BMBF-Nachwuchsgruppe ,,Kryo-Nanobiotechnologie" am Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT) Ensheimer Str. 48 66386 St. Ingbert



Fraunhofer Institut Biomedizinische Technik

Abschlussbericht

Kryo-Nanobiotechnologie

Förderkennzeichen:	03N8707
Bewilligungszeitraum:	01.02.2003 - 31.01.2008
Berichtszeitraum:	01.02.2003 - 31.01.2008
Projektleiter:	Prof. Dr. Heiko Zimmermann
Hauptsächlich beteiligte	Dr. Alisa Katsen-Globa
wissenschaftliche Bearbeiter:	Dr. Stephen G. Shirley
	DiplBiol. Friederike Ehrhart
	Dr. Frank Stracke
Datum:	30.09.2008
Verteiler:	Dr. Hans-Jörg Clar
	Forschungszentrum Jülich GmbH
	PTJ –Geschäftsbereich NMT
	Projektträger des BMBF
	Prof. Dr. Günter R. Fuhr
	Direktor Fraunhofer IBMT
Unterschrift Projektleitung	

(Heiko Zimmermann)

1FÖRDERUNGSPOLITISCH RELEVANTE ERGEBNISSE DER BMBF- NACHWUCHSGRUPPE "KRYO-NANOBIOTECHNOLOGIE"3				
2 ARE	2 ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER ARBEITSGRUPPE 5			
3	ARBEITEN UND ERGEBNISSE IM BERICHTSZEITRAUM	6		
3.1	Oberflächen (Methoden)	6		
3.2 Raste	Untersuchung der Grenzfläche Zelle-Substrat und Zelle-Medium: Block-face erelektronenmikroskopie (Block-face REM) und kombinierte Block-face -REM –Gefriersubstitut 13	ion.		
3.3	Adhärente Kryokonservierung in Kryo-Substraten	16		
3.4	Hydrogele (Methoden)	19		
3.4.1	. Mikro-Robotik-System für Generierung von Hydrogel-Spots	19		
3.4.2	3.4.2 Definierte Zelladhäsion auf planaren Substraten durch Anwendung des µContactPrinting 3.4.2.1 Motivation und Aufbau des System			
3.4 M	3.4.2.2 Herstellung von Substraten aus ultra hoch viskosem Alginat medizinischem Grades mit Alginat- Molding			
3.5	Tieftemperatur-Laser-Anwendungen	27		
3.6 3.0	Anwendungen 6.1 Kryokonservierung adhärenter hESC-Kolonien durch Vitrifikation 6.2 Entwickung eines Protokolls zur Vitrifikation adhärenter hESC Kolonien auf modifizierten	30 30		
Tł	hermanox TM -Substraten	31		
WE	ITERE ANGABEN	40		
3.7	Vergleich des Standes der Arbeiten mit dem geltenden Arbeitsplan	40		
3.8	Aussichten auf Zielerreichung	40		
3.9	Zieländerung gegenüber der geltenden Planung			
3.10	Inzwischen bekannt gewordene relevante Ergebnisse Dritter			
3.11	Angaben von gemachten Erfindungen			
4	VERWERTUNGSPLAN	40		

1

Förderungspolitisch relevante Ergebnisse der BMBF-Nachwuchsgruppe "Kryo-Nanobiotechnologie"

Bei der BMBF-Nachwuchsgruppe "Nanotechnologie" handelt es sich um eine personenbezogene Förderung. Sie hatte neben der Aufgabe, exzellente Forschung zu initiieren, auch die Aufgabe, die ausgewählten Projektleiter für hervorgehobene Aufgaben in der Industrie oder Akademie zu positionieren.

Die folgenden chronologisch sortierten Punkte (ohne Anspruch auf Vollständigkeit) spiegeln die persönlichen Meilensteine des Nachwuchsgruppenleiters wieder, die als Resonanz auf die erreichten wissenschaftlichen Ergebnisse zu werten sind.

2003: Aufbau der Nachwuchsgruppe am Fraunhofer IBMT in Sankt Ingbert (Saarland).

2004: Gründung der ersten gemeinsamen Juniorprofessur zwischen der Universität des Saarlandes und der Fraunhofer-Gesellschaft.

2004: Besuch des Bundespräsidenten, Herrn Prof. Dr. H. Köhler, im Rahmen seines Antrittsbesuches im Saarland und des Besuches des Fraunhofer IBMT.

2005: Positive Zwischenevaluierung der Nachwuchsgruppe durch den Projektträger.

2006: Einladung zur Beteiligung am ersten EU-Projekt zur Verbesserung und Standardisierung der Kryokonservierung aller therapeutisch relevanten Stammzelltypen durch Herrn Prof. Dr. J. Hescheler (Universität Köln). Start des "Crystal"-Projektes.

2006: Die Zentrale Ethikkomission für Stammzellenforschung stellt die Hochrangigkeit der kryobiotechnologischen Forschung des Fraunhofer IBMT fest. Der Nachwuchsgruppenleiter erhält die erste Genehmigung zum Import humaner embryonaler Stammzellen innerhalb der Fraunhofer-Gesellschaft.

2006: Die Bill & Melinda Gates Foundation vergibt das einzige aus Deutschland koordinierte Projekt im Rahmen der "Collaboration on AIDS Vaccine Development" an das Fraunhofer IBMT. Grund ist der international anerkannte Stand der kryobiologischen Forschung. Das Projekt wird vom Virologen PD Dr. Hagen v. Briesen geleitet. Der Nachwuchsgruppenleiter ist Principal Investigator für die Universität des Saarlandes sowie Key Scientist für Technologie. Die neuartige Kryobank, die im Rahmen dieses Projektes entsteht, geht 2009 in den "Public Mode" und wird die weltweite HIV-Impfstoffforschung unterstützen.

2006: Positive Evaluation der Juniorprofessur. Zuerkennung des "Tenure Tracks".

2006: Zuerkennung des mit 25.000 Euro dotierten SaarLB-Preises. Übergabe in Anwesenheit des Präsidenten der Fraunhofer-Gesellschaft, Herrn Prof. Dr. H.-J. Bullinger.

2007: Der Nachwuchsgruppenleiter erhält einen Ruf auf eine W3-Professur an der Universität des Saarlandes.

2008: Antritt des Lehrstuhls für "Molekulare und Zelluläre Biotechnologie / Nanotechnologie"

2008: Ausgründung der Firma "Perma-Cryo-Technologie" (Privatausgründung, www.permacryo.com) mit > 1Mio Investorenkapital. Die Firma wird Kryosubstrate herstellen, unter anderem auch für oberflächenbasiertes Einfrieren auf nanostrukturierten Substraten. Die Fraunhofer-Gesellschaft beteiligt sich mit einem Anteil von 22,5%.

2008: Die BMBF-Nachwuchsgruppe wird in eine permanente Fraunhofer-Arbeitsgruppe überführt. Eine weitere permanente Arbeitsgruppe für das Aufgabenfeld "Tieftemperatur-Laseranwendungen" ist in Vorbereitung.

2008: Der Nachwuchsgruppenleiter wird zum Hauptabteilungsleiter in der Fraunhofer-Gesellschaft ernannt.

2008: Der Nachwuchsgruppenleiter wird aufgrund der im Projektzeitraum erarbeiteten Expertise und Leistungen zum Biobank-Vertreter der Fraunhofer-Gesellschaft für die ESFRI-Europastrategie im Biobanking (BBMRI) bestimmt.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass hier im Saarland durch die Fraunhofer-Gesellschaft im Verbund mit der Universität des Saarlandes und der Landesunterstützung eine enorm hohe Nachhaltigkeit erreicht wurde. Dies betrifft zum Einen natürlich die Karriere des Nachwuchsgruppenleiters aber auch den Mehrwert, den die in das IBMT eingebettete Nachwuchsgruppe für das Institut erbracht hat. Die Ergebnisse der Nachwuchsgruppe werden 2010 in Form von echten Produkten, von dauerhaft angebotenen Dienstleistungen durch das Fraunhofer IBMT und durch Spin-Off-Projekte dauerhaft hochwertige Arbeitsplätze am Standort Sankt Ingbert sichern.

Die Analyse des Erfolges zeigt aber auch, dass das weit über das zu erwartende Maß gehende persönliche Engagement des Institutsleiters, Herrn Prof. Dr. G. Fuhr, sowie die beruflichpersönliche und wissenschaftliche Betreuung durch den Projektträger, namentlich hier Herrn Dr. H.-J. Clar, mit ausschlaggebend waren. Dies sollte bei der zukünftigen Förderung berücksichtigt werden. Die Kreativität und das Engagement des Projektträgers, gerade in Hinsicht auf die Vernetzung der thematisch unterschiedlichen Nachwuchsgruppen, hat zudem die Verbundenheit des Nachwuchsgruppenleiters zum Projekt dauerhaft gestärkt. Ein wesentlicher Punkt war auch die Kontinuität in der wissenschaftlichen Begleitung, also ein fester Betreuer währen der insgesamt sechs Jahre (5 Jahre Projektlaufzeit + Vor- / Nachbereitung), durch den Projektträger, die vom Nachwuchsgruppenleiter als sehr wichtig eingestuft wird.

Der Nachwuchsgruppenleiter beendet das Projekt und dankt den genannten Beteiligten und der betreuenden Einrichtung in der Hoffnung, dass die nächste Generation des wissenschaftlichen Nachwuchses wieder in den Genuss dieser außergewöhnlichen Förderung kommt.

2 Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Arbeitsgruppe

Die Nachwuchsgruppe "Kryonanobiotechnologie" hatte zum Ziel, unter Einbeziehung und Ausnutzung nanoskaliger Technologien, die Randbedinungen für zelluläre Ensembles mit therapeutischer Relevanz zu verbessern. Ziel war es, das Verständnis der Prozesse beim Einfrieren von Zellen und die Überlebensraten der Zellen bei diesem Prozess zu verbessern. Hintergrund der Zielstellung war die Erkenntnis, dass für viele Anwendungsbereiche ein hoch-definiertes Biobanking lebender Zellen auf Oberflächen essentiell ist.

