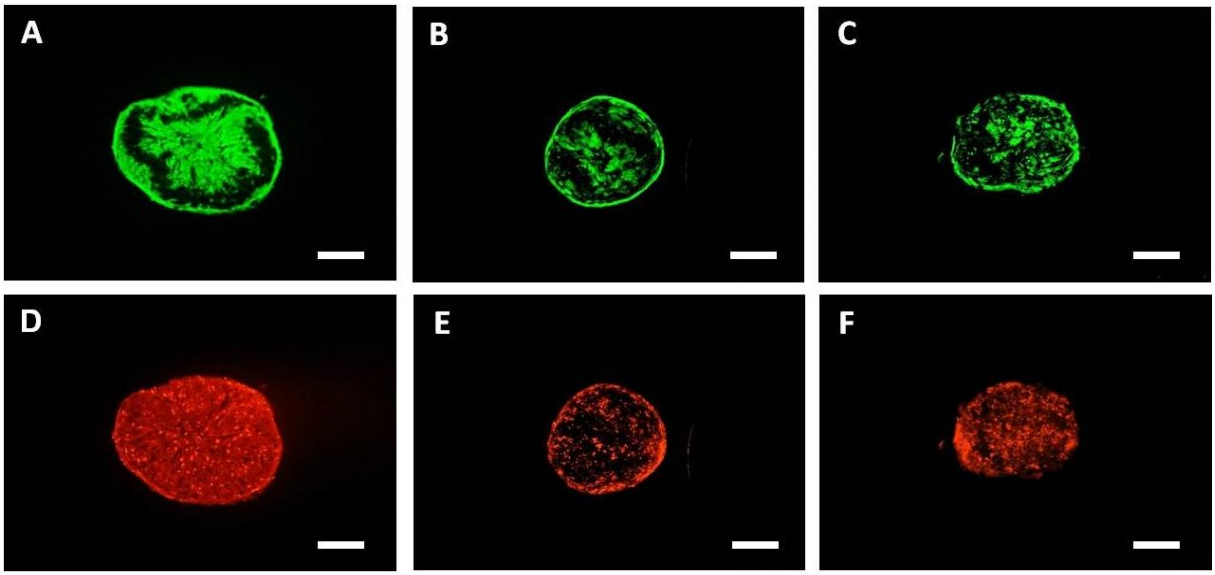

Abbildung 11:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme beispielhaft ausgewählter Sphäroide (50.000 Zellen) der Gruppe I. NHDF (A-C) sind mit CMFDA, HDMEC (D-F) mit PKH26 gefärbt. Dargestellt sind jeweils für die Tage 1, 3 und 6 die einzelnen Fluoreszenzkanäle des gleichen Schnittes. (A, D) d 1, (B, E) d 3, (C, F) d 6. Maßstabsbalken 200 µm

Gruppe II 50% HOB und 50% HDMEC

In Gruppe II zeigte sich sowohl im Phasenkontrast als auch im REM eine vergleichbare Morphologie wie in Gruppe I (Abb. 12).
Ähnlich wie die NHDF lagen die HOB am Rand dichter organisiert, jedoch waren sie insgesamt gleichmäßiger über das Sphäroid verteilt (Abb. 13 A). Mit zunehmendem Alter zeigte sich eine zunehmende Anlagerung in den Randbereichen des Sphäroids, wohingegen sich die HOB in der Sphäroidmitte zunehmend aufgelockert verteilten (Abb. 13 B und C). Insgesamt ähnelte die Verteilung der HOB der Verteilung der NHDF aus Gruppe I. Auch die Verteilung der HOB in den 10.000er und 50.000er-Sphäroiden ähnelte sich. In den 50.000er-Sphäroiden zeigte sich das Sphäroidzentrum leicht kompakter als bei den 10.000er-Sphäroiden (Abb. 14 A-C).
Bei den HDMEC war insgesamt zu beobachten, dass sie an den Tagen 1, 3 und 6 am Rand dichter lagen als innerhalb des Sphäroids. Insgesamt verteilten sich die HDMEC genau wie in Gruppe I flächiger als die HOB. Über die Zeit verlor sich diese gleichmäßige Verteilung über die Fläche (Abb. 13 und 14 D-F). Diese Anordnung der HDMEC war sowohl bei den 10.000er- als auch bei den 50.000er-Sphäroiden zu erkennen. Bei einigen der älteren 50.000er-Sphäroide war ein endothelzell-armes Areal in der Mitte des Sphäroids zu erkennen (Abb. 14 E und F).

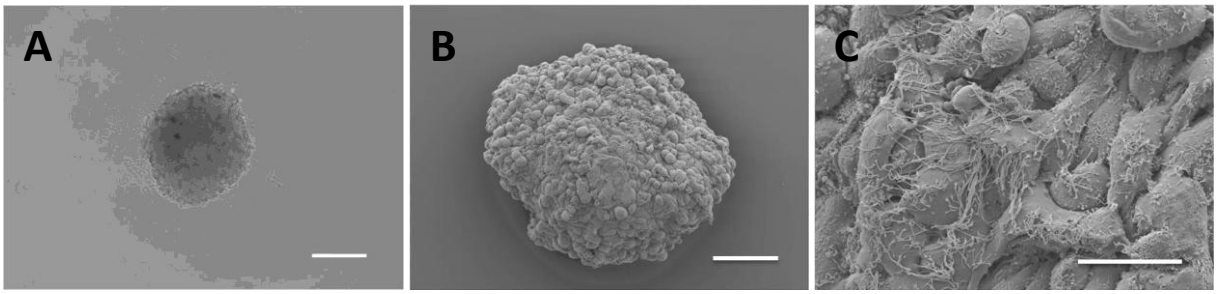

Abbildung 12:
A: Lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast) eines 10.000er-Sphäroids Tag 1 mit 50% HOB und 50% HDMEC; B und C: REM-Aufnahmen eines Sphäroids bestehend aus 10.000 Zellen (50% HOB, 50% HDMEC), SE-Detektor; A: Maßstabsbalken 200 µm, B: Maßstabsbalken 100 µm, C: Maßstabsbalken 20 µm

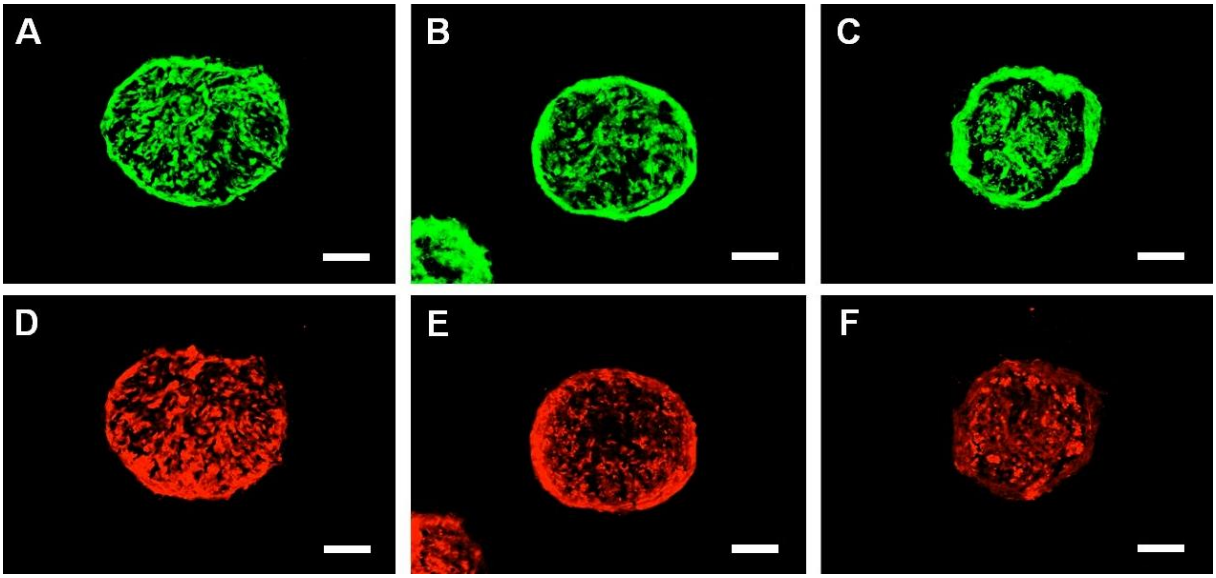

Abbildung 13:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von beispielhaft ausgewählten Kryoschnitten von Sphäroiden (10.000 Zellen) der Gruppe II. HOB (A-C) sind mit CMFDA, HDMEC (D-F) mit PKH26 gefärbt. Dargestellt sind jeweils für die Tage 1, 3 und 6 die einzelnen Fluoreszenzkanäle des gleichen Schnittes. (A, D) d 1, (B, E) d 3 (C, F) d6. Maßstabsbalken 100 µm

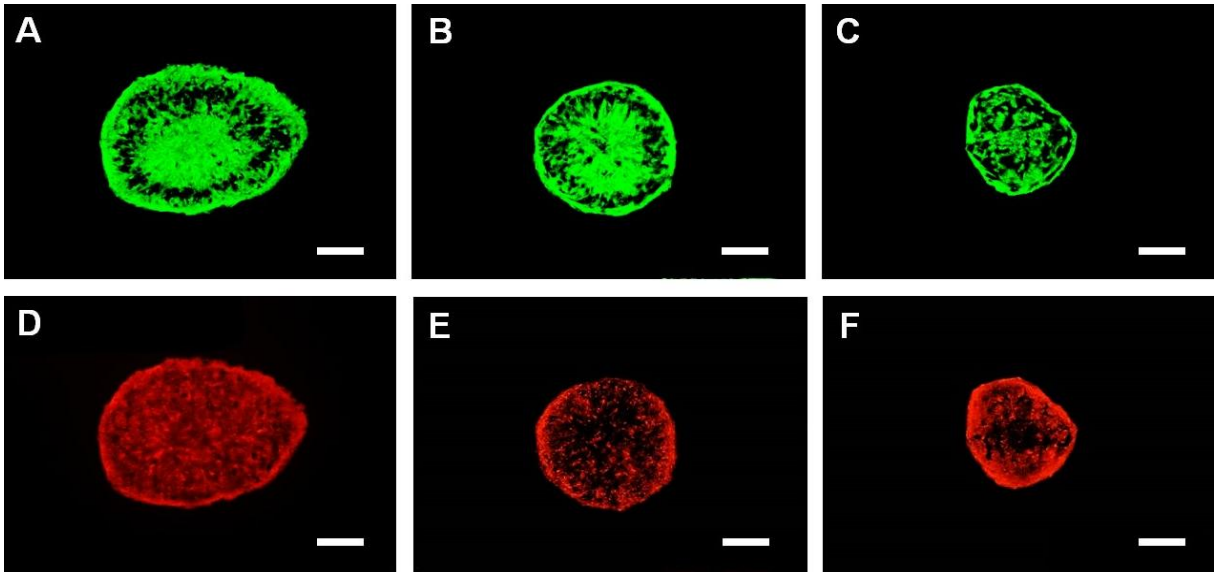

Abbildung 14:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme beispielhaft ausgewählter Sphäroide (50.000 Zellen) der Gruppe II. HOB (A-C) sind mit CMFDA, HDMEC (D-F) mit PKH26 gefärbt. Dargestellt sind jeweils für die Tage 1, 3 und 6 die einzelnen Fluoreszenzkanäle des gleichen Schnittes. (A, D) d 1, (B, E) d 3, (C, F) d 6. Maßstabsbalken 200 µm

Gruppe III 50% HOB, 25% NHDF und 25% HDMEC

Das runde, kompakte Erscheinungsbild war ähnlich wie in den anderen Gruppen auch im phasenkontrastmikroskopischen Bild zu sehen (Abb. 15 A). Auch im REM-Bild konnte man eine kompakte Form mit sehr dicht gepackten Zellen auf der Außenseite sehen (Abb. 15 B und C).

Bei Sphäroiden aus 10.000 Zellen konnte man eine flächige Anordnung der HOB mit wenig zellfreien Arealen an Tag 1 (Abb. 16 A) beobachten, welche sich mit zunehmendem Alter der Sphäroide hin zu mehr zellfreien Arealen veränderte (Abb. 16 B und C).

Eine ähnliche, wenn auch nicht so kompakte Anordnung der Zellen war bei den NHDF zu sehen. Wie bei den Sphäroiden der beiden vorherigen Gruppen fiel eine randständige Anordnung der Zellen, welche über die Zeit zunahm, auf (Abb. 16 D-F). Zum Teil kam es wieder zu einer zwiebelschalenartigen Anordnung der NHDF (Abb. 16 F).

