

**Untersuchung von  
strukturbildenden zellulären Prozessen  
im Kontext des Tissue Engineerings:  
Alginate-basierte Gerüststrukturen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von  
**Michael M. Gepp**  
**(M. Sc.)**

Saarbrücken  
2017

Tag des Kolloquiums: 29.11.2017

Dekan: Prof. Dr. G. Kickelbick

Vorsitzender: Prof. Dr. G.-W. Kohring

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Zimmermann

Prof. Dr. E. Heinzle

Akad. Mitarbeiter: Dr. J. Zapp







# Zusammenfassung

Die Kombination von Bio-(materialien) mit therapeutisch relevanten Zellen ist ein komplexes Feld im Bereich des *Tissue Engineerings* und der regenerativen Medizin. Neue zelluläre Umgebungen müssen derart gestaltet sein, dass sie auch bei empfindlichen Zelltypen, wie z.B. den humanen Stammzellen, eine optimale Mikroumgebung abbilden können. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Modifikation von bioinerten Alginaten zur Gestaltung neuartiger Zell-Nischen. Die Entwicklung der Materialien erfolgt zunächst auf zweidimensionalen Substraten und wird auf dreidimensionale Konstrukte übertragen. Hierfür sind insbesondere bei der Analyse und Kultivierung der Zellen, aber auch bei einer finalen Rückgewinnung physiologische Bedingungen zwingend erforderlich. Mit einem neuartigen parallelisierten Mikroskopie-Ansatz konnten in dieser Arbeit systematische Untersuchungen bzgl. der Modifikation von Alginaten als Gerüststruktur durchgeführt werden. Die Modifikation z. B. durch kovalente Kopplung von Tyramin an Alginat, zeigte, dass diese exzellent für die direkte und indirekte Adhäsion von humanen Stammzellen geeignet ist. Schonende Mechanismen zur Degradierung der Gerüststruktur mittels einer Alginat-Lyase, sowie erste Ansätze für eine automatisierte Entwicklung von Gerüststrukturen konnten etabliert werden. Die Ergebnisse konnten final auf frei-schwimmende, dreidimensionale Gerüststrukturen übertragen werden.

## Abstract

The combination of (Bio-)materials with therapeutically relevant cells is a challenging field in *Tissue Engineering* and Regenerative Medicine. Novel cellular environments require a sophisticated design in order to provide an optimal microenvironment for sensitive cell types like human stem cells. This thesis focuses on the study of alginate modifications designing novel cell niches. The initial developments are conducted using twodimensional substrates and are transferred in consequence to three-dimensional scaffolds. Physiological conditions are not only mandatory for the analysis and cultivation of cells, but also for the final recovery. Using a novel parallelized approach for living cell microscopy, systematic studies with respect to the modification of alginate hydrogels were performed. The results demonstrate that covalent coupling of tyramine molecules on alginate to be suitable for direct and indirect adhesion of human stem cells. In addition, gentle treatments for scaffold degradation using alginat lyases as well as first promising approaches for an automated engineering of scaffolds are established in this work. The knowledge gained from performed studies was finally transferred to free-floating, three-dimensional scaffolds.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung und Motivation</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Grundlagen und Stand der Technik</b> .....	<b>13</b>
2.1 Gerüststrukturen im Kontext zell-basierter Anwendungen .....	13
2.2 Eigenschaften von Gerüststrukturen.....	19
2.3 Zellsysteme.....	24
2.4 Dokumentation und Analyse strukturbildender zellulärer Prozesse.....	27
<b>3. Materialien und Methoden</b> .....	<b>33</b>
3.1 Zellsysteme.....	33
3.2 Zellkulturtechniken .....	34
3.3 Biomaterial Alginat .....	35
3.4 System zur parallelisierten automatisierten Lebendzell-Mikroskopie .....	37
3.5 Rechnergestützte Bildanalyse.....	38
3.6 Untersuchungen zu strukturbildenden zellulären Prozessen ohne Gerüststruktur.....	39
3.7 Modifikation von Alginat-basierten Gerüststrukturen .....	42
3.8 Destruktion von Alginat-Gerüststrukturen .....	55
3.9 Ansätze für die Voraussetzung einer automatisierten Untersuchung von Gerüststrukturen .....	58
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>61</b>
4.1 Implementierung und Charakterisierung eines quantitativen Systems für die Untersuchung zellulärer strukturbildender Prozesse .....	62
4.2 Untersuchung von strukturbildenden zellulären Prozessen ohne Gerüststruktur .....	65
4.3 Untersuchung von strukturbildenden zellulären Prozessen mit neuartigen Gerüststrukturen .....	84
4.4 Untersuchungen zu Reversibilität und Abbau von Gerüststrukturen .....	125
4.5 Untersuchungen zur Voraussetzung einer automatisierten Entwicklung von Gerüststrukturen .....	132
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>147</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>177</b>
<b>Publikationen</b> .....	<b>189</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>193</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>197</b>

# Abkürzungsverzeichnis

μCP, mCP	μ-Contact Printing
Alg/ALG	Alginat
AlgL	Alginatlyase
AlgL	Alginatlyase
Ba/Ba <sup>2+</sup>	Barium
ca.	circa
CaP	Calciumphosphat
CaP-NP	Calciumphosphat-Nanopartikel
COL	Kollagen I
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
GS	Gerüststruktur, Gerüststrukturen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hESC	humane embryonale Stammzellen
hiPSC	humane induziert pluripotente Stammzellen
hiPSC-CM	hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten
hMSC/huMSC	humane mesenchymale Stammzellen
hPSC	humane pluripotente Stammzellen
LCI	Live-Cell Imaging (Lebendzell-Mikroskopie)
LN	Alginat extrahiert aus <i>Lessonia nigrescens</i>
LNT	Mischung aus LN und LT (1:1, v/v)
LT	Alginat extrahiert aus <i>Lessonia trabeculata</i>
MW	Mittelwert
Na	Natrium
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIL	Nano-Imprint Lithographie
NP	Nanopartikel
PBR	Produktbildungsrate
PDMS	Polydimethylsiloxan
pLL	Poly-L-Lysin
qPH-M	quantitative Phasenkontrast-Mikroskopie
RBD	Reliability block diagramm, Ausfallsicherheits-Blockdiagramm
ROCKi	Rho-associated protein kinase Inhibitor
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
TCPS	Tissue culture treated polystyrene, zellkulturbehandeltes PS
TE	Tissue Engineering
Ti	Titan
Tyr/TYR	Tyramin
UHV	Ultra-hoch viskos



# 1. Einleitung und Motivation

---

Im Jahr 2003 wurde in der Fachzeitschrift *Nature* ein Leitartikel mit dem Titel „*Goodbye, flat biology?*“ veröffentlicht [1]. Das Zitat greift den zu dieser Zeit beginnenden Umbruch von der „traditionellen“ Kultivierung von Zellen auf planaren Plastikoberflächen auf, die durch komplexere Kultivierungsformen ersetzt wurde. Ebenso sind seit dem Jahr 2001 die Möglichkeiten gestiegen, hochqualitative Daten über zelluläre Zustände zu produzieren, z. B. durch die Sequenzierung und Annotation von ganzen Genomen [2, 3] und die sich daraus ableitenden Expressionsanalysen [4, 5]. In diesem Zusammenhang haben Untersuchungen an zweidimensionalen und dreidimensionalen Kultursystemen ergeben, dass auch die Dimension der zellulären Mikroumgebung direkten Einfluss auf die Expressionsprofile der Zellen nimmt [5]. Es entwickelten sich hieraus neue Ansätze für die Kultivierung von dreidimensionalen multizellulären Zellsystemen (sog. „Sphäroide“ bzw. „Aggregate“, Tumormodelle) [6] sowie biohybride Zell-Biomaterial-Systeme („Gerüststrukturen“, Modelle/Prototypen für das *Tissue Engineering*) [7].