Strategisch hatte sich die Nachwuchsgruppe auf die Bereiche "Oberflächen", "Hydrogele" und "Tieftemperatur-Laseranwendungen" fokussiert. Diese Bereiche wurden erfolgreich bearbeitet. Die detaillierten Ergebnisse finden sich in den fünf Zwischenberichten sowie den erschienenen Publikationen. Unveröffentlichte und zentrale Ergebnisse sind in den nächsten Kapiteln noch einmal dargestellt.

Im Bereich "Oberflächen" wurden im Rahmen des Projektes Enabling-Technologien vollständig entwickelt, die erstmals ein Einfrieren auf nanostrukturierten Substaten ermöglichten. Im Verlaufe des Projektes wurden zelluläre Modelle sowie eine große Anzahl von zellbiologisch relevanten Zellininen eingesetzt und erfolgreich konserviert (u.a. humane embryonale Stammzellen, adulte Stammzellen, Neuro-2A-Zellen, Fibrobalsten, Beta-Zellinien, etc.). Neue Auswertungsverfahren, die spezifisch für den Anwendungsbereich des Einfrierens auf nanostrukturierten Oberflächen angepasst wurden (basierend auf Licht- und Elektronenmikroskopie), erlaubten Korrelationen von Einfriererfolgen mit Nanotopographien sowie den Materialeigenschaften.

Im Bereich "Hydrogele" wurden bioaktive und biokompatible Gele eingesetzt und nanoskalig laserbasiert modifiziert. Es konnte im Projektverlauf gezeigt werden, dass alle Grenzflächen von Zellen definiert mit einem Hydrogel modifiziert werden können, so dass ein verbesserter Einfriererfolg erzielt werden kann (siehe angehängte Manuskripte).

Im Bereich "Tieftemperatur-Laseranwendungen" wurden erstmalig neue optische Methoden (u.a. auch Hochgeschwindigkeits-Kryomikroskopie sowie Zwei-Photonen-Kryomikroskopie) entwickelt und erfolgreich demonstriert (siehe angehängtes Manuskript). Es stehen mehrere Lasermessplätze für Tieftemperaturanwendungen (z.B. auch für lokales Auftauen mit IR-Lasern) zur Verfügung.

Abschließend lässt sich sagen, dass das Projekt planmäßig verlaufen ist und die wissenschaftlichen Resultate die Erwartungen übertroffen haben. Es sind aufwendige und neuartige Messplätze am Fraunhofer IBMT entstanden, mit denen nun Spin-Off und Nachfolgeprojekte bearbeitet werden.

3 Arbeiten und Ergebnisse im Berichtszeitraum

3.1 Oberflächen (Methoden)

Selektion und Evaluierung von neuen Materialien und die Entwicklung neuer Methoden für Biokompatibilitätsprüfungen sind im Fokus von vielen biotechnologischen Anwendungen. Ein zentraler Punkt bei solchen Testverfahren ist das Verhalten der Zellen auf mikro-/ nanostrukturierten Oberflächen. Dies umfasst Zelladhäsion, Ausbreitung, Motilität, Proliferation und Zelltod. Zelladhäsion und Ausbreitung spielen die Schlüsselrolle bei Zell-Material Interaktionen. Allerdings ist es sehr schwierig, die Zellausbreitungsfläche zu quantifizieren. Meistens basieren die Untersuchungs- und Quantifizierungsmethoden auf der Immunomarkierung des Zytoskeletts oder der Fokalkontakte mit Hilfe von Durchlicht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie. Die Zellgrenzen bei solchen Mikroskopieverfahren sind nicht deutlich erkennbar und bleichen sehr schnell aus, wodurch die Erkennung der Zellkonturen und eine anschließende Quantifizierung der Zellausbreitungsfläche nicht möglich ist. Außerdem sind die nanostrukturierten Materialien meistens nicht transparent und benötigen für die Untersuchungen hoch auflösende mikroskopische Verfahren, wie zum Beispiel Rasterelektronenmikroskopie (REM). Solche Methoden sind zeitaufwendig und für eine zuverlässige statistische Aussage ist die Untersuchung von vielen Zellen bei hoher Vergrößerung notwendig. Im Rahmen des Projektes wurde eine neue Methode zum schnellen, automatischen "high throughput screening" der Zellausbreitung auf mikro-/ nanostrukturierten Oberflächen mit Hilfe des Rückstreuelektronen (RSE)-Modus am REM entwickelt. Für die quantitative Analyse der Zellausbreitung wurden die Zellen 2, 4, 8 und 24 Stunden auf mikro- oder nanostrukturierten Substraten kultiviert und für das REM vorbereitet. Die Präparationsmethode ist von uns bereits früher beschrieben worden und umfasst Fixierung in Glutaraldehyd, Post-Fixierung in Osmiumtetroxid, Bearbeitung mit Gerbsäure und Uranylazetat, Entwässerung, Kritisch-Punkt-Trocknung und Beschichtung mit Kohlenstoff. Die REM-Abbildungen der ausgebreiteten Zellen wurden im RSE-Modus aufgenommen. In jedem Experiment wurden mindestens 4 Abbildungen aus verschiedenen Regionen des Substrates mit mindestens 300 Zellen analysiert. Aufnahmen wurden mit dem Evotec Acapella Programm bearbeitet und analysiert (Abbildung 1). Die Bildbearbeitung ist mit einer Skriptsprache in das Programm implementiert. Die Bearbeitung des Originalbildes (Abb. 1, a) umfasst die Erzeugung des invertierten Bildes, Generierung und Subtraktion der Hintergrundinformation (Abb. 1, b), Schwellwert-Segmentierung für jede Abbildung (Abb. 1, c), Löschen von nicht-zellulären Objekten (Abb. 1, d, mit Kreis markiert), Trennung von sich berührenden Zellen (Abb. 1, e, Pfeil), und Entfernung von Zellfragmenten an der Peripherie des Bildes (Abb.1, f, Pfeilspitzen).



Abbildung 1: Automatische Bearbeitung von RSE- Bildern.

Bei der Bearbeitung des unregelmäßigen Hintergrunds wurde die gleichmäßige Hintergrundhelligkeit mit Hilfe einer großen Filtermaske über das ganze Bild generiert (Abb. 1, b, homogener Hintergrund). Nach allen oben genannten Schritten wurden die markierten Zellen für weitere Quantifizierung aufgenommen. Mit Hilfe des Maßstabes in der Abbildung und angegebenen Pixelauflösung war die Zellfläche mit dem gleichen Programm kalkulierbar. Die quantifizierte Fläche von Zellen in einem Bild geteilt durch die Zellzahl wurde als Zellfläche in µm² definiert. Auch der Mittelwert der Zellen in RSE- Bildern wurde kalkuliert. Abbildung 2 zeigt die automatische Bearbeitung eines REM- Bildes im sekundären Elektronen-Modus (SE Modus, Abb. 2, a, b) und im RSE Modus (Abb. 2, c, d). Dabei werden die vielen Vorteile des RSE –Verfahrens ersichtlich. In Abbildung 2, a und c, ist ein rechteckige Bereich markiert, der in b und d vergrößert dargestellt und automatisch bearbeitet wurde. Die Trennung der gemeinsam markierten Zellen (Stern-markierte Zellen), Markierung der ganzen Zellfläche (Pfeile) war in SE-Bildern nicht möglich.

Mit Hilfe der oben genannten automatischen Bearbeitung wurde die Zellausbreitung auf nanostrukturierten (carbon nanotubes, Gold-Nanorasen) und mikrostrukturierten (HDPE) Oberflächen ausgewertet (Abbildungen 3, 4, 5). Alle Substrate sind mit Argon-, bzw. Sauerstoffplasma bearbeitet. Die Quantifizierung der Zellfläche zeigte, dass L929 Mausfibroblasten nach 24 Stunden Kultivierung auf Au-Nanorasen weniger als auf C-Nanotubes und noch weniger als auf PE-Mikrosubstrat ausgebreitet sind (Abbildung 6). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen zwei Plasma-Verfahren festgestellt werden. Die Zellzahl-Bestimmung erfolgte aus RSE- Abbildungen und ist auf Abbildung 7 vorgestellt. Die Zahl der adhärenten L929 Zellen auf dem PE-Substrat hat sich während der Kultivierung kaum geändert. Im Gegensatz dazu adhärieren mehr Zellen auf Gold-Substrat. Diese Zahl steigt mit der Zeit der Kultivierung an.



Abbildung 2: Automatische Bearbeitung von gleichem REM-Bild im SE- (a, b) und RSE-Modus (c, d).

Die Zellzahl, die Zellausbreitung und das mögliches Verhalten der L929 Mausfibroblasten bei Kultivierung auf Sauerstoffplasma behandelten Substraten mit unterschiedlichen Nano-, Mikro-Topographien sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. In der Tabelle ist die Zell-Substrat-Interaktion, Zelladhäsion mit gleichzeitiger Ausbreitung und Ablösen von einigen Zellen (möglicherweise bei Vorbereitung zu REM) erfasst. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen 2 und 4 Stunden Kultivierung auf planaren C- und PE- Substraten. Bei weiterer Kultivierung auf PE steigert sich die Zellfläche, aber nicht die Zellzahl. Bei Kultivierung auf Carbon erkennt man eine Steigerung von beiden Parametern, was möglicherweise auf eine Zellproliferation hindeuten könnte. Die große Variabilität der Parameter nach 24 Stunden Kultivierung auf Carbon und PE könnte durch unterschiedliches Zellverhalten erklärt werden. Zum Beispiel: Zellabtrennung vom Substrat, Zellteilung und erneute Adhäsion und Ausbreitung der Tochterzellen.