Auch die HDMEC organisierten sich sehr dicht am Rand des Sphäroids mit ansonsten flächiger Anordnung im Sphäroid. Über die Zeit verstärkte sich dieser Rand aus HDMEC (Abb. 16 G-I).

Die Zellanordnung aller 3 Zelltypen unterschied sich in den 50.000er-Sphäroiden deutlich zu den 10.000er-Sphäroiden. Bei allen 3 Zelltypen konnten zellfreie Areale an Tag 1 in der Mitte des Sphäroids nachgewiesen werden, welches mit zunehmendem Alter bei den HOB und den NHDF nicht mehr vorhanden war (Abb. 17 A-F). Eine Ausnahme bildeten hier die HDMEC. Hier sah man von Tag 1 bis Tag 6 zellfreie Areale in der Sphäroidmitte (Abb. 17 G-I). Auch nahm der Durchmesser der Sphäroide deutlich ab über die Zeit.

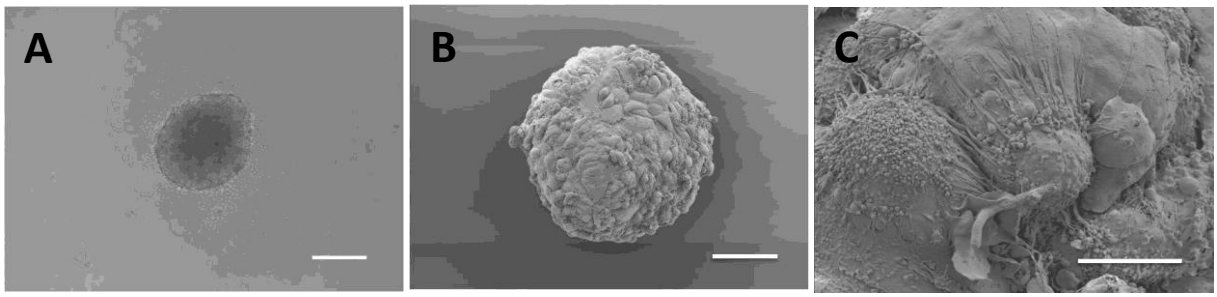

Abbildung 15:

A: Lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast) eines 10.000er-Sphäroids Tag 1 mit 50% HOB, 25% NHDF und 25% HDMEC; B und C: REM-Aufnahme eines 10.000er-Sphäroids mit 50% HOB, 25% NHDF25%, HDMEC, SE-Detektor; A: Maßstabsbalken 200 µm, B: Maßstabsbalken 100 µm, C: Maßstabsbalken 20 µm

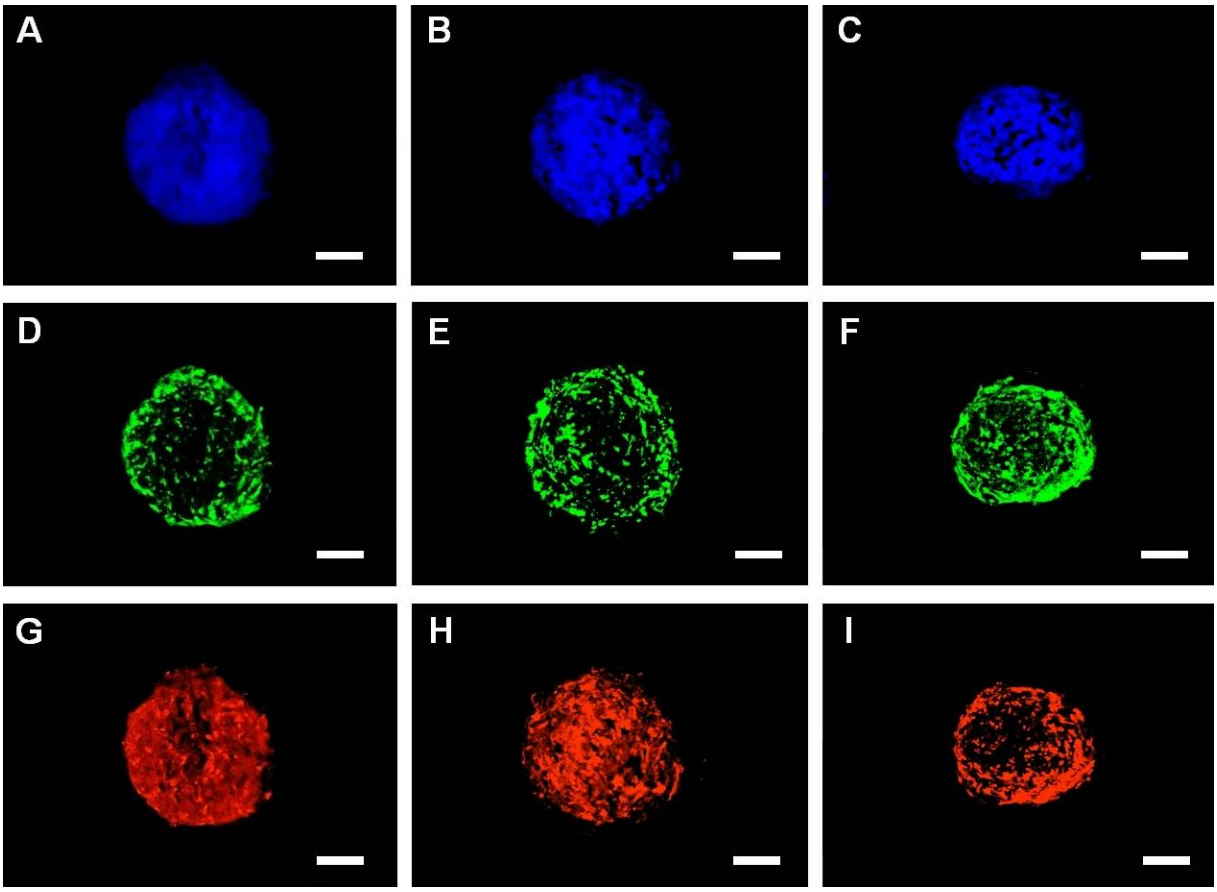

Abbildung 16:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme beispielhaft ausgewählter Sphäroide (10.000 Zellen) der Gruppe III. HOB (A-C) sind mit CellBrite, NHDF (D-F) mit CMFDA, HDMEC (G-I) mit PKH-26 gefärbt. Dargestellt sind jeweils für die Tage 1, 3 und 6 die einzelnen Fluoreszenzkanäle des gleichen Schnittes. (A, D, G) d 1, (B, E, H) d 3, (C, F, I) d 6. Maßstabsbalken 100 µm

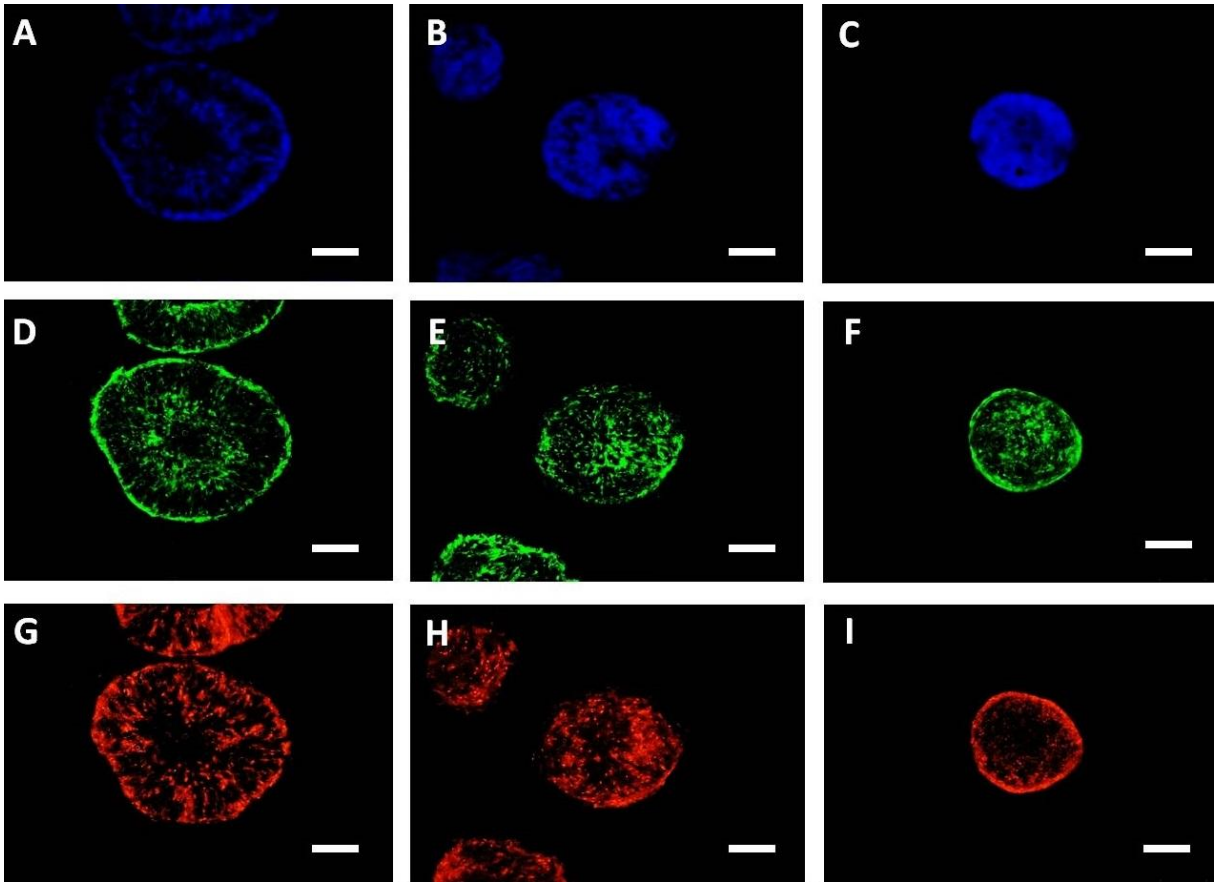

Abbildung 17:
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme beispielhaft ausgewählter Sphäroide (50.000 Zellen) der Gruppe III. HOB (A-C) sind mit CellBrite, NHDF (D-F) mit CMFDA, HDMEC (G-I) mit PKH-26 gefärbt. Dargestellt sind jeweils für die Tage 1, 3 und 6 die einzelnen Fluoreszenzkanäle des gleichen Schnittes. (A, D, G) d 1, (B, E, H) d 3, (C, F, I) d 6. Maßstabsbalken 200 µm

6.3 Durchmesser- und Flächenvergleich der Sphäroide

6.3.1 Durchmesser

Der Durchmesser der Sphäroide wurde am Kryoschnitt in Äquatorebene mit Hilfe der Messfunktion der Axiovision-Software bestimmt. Um Kryoschnitte anhand des Durchmessers der Äquatorebene der Sphäroide zuordnen zu können, wurde in Vorversuchen der Durchmesser lebender Sphäroide bestimmt (Tab. 8). Kryoschnitte mit einem Durchmesser plus minus 15% vom Durchmesser vitaler Sphäroide wurde in die quantitative Analyse eingeschlossen. Es wurden pro Zeitpunkt jeweils 4 Sphäroide vermessen und der Mittelwert dieser Messungen mit dem im Vorversuch bestimmten Durchmesser verglichen. Die bestimmten Standardabweichungen waren in allen Gruppen sehr gering. Mit dem Durchmesservergleich sollte festgestellt werden, ob die Sphäroide beim Einfrieren in flüssigem Stickstoff schrumpfen.

Tabelle 8: Durchmesser vitaler Sphäroide mit 10.000 bzw. 50.000 Zellen an Tag 1, 3 und 6 in µm, n=10.

	Tag 1		Tag 3		Tag 6	
	10.000	50.000	10.000	50.000	10.000	50.000
NHDF-HDMEC 50%-50%	357	625	317	470	321	455
HOB-HDMEC 50%-50%	447	943	359	639	340	554
HOB-NHDF-HDMEC 50%-25%-25%	406	737	346	662	321	607

10.000 er-Sphäroide

In Gruppe I nahmen sowohl der Durchmesser der Kryoschnitte als auch der Durchmesser lebender Sphäroide im Laufe der Zeit ab.
Weiterhin war zu sehen, dass die Durchmesser im Kryoschnitt immer unter denen des lebenden Sphäroids lagen (Abb. 18 A), wobei der Unterschied nur an Tag 1 signifikant war (p = 0,046).
Die Durchmesser der Kryoschnitte der Gruppe II verhielten sich analog zu denen der Gruppe I. Sie nahmen von Tag 1 bis Tag 6 ab. Dasselbe galt für die Durchmesser aus dem Vorversuch (Abb. 18 B). An keinem der Tage ergab sich eine statistische Signifikanz zwischen den Kryoschnittdurchmessern und denen der Vorversuche.
In Gruppe III war zu beobachten, dass die Durchmesser der Kryoschnitte an Tag 1 und 3 jeweils größer waren als die des Vorversuchs. Lediglich an Tag 6 war der Vorversuchs-Durchmesser größer (Abb. 18 D). An Tag 3 war ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Durchmessern der Kryoschnitte und den im Vorversuch ermittelten Durchmessern erkennbar (p=0,025).