Der Bereich des *Tissue Engineering*, also der in-vitro-Herstellung von funktionalen Geweben für die regenerative Medizin, hat in den letzten Jahren einen rasanten Aufstieg erlebt, was durch die Anzahl der Publikationen bei einer Suche dieses Begriffs in der Datenbank Pubmed deutlich wird [8]. Waren bis vor wenigen Jahren nur Ansätze für die Regeneration von Hautschichten Stand der Technik, so sind heute immer mehr komplexe funktionale Konstrukte in vitro realisierbar. Häufig sind von künstlich hergestellten Geweben in der Tagespresse [9, 10] sowie in der Fachliteratur zu lesen. Artifizielle Trachea [11], Hornhaut [12], Blutgefäße [13] oder weitere sog. „Mini-Organ“ [14] sind hierfür nur einige Beispiele. Diese Entwicklungen gehen oftmals einher mit der Entwicklung und Integration von Produktionstechniken in die biologischen Abläufe, um z. B. eine Formgebung der biologischen Systeme anhand von Gerüststrukturen (engl.: *scaffolds*) zu erreichen. Technologien werden dabei für zellbiologische Anwendungen neu entwickelt oder vorhandene adaptiert und erlauben eine reproduzierbare und exakte Produktion der Gerüste [15]. Die Produktion von Zell-Matrix-Strukturen entfernt sich dabei von empirischen Ansätzen und entwickelt sich zu einem rationalen Design, das dann als *Tissue Engineering* bezeichnet werden kann. Frühere Ansätze, die von Laura Nicklason mit dem Zitat „*Tissue, try this*“ belegt sind [16], werden sukzessive durch die rationalen Ansätze abgelöst [17].

In früheren Ansätzen bestand die Herangehensweise in der einfachen Kombination der besten Ideen und Materialien mit der anschließenden Anwendung im Tiermodell und dem „Flehen [Beten] für das Beste“ [18]. Die seltenen Erfolge führten zu einem Paradigmenwechsel, der Ansätze aus Ingenieurwissenschaften sowie Mikro- und Nanotechnologien interdisziplinär miteinander verbindet („*It takes a village to grow a tissue*“ [16]).

Durch die damit verbundene Komplexität dieses Feldes stößt man je nach verwendetem Biomaterial (zur Herstellung der Gerüststrukturen), als auch durch das zu verwendende Zellsystem (zur Zellularisierung)

auf neue Problemstellungen bzw. Optimierungsbedarf zur Realisierung strukturbildender zellulärer Prozesse. Diese umfassen beispielsweise die optische Analyse der Zell-Matrix-Interaktion zur frühzeitigen Detektion der Qualität der entwickelten Gerüststruktur oder auch die chemische oder physikalische Modifikation der Grenz- bzw. Interaktionsfläche zur Ermöglichung der Adhäsion von humanen Stammzellen. Strukturbildende zelluläre Prozesse werden in dieser Arbeit als die Interaktion von Zellen mit dem Biomaterial Alginate als Gerüststruktur definiert. Insgesamt decken diese Prozesse im Kontext des *Tissue Engineering* einen wichtigen Bereich ab. Ausgehend von mehreren Einzelzellen erfolgt, beispielsweise über die Zeit, eine Organisation der Zellen zu einer funktionalen Einheit [14], d. h. Zellrasen, Zellaggregate, Gewebe oder organoide Zellverbände. Für die Charakterisierung der Funktionalität dieser zellulären Strukturen können Adhäsion, Morphologie, Vitalität, Proliferation oder Expression spezieller Proteine als immanente Eigenschaften herangezogen werden. Die damit verbundenen zellulären Prozesse können sich in einem breiten zeitlichen Bereich abspielen. Auf molekularer Zellebene sind die Zeitkonstanten im Bereich von Millisekunden angesiedelt. Ein Beispiel ist die Interaktion von Molekülen oder die Reizweiterleitung in Nervenzellen ([19], BNID 107125). Mit steigender Komplexität des biologischen Systems ist in vielen Fällen auch eine Vergrößerung der Zeitkonstanten zu verzeichnen. So ist die Zellteilung ein sich wiederholender Prozess, der, je nach Zelltyp, z. B. alle 24 h abläuft und eine Zelle sich innerhalb von 30 bis 60 min bei mikroskopischer Betrachtung „verdoppelt“ ([19], BNID 109393). Die Adhäsion von Zellen auf einem Substrat liegt ebenso in einem Bereich von Minuten bis Stunden [20], wengleich die Adhäsion durch die zelluläre Umgebung verändert werden kann. Eine Differenzierung von multizellulären *embryonic bodies* verläuft innerhalb von mehreren Tagen bzw. Wochen [21]. Neben den molekularen Mechanismen und Reaktionen, die bei diesen Prozessen intrazellulär ablaufen, gehen diese auch einher mit einer morphologischen Änderung der Einzelzelle bzw. des Zellverbands. Diese können mittels mikroskopischer Beobachtung der Zellen über die Zeit detektiert werden. Ebenso ist eine zeitaufgelöste Untersuchung von biologischen Prozessen für die Interpretation von Zuständen in der Zellkultur interessant, da nicht nur Endpunktanalysen vorgenommen werden können. Der Zustand einer Kultur kann von Inokulation der Zellen bis Experimentende nachverfolgt werden. Molekularbiologische Untersuchungen, die z. B. Expressionsprofile von Zellpopulationen generieren können, haben den Nachteil, dass für eine zeitaufgelöste Untersuchung sehr viele Proben benötigt werden. Durch die „Zerstörung“ der Probe kann der weitere Verlauf der Expressionsprofile zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr analysiert werden.

In diesem Zusammenhang fand in den letzten Jahren eine Art Paradigmenwechsel in der Zellbiologie statt. Durch die Möglichkeit tiefergehende Analysen von Zellen durchführen zu können, erkannte man, dass auch die elastischen Eigenschaften der Kulturoberfläche maßgeblich das Zellverhalten beeinflussen und dass eine harte Plastikoberfläche aus Polystyren je nach Anwendung ungeeignet ist („*Biologists are from polystyrenia [...]*“, [22]). Der Fokus liegt dabei auf der Immobilisierung der Zellen in Hydrogelen oder der Kultivierung in porösen, dreidimensionalen Gerüststrukturen. Insbesondere die dreidimensionalen Systeme bieten den Zellen vergleichbarere Bedingungen zur in-vivo-Situation (z. B. Zell-Zell-Interaktion, Zell-Matrix-Interaktion, chemische Gradienten), ist jedoch bei einer rationalen Entwicklung im Labor mit systematischen Untersuchungen mit einigen Nachteilen verbunden. Eine homogene Verteilung der Zellen während der Inokulation ist schwierig, da die Zellen durch die Poren in das Innere der Gerüststruktur gebracht werden müssen. Während der Kultivierung oder zur finalen Analyse ist die Detektion der Zellen ebenfalls komplex, da alle Zellen im dreidimensionalen Raum verteilt sind. Je nach Material ist nur ein geringer Kontrast zu den Zellen vorhanden, die eine invasive Färbung der Zellen erfordert. Ferner sind Standardtechniken wie z. B. Durchlichtmikroskopie oder auch Screeningverfahren auf planare zweidimensionale Oberflächen ausgelegt. Betrachtet man poröse Gerüststrukturen, so erfolgt die Zell-Matrix-Interaktion, vereinfacht gesehen, auf einer planaren Oberfläche [23], trotz des dreidimensionalen Konstrukts. Eine zweidimensionale Petrischale, die mit dem Material der Gerüststruktur beschichtet ist, kann somit eine „Brücke“ zwischen Standardtechnologien und –methoden zur Analyse der Zellen und gleichzeitig die Untersuchung der Wechselbeziehungen zwischen Zellen und Materials bzw. der modifizierten ex-