Das Zellverhalten auf Gold-Nanorasen ist jedoch noch komplizierter, als bei relativ glatten Oberflächen. Es zeigte sich dabei eine reduzierte Ausbreitung mit gleichzeitig steigender Zellzahl. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen wenig Fokalkontakte erzeugen und zwischen 2 und 4 Stunden teilweise durch Apoptose sterben, was zu der reduzierten Zellzahl führen könnte. Eine solche Hypothese benötigt aber noch andere experimentelle Beweise.

Durch die automatische Auswertung der RSE-Bilder konnten nur zwei Parameter des Zellverhaltens analysiert werden. In der Realität sind die Zell-Substrat-Interaktionen sehr kompliziert und umfassen viel mehr abhängige und unabhängige Parameter, wie zum Beispiel spezifische und unspezifische Zelladhäsion, Zellausbreitung, Motilität, Teilung und Zelltod mit folgender Abtrennung, Kontakt- Hemmung des Zellwachstums und Zelldifferenzierung. Ein einzelner Parameter könnte alle diese Prozesse nicht beschreiben. Die Erstellung von Parameterfeldern, ähnlich zur Tabelle 1, könnte der Klassifizierung des Zell- und Substratspezifischen Verhaltens zur multidimensionalen Evaluierung von neu konstruierten Substraten dienen.



Abbildung 3: Repräsentative invertierte RSE- REM- und Fluoreszenz- (Inserts) Abbildungen von L929 Zellen nach der Kultivierung auf den Carbon-Nanotubes. Die Zellen wurden 2 (a und e), 4 (b und f), 8 (c und g) und 24 Stunden (d und h) auf Carbon, behandelt mit Argon-Plasma (a, b, c und d) oder Sauerstoff-Plasma (e, f, g und h) kultiviert.



Abbildung 4: Repräsentative invertierte RSE- REM- und Fluoreszenz- (Inserts) Abbildungen von L929 Zellen nach der Kultivierung auf dem Au-Nanorasen. Die Zellen wurden 2 (a und e), 4 (b und f), 8 (c und g) und 24 Stunden (d und h) auf Au-Nanorasen, behandelt mit Argon-Plasma (a, b, c und d) oder Sauerstoff-Plasma (e, f, g und h) kultiviert.



Abbildung 5: Repräsentative invertierte RSE- REM- und Fluoreszenz- (Inserts) Abbildungen von L929 Zellen nach der Kultivierung auf PE-Mikrosubstraten. Die Zellen wurden 2 (a und e), 4 (b und f), 8 (c und g) und 24 Stunden (d und h) auf PE, behandelt mit Argon-Plasma (a, b, c und d) oder Sauerstoff-Plasma (e, f, g und h) kultiviert.



Abbildung 6: Zellausbreitung bei Kultivierung auf nano-, und mikrostrukturierten Oberflächen, behandelt mit Argon-, oder Sauerstoff-Plasma: Man erkennt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen zwei Plasma-Verfahren (p<0,05). Die Zellen sind weniger ausgebreitet auf Gold-Nanorasen und carbon-Nanotubes, als auf PE-Mikrosubstraten.



Abbildung 7: Zellzahl bei Kultivierung auf nano- und mikrostrukturierten Oberflächen, behandelt mit Argon- oder Sauerstoff-Plasma: Zellzahl wurde aus RSE-Abbildungen kalkuliert: Man erkennt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen zwei Plasma-Verfahren (p<0,05). Mehr Zellen adhärieren auf Gold-Nanorasen als auf PE- Mikrosubstraten.

Material/time	Cell number	Cell area	Cell behaviour
С			
2-4 h	0	0	adhesion/detachment, spreading
4-8 h	+	++	proliferation, spreading
8-24 h	+	++	proliferation, spreading
Au			
2-4 h	-	+	adhesion/detachment, spreading, apoptosis
4-8 h	++	-	advanced adhesion, reduced spreading, proliferation
8-24 h	++	-	advanced adhesion, reduced spreading, proliferation
PE			
2-4 h	0	0	adhesion/detachment, spreading
4-8 h	0	+++	advanced spreading
8-24 h	0	+++	advanced spreading

Tabelle 1: Verhalten von L929 Mausfibroblasten nach Kultivierung auf nano-, und mikrostrukturierten Oberflächen, behandelt mit Sauerstoffplasma. "0" entspricht einem bleibenden Wert; "+"- einem steigenden Wert und "-" einem reduzierten Wert.

3.2 Untersuchung der Grenzfläche Zelle-Substrat und Zelle-Medium: Blockface Rasterelektronenmikroskopie (Block-face REM) und kombinierte Block-face -REM –Gefriersubstitution.

Die Untersuchung der Zelle-Substrat-Grenzflächen vor und nach der oberflächenbasierten Kryokonservierung könnte Daten über den Abstand der Zelle zum Substrat liefern. Dies könnte als Grundlage für weitere Prognosen zur Ablösung bzw. Adhäsion dienen. Es ist bekannt, dass die Zellen am Substrat mit der Hilfe von Fokalkontakten adhärieren. Die Größe dieser Zellstrukturen liegt unter 100nm und könnte nur mit hochauflösender Transmissionsmikroskopie (TEM) untersucht werden. Für TEM müssen Ultradünnschnitte mit Hilfe eines Ultramikrotoms hergestellt werden, damit der Elektronenstrahl beim Mikroskopieren die Probe durchdringe kann. Allerdings ist das Schneiden von harten Materialien wie Silizium oder Metallen nicht immer möglich. Als Alternative haben wir eine neue Block-Face Methode für die REM-Untersuchung von auf Nanostrukturen kultivierten Zellen entwickelt.

Die Methode basiert auf der Präparation der Zellen für das REM mit einer Osmium-, Gerbsäure- und Uranylazetat- Imprägnierung. Nach Entwässerung und Kritisch-Punkt-Trocknung wurden die Zellen mit Hilfe des REMs mikroskopiert und weiter in Epoxyharz (Epon) eingebettet, wie für die klassische TEM benötigt. Die eingebetteten Präparate schnitten wir mit einer Diamantsäge und polierten sie mit Diamantpaste, um eine glatte Oberfläche zu erreichen. Die Block-Face-REM Präparate wurden im RSE-Modus mit Hilfe des REMs analysiert und eine X-Ray Mikroanalyse durchgeführt (Abbildung 8). Die invertierten RSE-Abbildungen von Block-Face-REM Präparaten sind der mit Ultrastrukturdarstellung im TEM vergleichbar (Abb.9) und haben durch die Schwermetallimprägnierung einen guten Erhaltungszustand und Kontrast. Bei der Kryokonservierung auf Gold-Nanorasen (Abbildung 9) lag der Abstand zwischen Zelle und Nanostrukturen bei einem Wert von 40nm, was einem Fokalkontakt entspricht. Dieser Abstand hat sich nach der Kryokonservierung bis zu 500nm erhöht (Abbildung 9, c, d), was der Größe einer Eiskristallschicht entsprechen kann.

Um die genaue Lokalisierung der Eiskristalle im Bezug auf die Zell-Substrat-Grenzfläche zu haben wir Block-Face-REM mit der Gefriersubstitution kombiniert. untersuchen, Gefriersubstitution ist eine TEM-Methode für eine bessere Konservierung der intakten Zellultrastruktur. In der Kryobiologie wurde diese Methode zur Visualisierung der während des Einfrier-Auftauprozesses entstehenden Eiskristalle benutzt. Das eingefrorene Präparat wird innerhalb von 3 Tagen von -90°C bis +20°C in einer Substitutionslösung (Aceton/Osmiumtetroxid) erwärmt, dabei werden die Eiskristalle sublimiert und fixiert. Entstehende Hohlräume spiegeln die Größe der Eiskristalle wieder, die mit Hilfe des TEMs untersucht und vermessen werden können. Die Kombination Block-Face-REM mit der Gefriersubstitution ermöglicht es, die Eiskristalldomäne und deren Lokalisierung, die Struktur des Zytoplasmas, sowie den Zell-Substrat-Abstand zu definieren und darzustellen (Abbildung 10). Die Bildung einer intrazellulären Eisdomäne von bis zu 3µm (Abb. 10, b) sowie interzelluläre Eiskristalle mit einer Größe von über 1 µm(Abb. 10, c, d) könnten die Ablösung der Zellen nach dem Auftauen verursachen. Dadurch kann der Erfolg einer Kryokonservierungsmethode ermittelt werden.

Die neu entwickelte Methode kann weitgehend nicht nur in der Kryobiotechnologie, sondern auch in der Materialforschung für die Untersuchung neuer Substrate und deren Zell-Substrat-Verhalten eingesetzt werden. Allein Block-Face-REM ist eine gute Alternative zum TEM ohne Verlust der Information über die Zellultrastruktur.



Abbildung 8: Block-face-REM Methode zur Untersuchung der Grenzflächen Zelle-Nanosubstrat und Zelle-Medium: a- Einbettung in Epoxyharz; b- Schneiden mit der Diamantsäge; c- Polieren mit Diamantspray; d- REM-Abbildung im Rückstreuelektronen-Modus (RSE); e- invertierte REM-Abbildung im RSE-Modus; f- X-ray Elementen-Mikroanalyse.

Abbildung 9: Block-face REM Untersuchung beim Einfrieren von L929 Zellen auf Gold-Nanorasen: a und b- Kontrolle; c und d- nach dem Auftauen.

Abbildung 10.:Kombinierte Block-face REM und Gefriersubstitution für die Bestimmung der Größe von Eisdomänen: a und b- Silizium; c und d-Gold-Nanorasen. In (a) sieht man keine Eiskristalle; b- intrazelluläre Eiskristalle (Pfeilspitze) mit der Größe 1-3 μ m; c und d-interzelluläre Kristalle mit der Größe ca. 1 μ m.