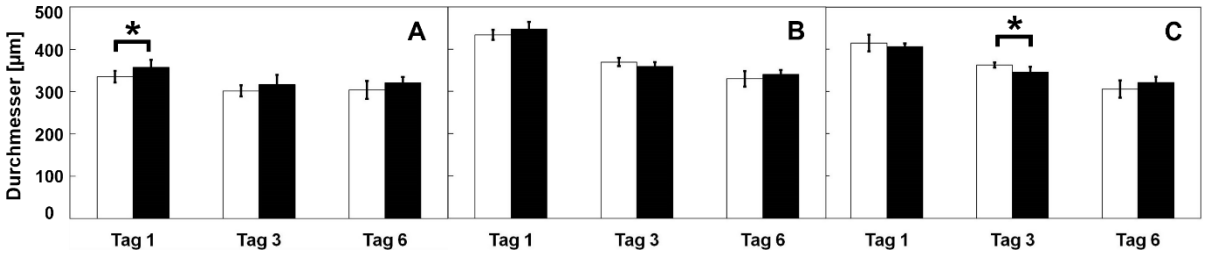

Abbildung 18: Grafische Darstellung des Vergleichs zwischen Kryoschnittdurchmesser und Durchmesser vitaler Sphäroide bei den 10.000er-Sphäroiden. Weiβer Balken: Kryoschnitt, schwarzer Balken: im Vorversuch ermittelter Durchmesser A: Gruppe I, B: Gruppe II und C: Gruppe III; n=4

50.000 er-Sphäroide

Analog zu den 10.000er-Sphäroiden zeigte sich bei den 50.000er-Sphäroiden eine Abnahme des Durchmessers sowohl bei den Kryoschnitten als auch bei den Durchmessern der lebenden Sphäroide mit zunehmendem Alter (Abb. 19).
In der Gruppe I zeigte sich kein Unterschied zwischen den Durchmessern der Kryoschnitte und denen der lebenden Sphäroide (Abb. 19 A)
In Gruppe II waren die Durchmesser der vitalen Sphäroide an Tag 1 signifikant größer als die der Kryoschnitte (Abb. 19 B, p=0,007 für Tag 1).
In Gruppe III gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Durchmessern der Kryoschnitte und der vitalen Sphäroide (Abb. 19 C).

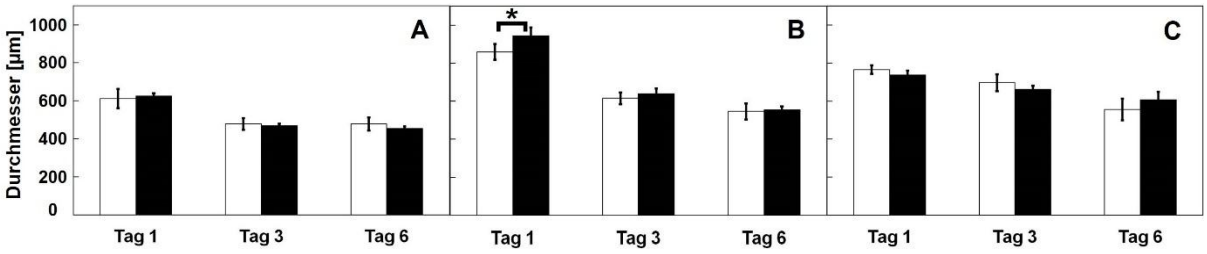

Abbildung 19: Grafische Darstellung des Vergleichs zwischen Kryoschnittdurchmesser und Durchmesser vitaler Sphäroide bei den 50.000er-Sphäroiden. Weiβer Balken: Kryoschnitt, schwarzer Balken: im Vorversuch ermittelter Durchmesser A: Gruppe I, B: Gruppe II und C: Gruppe III; n=4

6.3.2 Fläche

Die Fläche der Schnitte wurde zum einen manuell anhand des mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bildes bestimmt. Dazu wurde händisch ein Messrahmen um den Sphäroidschnitt gezogen, wodurch die Fläche bestimmt werden konnte. Zum anderen wurde die Größe automatisch von der Axiovision-Software beim Auswerten bestimmt. Hierbei wurden die Zellflächen der einzelnen Kanäle semiautomatisch bestimmt und später addiert. Der Vergleich sollte zeigen, inwiefern und ob sich die manuell gemessene Zellfläche von der durch die Software gemessenen Zellfläche unterscheidet.

10.000 er-Sphäroide

Es zeigten sich insgesamt Tendenzen mit einer Abnahme der gemessenen Flächen mit zunehmendem Sphäroidalter.
In Gruppe I wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zellfläche, die von der Axiovision-Software gemessen wurde und der manuell gemessenen Fläche festgestellt. An Tag 6 zeigte sich bei der Messung durch die Axiovision-Software eine hohe Standardabweichung. Insgesamt sah man eine Abnahme der manuell gemessenen Zellfläche von Tag 1 bis Tag 6 (Abb. 20 A).
Auch in Gruppe II zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden gemessenen Flächen. Die Flächen nahmen wie in Gruppe I mit zunehmendem Sphäroidalter ab (Abb. 20 B).
In Gruppe III wurde beobachtet, dass an allen Tagen der Axiovision-Wert über dem manuell gemessenen Wert lag. An Tag 6 war ein signifikanter Unterschied zu erkennen (p=0,010). Auch hier war eine Abnahme der Flächen über die Zeit zu sehen (Abb. 20 D).

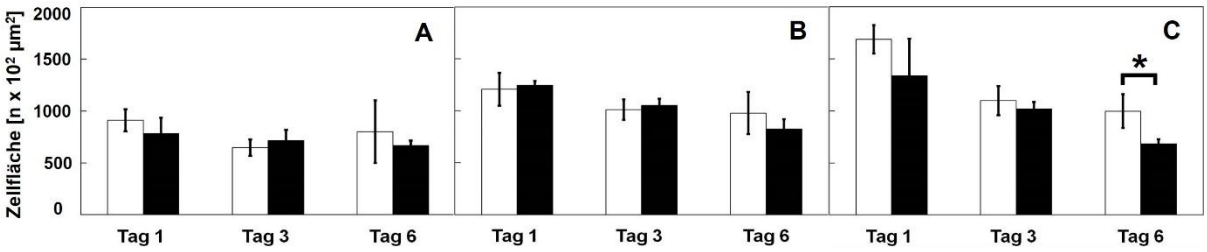

Abbildung 20: Vergleich zwischen der durch die Axiovision-Software (weiß) und manuell gemessene Größe (schwarz) der ausgewerteten Sphäroidschnitte. A: Gruppe I, B: Gruppe II und C: Gruppe III; n=4

50.000 er-Sphäroide

Bei den 50.000er-Sphäroiden zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den 10.000er-Sphäroiden mit einer Abnahme der Fläche mit zunehmendem Sphäroidalter.
In Gruppe I lag die durch die Axiovision-Software bestimmte Fläche an Tag 1 und an Tag 3 unter der manuell gemessenen Fläche, wobei sich an Tag 3 ein signifikanter Unterschied ergab (p=0,032) (Abb. 21 A).
In den Gruppen II und III zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den manuell gemessenen Flächen und der durch die Axiovision-Software gemessenen Fläche. Die Flächen nahmen mit zunehmendem Sphäroidalter ab, wobei sich bei einigen Messungen hohe Standardabweichungen ergaben, beispielsweise an Tag 1 in Gruppe II (Abb. 21 B und D).

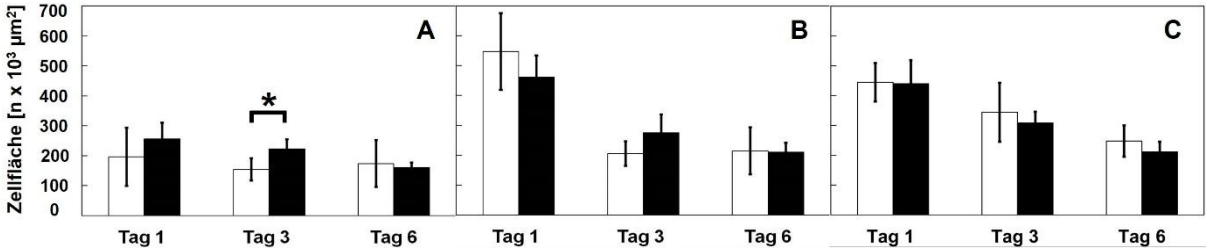

Abbildung 21: Grafische Darstellung des Unterschieds zwischen der durch die Axiovision-Software und manuell gemessene Größe. Weiβer Balken: von Axiovision gemessen, schwarzer Balken: manuell gemessen. A: Gruppe I, B: Gruppe II und C: Gruppe III; n=4

6.4 Auswertung der prozentualen Zellflächenanteile

Für die Auswertung wurden pro Versuch und Größe vier Sphäroide ausgewertet. Diese wurden wie beschrieben möglichst nahe an der Äquatorebene vermessen.

10.000 er-Sphäroide

Insgesamt blieben in allen drei Gruppen die Flächenanteile der untersuchten Zelltypen von Tag 1 bis Tag 6 nahezu konstant. Es zeigten sich nur Tendenzen in der Zu- oder Abnahme der Zellflächenanteile, die jedoch nicht signifikant waren.
Sowohl in der Gruppe I als auch in der Gruppe II zeigte sich eine leichte Abnahme der Zellflächenanteile bei den HDMEC (Gruppe I 48,41 ± 7,88% an Tag 6, Gruppe II 48,38 ± 4,29% an Tag 6) (Abb. 22 A und B).
Die Zellflächenanteile der NHDF hingegen nahmen etwas zu (51,59 ± 7,88% an Tag 6). (Abb. 22 A), anlog der HOB-Zellflächenanteil in Gruppe II (51,62 ± 4,29% an Tag 6) (Abb. 22 B). Die

Veränderungen der Zellflächen von Tag 0 bis Tag 6 waren in beiden Gruppen nicht statistisch signifikant.

Anders als in den Gruppen I und II zeigte sich in Gruppe III bei den HDMEC eine leichte Zunahme des Zellflächenanteils bis Tag 6 (28,99 ± 6,06% an Tag 6). Die Zellflächenanteile der HOB sowie der NHDF nahmen über die Zeit nur leicht ab (HOB 47,9 ± 13 % an Tag 6, NHDF 23,52 ± 6,94% an Tag 6) (Abb. 22 C). Die Veränderungen der HOB und HDMEC waren statistisch nicht signifikant. Der NHDF-Zellflächenanteil nahm gegenüber der berechneten und an Tag 0 ausgesäten zellulären Zusammensetzung der Sphäroide (Tag 0) auf Tag 1 signifikant ab. Die Zunahmen von Tag 1 auf Tag 3 (p=0,038), sowie von Tag 1 auf Tag 6 (p=0,026) waren ebenfalls signifikant.

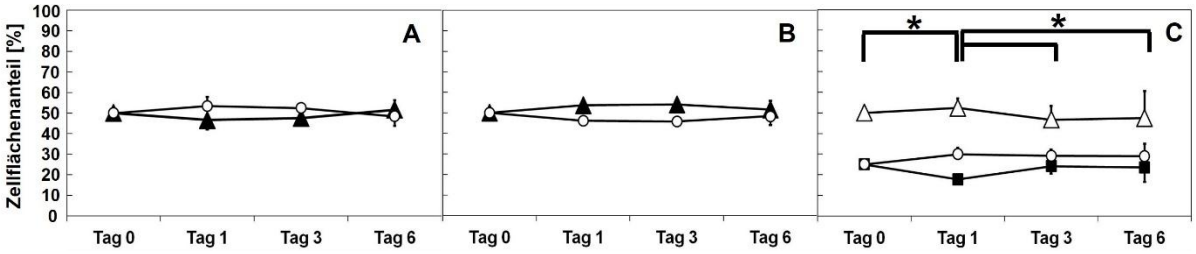

Abbildung 22: Grafische Darstellung der Zellflächenanteile im Sphäroidschnitt der drei Gruppen bei den 10.000er-Sphäroiden, Tag 0 Ausgangsansatz A: Gruppe I HDMEC weiße Kreise, NHDF schwarze Dreiecke, B: Gruppe II HDMEC weiße Kreise, HOB schwarze Dreiecke, C: Gruppe III. HOB weiße Dreiecke, NHDF schwarze Kästchen, HDMEC weiße Kreise, Signifikanzbalken beziehen sich auf die NHDF; n=4

50.000 er-Sphäroide

Die Zellsuspensionen der Ansätze hatten dieselbe prozentuale Zellverteilung wie die der 10.000er- Sphäroide. Wie bei den 10.000er Sphäroiden zeigten die Zellflächenanteile eine gute Konstanz über die Zeit.