trazellulären Matrix darstellen [24]. Dadurch kann ein wesentlicher Beitrag zu dem rationalen Design von Gerüststrukturen geleistet werden.

Die Beobachtung von Zellkulturen über die Zeit erlaubt hierbei eine detaillierte Charakterisierung von Einzelzellen, Zellpopulationen und Zellagglomeraten bzgl. einer Vielzahl von Parametern, aus denen sich letztendlich eine biologische Bedeutung/Aussage oder Modellbildung ableiten lässt. Die zeitaufgelöste Lebendzell-Mikroskopie von biologischen Proben unter physiologischen Bedingungen und eine automatisierte Analyse der Mikroskopiebilder stellt daher eine elegante Methode für die Untersuchung von biologischen Prozessen dar. Die momentan verfügbaren Mikroskopieansätze sind hier jedoch in vielerlei Hinsicht limitierend. Die konventionelle statische Mikroskopie von lebenden Zellen erlaubt durch die Aufnahme von nur wenigen Zeitpunkten (Anfangs- bzw. Endpunktanalyse) keine Rückschlüsse auf das dynamische zelluläre Verhalten und ist daher für die Untersuchung von Prozessen nur bedingt geeignet. Die automatisierte Lebendzell-Mikroskopie unter physiologischen Bedingungen ermöglicht bei hoher zeitlicher Auflösung eine (theoretisch) lückenlose Aufklärung zellulärer *Prozesse* auf morphologischer und dynamischer Ebene. Hier wird jedoch oftmals auf miniaturisierte Zellkulturgefäße zurückgegriffen, die die unmittelbare Zellumgebung und dadurch das Zellverhalten beeinflussen können. Bei den aktuellen Arbeiten im Bereich des *Tissue Engineerings* spielen adulte sowie induziert pluripotente Stammzellen eine wichtige Rolle und gelten als vielversprechende Zellsysteme für zukünftige in-vivo-Anwendungen. Mesenchymale (adulte) Stammzellen (hMSC) werden z. B. aus dem Knochenmark, dem Nabelschnurblut oder dem Nabelschnurgewebe (*Wharton's Jelly*) isoliert [25]. Sie besitzen ein hohes Differenzierungspotenzial in Knochen-, Knorpel- oder Fettgewebe [26] und leisten damit einen wichtigen Beitrag im *Tissue Engineering* und der Entwicklung neuer Therapieansätze. Laufende klinische Studien mit adulten Stammzellen zeigen ebenso, dass eine hohe Zellzahl für die Durchführung benötigt wird, die nicht durch Biopsien gedeckt werden kann. In einer Studie (ID: NCT00366145) zur Behandlung der Transplantat-Wirt-Reaktion (engl.: *Graft-versus-Host-Disease*, GvHD) wurden 240 Patienten in acht Sitzungen jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen pro kg Körpergewicht appliziert. Bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 75 kg waren für diese Studie demnach 1,2 Mrd. Zellen pro Patient für die Durchführung notwendig. Die Produktion der Zellen in planaren Kulturgefäßen ist dabei weniger effizient, verglichen mit z. B. einer Mikroträger-basierten Kultur in Bioreaktoren [27, 28].

Ebenso sind in den vergangenen Jahren weitere medizinisch relevante Zellquellen etabliert worden, mit denen das *Tissue Engineering* neuen Aufschwung erhalten hat. Nach der Entdeckung bzw. Etablierung der embryonalen Stammzellen aus Blastozysten der Maus 1981 [29] und der Etablierung 1998 der humanen embryonalen Stammzellen von James Thomson wurde diesen Zellen ein hohes Potenzial für die regenerative Medizin zugesprochen. Thomson gelang es humane Zellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste zu isolieren und auf mitotisch inaktivierten murinen embryonalen Fibroblasten zu kultivieren [30]. Durch Zugabe von Faktoren können sie in vitro ohne Verlust der Pluripotenz kultiviert und expandiert werden. Die klinische Anwendung dieser Zellen stellt sich jedoch als kritisch dar, da z. B. nach einer langen in-vitro-Kultivierung eine hohe spontane Differenzierungsrate und Instabilität auf Genomebene beobachtet wurde [31]. Das Potenzial dieser Zellen konnte jedoch bisher nicht bestätigt werden, da sowohl ethische [32] als auch biologische Probleme [33] mit diesen Zellen einhergehen. Neuen Aufwind erhielt dieses Forschungsgebiet im Jahr 2006/2007 durch Studien von Takahashi und Yamanaka von der Universität Wisconsin, denen es erstmals gelang, Körperzellen zu reprogrammieren und sog. induziert pluripotente Stammzellen zu generieren [34, 35]. Durch die Aktivierung von Entwicklungsgenen (z. B. Oct-4, Sox-2, c-Myc und Klf-4 [36]) können diese Zellen in eine Art embryonalen Zustand versetzt werden. Eine Differenzierung in Herzmuskel- [37] oder Nervenzellen [38] war von diesen Zellen ausgehend in vitro möglich, was somit die Möglichkeit eröffnet, patientenspezifische Zellmodelle (z.B. mit genetischer Prädisposition für kardiovaskuläre Erkrankungen) herzustellen [39]. Die Bereitstellung von definierten Stammzell-Nischen für die beiden hier genannten Vertreter ist ein zentrales Problemfeld des *Tissue Engineerings* für das in dieser Arbeit Lösungsansätze untersucht und entwickelt werden sollen.

Das **Ziel dieser Arbeit** ist die Untersuchung von zellulären strukturbildenden Prozessen im Kontext des *Tissue Engineerings*, insbesondere im Kontext von Gerüststrukturen, die auf Biopolymeren basieren. „Die Suche nach geeigneten dreidimensionalen Gerüststrukturen als Analogon zu der natürlichen extrazellulären Matrix ist [weiterhin] eine zentrale Aufgabe im *Tissue Engineering* [...]“ und „die Adaptation von Materialeigenschaften und der Geometrie von Gerüststrukturen ist immer noch eine Herausforderung“ [40]. Anknüpfend an dieses Zitat aus Detsch *et al.* [40] sollen in dieser Arbeit insbesondere planare und sphärische Gerüststrukturen, deren Modifikation und die resultierenden zellulären Prozesse/Verhalten untersucht werden, um einen Beitrag zum rationalen Design zukünftiger dreidimensionaler Gerüststrukturen zu leisten.