3.3 Adhärente Kryokonservierung in Kryo-Substraten

Die Kryokonservierung von adhärenten Stammzellen bedarf vollkommen anderer Arbeitsschritte als die Kryokonservierung von Suspensionszellen. Auf Grund dessen wurde während dieser Arbeit ein Protokoll passend für ein neues Substrat für die adhärente Kryokonservierung entwickelt. Das hier entwickelte Protokoll (Abbildung 11) besteht aus drei grundlegenden Arbeitsschritten: Erstens die Vorbereitung der Carrier und das Aufgeben der Zellen. Zweitens das Zusammenbauen des Substrates und die Kryokonservierung. Drittens der Auftau- bzw. Auswertungsvorgang.

Zum Vorbereiten der Carrier wurden diese zu Beginn in die Carrier-Einsätze mit 1µl reiner ECM Lösung eingeklebt. Anschließend wurde bei einem Teil der Carrier auf die Oberfläche eine ECM Lösung (1:30 bzw. 1:5 mit Kulturmedium verdünnt) aufgegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur polymerisiert. Ein Teil der Carrier wurde dabei unbehandelt belassen und dienten später als Kontrolle. Es ergaben sich also drei untersuchte Carrier-Gruppen: 1. Carrier ohne ECM Beschichtung, 2. Carrier mit einer 1:30 verdünnten ECM Beschichtung, 3. Carrier mit einer 1:5 verdünnten ECM Beschichtung. Anschließend erfolgte das Aufgeben der Zellen auf die Carrier. Dazu wurde je ein Tropfen von 25µl Zellsuspension (1x10⁵ Zellen/ml für L929 Zellen und 1x10⁴ Zellen/ml für Cesub2g Zellen) auf die Carrier aufgegeben. Die Carrier wurden anschließend 12h bei 37°C, 5% CO2 und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Zellen auf den Carrier-Gruppe willkürlich ein Carrier ausgewählt und mit FDA/EtBr angefärbt (Abbildung 12).

Die zur Kryokonservierung bestimmten Carrier wurden anschließend mit dem Carrier-Einsatz aus dem Rahmen für den Carrier-Einsatz herausgebrochen und in die Sockelverlängerung eingeschraubt. Anschließend erfolgte die Befüllung der Substrate mit 200µl Kryomedium (das jeweilige Kulturmedium mit 10% DMSO). Dazu wurde das Kryomedium vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasenbildung von unten mit einer medizinischen Spritze in das Substrat gefüllt. Zum Verschließen der Proben wurde die Verschlusskappe auf das Substrat aufgeschraubt. Anschließend wurden die Proben mit -1°C/min mit Hilfe eines programmierbaren Einfrierautomaten auf -80°C eingefroren und bei -176°C eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Proben einzeln aus dem Kryotank herausgeholt und per Hand in ein 37°C warmes Wasserbad getaucht. Nach dem Auftauen wurde das Kryomedium abgesaugt und die Carrier im Carrier-Einsatz aus dem jeweiligen Substrat herausgeholt und auf den Boden einer 24-Well-Platte gelegt. Die Proben wurden anschließend direkt mit FDA/EtBr gefärbt oder für 24h mit dem jeweiligen Kulturmedium bedeckt und dann gefärbt. Die Auswertung der mit FDA/EtBr gefärbten Carrier erfolgte unter einem Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskop.

Nachdem die prinzipielle Eignung der Substrate für die Kryokonservierung getestet worden war, wurden erste Versuch mit L929 Mausfibroblasten durchgeführt, bei dem alle Prozessschritte des Kryokonservierungs Protokoll für diese Substrate eingehalten wurden. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse zu diesen Versuchen.

Abbildung 11: Schematische Darstellung des Protokolls zum Einfrieren von adhärenten Zellen

Bei der adhärenten Kryokonservierung der L929 Mausfibroblasten in dem neu entwickelten Substrat zeigte sich, dass nach der Kultivierung auf allen drei Oberflächen Zellen anwachsen und diese Zellen eine sehr hohe Vitalität zeigen. Bei den L929 Zellen, die auf Carriern mit einer 1:5 verdünnten ECM Lösung kultiviert wurden, zeigten die Zellen jedoch nicht die ausgebreitete Morphologie und für Fibroblasten typische Form. Man sieht außerdem, dass die Zellen entlang definierter Linien auf dem Carrier wachsen und eine kugelige Form aufweisen. Direkt nach der Kryokonservierung sind fast alle Zellen auf den unbehandelten Carrier tot. Lediglich am Rand des Carriers zeigen sich noch vereinzelte vitale Zellen. Nach 24h sieht man jedoch eine größere Anzahl vitaler Zellen. Kultivierung Nach der Kryokonservierung mit 1:30 verdünnter ECM Lösung sieht man auf dem Carrier im zentralen Bereich eine große Anzahl vitaler Zellen. An beiden Enden des Carriers zeigen sich jedoch große Flächen mit toten Zellen. Nach 24h Kultivierung sieht man fast nur noch vitale Zellen und nur vereinzelt erkennt man tote Fibroblasten. Direkt nach der Kryokonservierung gefärbte Zellen auf dem mit 1:5 verdünnter ECM beschichteten Carrier zeigen noch immer die sphärische Form und wachsen noch immer entlang definierter Linien. Ein Großteil der so kryokonservierten Zellen ist jedoch noch vital. Nach der Kultivierung für 24h nach der Kryokonservierung sieht man erneut eine große Anzahl an vitalen Zellen auf dem Carrier und es zeigen sich nur sehr wenige tote Zellen im zentralen Bereich des Carriers (Abbildung 12). Um genauere Informationen von den so kryokonservierten Zellen zu erhalten, wurden die Zellen unter dem Raster-Elektronen-Mikroskop betrachtet. Abbildung 13 zeigt die Zellen ohne und Abbildung 14 nach der Kryokonservierung.

Auf den raster-elektronen-mikroskopischen Aufnahmen kann man sehr deutlich die verschiedenen Wachstums-Morphologien der L929 Mausfibroblasten erkennen. Die auf 1:5 verdünnter ECM wachsenden Zellen sind sphärisch und nicht ausgebreitet. Die auf 1:30

verdünnter ECM wachsenden Fibroblasten zeigen die typische auf der Oberfläche ausgebreitete Form. Bei den mit 1:5 verdünnter ECM beschichteten Carrier erkennt man zusätzlich die ECM, in der der gezeigte Fibroblast eingebettet ist.

Abbildung 12: Ergebnisse zu der adhärenten Kryokonservierung in den neuen Substraten. Zu sehen sind Carrier mit darauf angewachsenen L929 Mausfibroblasten. Die Zellen wurden jeweils mit FDA/EtBr gefärbt und bei zweifacher Vergrößerung unter dem Floreszens-Auflicht-Mikroskop betrachtet. Gezeigt sind jeweils aus dem Rot- und Grünkanal zusammengelegte Aufnahmen bei zweifacher Vergrößerung. Vitale Zellen erscheinen dabei in grüner, tote Zellen in roter Farbe. Abbildung A-C zeigen L929 Mausfibroblasten auf Carriern einer 1:30 verdünnten ECM Beschichtung D-E zeigen L929 Mausfibroblasten auf Carriern mit einer 1:5 verdünnten ECM Beschichtung. Abbildung A, D und G zeigen die Zellen vor der Kryokonservierung B, E und H direkt nach der Kryokonservierung C, F und I nach 24h Inkubation nach der Kryokonservierung.

Abbildung 13: REM- Untersuchungen von L929 Maus Fibroblasten vor der Kryokonservierung. Man sieht einen Fibroblasten adhärent auf einem mit 1:5 verdünnter ECM beschichteten Carrier (A). und einen Fibroblasten adhärent auf einem mit 1:30 verdünnter ECM beschichteten Carrier (B).

Abbildung 14: REM Untersuchungen von L929 Maus Fibroblasten nach der Kryokonservierung. Man sieht einen Fibroblasten adhärent auf einem mit 1:5 verdünnter ECM beschichteten Carrier A. und einen Fibroblasten adhärent auf einem mit 1:10 verdünnter ECM beschichteten Carrier B.

Auf den REM-Aufnahmen nach der Kryokonservierung sieht man erneut den sphärischen Charakter der auf den mit 1:5 verdünnter ECM beschichteten Carriern und die ausgebreitete Form der Fibroblasten auf den mit 1:30 verdünnten ECM beschichteten Carriern. Zusätzlich dazu erkennt man auf den mit 1:5 verdünnter ECM beschichteten Carriern, dicke ECM Stränge an denen die Fibroblasten anheften

3.4 Hydrogele (Methoden)

3.4.1. Mikro-Robotik-System für Generierung von Hydrogel-Spots

Die Entwicklung und Optimierung nanotechnologischer Verfahren und Materialien im Hinblick auf die Tieftemperaturablage therapeutisch und diagnostisch wertvoller Zellen führte zur Entwicklung, Charakterisierung und Optimierung eines Prozesses zur Immobilisierung adhärenter Säugerzellen ("2D Verkapselung").