In Gruppe I blieb der Zellflächenanteil der HDMEC sowie der NHDF in etwa konstant (HDMEC 51,24 ± 7,64%, NHDF 48,76 ± 7,64% an Tag 6) (Abb. 23 A).

In Gruppe II zeigten die HOB-Zellflächenanteile zunächst eine leichte Zunahme, lagen an Tag 6 jedoch nahezu am Ausgangswert (60,3 ± 3,56% an Tag 3, 49,79 ± 2,5% an Tag 6). Die HDMEC-Zellflächenanteile verhielten sich dazu gegenläufig (39,7 ± 3,56% an Tag 3, 50,21 ± 2,59% an Tag 6) (Abb. 23 B). Die Änderungen der Zellflächenanteile waren bei beiden Zelltypen nicht signifikant.

Die Zellflächenanteile der HOB sowie die NHDF in der Gruppe III blieben nahezu unverändert gegenüber der berechneten und an Tag 0 ausgesäten zellulären Zusammensetzung der

Sphäroide (Tag 0) (HOB 44,79 ± 5,63% an Tag 6, NHDF 25,98 ± 2,9% an Tag 6). Die HDMEC-Zellflächenanteile nahmen wie bei den 10.000er Sphäroiden leicht zu (29,24 ± 2,73% an Tag 6) (Abb. 23 C).

Alle Veränderungen der drei Zelltypen in allen 3 Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

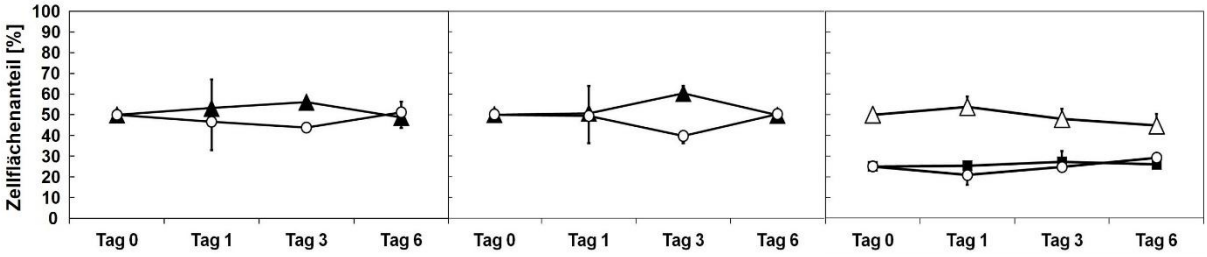

Abbildung 23: Grafische Darstellung der Zellflächenanteile der vier Gruppen bei den 50.000er-Sphäroiden, A: Gruppe I HDMEC weiße Kreise, NHDF schwarze Dreiecke, B: Gruppe II HDMEC weiße Kreise , HOB schwarze Dreiecke, C: Gruppe III HOB weiße Dreiecke, NHDF schwarze Kästchen, HDMEC weiße Kreise; n=4

6.5 FACS-Analyse der dissoziierten Sphäroide

Exemplarisch wurden zehn 50.000er-Sphäroide bestehend aus 50% ungefärbten HDMEC und 50% CMFDA-gefärbten NHDF dissoziiert und analysiert. Die CMFDA-Färbung zeigte auch hier eine hohe Färbeeffizienz von über 99% (Abb. 24 D).

Die ungefärbten HDMEC konnten ohne Probleme von den grün gefärbten NHDF unterschieden werden (Abb. 24 A, B, C).

Es zeigte sich weder an Tag 1, 3 oder 6 ein signifikanter Unterschied zwischen der Zusammensetzung des Ausgangsansatz und der zellulären Zusammensetzung der dissoziierten Sphäroide (Abb. 25).

Außerdem fiel auf, dass der prozentuale Anteil der NHDF konstant bis Tag 6 zunahm, der prozentuale Anteil der HDMEC im Gegenzug dazu abnahm (Abb. 25).

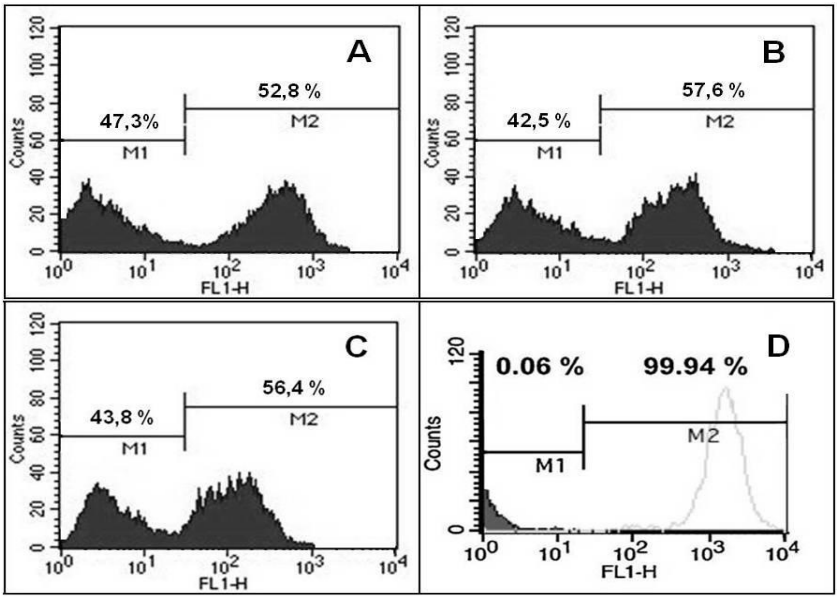

Abbildung 24: Graphische Darstellung der FACS-Analyse von 50.000er-Sphäroiden bestehend aus 50% NHDF (CMFDA-gefärbt) und 50 % HDMEC (ungefärbt), sowie Färbeeffizienz; A: Tag 1, B: Tag 3, C: Tag 6, D: Färbeeffizienz der CMFDA-Färbung von NHDF0; 10 Sphäroide wurden dissoziiert

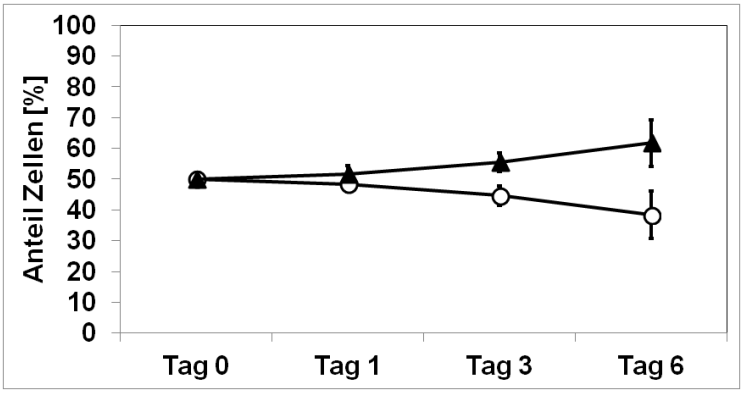

Abbildung 25: Grafische Darstellung der prozentualen Zellanteile in der FACS-Analyse nach Dissoziation von 50.000er-Sphäroiden bestehend aus 50 % HDMEC (ungefärbt) weiße Kreise und 50 % NHDF schwarze Dreiecke (CMFDA-gefärbt), Dissoziation von je 10 Sphäroiden der Gruppe I; n=2

7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird eine neue Methode zur quantitativen Analyse der zellulären Zusammensetzung von Co-Kultur-Sphäroiden vorgestellt. Die Zellen wurden als Monokulturen vor der Generierung der Sphäroide lebendfluoreszenzgefärbt und die Sphäroide mit Hilfe einer semiautomatischen Messroutine quantitativ analysiert. Hierzu wurden Kryoschnitte der Co-Kultur-Sphäroide hergestellt und die Zellflächen der einzelnen Zelltypen semiautomatisch quantifiziert. Weiterhin wurde auch die Anordnung der Zellen im Sphäroid und Reorganisationen der Zellen über die Zeit untersucht.
Hergestellt wurden die Co-Kultur-Sphäroide mit Hilfe der LOT, die eine zuverlässige und reproduzierbare Methode zur Sphäroidherstellung darstellt.

7.1 Lebendfluoreszenzfärbung

Allgemeines

In der vorliegenden Arbeit wurden die unterschiedlichen Zelltypen mit Lebendfluoreszenzfarbstoffen gefärbt. Diese einfach durchzuführenden Färbungen ermöglichten es uns, die einzelnen Zelltypen in Co-Kultur-Sphäroiden voneinander zu unterscheiden. Die HDMEC wurden mit dem 1:5 verdünnten PKH 26-Farbstoff gefärbt. Der PKH 26-Farbstoff zeichnet sich durch seine für den Versuchsaufbau dieser Arbeit wichtigen Eigenschaften aus. Zum einen wird die Vitalität vieler Zelltypen in niedrigen Farbstoffkonzentrationen kaum verringert, zum anderen ist die Fluoreszenz über mehrere Tage der Inkubation stabil. Weiterhin kam es während der Analyse am Fluoreszenzmikroskop zu keinem deutlichen Bleaching, d.h. die Fluoreszenz ist sehr stabil. Diese Eigenschaften der PKH-Farbstoffe wurden auch schon in der Literatur beschrieben (Horan und Slezak 1989, Spötl et al. 1995). Dies war für die vorliegende Arbeit sehr wichtig, da die Sphäroide über einen Zeitraum von bis zu sechs Tagen inkubiert wurden und die Schnitte dann längere Zeit unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet sowie vermessen wurden.
Ein weiterer Vorteil des PKH 26-Farbstoffes ist, dass er nicht oder nur kaum von einer auf die andere Zelle übergeht (Horan und Slezak 1989), auch nicht bei längeren Inkubationszeiten. So können ungefärbte bzw. mit anderen Farbstoffen gefärbte Zellen von PKH-gefärbten Zellen gut unterschieden werden, was auch für die vorliegende Arbeit von großer Bedeutung war.
Weiterhin kann man mit dem Farbstoff sowohl adhärente Zellen als auch Zellen in Suspension effektiv färben. Dies war wichtig für uns, denn die Zellen sollten vor der Sphäroidherstellung in Adhärenz gefärbt werden. Die Intensität des Fluoreszenzsignals hängt hierbei von der

Inkubationszeit, den Inkubationsbedingungen und der verwendeten Konzentration ab. Die Färbeeffizienz deckte sich mit der aus einer Arbeit von Ford et al, in der die Anzahl der gefärbten Endothelzellen über 98 % lag (Ford et al. 1996).

Nach einigen Vorversuchen wurde eine im Vergleich zum Hersteller 1:5 verdünnte Färbelösung verwendet, da die Fluoreszenz ansonsten im Sphäroid sehr stark war. In manchen Teilen des Sphäroids waren Zusammenlagerungen des Farbstoffes zu sehen, die an Kristalle erinnerten. Dies könnte auch Präzipitaten des Farbstoffes entsprechen. Durch diese Bereiche ergab sich ein inhomogenes Färbeergebnis, was wiederum die Messung der Zellflächenanteile beeinflussen könnte. Außerdem ist zu beachten, dass eine erhöhte Konzentration an Farbstoff zu Zytotoxizität führen kann (Teare et al. 1991).

Der Cell Brite-Farbstoff wurde in der Gruppe III für die Färbung der HOB verwendet. Ein vorher von unserer Arbeitsgruppe verwendeter Farbstoff, Cell Tracker™ CMAC, wurde ausgetauscht, weil die Färbung mit CMAC viele Färbeschritte beinhaltet. Daher erwies sie sich als wenig praktikabel für die Versuche dieser Arbeit, weil hierbei die unterschiedlichen Zelltypen parallel gefärbt werden mussten. Durch die Optimierung der Inkubationszeiten bei Verwendung des Cell Brite-Farbstoffs konnten die Färbungen zeitgleich beendet werden und die Sphäroidherstellung konnte unmittelbar folgen. Der Cell Brite-Farbstoff ist ein so genannter Carbocyanin-Farbstoff. Es existieren mehrere Arbeiten, die die guten Eigenschaften dieser Carbocyanin-Farbstoffe darstellen (Honig und Hume 1986, Ferrari et al. 2000). So ist ihre Fluoreszenz sehr stark, nimmt beim Betrachten im Fluoreszenzmikroskop nur wenig ab und ist auch über mehrere Wochen stabil. Dies sind Eigenschaften, die aus den oben genannten Gründen für meine Arbeit sehr wichtig waren. Außerdem beeinflussen diese Farbstoffe den Zellstoffwechsel nicht und sind auch nicht giftig (Honig und Hume 1986, Li et al. 2008). Weiterhin zeigte sich in der vorliegenden Arbeit auch bei diesem Farbstoff eine hohe Färbeeffizienz.