Die Untersuchung solcher Prozesse soll im **ersten Teil** dieser Arbeit mithilfe eines parallelisierten Lebendzell-Mikroskopieansatzes erfolgen, welches eine große Stichprobenzahl, als auch eine simultane Untersuchung von mehreren Konditionen erlaubt. Die Parallelisierung soll dabei nicht durch eine Miniaturisierung der Zellkulturgefäße erfolgen, sondern auf Kulturschalen (z. B. mit 35 mm Durchmesser) basieren. Diese Substrate haben den Vorteil, dass konstante Kultivierungsbedingungen über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden können und erlauben ebenso die Untersuchung planarer Gerüststrukturen. Das biologische Verhalten von immortalisierten Zelllinien, als auch komplexer Zellsysteme soll im **zweiten Teil** dieser Arbeit zunächst ohne Gerüststrukturen untersucht werden. Durch diesen Bild-basierten Ansatz ist es erforderlich, Methoden der automatisierten Bildanalyse zu entwickeln und untersuchen, mit denen die biologischen Prozesse abgeleitet werden können. Die Untersuchungen und Analyseschritte sollen weitestgehend ohne Fluoreszenzmarkierung erfolgen, um dadurch mögliche Artefakte zu vermeiden. Mit der Untersuchung therapeutisch relevanter Zellsysteme wie multipotente oder pluripotente Stammzellen soll einen Beitrag zur Analyse dieser Zellsysteme im Kontext des *Tissue Engineering* geleistet werden. Mit Prototypen, basierend auf dem Mikroskopiesystem, sollen Untersuchungen erfolgen, die eine automatisierte (klinische) Anwendung des Systems, mit z. B. kryokonservierter Proben, auf neu entwickelten Gerüststrukturen unterstützt. Im **dritten Teil** der Arbeit soll die Untersuchung der zellulären Prozesse in Kombination mit Gerüststrukturen erfolgen. Der Fokus soll hierbei auf das Polysaccharid Alginate gelegt werden, da dieses durch seine physiko-chemischen Eigenschaften ein exzellentes Biomaterial für Gerüststrukturen darstellt, in seiner aufgereinigten Form jedoch bioinert ist und dadurch keine Signale für die Adhäsion von Zellen bereitstellt. Es soll daher untersucht werden, welche Modifikationen für die Zell-Matrix-Interaktion adhäsionsabhängiger Zellen geeignet sind. Die zellulären Antworten auf verschiedene Modifikationen sollen mit einem Lebendzell-Mikroskopie-Ansatz untersucht werden und letztendlich zu planaren oder sphärischen Gerüststrukturen führen. Die Funktionalität der Gerüststrukturen soll anhand der Kultivierung von humanen Stammzellen untersucht werden und deren biotechnologische Anwendung z. B. in Bioreaktoren überprüft werden. Ferner soll untersucht werden, ob sich Modifikationen der Gerüststruktur eignen, komplexere Zellsysteme (beispielsweise humane induziert pluripotente Stammzellen und daraus abgeleitete differenzierte Zellen) strukturiert zu kultivieren und dadurch einen Beitrag für zukünftige Zell-basierte Modelle für die Modellierung von pathogenem Gewebe zu leisten. Hierfür soll eine geeignete Methode zur Strukturierung etabliert werden. Im **vierten Teil** soll die Reversibilität bzw. die Degradierbarkeit der Gerüststrukturen untersucht werden. Die Degradierbarkeit ist im Kontext des *Tissue Engineerings* eine wichtige Funktion um zellularisierte Gerüststrukturen beispielsweise *in vivo* zeitabhängig zu integrieren. Bei *in-vitro*-Anwendungen wird die Isolation von Zellen aus/von Gerüststrukturen durch deren Degradierung erleichtert. Unterschiedliche Mechanismen zur Degradierung bei Alginate-basierten Gerüststrukturen sollen in dieser Arbeit untersucht werden. Abschließend sollen im **fünften Teil** die Grundlagen einer automatisierten Entwicklung von Gerüststrukturen untersucht werden. Hierbei sollen insbesondere die Kultursubstrate bzw. die Analyseverfahren im Vordergrund stehen.



# 2. Grundlagen und Stand der Technik

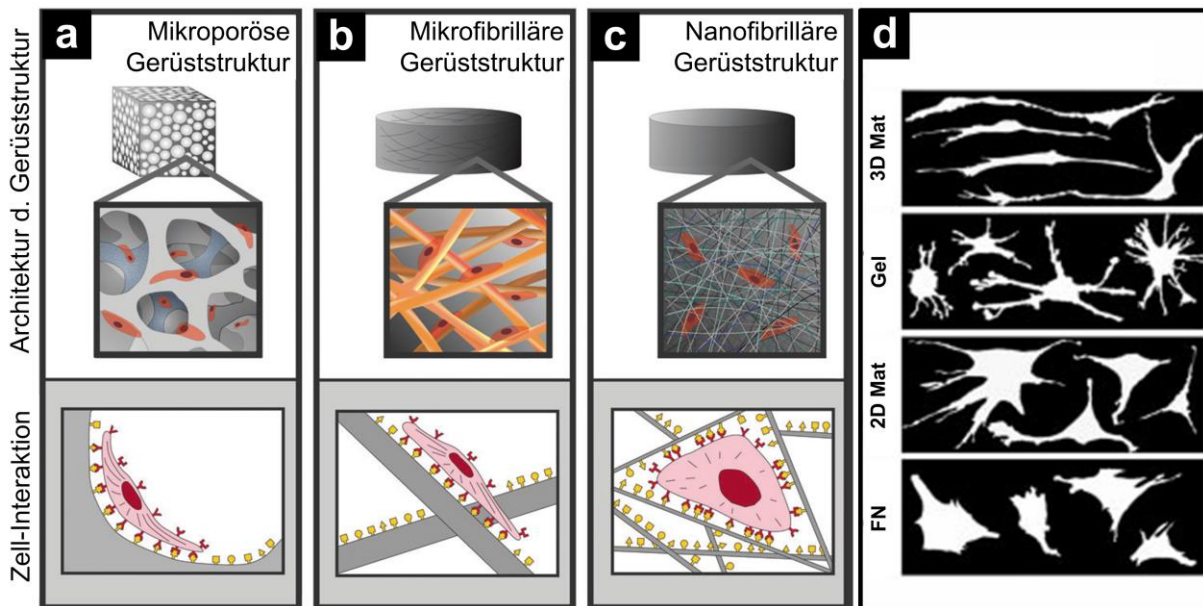
---

## 2.1 Gerüststrukturen im Kontext zell-basierter Anwendungen

Der Begriff „Gerüststrukturen“ (in der Folge abgekürzt mit „GS“) wird in der englischsprachigen Fachliteratur allgemein als „*scaffold*“ bezeichnet. Das Spektrum an Gerüststrukturen ist dabei breit gefächert, wie in einem Artikel von Dhandayuthapani *et al.* [41] beschrieben wird. Sie unterscheiden zwischen sechs unterschiedlichen Typen von GS: porös, hydrogelbasiert, fibrillär, mikrosphärisch, Polymer-Keramik-Komposit und dezellularisiert [41]. Zweidimensionale Polymerschichten, die aus synthetischen oder natürlichen Polymeren aufgebaut sind, werden hierbei nicht explizit genannt, werden aber aufgrund der Relevanz [42] als physiko-chemisch adaptierbare Wachstumsfläche von therapeutisch relevanten Zellen in diese Liste aufgenommen. Zweidimensionale GS mit zusätzlicher chemischer oder topographischer Strukturierung werden in der Literatur auch als „2,5D“ GS bezeichnet [43, 44].