Nach der erfolgreichen Inbetriebnahme des entwickelten Dispensersystems für ultra hoch viskose Hydrogele, wie das verwendete Alginat, lag der Fokus im Berichtszeitraum auf der Entwicklung eines robusten Prozessablaufs für die 2D-Verkapselung adhärenter Säugerzellen. Zellen, die auf diese Art verkapselt vorliegen, sind analog zur 3D-Verkapselung, durch die Alginatmembran mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, gleichzeitig aber vor z. B. Immunzellen geschützt (siehe Abbildung 15). Durch einen optimierten Extraktionsprozess in einem GMP-konformen Prozessraum für die Extraktion des Alginats aus dem Rohmaterial (Braunalgen) liegt ein ultra reines Biomaterial vor, welches keine Immunantwort initiiert. Der im Rahmen diese Projektes neu entwickelte Verkapselungsprozess (Abbildung 15) lässt sich, stark vereinfacht, in (i) Zellkultur, (ii) Modifikation der Substratoberfläche sowie in (iii) Dosierung und Vernetzung des Alginats untergliedern. Die Zellkultur stellt dabei adhärente Zellen auf einer Substratoberfläche zur Verfügung. Bei der Wahl des Substrates kann auf kommerzielle Substrate, wie z. B. 6-Well Platten, aber auch individuelle Substrate zurückgegriffen werden. Vor der eigentlichen Verkapselung ist eine chemische oder topographische Modifikation der Substrat- und Zelloberfläche vorteilhaft, damit dem Natrium-Alginat ein Adhäsionspunkt zur Verfügung steht. Durch die Behandlung der Oberfläche mit poly-(L-Lysin) (pLL) werden positive Ladungen auf die Oberfläche übertragen, durch die eine Interaktion der Carboxylgruppen des Alginats mit der Substratoberfläche erst ermöglicht wird. Aufgrund der Zytotoxizität polykationischer Polymere musste an dieser Stelle des Prozesses eine erste Optimierung bzgl. der pLL-Konzentration erfolgen. Generell lässt sich sagen, dass mit steigender pLL-Konzentration ein signifikanter Verlust der Vitalität festzustellen ist. Aus diesem Grund wird bei der 2D-Verkapselung eine pLL-Konzentration von maximal 0,0005% (V/V) verwendet.

Nach der Funktionalisierung der Oberfläche mit pLL kann das kontaktlose Dosieren von Alginat auf adhärente Zellen mit dem beschriebenen System erfolgen.

Durch die vorhandenen Software eines modifizierten GeSiM Nano-Plotters[™] können Muster auf der Basis einer (n x m) dimensionalen Punktmatrix oder individuell ausgewählten Positionen durch eine Mikroskopkamera realisiert werden. Eine Vernetzung des Natrium-Alginats erfolgt unmittelbar nach dem Dosierprozesses mit einer Bariumchloridlösung und bedeckt nun die jeweiligen Zellen mit dem makroporösen Hydrogel Alginat in Form von Spots mit einem Durchmesser zwischen 300-500µm.

Mit Time-Lapse Untersuchungen von verkapselten adhärenten L929 Fibroblasten zeigen, dass diese unter dem Hydrogel ihre Motilität nicht verlieren, jedoch durch das umgebene Hydrogel nicht mehr zur lateralen Migration fähig sind. Dies hat zur Folge, dass sich nach mehreren Zellzyklen alle entstandenen Zellen den Raum der ursprünglich verkapselten Zelle teilen müssen und sich letztendlich nach mehreren Tagen der Kultivierung Zellsphäroide unter dem Alginat bilden.

Abbildung 15: Neuer 2D- Verkapselung Plotter für Generierung von Hydrogel-Spots (A, B): Nanoplotter 2.1 (B) mit Dispenser, Verdünner, Ansteurungsgerät, und Hochdruckmodul (nicht gezeigt). Unten rechts in B: Dispenser mit dem Alginatreservoir. In C- Kultivierung der Säugerzellen unter dem Alginatschicht (Gepp et al. Proceedings BMT 2007 Aachen, No. 1569047851)

3.4.2 Definierte Zelladhäsion auf planaren Substraten durch Anwendung des μ ContactPrinting

3.4.2.1 Motivation und Aufbau des System

Die gezielte Adhäsion von Zellen auf Oberflächen spielt in vielen wissenschaftlichen Gebieten eine wichtige Rolle. Oft genannte Beispiele stellen hierbei Lab-On-A-Chip Anwendungen, Microarrays aber auch biomedizinische Anwendungen wie das gezielte Verschalten von neuronalen Zellen auf einer Oberfläche zu neuronalen Netzwerken. Im Gegensatz zur konventionellen photolithographischen Übertragung der Muster stellt das μ ContactPrinting (μ CP) eine relativ neue Methode dar, bei der der das gewünschte Muster durch eine PDMS-Matrize durch einen Stempelschritt auf die Oberfläche übertragen wird. Der generelle Ablauf der Strukturierung mit dieser Methode läuft in vier Schritten ab: Herstellung eines strukturierten Stempels (1), Benetzen des Stempels mit einer (bioaktiven) Lösung (2), Bedrucken des Substrats (3) und Anwendung des funktionalisierten Substrats (4).

Abbildung 16: Links: Prototyp des μ CP Systems der Firma GeSiM. Rechts oben: Position des strukturierten PDMS-Stempels, der in eine spezielle Kammer eingespannt ist um per Überdruck eine Auslenkung des Stempels zu ermöglichen und dadurch das Muster auf die Oberfläche zu übertragen. Rechts unten: Das auf dem Markt befindliche System μ CP2.1 das eine automatisierte Strukturierung von Oberflächen erlaubt.

Die Anwendung eines derartigen Systems für die Zellbiologie/Regenerative Medizin konnte erfolgreich evaluiert werden. Das evaluierte System μ CP2.1 der Firma GeSiM, Rossendorf, Deutschland beruht auf diesem beschriebenen Prinzip. Durch die Kombination der Stempeleinheit mit einer Robotik lässt sich die Übertragung des Musters auf die Oberfläche automatisiert realisieren. Hierfür sind bei dem Gerät eine Station für die Benetzung des Stempels, das Trocknen des Stempels und eine Station mit der zu funktionalisierenden Oberfläche vorhanden. Eine Besonderheit des Systems stellt der Stempel selbst dar. Eingespannt in eine spezielle Kammer kann der strukturierte PDMS-Stempel durch einen bestimmten Überdruck zur Oberfläche ausgelenkt werden und überträgt so das Muster auf das Substrat (Abbildung 16).

Die Evaluation des Systems erfolgte mit verschiedenen biologisch relevanten Lösungen (hochviskoses Alginat, poly-L-Lysin (pLL), Fibronektin (FN), extrazelluläre Matrix (ECM)) und L929 Fibroblasten. Mit den bioaktiven und die Adhäsion von Zellen fördernden Lösungen wie Fibronektin und extrazelluläre Matrix konnten hydrophile Glasträger erfolgreich strukturiert und eine definierte Adhäsion der Fibroblasten auf der Oberfläche beobachtet werden. Die Form der adhärenten Fibroblasten lässt Rückschlüsse auf die gedruckte Struktur zu: Es konnte neben den in Abbildung 17 gezeigten ringförmig adhärierenden Fibroblasten, konnten auch Fibroblasten beobachtet werden, die in Form eines definierten Quadrates auf der Oberfläche adhärieren. Trotz dieser ersten Erfolge besteht weiterer Optimierungsbedarf bzgl. der Qualität des Musters selbst, da das Muster zum Teil nur bruchstückhaft übertragen werden konnte. Nach den ersten Versuchen lässt sich jedoch sagen, dass das System generell für die Zellbiologie geeignet ist und in Zukunft ein System für die Realisierung von z. B. Biochips, Substrate für die Kryokonservierung adhärenter Zellen oder Implantaten darstellen kann.

Die Strukturierung von Oberflächen mit einer sehr dünnen Hydrogelschicht aus ultra hochviskosem Alginat (*medical grade*) stellt dahingegen eine größere Herausforderung dar. Durch die hohe Viskosität dieses Biomaterials (bei einer verwendeten Konzentration von 0,7%) wird der Stempel an manchen Stellen überladen und in Folge dessen das Muster nicht korrekt übertragen. Die generelle Realisierung von derartigen Oberflächen konnte dennoch belegt werden. Die strukturierten Oberflächen zeigten nach dem µCP definierte Zelladhäsion. Hierbei ist anzumerken, dass hier das Negativ des Stempels letztendlich auf dem Substrat vorhanden war. Ringförmige Strukturen ließen einen Kontakt der Zellen zum poly-L-Lysin beschichteten Substrat zu und initiierten exakt an diesen Stellen die Adhäsion der Fibroblasten.

3.4.2.2 Herstellung von Substraten aus ultra hoch viskosem Alginat medizinischem Grades mit Alginat-Molding

Die Herstellung biokompatibler Substrate aus dem Hydrogel Alginat konnte ebenso im Berichtsjahr evaluiert werden. Die Anwendung von ultra reinem hoch viskosem Alginat (medical grade) in der Zellkultur wurde in den vergangenen Jahren bereits erfolgreich mit der Verkapselung von Säugerzellen (3D-Verkapselung) und die Strukturierung mit der Herstellung von Alginatmembranen (Alginat-Sheets) erfolgreich etabliert und charakterisiert. Der Ansatz des Alginat-Moldings verfolgt das Ziel maßgeschneiderte Substrate der Anwendung in Zellkultur, Biotechnologie und regenerativen Medizin zur Verfügung zu stellen. Hierbei wird ein der Schritt der Vernetzung des Alginats mit der Strukturierung kombiniert. Da es sich bei Alginat um ein ionotropes Hydrogel handelt, stellt die Vernetzung in Zusammenhang mit der Strukturierung eine nicht triviale Aufgabe dar. Die mehrwertigen Ionen (Kalzium, Barium etc.) liegen entweder in Lösung oder pulverförmig vor. Um eine Vernetzung und Strukturierung gleichzeitig vornehmen zu können, müssen die Vernetzerionen in eine strukturierte Matrize eingebettet werden, die eine Diffusion zum Alginat zulässt. Hierfür wurde Kalzium in (erhitzter) Agarose gelöst und damit Mikrostrukturen abgegossen. Nach dem Abkühlen liegt eine Matrize vor, mit der eine Vernetzung und Strukturierung des Alginats (und anderer ionotroper Gele) realisiert werden kann. Auf das die strukturierte Agarose Matrize (diese Struktur muss invers zur gewünschten sein) wird nun das Alginat gegossen und für 15min inkubiert, so dass ein vernetztes Hydrogel vorliegt (Abbildung 18). Diese Prozedur konnte für das extrahierte Alginat erfolgreich

evaluiert werden. Ferner lässt diese Methode auch neue Möglichkeiten der Zellkultiverung zu, da in dem Alginat Zellen eingeschlossen werden können und so Co-Kultivierung von Zellen ermöglicht werden kann (siehe Abbildung 19). In ersten Versuchen konnten einfache Strukturen wie Mikro-Kulturgefäße aber auch Zell-Alginat Einsätze für Mikrotiterplatten realisiert werden.