Die NHDF bzw. HOB (in Gruppe II) wurden mit dem Cell Tracker™-Farbstoff CMFDA gefärbt. Der Farbstoff zeigte eine starke gleichmäßige Färbung mit hoher Färbeeffizienz. Durch seine Reaktion mit der zytosolischen Esterase kann der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen. Außerdem können dadurch ausschließlich lebende Zellen gefärbt werden (Wartenberg und Acker 1995, Chandrasekaran et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen vor Herstellung der Sphäroide lebend-fluoreszenzgefärbt, die Sphäroide danach bis zu sechs Tage inkubiert und dann Kryoschnitte angefertigt. Dadurch konnten an Sphäroiden jeden Alters die einzelnen Zelltypen sehr gut unterschieden werden.

Andere Arbeiten beschäftigen sich mit der Färbung ganzer Sphäroide. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass es mit der nachträglichen Färbung der Sphäroide nicht möglich ist, die verschiedenen Zelltypen in Co-Kultur-Sphäroiden unterschiedlich anzufärben. Einen weiteren

Nachteil stellt die Tatsache dar, dass der Farbstoff insbesondere bei Sphäroiden mit großem Durchmesser möglicherweise nicht bis in die tiefen Schichten des Sphäroids eindringt. Dadurch kann keine gleichmäßige Färbung gewährleistet werden (Wartenberg und Acker 1995).

Vorteile der Lebendfluoreszenzfärbung

In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für die Lebendfluoreszenzfärbung, da sie einige Vorteile bietet. Zum einen ist die Färbung vor Herstellung der Sphäroide einfach durchführbar und gleichzeitig weniger teuer als Immunfärbungen. Zum anderen kann man die Lebendfluoreszenzfärbung in einem weiteren Rahmen einsetzen als die Immunfärbungen, denn die Fluoreszenzfärbung benötigt keine zellspezifischen Rezeptoren und kann daher auch für Co-Kulturen, bestehend aus Fibroblasten und nicht ausdifferenzierten Osteoblasten, verwendet werden. Mittels immunhistochemischen Färbungen ist es nicht möglich, Osteoblasten von Fibroblasten zu unterscheiden (Metzger et al. 2013). Die Gene, die in Fibroblasten exprimiert werden, werden auch in unreifen, nicht differenzierten Osteoblasten exprimiert (Ducy et al. 2000). Außerdem kann durch die Färbung der Zellen mit Lebendfluoreszenzfarbstoffen die Anordnung der unterschiedlichen Zelltypen, vor allem der Osteoblasten und Fibroblasten im Sphäroid sehr gut beurteilt werden (Dorst et al. 2014).

7.2 Mono-Kultur- und Co-Kultur-Sphäroide

Mono-Kultur-Sphäroide, die ausschließlich aus NHDF oder HOB bestehen, zeigen eine runde, gut definierte Form. Reine HDMEC-Sphäroide sind weniger klar definiert und scheinen weniger fest angeordnet (Metzger et al. 2011, Metzger et al. 2013). In dieser Arbeit enthalten alle untersuchten Sphäroide HDMEC. Daher wirkt auch hier die Oberfläche etwas locker. Dennoch zeigen alle Sphäroide dieser Arbeit sowohl im phasenkontrastmikroskopischen Bild als auch im REM-Bild eine runde und kompakte Form.

Die Erforschung von Co-Kultur-Sphäroiden ist gerade für Fragestellungen im Tissue-Engineering essenziell, weil sie die physiologischen Aufgaben und die Morphologie von Gewebe in vivo simulieren. Außerdem zeigen sich in Sphäroiden höhere Zellüberlebensraten sowie eine vermehrte Produktion von Proteinen der ECM (Zhuang et al. 2021). Sphäroide gewinnen zusehends an Bedeutung, wenn es darum geht, ein primitives Blutgefäßnetzwerk zu bilden oder den Anschluss an das Blutgefäßsystem des Patienten zu gewährleisten. (Metzger et al. 2011, Laschke und Menger 2017).

Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden daher Co-Kultur-Sphäroide bestehend aus HOB, NHDF und HDMEC verwendet. Gewebe und Organe in vivo bestehen aus verschiedenen

Zelltypen, welche systematisch und funktionell über parakrine Wege sowie direkte Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden sind. Daher ist das Co-Kultur-Sphäroid für die Forschung von sehr viel größerer Bedeutung als das Mono-Kultur-Sphäroid (Takezawa et al. 1992).
Weiterhin haben wir im Rahmen von Arbeiten unserer Arbeitsgruppe festgestellt, dass der Erfolg der LOT stark abhängig ist vom Zelltyp. Zellen besitzen laut Takezawa et al. ein unterschiedlich starkes Vermögen zu aggregieren. Ein weiteres Problem bei der Herstellung der Co-Kultur-Sphäroide sei, dass man die Größe der Sphäroide nicht im Vorhinein bestimmen könne. Das Zusammenlagern der Zellen geschehe per Zufall. Daher entspräche die Zusammensetzung des Sphäroids oftmals nicht der Zusammensetzung der anfänglichen Zellsuspension (Takezawa et al. 1992). Dies steht in klarem Gegensatz zu Ergebnissen sowohl aus meiner Arbeit als auch aus Arbeiten unserer Arbeitsgruppe. Wir haben die LOT als eine zuverlässige Methode etabliert, um Sphäroide konstant gleicher Größe mit leicht steuerbarer Zellzusammensetzung herzustellen. Dies zeigt sich auch in den sehr niedrigen Standardabweichungen der Sphäroidgrößen (Metzger et al. 2011, Metzger et al. 2021).

7.3 Vor- und Nachteile der Kryoschnitte

In dieser Arbeit wurden Kryoschnitte von Sphäroiden hergestellt, um die Morphologie der Zellen bewerten sowie die prozentuale zelluläre Verteilung bestimmen zu können.
Kryoschnitte haben eine Reihe von Vorteilen, denn sie bieten eine einfache Methode, um feine Details des Sphäroidinneren zu analysieren. Auch wenn Kryoschnitte weniger stabil sind als beispielsweise mit Paraffin eingebettete Schnitte, so sind sie doch überlegen, was den Erhalt der Antigenität und die daraus folgende Detektierbarkeit der gefärbten Antigene im Mikroskop betrifft (Fischer et al. 2008). Außerdem wird das Austrocknen der Probe verhindert, indem die Probe weder ausgewaschen noch dehydriert werden muss, wie dies bei Paraffinschnitten der Fall ist.
Ein weiterer Vorteil ist, dass die Probe insgesamt wenig verändert wird, wodurch ein eher natürlicher Zustand der Probe abgebildet wird. Die Proben werden sehr schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dieses schnelle Einfrieren vermindert das Auftreten von Eiskristallen und minimiert dadurch Schäden an der Probe (Fischer et al. 2008, Cohen et al. 2012). Außerdem wird in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt, dass das schnelle Einfrieren der Sphäroide keinen signifikanten Einfluss auf die Sphäroidgröße hat.
Ein Nachteil dieser Methode sowie anderer Schnittmethoden ist jedoch, dass sie invasiv sind und die Sphäroide dadurch komplett zerstört werden, da Serienschnitte angefertigt werden. Dadurch stehen sie nicht mehr für weitere Untersuchungen, wie z.B. eine FACS™-Analyse, zur Verfügung (Sharma et al. 2007). Ein weiterer Nachteil besteht im Zuge der vorliegenden

Arbeit darin, dass die Schnittdicke mit dem zur Verfügung stehenden Kryostat schwer einstellbar war, wodurch die teilweise hohen Standardabweichungen zu erklären sein könnten.

7.4 Morphologische Merkmale der Sphäroide

Vergleich der Sphäroid-Durchmesser

In der hier vorliegenden Arbeit war zu erkennen, dass der Sphäroiddurchmesser über die Zeit abnahm. Dieses Ergebnis deckte sich auch mit weiteren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe (Metzger et al. 2011, Metzger et al 2021). Ein Grund dafür könnte sein, dass die Zell-Zell-Kontakte in älteren Sphäroiden stärker ausgebildet sind und die Zellen im Rahmen von Organisationprozessen näher zusammenrücken. Außerdem konnte unsere Gruppe zeigen, dass Zellen im Sphäroid kleiner werden, je länger sie in 3D wachsen, was sich nach Dissoziation in Einzelzellen zeigte (Grässer et.al. 2018).
Die Sphäroide der hier vorliegenden Arbeit werden von Tag 1 bis Tag 6 kontinuierlich kleiner. Folkman und Hochberg gehen in einer Arbeit davon aus, dass das Wachstum von Zellen unter zweidimensionalen Kulturbedingungen im Prinzip unbegrenzt ist, wenn die Zellen genügend Medium sowie ausreichend Platz zur Verfügung haben. Zellen, die in sphäroidischen Gebilden gezüchtet werden, wachsen nicht über einen gewissen Durchmesser oder eine gewisse Zellzahl hinaus. Daher kommen sie zu dem Schluss, dass Zellwachstum in dreidimensionalen Gebilden selbstregulierend ist (Folkman und Hochberg 1973). Es muss jedoch erwähnt werden, dass auch das Wachstum in der 2D-Zellkultur limitiert ist. Die Zellen können nur eine begrenzte Anzahl von Zellzyklen durchlaufen, dieses Phänomen wird auch Hayflick-Grenze genannt (Shay und Wright 2000). Weiterhin nimmt die Proliferationsrate der Zellen, gemessen an dem Proliferationsmarker Ki67 von Tag 1 auf Tag 3 deutlich ab und kann an Tag 6 nicht mehr gemessen werden (Metzger et al. 2021).
Bourrat-Floeck et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass der Wachstumsstopp der Sphäroide durch Anhäufung wachstumshemmender Stoffe, zusammen mit ständigem Zellverlust, zustande kommt (Bourrat-Floeck et al. 1991).
Ein Grund für das Schrumpfen der Sphäroide über die Zeit könnte auch sein, dass sich die Zellen im Sphäroid organisieren und kompakter zusammenliegen. Sharma et al. stellt in einer Arbeit dar, dass die Sphäroide inkubiert bis Tag 6 immer weniger lichtdurchlässig werden. Man sieht von Tag 1 zu Tag 6 eine Zunahme eines dunklen Zentrums. Das führt Sharma auf eine Zunahme der Dicke sowie auf verstärkte Bindungen der Zellen untereinander im Sphäroidzentrum zurück (Sharma et al. 2007). Es wird auf eine Arbeit von Robinson et al. verwiesen, in der die Rolle von Cadherinen und Integrinen im Sphäroid untersucht wurde. Integrine waren zusammen mit Fibronektin hauptsächlich für die Bindung der Zellen im

Sphäroid verantwortlich (Robinson et al. 2003). Aber auch über Cadherine finden homophile Zell-Zell-Kontakte im Sphäroid statt (Foty und Steinberg 2004).
Auch in einer Arbeit von Takezawa et al. wird gezeigt, dass Sphäroide über die Zeit an Durchmesser verlieren. Hier ist beschrieben, dass sich die Zellen organisieren. Außerdem verschwinden im Laufe der Zeit die Zellzwischenräume im Inneren des Sphäroids. (Takezawa et al. 1993).
Die Vermessung der Kryoschnitte zeigt, dass diese durch die Kryokonservierung tendenziell nicht schrumpfen. In einer Mehrzahl der Fälle waren die Kryoschnitte minimal kleiner als die Durchmesser der lebenden Sphäroide. In manchen Fällen waren sie jedoch auch leicht größer als die lebenden Sphäroide.
Eine leichte Schrumpfung der Sphäroide bei Fixierung und Schneiden wird auch in anderen Arbeiten beschrieben (Dorie et al. 1982, Sutherland et al. 1986).
Auch Paraffinschnitte schrumpfen um 10 - 25%, während Kryoschnitte weder schrumpfen noch anschwellen (Bourrat-Floeck et al. 1991). Den umgekehrten Effekt hat Hitze. Durch Erhöhung der Temperatur auf 43°C - 45°C konnte gezeigt werden, dass die Sphäroide zwischen 10 - 50% an Größe zunahmen (Yi et al. 1987).
Die Temperatur und Fixierungsart hat in vielen Arbeiten scheinbar Einfluss auf die Größe der Sphäroide bzw. Sphäroidschnitte. In der vorliegenden Arbeit beeinflusste die Kryokonservierung diese kaum; dies deckt sich mit den Aussagen von Bourrat-Floeck et al. (Bourrat-Floeck et al. 1991).