Die Motivation Gerüststrukturen als Kulturoberfläche für Zellen zu nutzen, ist das zunehmende Wissen über die komplexe Wechselwirkung von Zellen mit ihrer Mikroumgebung (siehe z. B. [1, 45-49]). Harte Plastikoberflächen für die Zellkultivierung sind in der Regel für die Kultivierung zweckdienlich, je nach Zelltyp ist man jedoch auf Eigenschaften der Kulturoberfläche angewiesen, die über die Polystyrenoberfläche hinausgehen. Der direkte Einfluss der Dimensionalität der GS konnte von Kumar *et al.* [50] sowie Birgersdotter *et al.* [51] anhand von Expressionsstudien belegt werden, in denen Zellen auf zweidimensionalen GS u. a. ein verändertes Expressionsprofil aufwiesen [50, 51]. Gerüststrukturen, die die in-vivo-Situation am realistischsten abbilden, sind dezellularisierte Gewebe oder Organe (Entfernen der Zellen, so dass überwiegend das Kollagen-Gerüst übrigbleibt, z. B. dezellularisiertes Peritoneum [52] oder porcine Herzklappen [53]). Die dezellularisierte Gerüststruktur kann dabei vor Implantation mit Zellen in vitro besiedelt [54] werden oder wird nach erfolgter Implantation mit körpereigenen zirkulierenden Zellen besiedelt [55]. Wie Crapo *et al.* zeigen, ist der Herstellungsprozess recht aufwendig [56] und auch auf Spender angewiesen. Eine Übertragung auf in-vitro-Ansätze ist somit nur bedingt praktikabel, da dezellularisierte Gerüststrukturen ein limitierender Faktor sind und mit der allgemein geringen Verfügbarkeit von Spenderorganen einhergehen [57].

In der Konsequenz ist es erforderlich, sich von Gewebe- bzw. Organspenden unabhängig zu machen und funktionale Gerüststrukturen systematisch in vitro nachzubilden. In einem Übersichtsartikel zeigen Santos *et al.* [58] Strategien auf, um die Mikroumgebung von Zellen in vitro nachzustellen. Sie stellten dabei heraus, dass die Komplexität von dreidimensionalen Gerüststrukturen durch die Nutzung von zweidimensionalen vereinfachten Modellen ein guter Ansatz ist, um strukturelle, biophysikalische oder biochemische Eigenschaften der Struktur kombinatorisch in vitro zu untersuchen und zu optimieren [58].



**Abbildung 1: ARCHITEKTUR UND ZELL-INTERAKTION VON GERÜSTSTRUKTUREN.**

*a* Mikroporöse Gerüststrukturen. *b* Mikrofibrilläre Gerüststrukturen. *c* Nanofibrilläre Gerüststrukturen. Abbildung modifiziert nach [23]. *d* Morphologien von humanen Fibroblasten in/auf unterschiedlichen Substraten. Abkürzungen: 3D Mat: 3D-Matrix, Gel: gelartiges Substrat, 2D-Mat: 2D-Matrix, FN: Fibronectin. Abbildung modifiziert aus [59].

Stevens *et al.* [23] unterscheiden zwischen mikroporösen, mikrofibrillären und nanofibrillären Gerüststrukturen (siehe auch Abbildung 1 a-c). Bei näherer Betrachtung erkennt man sowohl bei makroporösen, als auch bei mikrofibrillären GS planare und/oder gekrümmte Oberflächen, wohingegen nur bei der nanofibrillären Gerüststruktur die Zellen tatsächlich dreidimensionalen Kontakt zu den strukturellen Elementen der Gerüststruktur herstellen können [23]. Die Besiedelung mit Zellen erfolgt entweder in (siehe z. B. [60]) oder auf der GS (siehe z. B. [61]) und kann, je nach Architektur, eine unterschiedliche Zellreaktion beispielsweise in Form der Morphologie zur Folge haben ([59], Abbildung 1 d).

### 2.1.1 Polymerbasierte Gerüststrukturen

Eine Möglichkeit, die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Gerüststrukturen herzustellen, ist die Verwendung von polymerbasierten Biomaterialien. Es wird zwischen synthetischen und natürlichen Biomaterialien unterschieden, die in Tabelle 1 als Übersicht dargestellt sind (nach [62] und [63]). Durch den Bezug für diese Arbeit wird verstärkt auf das Biomaterial Alginate eingegangen.

Im Williams Wörterbuch der Biomaterialien werden mehrere Definitionen unter dem Stichwort „Biomaterial“ angegeben, wobei ein Konsens für folgende Definition besteht: „ein Material, das als Schnittstelle mit biologischen Systemen verbunden ist, um Gewebe, Organe oder Körperfunktionen zu beurteilen, behandeln, erweitern oder zu ersetzen“ [64].

Durch die technologischen Entwicklungen im Bereich der Biomaterialien kann man mittlerweile drei Generationen an Biomaterialien unterscheiden: die erste Generation zielte auf die Bioinertheit ab, um als Implantat keine oder nur geringe (Immun-) Reaktionen hervorzurufen. Die zweite Generation Biomaterialien zielte auf eine kontrollierte Interaktion mit dem umgebenen Gewebe ab, sei es bei der Osseointegration oder als Depot zur kontrollierten Wirkstoffabgabe. Die dritte Generation umfasst die Regeneration von funktionalem Gewebe, das durch Funktionalisierung bestimmte Zellreaktionen (wie z. B. Proliferation, Differenzierung, u.a.) hervorruft [65].

Der Begriff „Biomaterial“ wurde bis vor 60 Jahren noch nicht für die Materialien gebraucht, die heute als Biomaterialien bezeichnet werden [66]. Die ersten nicht-biologischen Materialien in menschlichem Gewebe wurden im *Kennewick Mannes* gefunden, der vor etwa 9000 Jahren lebte. Das sich im Körper be-

findliche Material war eine steinerne Speerspitze, die im Beckenknochen steckte. Obwohl sie ein Fremdkörper war, schien sie den Kennewick Mensch nicht zu beeinflussen und war auch nicht dessen Todesursache [66]. Die Maya beherrschten eine Technik für Zahnimplantate, die in dem Einbau von Zähnen aus Perlmutter bestanden, die mit der Zeit mit dem Kieferknochen verwachsen - heute als Osseointegration bekannt [67].

**Tabelle 1:** Auswahl von natürlichen und synthetischen Biomaterialien. Tabelle abgeändert aus [62] und ergänzt durch [63].