Abbildung 17: Oben Links: Definierte Reaktion der Fibroblasten nach 2h Kultivierung auf den funktionalisierten Substraten. Die Zellen adhärieren gemäß der gedruckten Struktur auf ringförmigen 50µm Mustern aus extrazellulärer Matrix. Oben rechts: Auf einem gedruckten Ring adhärieren 3 Fibroblasten, nicht bedruckte Stellen zeichnen sich durch nicht konfluente, runde Fibroblasten aus. Unten links: definierte Zelladhäsion nach 1h Inkubation auf einer mit Fibronektin funktionalisierten Oberfläche. Die Fibroblasten auf einem gedruckten Quadrat aus Fibronektion. Die Dimension von 50µm ist ebenso zu erkennen wie der scharfe Rand des Musters. Zellen außerhalb des gedruckten Musters liegen rund auf der Substratoberfläche vor.

Alginat (medical grade) in der Zellkultur wurde in den vergangenen Jahren bereits erfolgreich mit der Verkapselung von Säugerzellen (3D-Verkapselung) und die Strukturierung mit der Herstellung von Alginatmembranen (Alginat-Sheets) erfolgreich etabliert und charakterisiert. Der Ansatz des Alginat-Moldings verfolgt das Ziel maßgeschneiderte Substrate der Anwendung in Zellkultur, Biotechnologie und regenerativen Medizin zur Verfügung zu stellen. Hierbei wird ein der Schritt der Vernetzung des Alginats mit der Strukturierung kombiniert. Da es sich bei Alginat um ein ionotropes Hydrogel handelt, stellt die Vernetzung in Zusammenhang mit der Strukturierung eine nicht triviale Aufgabe dar. Die mehrwertigen Ionen (Kalzium, Barium etc.) liegen entweder in Lösung oder pulverförmig vor. Um eine Vernetzung und Strukturierung gleichzeitig vornehmen zu können, müssen die Vernetzerionen in eine strukturierte Matrize eingebettet werden, die eine Diffusion zum Alginat zulässt. Hierfür wurde Kalzium in (erhitzter) Agarose gelöst und damit Mikrostrukturen abgegossen. Nach dem Abkühlen liegt eine Matrize vor, mit der eine Vernetzung und Strukturierung des Alginats (und anderer ionotroper Gele) realisiert werden kann. Auf das die strukturierte Agarose Matrize (diese Struktur muss invers zur gewünschten sein) wird nun das Alginat gegossen und für 15min inkubiert, so dass ein vernetztes Hydrogel vorliegt (Abbildung 18). Diese Prozedur konnte für das extrahierte Alginat erfolgreich evaluiert werden. Ferner lässt diese Methode auch neue Möglichkeiten der Zellkultiverung zu, da in dem Alginat Zellen eingeschlossen werden können und so Co-Kultivierung von Zellen ermöglicht werden kann (siehe Abbildung 19). In ersten Versuchen konnten einfache Strukturen wie Mikro-Kulturgefäße aber auch Zell-Alginat Einsätze für Mikrotiterplatten realisiert werden.

Abbildung 18: Prinzip des Molding von Alginat. Die Templatestruktur wird mit Agarose (mit Vernetzer) abgeformt (A und B) und das Alginat in der resultierenden Matrize vernetzt und strukturiert (C und D). Die Alginatsubstrate können dann verwendet werden (E und F).

Abbildung 19: Alginat Template (Silizium Struktur) mit dem abgeformten Agarose Block (A). Die Herstellung eines Einsatz für Mikrotiterplatten ist in B1 bis B4 gezeigt: Template (B1), Agarosematrize (B2), Alginat-Insert (B3) und eingesetzt in Mikrotiterplatte (B4).

Abbildung 20: Strukturierung von Alginat. A-D zeigen verschiedene Formen, die durch die oben beschriebene Technik hergestellt werden konnten. E-I zeigen die Anwendung der Technik auf die Zellkultur: Fibroblasten wachsen auf der strukturierten Alginatschicht (nach Behandlung mit Fibronektin, E,F) oder sind direkt im Alginat eingeschlossen(G,H,I).

3.5 Tieftemperatur-Laser-Anwendungen

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieses Projektes zwei neue Anwendungsgebiete für Ultrakurzpulslaser in der Biotechnologie eruiert werden. Zum einen konnte mittels eines Messaufbaus, durch Kombination etablierter Mikroskopiemethoden neuen mit Ultrakurzpulslasern ein "proof of concept" erbracht werden, der eine neue Möglichkeit zum minimal invasiven online Monitoring kryokonservierter Proben darstellt. Durch die Multiphotonen Kryomikroskopie ist es erstmals möglich durch optische Methoden, gefrorene Proben mit sub-zellulärer Auflösung abzubilden. Dadurch können z.B. Änderungen in der Morphologie konservierter Zellen im gefroren Zustand abgebildet werden und die verschiedenen Ausmaße intrazellulärer Eiskristallbildung bestimmt werden, ohne die Proben dauerhaft zu schädigen. Durch die Kombination dieser Methodik mit einer Fluoreszenz Lebensdauer Messung ist es weiterhin möglich temperaturabhängige, intrazelluläre physikalische und chemische Änderungen während des Einfrier- und Auftauvorgangs zu beobachten. Somit können auch verschiedene Einflüsse der Kryoprotektiva auf die Zellen auf molekularer Ebene lokalisiert werden. Durch eine Tomographie von Gewebeproben ermöglich diese Technik eine dreidimensionale Rekonstruktion einer gefrorenen Biopsie, die bislang nur durch die Anfertigung von Kryoschnitten möglich war, was aber zu einer irreversiblen Beschädigung der Probe führte. Somit konnte durch die Ausnutzung nichtlinearer Lasereffekte eine nicht invasives Monitoring-Verfahren kryokonservierter Proben mit einer Abbildungstiefe >200µm demonstriert werden.

Abbildung 21: Aufbau Multiphotonen Kryomikroskop

Abbildung 22: Prinzipskizze Multiphotonen Kryomikroskop

Abbildung 23: Autofluoreszenz einer L929 Zellsuspension l_{ex} =760nm: a) flüssig bei 0°C b) gefroren bei -60°C

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war es, durch den Einsatz von Ultrakurzpulslasern ein Bearbeitungsverfahren für Alginat Hydrogele zu evaluieren, um die Oberflächenattraktivität auf zellulärer Ebene zu steigern. Die Fokussierung der ultrakurzen Laserpulse erlaubt eine Bearbeitung des Materials mit um- bis nm-Präzision. Da die Spitzenintensitäten der verwendeten Strahlquellen im Fokus zu einer nichtlinearen Absorption führen, ermöglicht dies zusätzlich das Schneiden und Abtragen im Inneren des transparenten Materials. Durch die kurze und effiziente Energiedepositionierung sind die thermischen Begleiterscheinungen und die damit verbundenen Schädigungen äußerst gering. Dadurch konnte eine Bearbeitung des Materials mit eingeschlossenen Zellen unter Zellkulturbedingungen durchgeführt werden. Durch die Strukturierung der Oberflächen der Hydrogel Sheets konnte deren adhäsionshemmende Eigenschaft aufgehoben werden. Dies wurde durch eine Kultivierung verschiedener Zelllinien über mehrere Wochen auf den strukturierten Alginat-Sheets nachgewiesen. Weiterhin ermöglichten diese Strukturen die Erschaffung einer geometrisch definierten Zellmatrix. Anhand der L929 Zelllinie konnten die Einflüsse der verschiedenen Oberflächenbeschaffenheiten der Strukturen auf das Zellverhalten demonstriert werden. Es wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Umgebung signifikante Einflüsse auf die Zelladhäsion, das Wachstum und auch auf die Differenzierung hat.

Abbildung 24. 230 μ m x 230 μ m strukturiertes Alginatsheet (15h) mit L929 besetzt nach 6 Tagen

Abbildung 25. Prinzipskizze der Multiphotonenablation von Alginat- Sheets

3.6 Anwendungen

3.6.1 Kryokonservierung adhärenter hESC-Kolonien durch Vitrifikation

Für hESC, sowie für Spermien und Eizellen ist bis heute die Vitrifikation eine der meistgenutzten Formen der Kryokonservierung. Dabei werden die Zellen schrittweise in sehr hohen Konzentrationen von Kryoprotektiva inkubiert und anschließend mit möglichst hohen Kühlraten (10000-20000°C pro Minute) vitrifiziert. Der Vorteil der Vitrifikation liegt darin, dass eine intrazelluläre Eiskristallbildung bei der Kryokonservierung vermieden wird, da es durch die rapide Absenkung der Molekülbewegung innerhalb der Probe zu einer so genannten Verglasung der Medien kommt. Intrazelluläre Eiskristallbildung ist in den meisten Fällen tödlich für die Zelle, da es zu unreparablen Schäden der Zellmembranen und Organellen im Zellinneren kommt. Reubinoff et al. entwickelten 2001 das erste Vitrifikations-Protokoll für hESC (Reubinoff et al., 2001), welches auf der Verwendung von so genannten "Vitrifikations-Straws" basiert und mit dem Recoveryraten von über 90% erzielt werden konnten. "Straws" sind kleine Kunststoff- oder Glasröhrchen, die ein sehr geringes Flüssigkeitsvolumen aufnehmen können (ca. 20µl) und mit denen, durch ihr großes Oberflächen/Volumen Verhältnis, sehr hohe Wärmeaustauschraten erreicht werden können. Allerdings ist der Arbeitsaufwand dieser Methode sehr hoch und die Mengen an vitrifizierten Kolonien sehr gering (ca. 5 Kolonien pro Straw). Durch eine erfolgreiche Vitrifikation adhärenter hESC-Kolonien ließe sich diese Menge vervielfachen, da auf den verwendeten Substraten eine große Anzahl an Kolonien kultiviert, und somit auch vitrifiziert werden kann. Ein weiterer Vorteil der Vitrifikation von hESC-Kolonien im adhärenten Zustand ist das Ausbleiben der Anwachsphase nach dem Wiederauftauen der Proben. Besonders bei "Slow-Rate-Freezing"-Ansätzen von abgelösten hESC-Kolonien rührten die größten Einbußen am

Kryokonservierungserfolg von einem Ausbleiben des Wiederanwachsens nach dem Wiederauftau her. Dies lässt sich mit der Kryokonservierung bereits adhärenter hESC umgehen.