Zellverteilung

In dieser Arbeit wurden zum Teil abweichende, aber auch übereinstimmende Ergebnisse im Vergleich zu anderen Arbeiten festgestellt.
Vergleicht man die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit mit einer Arbeit von Wenger et al. (Wenger et al. 2005), so lässt sich feststellen, dass es hier sowohl Ähnlichkeiten als auch entscheidende Unterschiede gibt. Wenger et al. beschreiben in einer ihrer Arbeiten die räumliche Verteilung von HUVEC im Co-Kultur-Sphäroid. Hierzu stellen sie Sphäroide bestehend aus 500 Zellen her. Die Verteilung der zwei verwendeten Zelltypen ist 50% - 50% und die HUVEC werden mit PKH 26 gefärbt. An Tag 1 verteilen sich die HUVEC uniform im Sphäroid, welches der Verteilung der Endothelzellen in meiner Arbeit ähnelt. Mit zunehmendem Alter verlagern sich die HUVEC in das Sphäroidzentrum, wohingegen sich die Endothelzellen in meiner Arbeit auch am Rand des Sphäroids verdichten. Wenger et al. beschreiben, dass die NHDF nur in der Peripherie lokalisiert sind, wohingegen die NHDF in der vorliegenden Arbeit an Tag 1 sowohl am Rand dicht gepackt liegen als auch in der Mitte des Sphäroids. Die Verteilung ändert sich bis Tag 6 wenig, die Zellen lagern sich nur in

Gruppen zusammen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Beobachtungen könnten die Verwendung unterschiedlicher Endothelzelltypen sein oder auch die unterschiedlichen Sphäroidgrößen.

In zwei weitere Arbeiten (Stahl et al. 2004, Wenger et al. 2004) wurden Co-Kultur-Sphäroide untersucht, die in ihrer Zusammensetzung denen aus Gruppe II dieser Arbeit ähnelten. Die Endothelzellen verteilten sich an Tag 1 zunächst über das ganze Sphäroid und verlagern sich mit zunehmendem Alter fast ausschließlich an den Rand des Sphäroids. Anfänglich ist dies übereinstimmend mit meinen Ergebnissen, jedoch gibt es auch Unterschiede. Bei den 10.000er-Sphäroiden sah man eine solche Verteilung nicht, bei den 50.000er-Sphäroiden hingegen sah man mit zunehmendem Sphäroidalter einen endothelzellfreien Kern. Bei Wenger et al. lagen die Osteoblasten gleichmäßig über das ganze Sphäroid verteilt. Diese Verteilung änderte sich nicht über die Zeit. In meiner Arbeit verteilten sich die Osteoblasten ebenfalls vor allem an Tag 1 homogen über das ganze Sphäroid, lagerten sich jedoch bis Tag 6 insgesamt mehr zusammen, wodurch HOB-freie Areale entstanden.

Die Unterschiede in den Ergebnissen lassen sich eventuell dadurch erklären, dass in den zitierten Arbeiten kleinere Sphäroide mit nur 500 Zellen verwendet wurden. Interessanterweise ähneln die Ergebnisse denen der 50.000er-Sphäroide meiner Arbeit (Stahl et al. 2004, Wenger et al. 2004).

Ein weiterer Grund für den Unterschied in den Ergebnissen könnte sein, dass die beiden Arbeiten HUVEC verwenden und die Zellen der hier vorliegenden Arbeit HDMEC sind. HUVEC sind makrovaskulare Zellen, denn sie stammen von der großen Umbilikalvene, wohingegen die HDMEC mikrovaskulare Zellen darstellen, isoliert aus der Vorhaut. Diese beiden Endothelzelltypen unterscheiden sich in ihrem Wachstumsverhalten in vitro, ihren immunologischen Phänotypen, sowie ihrer Regulation von Zelladhäsionsmolekülen (Gille et al. 1996, Jayasinghe et al. 2008).

In einer Arbeit von Saleh et al. (Saleh et al. 2011) wurden Co-Kultur-Sphäroide bestehend aus HUVEC und MSC untersucht. Diese Sphäroide bestanden aus 30.000 Zellen. Die HUVECs wurden mittels Cell Tracker™ Red und die MSC mittels Cell Tracker™ Green gefärbt. Auch in diesen Sphäroiden wurde eine charakteristische Verteilung beobachtet. Die Zellen am Rand zeigten eine flache ausgestreckte Form, wohingegen die Zellen im Inneren des Sphäroids eher rundlich aussahen. Zunächst verteilten sich die HUVEC homogen über das gesamte Sphäroid und bildeten mit zunehmendem Sphäroidalter kompakte Zonen, die einem Netzwerk ähnelten.

Korff et al. (Korff et al. 2001) untersuchten Sphäroide bestehend aus 1.125 HUVEC und 1.125 SMC. Die Verteilung der Zellen wurde an Tag 2 und Tag 4 betrachtet. An Tag 2 sah man eine Verteilung von SMC im Kern des Sphäroids, sowie eine Randschicht von Endothelzellen. Diese Verteilung änderte sich kaum bis Tag 4, nur die Randschicht der Endothelzellen wurde flach und einzellschichtig. Diese in den beiden Arbeiten beschriebene Zellmorphologie ist auch

in den Sphäroiden der vorliegenden Arbeit zu beobachten. Die randständigen Zellen haben eine flache und längliche Gestalt, die in der Mitte des Sphäroids sind eher rund.
Korff et al. beschreiben weiterhin, dass sich die HUVEC am Rand des Sphäroids anordnen. Durch CD 31-Färbung von 10 µm dicken Schnitten konnte die Zellverteilung an drei unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 1, 3 und 7) betrachtet werden. Hier sah man, dass die HUVEC an Tag 1 am Rand, sowie inselartig verteilt im Sphäroid lagen. Bis zu Tag 7 organisierten sich die HUVEC und es bildeten sich primitive endotheliale Netzwerke. Außerdem wurden die Sphäroide mit der Zeit kompakter, wodurch der Durchmesser abnahm. Ein Grund für die Anordnung der Zellen könnte laut Korff et al. sein, dass sich die Zellen bei der Bildung des Sphäroids so organisieren, um einen energetisch möglichst günstigen Zustand zu erreichen. Manche Zellen haben eine hohe Affinität zu anderen Zellen beispielsweise über Cadherine und bilden deshalb den inneren Kern des Sphäroids, andere exprimieren mehr Integrine und bilden die äußeren Bereiche des Sphäroids, da Integrine für die Wechselwirkung mit der ECM verantwortlich sind. Dieses Phänomen bei der Bildung von Sphäroiden wird durch die DAH beschrieben (Foty et Steinberg 2013).

Nekrotisches Zentrum der Sphäroide

In der hier vorliegenden Arbeit war ausschließlich bei den 50.000er-Sphäroiden der Gruppe III ein rundes zellfreies Areal in der Mitte mancher Sphäroide zu sehen. Dieses „Loch“ war nur bei einigen wenigen Sphäroiden dieser Größe zu beobachten. Ein nekrotisches Zentrum, wie es gelegentlich in anderen Arbeiten beschrieben wird, findet sich bei den von mir untersuchten Sphäroiden nicht. Zellfreie Areale kommen im gesamten Sphäroid vor und nehmen tendenziell von Tag 1 bis Tag 6 zu.
Sphäroide, insbesondere wenn sie aus sehr stoffwechselaktiven und proliferativen Tumorzellen hergestellt wurden, besitzen oft einen nekrotischen oder zellfreien Kern (Franko und Sutherland 1979, Ma et al. 2012).
So beschreiben Freyer und Sutherland, dass Sphäroide aus einer äußeren Schicht von proliferierenden Zellen und aus einem inneren Kern mit nicht-proliferierenden Zellen bestehen. Das könnte darauf beruhen, dass in den Sphäroiden ein Konzentrationsgradient von Glucose und Sauerstoff sowie anderen Metaboliten herrscht. Dadurch sind die Zellen im Inneren des Sphäroids dem Fehlen von Glucose und anderer Metabolite sowie der Anhäufung von Stoffwechselendprodukten ausgesetzt (Freyer und Sutherland 1980, Ma et al. 2012). Auch in anderen Arbeiten wird beschrieben, dass die Sphäroide im Inneren Zellen aufweisen, die nicht aktiv im Zellzyklus sind und ab einem Durchmesser von ca. 400 µm bzw. 300 µm einen nekrotischen Kern entwickeln. Es bestehen drei Wachstumszonen im Sphäroid mit einer äußeren schnell proliferierenden Zone, einer mittleren Zone mit wesentlich langsamer

proliferierenden Zellen sowie einem nekrotischen Sphäroidzentrum (Durand und Sutherland 1973, Franko und Sutherland 1979, Ma et al. 2012).
Die Sphäroide der hier vorliegenden Arbeit bestehen nicht aus Tumorzellen, sondern aus primären humanen Zellen. Dennoch ist bei einigen größeren Sphäroiden ein zellfreies Sphäroidzentrum zu sehen. Diejenigen Sphäroide, die ein zellfreies Areal in ihrer Mitte besitzen, haben eine Größe von 530 µm bis 770 µm. Damit liegen sie größenmäßig in einem Bereich, in dem die Tumorsphäroide ihren nekrotischen Kern ausbilden. Eine Erklärung könnte sein, dass die Zellen durch fehlende Nährstoffe und Sauerstoff nekrotisch werden, der Zellverband dadurch aufgelockert wird und die Zellen im Rahmen des Schneidens verloren gehen.

7.5 Vor- und Nachteile der Axiovision-Software-Auswertung

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der gefärbten Kryoschnitte von Sphäroiden sowie die nachfolgende Auswertung erfolgte mit Hilfe der Axiovision-Software. Die Auswertung erfolgte semiautomatisiert, d.h. es mussten während der Messung der Zellflächenanteile manuell Messrahmen um die Sphäroidschnitte gezogen werden. Das aufgenommene Bild wurde aber manuell nicht bearbeitet.
Diese Methode bietet eine Reihe von Vorteilen. So ist die semiautomatisierte Quantifizierung von Zellflächenanteilen im Co-Kultur-Sphäroid möglich. Die Unterschiede zwischen gemessenem Zellflächenanteil und dem initialen stöchiometrischen Verhältnis der Zellsuspension waren sehr gering. Dies deutet darauf hin, dass die Zellzusammensetzung bis zum sechsten Tag stabil zu sein scheint.
Die semiautomatisierte Zellflächenanteilbestimmung stellt außerdem eine objektive Methode dar, die gleichzeitig wenig arbeitsintensiv und einfach durchführbar ist.
Ein Nachteil der Methode ist jedoch, dass manche Ergebnisse hohe Standardabweichungen zeigen. Dies könnte eventuell an der teilweise inhomogenen PKH 26-Färbung liegen. Daher wären weitere Versuche mit unterschiedlichen Zellzusammensetzungen sowie unterschiedlichen Farbzuordnungen sinnvoll. So könnte festgestellt werden, ob bestimmte Zellen mit bestimmten Farbstoffen ein besseres Färbeergebnis liefern. Weiterhin könnten die hohen Standardabweichungen mit inhomogenen Schnittdicken der Kryoschnitte erklärbar sein.
Auch in anderen Arbeiten werden Programme zur Auswertung benutzt und die Vorteile einer solchen Analyse beschrieben. Zum einen können Bilder ohne manuelle Beeinflussung analysiert werden. Zum anderen stellt diese Methode der Bildauswertung eine konstante, objektive und wenig arbeitsintensive Methode dar (Kaiser und Bruinink 2004, Burguera et al. 2010).