Typ		Beispiel	Anwendungen
Natürliche Biomaterialien	Protein-basiert	Kollagen Fibrin Seide	Knochen, Knorpel, Herz, Ligament, Nerven, Gefäße Knorpel, Nerven, Gefäße Knochen, Knorpel, Leber Knorpel, Herz, Nerven
	Polysaccharid-basiert	Agarose Alginat Hyaluronsäure Chitosan	Knorpel, Leber, Nerven, Gefäße Fettgewebe, Knorpel, Nerven, Haut, Gefäße Knochen, Knorpel, Nerven, Haut
Synthetische Biomaterialien	Polymer-basiert	PLGA PEG PGA PLA PLGA PVA PHEMA	Fettgewebe, Knochen, Knorpel, Muskel, Nerven Fettgewebe, Knochen, Knorpel, Leber, Herz, Nerven
	Peptid-basiert Keramik-basiert		Knochen, Nerven Knochen, Knorpel

Abkürzungen: PEG = Polyethylenglycol, PGA = Polyglycolsäure, PLA = Poly(L)Laktat, PLGA = poly(DL)glycolaktat, PVA = Polyvinylalkohol, PHEMA = Polyhydroxyethylmethacrylat

### 2.1.2 Alginat als Beispiel für ein Biomaterial

Alginat und deren Hydrogele haben sich im Laufe der letzten Jahrzehnte zu einem vielfach genutzten Biomaterial etabliert [68]. Aufgrund seiner physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften ist es in vielen Studien sowohl als immunoisolierende Matrix, als auch als GS für zellbasierte Anwendungen in der regenerativen Medizin untersucht worden.

Alginat liegt in ihrer natürlichen Form in Braunalgen und in Bakterien vor [69]. Braunalgen wie z. B. die Spezies *Macrocystis sp.* oder *Lessonia sp.* [70] enthalten Alginat als Bestandteil der Zellwand.

#### Physiko-chemische Eigenschaften

Die Polymere des Alginats setzen sich aus den Monomeren  $\alpha$ -L-Guluronsäure („G“, Abbildung 2 a) und  $\beta$ -D-Mannuronsäure („M“, Abbildung 2 a) zusammen und sind über eine 1-4 glykosidischen Bindung miteinander verknüpft. In den unverzweigten Polymeren treten die Monomere blockweise auf. Die Blöcke sind entweder homogen ( $MMMM_n$ ,  $GGG_n$ ) oder heterogen ( $MGM_n$ ,  $GMG_n$ ) zusammengesetzt (Abbildung 2 a). Die Repetitivität der Blöcke wird durch den Index  $n$  ausgedrückt und ist variabel, da es sich um ein Naturprodukt handelt. Je nach Umweltbedingungen oder Algenteil kann diese Zusammensetzung variieren, da mit ihr unterschiedliche elastische Anforderungen einhergehen. Heterogene Blöcke verleihen der Alge eine hohe Flexibilität, wohingegen die homogenen Blöcke der Alge mehr Stabilität ver-

leihen [71]. Die Festigkeit der Alginat ist bestimmt durch Monomerblöcke und verläuft von fest zu flexibel durch GGG > MMM > MGM, GMG [72]. Die Dichte von Alginaten wird in der Literatur mit  $0,8755 \text{ g/cm}^3$  angegeben [73]. Das Molekulargewicht für *Lessonia nigrescens* wird zwischen  $3,3 \times 10^5$  bis  $2,9 \times 10^6 \text{ g/mol}$  und für *Lessonia trabeculata* zwischen  $1,4 \times 10^5$  bis  $2,6 \times 10^6 \text{ g/mol}$  angegeben [74, 75].

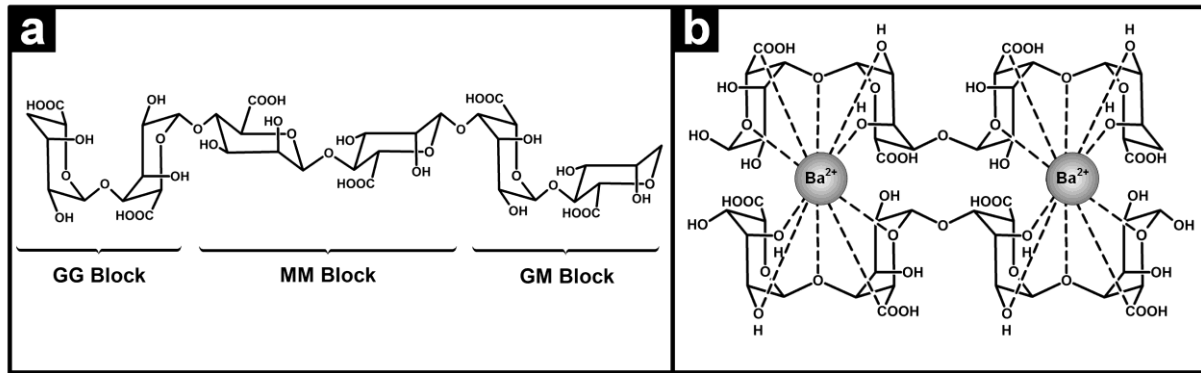
### Alginat-Biosynthese

Die molekularen Mechanismen der Biosynthese von Alginaten ist in Bakterien weitestgehend erforscht [76-78], wohingegen der Produktionsweg in Algen größtenteils unbekannt ist. Es besteht jedoch der Konsens, dass die Biosynthese sehr ähnlich zu der von Bakterien ist [68]. Die GDP-Mannuronsäure ist damit das Molekül, das durch ein Zusammenspiel mehrerer Enzyme zum Alginat polymerisiert wird [79]. In Braunalgen wird Alginat im Golgi-Apparat synthetisiert und in Vesikeln zum Zielort, der Zellwand, transportiert [80].

Die Extraktion des Alginats aus dem Rohmaterial ist, neben der Vorbehandlung des Rohmaterials selbst, der entscheidende Schritt, der den Unterschied technischer und medizinischer Qualität ausmacht [81]. Im Gegensatz zu Alginaten für die Lebensmittelindustrie sind die Anforderungen an die Reinheit in der medizinischen Anwendung wesentlich höher angesetzt. Eine Methode zur Extraktion von ultra-hoch viskosen Alginaten medizinischen Grades wurde von Zimmermann *et al.* entwickelt, die Alginat durch Chelatisierung, Filtrationen und mehrfachen Präzipitationen in ultra-reiner Qualität im großen Maßstab extrahiert [82]. Extraktionsprozesse von anderen Forschergruppen beinhalten ähnliche Prozessschritte [83]. Die biologischen Auswirkungen von ultra-reinem im Gegensatz zu nicht-gereinigtem Alginat konnten von van Schilfgaarde *et al.* aufgezeigt werden. In ihren Studien an Ratten zeigten Alginatkugeln aus ultra-reinem Alginat nur geringen fibrotischen Bewuchs, wohingegen Kugeln mit nicht-gereinigtem Alginat nach einem Monat komplett mit fibrotischem Gewebe bewachsen und mit Kollagen bedeckt waren [84].

### Hydrogele aus Alginaten

Die biotechnologische Nutzung von Alginaten erfolgt in der Regel in Form von vernetztem Alginat, den Alginat-Hydrogelen. Flüssige Na-Alginat werden durch ionotrope Vernetzung in Hydrogele mit einem sehr hohen Anteil an Wasser (bis zu 95% in Alginatkugeln [85]) umgewandelt. Die am häufigsten verwendete Methode ist die Herstellung durch eine Lösung, in dem multivalenten Kationen in gelöster Form vorliegen. Gibt man Na-Alginat in diese Lösung bzw. tropft die Lösung auf Na-Alginat, erfolgt die Vernetzung durch Diffusion von außen nach innen [86]. In der Anwesenheit multivalenter Kationen wie Calcium oder Barium bilden Natrium-Alginat ionotrope Gele aus [87]. Die Kationen werden dabei hauptsächlich von adjazenten Guronsäureblöcken komplexiert. Es entsteht auf molekularer Ebene eine Konformation, die Morris *et al.* [88] mit dem sog. *egg-box model* beschrieben haben (siehe hierzu Abbildung 2 b). Die Art der Vernetzung ist für die Nutzung in der Zellbiologie bzw. regenerativen Medizin von Vorteil, da sie unter physiologischen Bedingungen stattfinden kann. Je nach Volumen des zu vernetzenden Alginats ist hier Gradientenbildung in der Vernetzung möglich, so dass der äußere Bereich des Hydrogels stärker vernetzt als der innere Bereich [89]. Eine Methode zur simultanen Vernetzung, sowohl extern als auch intern, ist die sog. *Crystal-Gun*-Methode, die von Zimmermann *et al.* entwickelt wurden [90]. Bei dieser Technik werden die Alginattropfen vor dem Eintauchen in die Vernetzerlösung zusätzlich mit Bariumsulfatkristallen beschossen, die die Vernetzung im Innern der Hydrogelkugel unterstützen und zusammen mit der Vernetzung durch das Fällbad homogen vernetzte Alginatkugeln produziert [82, 91].