Da in der Literatur bis heute fast keine Systeme zur Vitrifikation adhärenter humaner embryonaler Stammzellen bekannt sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob die Vitrifikation adhärenter hESC überhaupt durchführbar, und, im Falle zufriedenstellender Kryokonservierungserfolge, ob Vitrifikation für die Kryokonservierung therapeutisch relevanter Zellsysteme anwendbar ist. Um dies zu erreichen wurde ein Vitrifikationsprotokoll, basierend auf bereits publizierten Protokollen für hESC in Suspension entwickelt und Substrate gesucht, die für die Vitrifikation geeignete Eigenschaften besitzen und eine Kultivierung großer Mengen an hESC zulassen. Grundvoraussetzung für die Substrat-Auswahl waren Biokompatibilität (Kultivierbarkeit von hESC auf dem Substrat), Kryokompatibilität (Tieftemperaturtauglichkeit) und leichtes Handling (Einhalten der Inkubationszeiten und schneller Transport möglich). Da in Flüssigstickstoff vitrifizierte Substrate bereits nach ca. 3 Sekunden bei Raumtemperatur auftauen (Data not shown) und die Einhaltung der sehr kurzen Inkubationszeiten in den zum Teil sehr hoch konzentrierten Vitrifikationsmedien bei Vitrifikationsversuchen von hESC in Suspension problematisch ist, wurde besonderer Wert auf die Handhabbarkeit der Substrate gelegt. Um Aussagen über den Kryokonservierungserfolg der angewandten Vitrifikationsprotokolle und Substrate machen zu können, wurden die Kolonien nach dem Auftauen anhand der Auswertungsmethode nach den vitalen Restflächen (Vergleich der Koloniegrößen vor und nach der Kryokonservierung) untersucht und gegenübergestellt. Abbildung 26 zeigt eine Auswahl an Substraten, welche für Vitrifikationsversuche adhärenter hESC-Kolonien verwendet wurden.

Abbildung 26: Für Vitrifikationsversuche verwendete Substrate. A) Standard ø35mm Petrischale von Nunc, behandelte Oberfläche. B) Modifiziertes ThermanoxTM Substrat ø13mm an steriler Pinzette. C) IBIDI-Substrat ø35mm mit extrem dünner Kultivierungsoberfläche.

3.6.2 Entwickung eines Protokolls zur Vitrifikation adhärenter hESC-Kolonien auf modifizierten ThermanoxTM-Substraten

Um ein Substrat zu erhalten, welches eine kultivierbare Oberfläche besitzt und über gute Handling-Eigenschaften verfügt, wurden ThermanoxTM-Substrate mit einem Griff versehen, der ein verbessertes Handling durch sterile Pinzetten ermöglicht.

Abbildung 27: A) Modifiziertes ThermanoxTM-Substrat mit Griff zum verbesserten Handling. B) Modifiziertes ThermanoxTM-Substrat an steriler Pinzette. C) Modifizierte ThermanoxTM-Substrate in Kultivierungsschale.

Die modifizierten Substrate können durch den Griff sehr einfach in den Vitrifikationsmedien inkubiert und anschließend, um optimale Abkühlraten zu erreichen, direkt in Flüssigstickstoff getaucht werden. Die Kultivierung der hESC-Kolonien nach dem dafür vorgesehenen Standardprotokoll war ohne Probleme möglich und morphologische Unterschiede zwischen hESC-Kolonien auf Standardsubstrat und ThermanoxTM-Substrat traten nicht auf. Die durchschnittliche Kolonieanzahl auf einem Substrat betrug 292±56 Kolonien (Daten von 9 Substraten aus drei unabhängigen Ansätzen).

Abbildung 28: Fünf Tage alte hESC-Kolonien auf ø13mm ThermanoxTM-Substraten 7,5fache Vergrößerung unter Binocular. A) Obere Hälfte des Substrates. B) Untere Hälfte des Substrates.

Für die Vitrifikation von hESC-Kolonien in Suspension wurde von Richards et al. 2004 ein Protokoll publiziert, mit dem mit Hilfe der "Closed-Sealed-Straw"- Methode humane embryonale Stammzellen erfolgreich vitrifiziert werden konnten (Richards et al., 2004). Leider ist diese Methode sehr arbeitsintensiv und es ist nur möglich sehr wenige Kolonien (ca. 5 Stück) gleichzeitig in einem Straw zu vitrifizieren. Abbildung 29 zeigt das Arbeitsprotokoll von Richards et al., welches für die Vitrifikation adhärenter hESC-Kolonien modifiziert. In Abbildung 31 sind die verwendeten Konzentrationen an Kryoprotektiva zusammengefasst.

In	kubation und Vitrifikation		
Α	4-Wellplate vorbereiten		
	H1-Medium VS 1 VS2 WS1		
в	Kolonien picken (5-8 Kolonien pro Straw), waschen und in H1 (Wellplate) sammeln		
С	Straw beladen mit VS2 und AIR1		
D	20µl drop VS2 auf Petrischale geben		
Е	Inkubation der Kolonien in VS1 1 Minute		
F	Inkubation der Kolonien in VS2 5 Sekunden		
G	Schnelles Überführen der Kolonien aus VS2 in 20µl drop VS2		
н	Sofort in Straw aufziehen, anschließend AIR2 und WS1 aufziehen		
1	Mit eisgekühlter Zange am hES-Cell Abschnitt festhalten und die Enden versiegeln		
J	Vitrifizieren (Eintauchen) in Flüssigstickstoff		
Αı	Auftauprozess		
Α	4-Wellplate vorbereiten		
	WS1 WS2 H1-Medium		
в	Straws in Wasser (Raumtemperatur) halten für ca. 5 Sekunden		
С	Straw mit 70% Isopropanol-Tuch abstreifen		
D	Straw-Enden mit steriler Schere abschneiden		
Е	Kompletten Inhalt des Straws in WS1 überführen (1min)		
F	Die hESC-Kolonien in WS2 überführen und 5min inkubieren		
G	Die hESC-Kolonien 5min in H1-Medium waschen		
Н	Auf neues Feeder-Layer ausplattieren		

Abbildung 29: Protokoll für die Vitrifikation im Straw nach Richards et al. (Richards et al., 2004); Auf Grundlage dieses Protokolls wurde ein Protokoll für die Vitrifikation adhärenter hESC-Kolonien auf ThermanoxTM-Substraten entwickelt. Richards et al. konnten durch Vitrifikation im "Closed-Sealed-Straw" sehr gute Kryokonservierungserfolge erzielen (82-83% Recovery Rate). VS1, VS2, WS1 und WS2 sind die in Abbildung 31 zusammengefassten Kryomedien, AIR1 und AIR2 stehen für Lufteinschlüsse innerhalb des Straws.

Durch Anpassung dieses Protokolls an die Anforderungen der Vitrifikation adhärenter hESC-Kolonien konnte folgendes Protokoll entwickelt (Abbildung 30) und erfolgreich getestet werden. Besonderer Wert wurde auf die Aufbewahrung der vitrifizierten Substrate während des Transports zum Lagertank und der Ein- und Auslagerung gelegt, da ein vorzeitiges Auftauen der Proben den Kryokonservierungserfolg gefährden kann. Durch die Einführung eines Auffangsubstrates am Grund des Flüssigstickstoffs im Dewer, welcher für den Transport verwendet wurde, konnte eine Exposition der Substrate über längere Zeit (mehr als 3 Sekunden) bei Raumtemperatur vermieden werden. Als Auffangsubstrat wurde entweder eine 6cm Petrischale oder eine 4-Wellplate verwendet, welche vor Beginn der Vitrifikationsabläufe im Flüssigstickstoff versenkt wurde.

Inkubation und Vitrifikation

- A Drei 6cm Petrischalen mit Vitrifikationsmedien vorbereiten H1-Medium VS 1 VS2
- **B** ThermanoxTM-Substrate in H1-Medium sammeln
- **C** Dewer mit Flüssigstickstoff vorbereiten
- **D** Auffang-Vorrichtung (Petrischale; 4-Wellplate) in Stickstoff versenken
- E ThermanoxTM mit Pinzette am Griff in VS1 überführen und 1min inkubieren
- F ThermanoxTM mit Pinzette am Griff in VS2 überführen und 5Sek inkubieren
- **G** ThermanoxTM mit Pinzette am Griff in Flüssigstickstoff tauchen
- H Vitrifiziertes ThermanoxTM in Auffang-Vorrichtung unter Flüssigstickstoff sammeln
- Lagerung der Proben in der Gasphase im N2-Tank
- J Die Proben nie länger als 3 Sekunden bei Raumtemperatur aufbewahren

Auftauprozess

- A Drei 6cm Petrischalen mit Auftaumedien vorbereiten H1-Medium WS1 WS2
- **B** Vitrifizierte ThermanoxTM-Substrate im Dewer unter Flüssigstickstoff vom Lagertank zur Arbeitsfläche transportieren
- **C** ThermanoxTM mit Pinzette am Griff in WS1 überführen und 60Sek. Inkubieren
- **D** ThermanoxTM mit Pinzette am Griff in WS2 überführen und 5min inkubieren
- **E** ThermanoxTM mit Pinzette am Griff in H1 überführen

Abbildung 30: Für die Vitrifikation adhärenter hESC modifiziertes Arbeitsprotokoll. Ursprüngliches Protokoll nach (Richards et al., 2004).