7.6 Dissoziation und FACS™-Analyse

Die Dissoziation der Sphäroide und anschließende Zellzahlbestimmung im FACS™ stellt eine Alternativmethode dar, um die Zellanteile im Sphäroid zu bestimmen. Gleichzeitig dient sie der Überprüfung der in dieser Arbeit etablierten Methode zur Zellflächenanalyse.
Dazu wurden exemplarisch zehn Sphäroide mit 50.000 Zellen bestehend aus 50% NHDF und 50% HDMEC hergestellt und dissoziiert. Je älter die Sphäroide waren, desto strengere Dissoziationsbedingungen mussten gewählt werden, d.h. Sphäroide an Tag 1 konnten nur mit Accutase dissoziiert werden, wohingegen bei Sphäroiden nach drei oder sechs Tagen zusätzlich Kollagenase verwendet werden musste, um eine vollständige Dissoziation in Einzelzellen zu erzielen.
In einer Arbeit von Ivascu und Kubbies reichte allein Accutase, um 10.000er-Sphäroide bestehend aus Brustkrebs-Zelllinien zu dissoziieren (Ivascu und Kubbies 2006). In der vorliegenden Arbeit führte Accutase allein bei den 50.000er-Sphäroiden nicht zu einer vollständigen Dissoziation.
Die erschwerten Dissoziationsbedingungen über die Zeit könnten dadurch erklärt werden, dass die ECM innerhalb des Sphäroids sowie die Zell-Zell-Kontakte zunehmen (Sharma et al. 2007).
In der FACS™-Analyse war zu erkennen, dass die Anzahl der HDMEC immer unter der der NHDF lag und im Laufe der Zeit abnahm, während die Anzahl der NHDF stetig zunahm. Im Vergleich dazu zeigten sich bei der Auswertung der Sphäroidschnitte keine signifikante Zu- oder Abnahme der Zellflächenanteile. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen in 2D-Kultur eine stärkere Proliferation von NHDF als von HDMEC (Oberringer et al. 2008).
Ein Erklärungsversuch für die unterschiedlichen Ergebnisse beider Methoden könnte sein, dass durch stringentere Dissoziationsmethoden die Vitalität der Zellen abnehmen und die Apoptoserate zunehmen könnte (Fischer et al. 2018). Hierzu sind weitere Versuche notwendig, um den Einfluss der Dissoziation auf die Zellvitalität zu eruieren.
Vergleicht man die beiden Methoden FACS™ und die Auswertung der Zellflächen mittels Axiovision, lassen sich Vor- sowie Nachteile beider Methoden feststellen. Die Axiovision-Methode erlaubt nicht nur die Auswertung der Zellflächen anhand von Kryoschnitten. Weiterhin kann man hier die zellulären Organisationsprozesse innerhalb des Sphäroids analysieren und sichtbar machen.
Von Nachteil ist jedoch, dass die Qualität der Kryoschnitte essenziell für die quantitative Analyse ist. Außerdem ist die Methode im Vergleich zur FACS™-Analyse zeitintensiver, da man viele Schnitte benötigt, um statistisch überprüfbare Ergebnisse zu generieren.
Die FACS™-Analyse liefert schnelle Ergebnisse, jedoch ist hier keine Aussage zu den Organisationsprozessen im Sphäroid sowie zur Zellverteilung möglich. Weiterhin ist die

Voraussetzung für eine erfolgreiche FACS™-Analyse die optimale Dissoziation der Sphäroide in einzelne Zellen. Dazu müssen die Dissoziationsbedingungen je nach Sphäroidgröße, Sphäroidalter und zellulärer Zusammensetzung der Sphäroide in Vorversuchen bestimmt werden. Hierbei ist jedoch auch zu bedenken, dass verstärkte Dissoziationsbedingungen die Vitabilität der Zellen stark beeinflussen können.
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Wahl der Methode davon abhängt, was in einem Experiment genau festgestellt werden soll. Je nach Fragestellung kann es auch sinnvoll sein, beide Methoden anzuwenden, um so synergetische Effekte nutzen zu können.

7.7 Fazit und Perspektiven

Insgesamt stellt die Untersuchung von Kryoschnitten eine gute Methode dar, um die zellulären Vorgänge im Sphäroid zu erforschen. Mit Hilfe der semiautomatisierten Messroutine ist eine objektive und schnelle Methode entwickelt worden, um Zellflächenanteile im Sphäroid zu bestimmen.
Bei Betrachtung der anhand der Kryoschnitte bestimmten Zellflächenanteile fällt jedoch auf, dass die Standardabweichungen häufig recht groß ausfallen.
Dies könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen wäre es sinnvoll, weitere Zell-Farbstoff-Kombinationen zu testen. Vor allem bei den HDMEC liegt der Verdacht nahe, dass die Wahl des Farbstoffs der Fluoreszenzfärbung den gemessenen Zellflächenanteil beeinflussen könnte. So hat sich bei Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Zellflächenanteile von HDMEC, welche mit CMFDA gefärbt wurden, geringer waren als mit PKH 26 gefärbte HDMEC. Diese Unterschiede gilt es in weiteren Arbeiten näher zu untersuchen.
Die Herstellung von Kryoschnitten stellt zwar eine kostengünstige und schnelle Methode dar, um Schnitte von Sphäroiden herzustellen. Die großen Standardabweichungen könnten auch dadurch begründet werden, dass es mit dem zur Verfügung stehenden Kryostat nicht immer möglich war, die Schnitte so dünn wie nötig anzufertigen. Durch Wartung und Austausch des Mehrfachmessers gegen Einmalmesser könnte dieses Problem eventuell beseitigt werden. Weiterhin wäre anhand von Paraffinschnitten eventuell eine noch bessere Qualität der Schnitte erreichbar. Auch hier wären weitere Versuche notwendig. Zu bedenken ist allerdings auch, dass die Herstellung von Paraffinschnitten eine etwas aufwendigere und teurere Methode darstellt, welche auch die Qualität der Fluoreszenzfärbungen beeinflussen könnte.
Als eine sehr gute zweite Methode stellte sich die FACS™-Analyse dar. Die FACS™-Analyse liefert schnelle Ergebnisse, lässt jedoch keine Rückschlüsse auf Organisationsprozesse der Zellen im Sphäroid zu. Auch hier könnten noch weitere Co-Kultur-Sphäroide und weitere Sphäroidgrößen betrachtet werden.

Vergleichend lässt sich zusammenfassen, dass sich für die Beurteilung der Zellmorphologie und Zellverteilung im Sphäroid die Axiovision-Methode sehr gut eignet, für die reine Quantifizierung von Zellflächenanteilen stellt die FACS™-Analyse eine gut geeignete Methode dar. Je nach Fragestellung wirkt die synergistische Anwendung beider Methoden sinnvoll.
In Zukunft wären noch weitere Zellkombinationen im Sphäroid mit anderen Zelltypen wie zum Beispiel SMC oder Perizyten von Interesse, um mehr über die Verteilung dieser Zellen im Sphäroid zu erfahren.
Sphäroide können eine wichtige Bedeutung in weiteren Forschungsgebieten einnehmen. So können sie beispielsweise zur Bestimmung der Interaktion von Sphäroiden mit entsprechenden Gerüststrukturen (Scaffolds) im Rahmen des Tissue Engineering eingesetzt werden. Insbesondere im Tissue Engineering spielt das Verstehen der Angiogenese eine wichtige Rolle. Auch hier können Sphäroide als Kristallisationspunkte für Angiogenese eingesetzt werden. Außerdem könnte die Etablierung eines Sprouting-Assays zur genaueren Erforschung der Angiogenese von großem Interesse sein. Weiterhin wirkt auch die Erforschung der Sphäroide im Tiermodell vielversprechend. Durch das Verstehen der zellulären Vorgänge im Sphäroid sowie durch weitreichendere Erkenntnisse im Bereich der Angiogenese könnten Sphäroide in Zukunft eine Rolle bei der Verwendung in vivo spielen.

8. Literaturverzeichnis

1. Achilli TM, Meyer J, Morgan JR (2012) Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. Expert Opinion on Biological Therapy 12:1347-1360
2. Albrektsson T und Johansson C (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. European Spine Journal 10:96-S101
3. Anderson, J. M (2001) Biological responses to materials. Annual Review of Materials Research 31:81-110
4. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005) Endothelial/pericyte interactions. Circulation Research 97:512-523
5. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. BioEssays 16:901-906
6. Berendsen AD, Olsen BR (2015) Bone development. Bone 80:14-18
7. Bernstein P, Bornhäuser M, Günther KP, Stiehler M (2009) Knochen-Tissue-Engineering in der klinischen Anwendung: Eine Standortbestimmung. Der Orthopäde 38:1029-1037
8. Bouletreau PJ, Warren SM, Spector JA, Peled ZM, Gerrets RP, Greenwald JA, Longaker MT (2002) Hypoxia and VEGF up-regulate BMP-2 mRNA and protein expression in microvascular endothelial cells: implications for fracture healing. Plastic and Reconstructive Surgery 109:2384-2397
9. Bourrat-Floeck B, Groebe K, Mueller-Klieser W (1991) Biological response of multicellular EMT6 spheroids to exogenous lactate. International Journal of Cancer 47:792-799
10. Breslin S, O'Driscoll L (2013) Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. Drug Discovery Today 18:240-249
11. Burguera EF, Bitar M, Bruinink A (2010) Novel in vitro co-culture methodology to investigate heterotypic cell-cell interactions. European Cells and Materials 19:166-179
12. Burry RW, Vandré DD, Hayes DM (1992) Silver enhancement of gold antibody probes in pre-embedding electron microscopic immunocytochemistry. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 40:1849-1856
13. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE (2007) Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatologica Portuguesa 32:103-110
14. Carano RA, Filvaroff EH (2003) Angiogenesis and bone repair. Drug Discovery Today 8:980-989
15. Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nature Medicine 6:389-395

16. Chandrasekaran AR, Venugopal J, Sundarrajan S, Ramakrishna S (2011) Fabrication of a nanofibrous scaffold with improved bioactivity for culture of human dermal fibroblasts for skin regeneration. Biomedical Materials 6:015001
17. Chitcholtan K, Asselin E, Parent S, Sykes PH, Evans JJ (2013) Differences in growth properties of endometrial cancer in three dimensional (3D) culture and 2D cell monolayer. Experimental Cell Research 319:75-87
18. Clarke B (2008) Normal bone anatomy and physiology. Clinical Journal of the American Society of Nephrology 3:131-9
19. Claeys L, Bravenboer N, Eekhoff EMW, Micha D (2020) Human Fibroblasts as a Model for the Study of Bone Disorders. Frontiers in Endocrinology (Lausanne) 11:394
20. Cohen M, Varki NM, Jankowski MD, Gagneux P (2012) Using unfixed, frozen tissues to study natural mucin distribution. Journal of Visualized Experiments 67:3928
21. Creecy A, Damrath JG, Wallace JM (2021) Control of Bone Matrix Properties by Osteocytes. Frontiers of Endocrinology (Lausanne) 11:578477
22. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS (2012) In search of an osteoblast cell model for in vitro research. European Cells and Materials 24:1-17
23. Dariima T, Jin GZ, Lee EJ, Wall IB, Kim HW (2013) Cooperation between osteoblastic cells and endothelial cells enhances their phenotypic responses and improves osteoblast function. Biotechnology Letters 35:1135-1143
24. Deckers MM, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van Der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CW (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. Endocrinology 143:1545-1553
25. Del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, Breant C, Duarte A, Takakura N, Fukamizu A, Penninger J, Eichmann A (2010) Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. Blood 116:4025-4033
26. Dorie MJ, Kallman RF, Rapacchietta DF, Van Antwerp D, Huang YR (1982) Migration and internalization of cells and polystyrene microsphere in tumor cell spheroids. Experimental Cell Research 141:201-209
27. Dorst N, Oberringer M, Grässer U, Pohlemann T, Metzger W (2014) Analysis of cellular composition of co-culture spheroids. Annals of Anatomy 196:303-311
28. Dubessy C, Merlin JM, Marchal C, Guillemin F (2000) Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy. Critical Reviews in Oncology Hematology 36:179-192
29. Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science 289:1501-4
30. Durand RE, Sutherland RM (1973) Dependence of the radiation response of an in vitro tumor model on cell cycle effects. Cancer Research 33:213-219

31. Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J (2013) Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. Trends in Biotechnology 31:108-115
32. Ferrari A, Hannouche D, Oudina K, Bourguignon M, Meunier A, Sedel L, Petite H (2001) In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye. Journal of Biomedical Materials Research 56:361-367
33. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R (2008) Cryosectioning tissues. Cold Spring Harbor Protocols 4991
34. Fischer B, Meier A, Dehne A, Salhotra A, Tran TA, Neumann S, Schmidt K, Meiser I, Neubauer JC, Zimmermann H, Gentile L (2018) A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres. Stem Cell Research 32:65-72
35. Folkman J, Hochberg M (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. Journal of Experimental Medicine 138:745-753
36. Folkman J, D'Amore PA (1996) Blood vessel formation: what is its molecular basis? Cell 87:1153-1155
37. Ford JW, Welling TH 3rd, Stanley JC, Messina LM (1996) PKH26 and 125I-PKH95: characterization and efficacy as labels for in vitro and in vivo endothelial cell localization and tracking. Journal of Surgical Research 62:23-28
38. Foty RA, Steinberg MS (2005) The differential adhesion hypothesis: a direct evaluation. Developmental Biology 278:255-263
39. Foty RA, Steinberg MS (2013) Differential adhesion in model systems. Wiley Interdisciplinary Reviews Developmental Biology 2:631-645
40. Franko AJ, Sutherland RM (1979) Oxygen diffusion distance and development of necrosis in multicell spheroids. Radiation Research 79:439-453
41. Freyer JP, Sutherland RM (1980) Selective dissociation and characterization of cells from different regions of multicell tumor spheroids. Cancer Research 40:3956-3965
42. Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA (2009) Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. Nature Protocols 4:309-324
43. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Oohashi T, Inoue H, Ninomiya Y (2003) Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. Journal of Biochemistry 133:633-639
44. Garlanda C, Dejana E (1997) Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 17:1193-1202
45. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA (1995) Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 3:1-8

46. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C (2003) VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. Journal of Cell Biology 161:1163-1177
47. Gille J, Swerlick RA, Lawley TJ, Caughman SW (1996) Differential regulation of vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha in dermal microvascular endothelial cells. Blood 87:211-217
48. Grässer U, Bubel M, Sossong D, Oberringer M, Pohlemann T, Metzger W (2018) Dissociation of mono- and co-culture spheroids into single cells for subsequent flow cytometric analysis. Annals of Anatomy 216:1-8
49. Grüneboom A, Hawwari I, Weidner D, Culemann S, Müller S, Henneberg S, Brenzel A, Merz S, Bornemann L, Zec K, Wuelling M, Kling L, Hasenberg M, Voortmann S, Lang S, Baum W, Ohs A, Kraff O, Quick HH, Jäger M, Landgraeber S, Dudda M, Danuser R, Stein JV, Rohde M, Gelse K, Garbe AI, Adamczyk A, Westendorf AM, Hoffmann D, Christiansen S, Engel DR, Vortkamp A, Krönke G, Herrmann M, Kamradt T, Schett G, Hasenberg A, Gunzer M (2019) A network of trans-cortical capillaries as mainstay for blood circulation in long bones. Nature Metabolism 1:236-250
50. Hee CK, Nicoll S (2006) Induction of osteoblast differentiation markers in human dermal fibroblasts: potential application to bone tissue engineering Potential Application to Bone Tissue Engineering. International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society 2006:521-524
51. Heiss M, Hellström M, Kalén M, May T, Weber H, Hecker M, Augustin HG, Korff T (2015) Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. The FASEB Journal 29:3076-3084
52. Hillmann G, Gebert A, Geurtsen W (1999) Matrix expression and proliferation of primary gingival fibroblasts in a three-dimensional cell culture model. Journal of Cell Science 112:2823-2832
53. Honig MG, Hume RI (1986). Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. Journal of Cell Biology 103:171-187
54. Horan PK, Slezak SE (1989) Stable cell membrane labelling. Nature 340:167-168
55. Ivascu A, Kubbies M (2006) Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. Journal of Biomolecular Screening 11:922-932
56. Jayasinghe C, Simiantonaki N, Michel-Schmidt R, Kirkpatrick CJ (2009) Hypoxia-induced reduction of sVEGFR-2 levels in human colonic microvascular endothelial cells in vitro: Comparative study with HUVEC. International Journal of Molecular Medicine 23:49-55

57.Kaiser JP, Bruinink A (2004) Investigating cell-material interactions by monitoring and analysing cell migration. Journal of Materials Science Materials in Medicine 15:429-435
58.Kanczler JM, Oreffo RO (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. European Cells and Materials 15:100-14
59.Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK (2003) Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. Biotechnology and Bioengineering 83:173-180
60.Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE (2006) Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. Journal of Cellular and Molecular Medicine 10:7-19
61.Korff T, Augustin HG (1998) Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. Journal of Cell Biology 143:1341-1352
62.Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG (2001) Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. The FASEB Journal 15:447-457
63.Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. Nature 423:332-6
64.Kronemberger GS, Matsui RAM, Miranda GASCE, Granjeiro JM, Baptista LS (2020) Cartilage and bone tissue engineering using adipose stromal/stem cells spheroids as building blocks. World Journal of Stem Cells 12:110-122
65.Kunz-Schughart LA, Freyer JP, Hofstaedter F, Ebner R (2004) The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model. Journal of Biomolecular Screening 9:273-285
66.Laschke MW, Harder Y, Amon M, Martin I, Farhadi J, Ring A, Torio-Padron N, Schramm R, Rücker M, Junker D, Häufel JM, Carvalho C, Heberer M, Germann G, Vollmar B, Menger MD (2006) Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. Tissue Engineering 12:2093-2104
67.Laschke MW, Menger MD (2017) Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. Trends in Biotechnology 35:133-144
68.Laschke MW, Menger MD (2017) Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications. Biotechnology Advances 35:782-791
69.Li Y, Song Y, Zhao L, Gaidosh G, Laties AM, Wen R (2008) Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI. Nature Protocols 3:1703-1708

70. Loeffler J, Duda GN, Sass FA, Dienelt A (2018) The Metabolic Microenvironment Steers Bone Tissue Regeneration. Trends in Endocrinology and Metabolism 29:99-110
71. Ma HL, Jiang Q, Han S, Wu Y, Cui Tomshine J, Wang D, Gan Y, Zou G, Liang XJ (2012) Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. Molecular Imaging 11:487-498
72. Metzger W, Sossong D, Bächle A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M (2011) The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts, fibroblasts and endothelial cells. Cytotherapy 13:1000-1012
73. Metzger W, Schimmelpfennig L, Schwab B, Sossong D, Dorst N, Bubel M, Görg A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M (2013) Expansion and differentiation of human primary osteoblasts in two- and three-dimensional culture. Biotechnic and Histochemistry 88:86-102
74. Metzger W, Rösch B, Sossong D, Bubel M, Pohlemann T (2021) Flow cytometric quantification of apoptotic and proliferating cells applying an improved method for dissociation of spheroids. Cell Biology International 45:1633-1643
75. Mueller-Klieser W (1987) Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 113:101-122
76. Nauth A, Schemitsch E, Norris B, Nollin Z, Watson JT (2018) Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment? Journal of Orthopaedic Trauma 32:7-11
77. Notingher I, Jell G, Lohbauer U, Salih V, Hench LL (2004) In situ non-invasive spectral discrimination between bone cell phenotypes used in tissue engineering. Journal of Cellular Biochemistry 92:1180-1192
78. Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T (2008) In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. Journal of Molecular Histology 39:37-47
79. Page H, Flood P, Reynaud EG (2013) Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. Cell and Tissue Research 352:123-131
80. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EH (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8:839-845
81. Pampaloni F, Stelzer EH, Masotti A (2009) Three-dimensional tissue models for drug discovery and toxicology. Recent Patdnts on Biotechnology 3:103-117
82. Perry CR (1999) Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. Clinical Orthopaedics and Related Research 360:71-86

83.Risau W (1997) Mechanisms of angiogenesis. Nature 386:671-674

84.Robinson EE, Zazzali KM, Corbett SA, Foty RA (2003) Alpha5beta1 integrin mediates strong tissue cohesion. Journal of Cell Science 116:377-386

85.Saleh FA, Whyte M, Genever PG (2011) Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. European Cells and Materials 22:242-257

86.Santini MT, Rainaldi G (1999) Three-dimensional spheroid model in tumor biology. Pathobiology 67:148-157

87.Schmitz JP, Hollinger JO (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clinical Orthopaedics and Related Research 205:299-308.

88.Shay JW, Wright WE (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. Nature Reviews Molecular Cell Biology 1:72-76

89.Sharma M, Verma Y, Rao KD, Nair R, Gupta PK (2007) Imaging growth dynamics of tumour spheroids using optical coherence tomography. Biotechnology Letters 29:273-278

90.Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG (2012) Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. Nature Protocols 7:1918-1929

91.Spötl L, Sarti A, Dierich MP, Möst J (1995) Cell membrane labeling with fluorescent dyes for the demonstration of cytokine-induced fusion between monocytes and tumor cells. Cytometry 21:160-169

92.Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G (2004) Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. Biochemical and Biophysical Research Communications 322:684-692

93.Steiner D, Lampert F, Stark GB, Finkenzeller G (2012) Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. Journal of Orthopaedic Research 30:1682-1689

94.Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W (1986) Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. Cancer Research 46:5320-5329

95.Takezawa T, Yamazaki M, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K (1992) Morphological and immuno-cytochemical characterization of a hetero-spheroid composed of fibroblasts and hepatocytes. Journal of Cell Science 101:495-501

96.Takezawa T, Mori Y, Yonaha T, Yoshizato K (1993) Characterization of morphology and cellular metabolism during the spheroid formation by fibroblasts. Experimental Cell Research 208:430-441

97.Teare GF, Horan PK, Slezak SE, Smith C, Hay JB (1991) Long-term tracking of lymphocytes in vivo: the migration of PKH-labeled lymphocytes. Cellular Immunology 134:157-170

98.Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, Nagashima M, Nakamura T (2003) Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. Bone 32:491-501

99.Unger RE, Sartoris A, Peters K, Motta A, Migliaresi C, Kunkel M, Bulnheim U, Rychly J, Kirkpatrick CJ (2007) Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. Biomaterials 28:3965-3976

100.Vakhrushev IV, Nezhurina EK, Karalkin PA, Tsvetkova AV, Sergeeva NS, Majouga AG, Yarygin KN (2021) Heterotypic Multicellular Spheroids as Experimental and Preclinical Models of Sprouting Angiogenesis. Biology (Basel) 11:18

101.von Schroeder HP, Veillette CJ, Payandeh J, Qureshi A, Heersche JN (2003) Endothelin-1 promotes osteoprogenitor proliferation and differentiation in fetal rat calvarial cell cultures. Bone 33:673-684

102.Wartenberg M, Acker H (1995) Quantitative recording of vitality patterns in living multicellular spheroids by confocal microscopy. Micron 26:395-404

103.Weber L, Mauch C, Kirsch E, Müller PK, Krieg T (1986) Modulation of collagen type synthesis in organ and cell cultures of fibroblasts. Journal of Investigative Dermatology 87:217-220

104.Wenger A, Stahl A, Weber H, Finkenzeller G, Augustin HG, Stark GB, Kneser U (2004) Modulation of in vitro angiogenesis in a three-dimensional spheroidal coculture model for bone tissue engineering. Tissue Engineering 10:1536-1547

105.Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, Mehlhorn AT, Schmal H, Stark GB, Finkenzeller G (2005) Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. Cells Tissues Organs 181:80-88

106.Yi PN, Alexander CR, Fenn JO, Jarrett JH, Lung B, Wallace KM, Cho C (1987) Swelling of multicellular spheroids induced by hyperthermia. International Journal of Hyperthermia 3:217-233

107.Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ A (1977) Simplified Method for Production and Growth of Multicellular Tumor Spheroids. Cancer Research 37:3639-3643

108. Zhuang P, Chiang YH, Fernanda MS, He M (2021) Using Spheroids as Building Blocks Towards 3D Bioprinting of Tumor Microenvironment. International Journal of Bioprinting 7:444

9. Publikationen

- Metzger W, Schimmelpfennig L, Schwab B, Sossong D, Dorst N, Bubel M, Görg A, Pütz N, Wennemuth G, Pohlemann T, Oberringer M (2013) Expansion and differentiation of human primary osteoblasts in two- and three-dimensional culture. Biotechnic & Histochemistry 88: 86-102

- Dorst N, Oberringer M,. Grässer U, Pohlemann T, Metzger W (2014) Analysis of cellular composition of co-culture spheroids. Annals of Anatomy 196: 303-311

10. Danksagung

Bei der Erstellung dieser Arbeit haben mich viele Menschen unterstützt, bei denen ich mich hiermit bedanken möchte:

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater PD Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger, der mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mich immer wieder motiviert hat diese Arbeit auch nach langer Pause fertig zu stellen. Ich habe viel von ihm gelernt und werde das Verständnis für wissenschaftliches Arbeiten in meinem weiteren Berufsleben häufig gebrauchen.

Ein großer Dank gilt auch meinem Doktorvater zu Beginn PD. Dr. rer. nat. Martin Oberringer, von dem ich ebenfalls viel gelernt habe. Durch seine klugen Anmerkungen und Kritiken habe ich die Doktorarbeit in dieser Gründlichkeit zu Ende bringen können.

Auch möchte ich mich bei den Mitarbeitern des molekularbiologischen Labors, insbesondere bei Daniela Sossong, für die tatkräftige Unterstützung und die Geduld, mir das zellbiologische Arbeiten beizubringen, bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Gunther Wennemuth und Norbert Pütz für die Bereitstellung des REM und für die Unterstützung bei der Arbeit am REM und der Probenvorbereitung.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann für die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Forschungslabor anfertigen zu können und die Bereitstellung der Arbeitsmaterialen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht hat, mich immer wieder motiviert hat die Dissertation fertigzustellen und ohne deren Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre.

11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 11.06.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter:

PD Dr. rer. nat. Wolfgang Metzger

Prof. Dr. rer. nat. Peter Lipp