**Abbildung 2: CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG VON ALGINATEN UND HYDROGELN.**

**a** Homogene und heterogene Monomerblöcke des Alginats aus Guluronsäure (G) und/oder Mannuronsäure (M).

**b** Interaktion von adjazenten G-Blöcken mit multivalenten Kationen zur Formation eines Hydrogels am Beispiel von Ba<sup>2+</sup>. Strukturen nach [72].

Eine ähnliche homogene Vernetzung kann durch die sog. in-situ-Vernetzung mit Calciumcarbonat (CaCO<sub>3</sub>) erfolgen. Hier wird das noch flüssige Na-Alginat mit CaCO<sub>3</sub> gemischt und das Calcium-Ion durch eine Reduzierung des pH-Werts durch z. B. D-glucono- $\delta$ -lacton (GDL) freigesetzt [92]. Franzesi *et al.* zeigten, dass durch die Nutzung eines weiteren Hydrogels eine Vernetzung von Alginat ohne ein Fällbad möglich ist [93]. Die multivalenten Kationen wurden dabei in dem Hydrogel bereitgestellt und zur Herstellung des Alginat-Hydrogels mit dem noch flüssigen Na-Alginat kontaktiert und per Diffusion vernetzt. Das Interessante bei dieser Vorgehensweise ist, dass eine Formgebung durch das Hydrogel bei gleichzeitiger Vernetzung erfolgen kann [93]. Neben der Vernetzung durch multivalente Kationen besteht die Möglichkeit der enzymatischen Vernetzung von Alginaten. Voraussetzung hierbei ist die kovalente Kopplung von Tyramin an die Alginatketten um für das Enzym ein Substrat zur Verfügung zu stellen. Die an den Polymeren befindlichen Phenolgruppen können durch eine Meerrettichperoxidase (HRP, engl.: *horseradish peroxidase*) miteinander verknüpft werden, um das Hydrogel herzustellen [94-96].

### Anwendung von Alginaten

In der pharmazeutischen Industrie/Technologie wird Alginat für die kontrollierte Wirkstoffabgabe (engl.: *controlled drug release*) [97] oder auch die Kapselung (Beschichtung) von Tabletten zur Verringerung der Desintegration [98] genutzt. In der Lebensmittelindustrie werden Alginat als Zusatzstoffe eingesetzt, die z. B. die Konsistenz, Stabilität oder Textur von Lebensmittelprodukten verbessern sollen [99-102]. In der medizinischen Anwendung wird Alginat u.a. zur Abformung von Zähnen in der Dentaltechnik [103] verwendet und ist auch als Wundauflage verbreitet [104]. In der regenerativen Medizin ist die Immobilisierung von Faktor-produzierenden Zellen die am häufigsten zitierte Anwendung, die über die letzten Jahrzehnte in vielen Veröffentlichungen untersucht, verbessert und modifiziert wurde (z. B. [105, 106]).

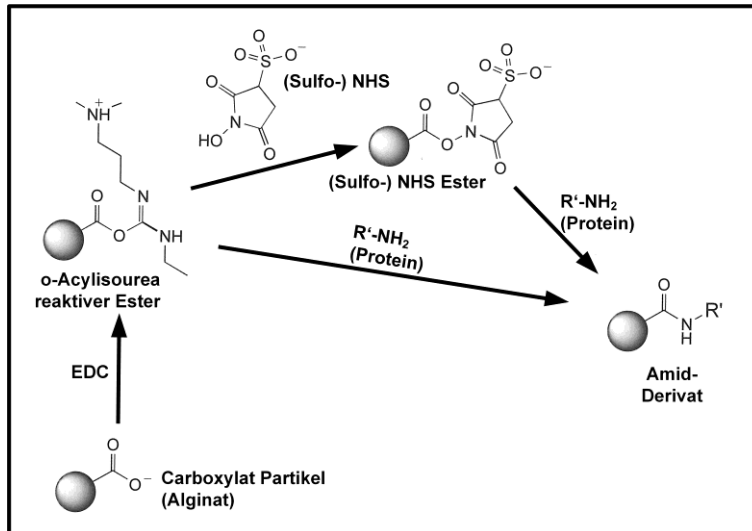
### Modifikation und Degradierung von Alginaten

Durch die zuvor beschriebene Aufklärung der Biosynthese von Alginaten konnten molekulare Werkzeuge etabliert werden, mit denen es möglich ist, maßgeschneiderte Alginatpolymere herzustellen. Insbesondere die C-5 Epimerase ist Bestandteil vieler Forschungsarbeiten (z. B. [107-109]), da sie die Epimerisation von Mannuron- zu Guluronsäure katalysiert und dadurch auch für die industrielle Herstellung von Alginaten von Interesse ist [110]. Durch diese Umwandlung kann das Verhältnis von Mannuronsäure zu Guluronsäure verschoben werden. Höhere Anteile von Guluronsäure, in homogenen Blöcken angeordnet, ermöglichen die Ausbildung von festeren Hydrogelen. Neben dem typischen M:G Verhältnisses durch die natürliche Umgebung von Braunalgen [75] bzw. der Teile der Braunalge selbst [111], kann eine anwendungsspezifische Optimierung der mechanischen Eigenschaften des Hydrogels vorgenommen werden.

Die Degradierung von Alginaten bzw. Alginat-Hydrogelen kann über chemische, physikalische aber auch enzymatische Mechanismen erfolgen. Die Behandlung von Alginat mit Ultraschall führt zu einer Fragmentierung der Molekülketten und damit zu Verringerung des Molekulargewichts und der Viskosität [75]. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass eine photolytische Degradierung von Alginaten durch UV-Bestrahlung eintritt [112]. Die Degradierung von Alginat-Hydrogelen erfolgt in der Regel durch Chelatbildner, die die multivalenten Kationen aus dem vernetzten Hydrogel binden und dadurch das Hydrogel degradieren. Beispiele hierfür sind Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) [113], Natriumsulfat [114] oder Phosphatverbindungen [115].