Vitrifikations- und Auftaumedien			
H1	Holding Medium 1	Standard H1-Kulturmedium	
H2	Holding Medium 2	Standard H1-Kulturmedium mit 1M Sucrose	
VS1	Vitrifikationsmedium 1	80% H1-Medium; 10% DMSO; 10% Ethylenglykol	
VS2	Vitrifikationsmedium 2	30% H1-Medium; 30% H2-Medium; 20% DMSO; 20% Ethylenglykol	
WS1	Auftaumedium 1	80% H1-Medium; 20% H2-Medium	
WS2	Auftaumedium 2	90% H1-Medium; 10% H2-Medium	

Abbildung 31: Auflistung der für die Vitrifikation von ThermanoxTM-Substraten verwendeten Vitrifikations- und Auftaumedien. Die Konzentrationen der Kryoprotektiva wurden aus dem Vitrifikationsprotokoll nach Richards et al. übernommen.

Wie auch beim "Slow-Rate-Freezing" adhärenter embryonaler Stammzellen, kann auch der Kryokonservierungserfolg bei der Vitrifikation von kleinsten Variationen am Konservierungsablauf beeinflusst werden. Aus diesem Grund wurden auch für die Vitrifikation detaillierte "Work-Flow"-Diagramme angefertigt, um Expositionszeiten, osmotische Belastungen und Temperaturschwankungen bei der Vitrifikation adhärenter humaner embryonaler Stammzellen möglichst genau beschreiben und nachvollziehen zu können. Auch sind die Unterschiede der verschiedenen Kryokonservierungsansätze, wie etwa Vitrifikation und "Slow-Rate-Freezing", durch standardisierte "Work-Flow"-Layouts besser miteinander vergleichbar und Vor- und Nachteile der jeweiligen Verfahren leichter auf ihre Ursachen zurückzuführen. Der oben beschriebene Vitrifikationsablauf wurde in Abbildung 32 (Vitrifikation) und 8 (Auftauvorgang) als ausführliches "Work-Flow"-Diagramm zusammengefasst.

Work Flow Diagramm - VITRIFIKATION Kryokonservierung adhärenter hESC-Kolonien durch VITRIFIKATION

Abbildung 32: Vitrifikations-"Work-Flow" für die Vitrifikation adhärenter humaner embryonaler Stammzellen auf ThermanoxTM-Substraten; Die grauen Felder beschreiben Ort, Osmolarität, Temperatur und die jeweiligen Expositionszeiten der unterschiedlichen Arbeitsschritte. Weiße Felder geben genaue Arbeitsanweisungen.

Work Flow Diagramm - AUFTAUEN Kryokonservierung adhärenter hESC-Kolonien durch VITRIFIKATION

Abbildung 33: "Work-Flow" des Auftauablaufes für die Vitrifikation adhärenter humaner embryonaler Stammzellen; Die grauen Felder beschreiben Ort, Osmolarität und Temperatur der unterschiedlichen Arbeitsschritte. Weiße Felder geben genaue Arbeitsanweisungen.

Um den Kryokonservierungserfolg der Vitrifikation adhärenter humaner embryonaler Stammzellen auf ThermanoxTM-Substraten zu ermitteln, wurden die Proben wie im Protokoll und im "Work-Flow" oben beschrieben behandelt. Nach der Kultivierung der hESC auf den Substraten, der Vitrifikation und dem Auftauprozess wurden die vitalen Restflächen der einzelnen Kolonien errechnet und zusammengestellt. Abbildung 34 zeigt mikroskopische Aufnahmen der vitrifizierten hESC-Kolonien zu unterschiedlichen Zeiten nach dem Wiederauftau. Zur Ermittlung der vitalen Restflächen wurden die Kolonien mit FDA und Ethidiumbromid angefärbt und nach dem Auswertungssystem über die vitalen Restflächen ausgewertet. Abbildung 34 gibt Auskunft über den Kryokonservierungserfolg nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten nach dem Auftauen.

Abbildung 34: Mikroskopische Aufnahmen auf ThermanoxTM-Substraten vitrifizierter hESC-Kolonien vor und nach dem Wiederauftau. Vitale Zellen sind durch FDA/EtBr-Färbung grün dargestellt. Tote Zellen erscheinen rot. Durchmesser der Substrate 13mm A) hESC-Kolonien vor der Vitrifikation im Durchlichtmikroskop. B) Die in A gezeigten Kolonien nach Vitrifikation ca. 20 min nach dem Auftauen. C) Vitrifizierte Kolonien ca 20min nach dem Auftauen bei 100facher Vergrößerung. D) hESC-Kolonien vor dem Einfrieren E) Die in D gezeigten Kolonien nach Vitrifikation, Wiederauftau und 24h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 24h Kultivierung bei 100facher Vergrößerung. G) hESC-Kolonien vor dem Einfrieren H) Die in G gezeigten Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien nach dem Auftauen und 48h Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien Kolonien Kolonien Kolonien Kolonien nach Kultivierung. F) Vitrifizierte Kolonien Kol

Die aufgetauten Kolonien zeigen keine gängigen Differenzierungsformen. Nach 24, bzw. 48h Kultivierung sind keine Anzeichen einsetzender Differenzierung zu erkennen (ausgefranste Ränder der Kolonien, dunkle Bereiche im Kolonieinneren). Die Vitalität der Kolonien unmittelbar nach dem Auftauen liegt im Bereich von 93%. Ein großer Zellverlust durch Nekrose ist somit sehr unwahrscheinlich. Genauere Auskunft gibt die Auswertung der vitalen Restflächen. Diese wurden in Abbildung 35 zusammengefasst. Mit Überlebensraten von ca. 90% direkt nach dem Auftauen und einem Wachstum der Kolonien um 90% in den ersten 24h Kultivierung (Wachstumsraten in Abbildung 36 zusammengefasst) lässt sich der Kryokonservierungserfolg dieser Methode als äußerst zufrieden stellend zusammenfassen.

Abbildung 35: Vitale Restflächen der hESC-Kolonien nach der Vitrifikation auf ThermanoxTM-Substraten. Als Vitrifikationsmedien wurden VS1 (H1-Kulturmedium mit 10% DMSO, 10%Ethylenglykol) und VS2 (H1-Kulturmedium mit 20% DMSO, 20% Ethylenglykol und 30% 1M Sucroselösung) verwendet. In VS1 wurde 1min inkubiert, in VS2 5 Sekunden. Als Auftaumedien wurden WS1 (H1-Kulturmedium mit 20% 1M Sucroselösung) und WS2 (H1-Kulturmedium mit 10% 1M Sucroselösung) verwendet. In WS1 wurde 1 Minute inkubiert, in WS2 5 Minuten. Die Substrate wurden nach der Inkubation in VS1 und VS2 in direkten Kontakt mit Flüssigstickstoff gebracht (ca. 5 Sekunden) und anschließend in der Stickstoff-Gasphase im N2-Tank gelagert. Die Lagerzeit betrug mindestens 3 Tage. Zum Auftauen wurden die Proben direkt aus dem Flüssigstickstoff in WS1 getaucht und 1 Min inkubiert. Vor der Feststellung der vitalen Restflächen wurden die hESC-Kolonien in Normalmedium inkubiert (0h, 24h, 48h) und anschließend mit FDA und Ethidiumbromid gefärbt. Die Auswertung erfolgte nach dem System für adhärente, vitale Restflächen. Zu sehen sind die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuchsansätze. Unmittelbar nach dem Auftauen (Oh-Probe, ca. 30min nach dem Auftauen) betrug die durchschnittliche vitale Restfläche 89,81% mit einer Standardabweichung von 10,68%. Nach 24h Inubation in H1-Normalmedium im Brutschrank 153,58% (mit Standardabweichung 40,56%) und nach 48h Inkubation 264,98% (mit einer Standardabweichung von 108,69%).

Was den Erfolg dieser Methode untermauert ist das Ausbleiben von Apoptose innerhalb der ersten 24h Kultivierung nach dem Auftauen, wie es bei "Slow-Rate-Freezing"-Ansätzen üblich ist. Eine Überlebensrate von ca. 90% wurde bisher nur mit hESC Kolonien, welche im Straw eingefroren wurden erreicht. Allerdings lassen sich mit der Methode nach Richards et. al nur sehr wenige Kolonien (5 Stück pro Straw) einfrieren. Die ca. 300 Kolonien pro ThermanoxTM-Substrat stellen eine deutliche Verbesserung der Kryokonservierungsausbeute dar.

Abbildung 36: Darstellung der Wachstumsrate der auf Thermanox vitrifizierten Kolonien nach dem Wiederauftau. Der linke Balken zeigt ein Koloniewachstum innerhalb der ersten 24h von ca. 90%. Der rechte Balken zeigt ein Koloniewachstum von etwa 60% im Zeitintervall 24 bis 48h nach dem Auftauen.

Weitere Angaben

3.7 Vergleich des Standes der Arbeiten mit dem geltenden Arbeitsplan Die Arbeiten verliefen planmäßig.

3.8 Aussichten auf Zielerreichung Die Ziele wurden erreicht.

3.9 Zieländerung gegenüber der geltenden Planung Keine.

3.10 Inzwischen bekannt gewordene relevante Ergebnisse Dritter Keine relevanten.

3.11 Angaben von gemachten Erfindungen Siehe Zwischenberichte.

4 Verwertungsplan

Es hat eine Ausgründung gegeben.