Die gerichtete enzymatische Degradierung von Alginaten kann über die Alginatlyase (AlgL) erfolgen. Alginatlyasen kommen sowohl in alginatproduzierenden Organismen als Teil der Biosynthese, als auch in anderen Organismen vor, die Alginat als Kohlenstoffquelle nutzen [116]. Je nach Substratspezifität spaltet das Enzym sowohl Na-Alginat als auch Alginat-Hydrogele [117]. Hierdurch werden die Polymere fragmentiert und damit das Molekulargewicht, sowie die Viskosität der Polymere bei zellphysiologischen Reaktionsbedingungen reduziert [117]. Die zugrundeliegende chemische Reaktion ist dabei die sog.  $\beta$ -Elimination [118]. Ebenso ist die Lyase bei vernetzten Hydrogelen aktiv und kann damit den Abbau/Desintegration von Alginat-Hydrogelen katalysieren. Dabei sind die Vernetzungsbedingungen sowie die chemische Zusammensetzung des Alginats von entscheidender Bedeutung für die Wirkweise und Effizienz der AlgL [119]. Im menschlichen Organismus kommt ein Enzym zur Spaltung von Alginat praktisch nicht vor [120], was für die Stabilität von implantierten Alginaten von großem Vorteil ist. Alginatlyasen lassen sich gemäß ihrer Substratspezifität in Mannuronsäure-Lyasen (E.C. 4.2.2.3) und Guronsäure-Lyase (E.C. 4.2.2.11) klassifizieren [121]. Lundqvist konnte bei einer Mannuronsäure-Lyase eine minimale Oligosaccharidkette von sechs homogenen Mannuronsäuren bestimmen, die für eine Katalyse durch das Enzym notwendig sind [122]. Iwamoto *et al.* isolierten aus *Alteromonas sp.* eine AlgL, die bifunktional die Katalyse von homogenen Mannuronsäure Oligomeren und homogenen Guronsäure Oligomeren katalysiert [123]. Für den analytischen Nachweis der Aktivität der AlgL kann das entstehende Produkt genutzt werden. Mit dem Thiobarbitursäure Assay kann die Quantifizierung der ungesättigten Uronsäuren kolorimetrisch mit einer Wellenlänge von 548 nm erfolgen. Ebenso ist eine direkte Quantifizierung ohne zusätzliche Chemikalien bei 235 nm möglich [121, 124].

Neben der Degradierung ist eine Epimerisierung der Alginate Bestandteil einiger Studien und ebenso von hohem Interesse, da hierdurch MMM-Blöcke in GGG-Blöcke umgewandelt werden können [110]. Durch diese enzymatische Methode kann letztendlich Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften des Hydrogels genommen werden, da die Stabilität mit dem GGG-Anteil korreliert [107, 109]. Anwendungen in der Zellbiologie, die nicht auf eine Immunisolation von Zellen in Alginaten abzielen, werden von Untersuchungen begleitet, die eine Modifikation der Alginat-Polymere bzw. der Alginat-Hydrogele beinhaltet. In der Literatur überwiegen hier besonders die chemischen Modifikationen. Abgeleitet von traditionellen chemischen Reaktionen zur Immobilisierung von Molekülen auf Oberflächen, haben Rowley *et al.* die sog. Carbodiimid-Chemie auf Alginate angepasst [125]. Diese Methode nutzt die vorhandenen Carboxylgruppen des Alginats zur kovalenten Kopplung von Peptiden/Proteinen mit deren Aminogruppe (siehe Abbildung 3). Diese Methode hat sich mittlerweile etabliert und wurde bereits in vielen Studien zur Modifikation von Alginaten verwendet [73, 87, 125-129].



**Abbildung 3: MODIFIKATION MIT EDC/NHS.** Partikel mit  $-COOH$  Gruppen werden mit EDC aktiviert und durch (Sulfo-) NHS stabilisiert. An den NHS-Ester können dann Moleküle mit  $NH_2$ -Gruppe kovalent angekoppelt werden (Abbildung aus [130], abgeändert).

## Technologien zur Herstellung von Gerüststrukturen aus Alginat-Hydrogelen

Im Laufe der letzten Jahre wurden, auch aufgrund von technischen Weiterentwicklungen und der interdisziplinären Zusammenarbeit von Mikrosystemtechnologen, Materialwissenschaftlern und Biologen Ansätze entwickelt, um GS aus Hydrogelen *on demand* herstellen zu können. Die Dosierung von Hydrogelen konnte in mehreren Studien und Entwicklungen gezeigt werden [131, 132]. Eine Dosierung und gleichzeitiger Aufbau von dreidimensionalen Konstrukten erlaubt beispielsweise eine Methode, die von Gruene *et al.* vorgestellt wurde. Hydrogele bzw. Zellhydrogel-Suspensionen befinden sich auf einer Matrix und werden per Laserpuls auf eine darunterliegende Oberfläche beschleunigt und anschließend vernetzt [133]. Eine ähnliche Verfahrenstechnik wurde von Derby *et al.* vorgestellt, die eine *Drop-on-demand*-Technologie zum Aufbau großer, dreidimensionaler Konstrukte (z. B. eine Nase) aus Alginat ermöglicht. Chohen *et al.* entwickelten ein System, das es erlaubt beliebige Strukturen aus Hydrogelen aufzubauen und z. B. Bandscheiben anhand von Daten aus der biomedizinischen Bildgebung zu verarbeiten und letztendlich aus Hydrogel zu reproduzieren [134].

Einen Ansatz, basierend auf größer dimensionierten GS, verfolgten Kang *et al.* Sie stellten poröse Hydrogelstruktur her, die durch die vorgegebene GS makroporöse Strukturen aufwies und hierdurch auch Zellen in größeren Gerüststrukturen, wie z. B. einen Zahn, mit Nährstoffen etc. versorgen konnten.

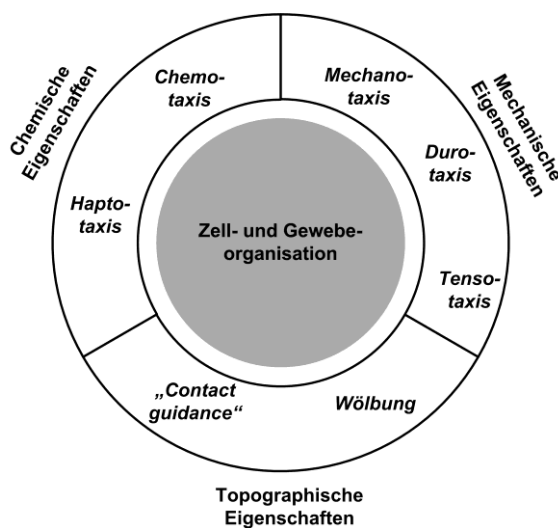
Schwammartige Gerüststrukturen aus Alginat sind kommerziell erhältlich (AlgiMatrix®, Life Technologies GmbH) und ebenso Bestandteil von Studien im Bereich des *Tissue Engineerings*. Durch die eingebrachten großen Poren können Nischen geschaffen werden, die den Zellen eine physiologische Umgebung zur Verfügung stellen, die ähnlicher zur *in-vivo*-Umgebung ist [135-137]. Ebenso konnte von Katsen-Globa *et al.* gezeigt werden, dass Alginatschwämme im Bereich der Kryokonservierung von Stammzellen genutzt werden können [60].

## 2.2 Eigenschaften von Gerüststrukturen

Das zelluläre Verhalten von Einzelzellen und Zellverbänden hängt im Wesentlichen von ihrer unmittelbaren Mikroumgebung ab (siehe Abbildung 4). Biochemische, physiko-chemische, als auch topographische Eigenschaften der Gerüststruktur können das zelluläre Verhalten durch die damit verbundenen Zell-Matrix Interaktionen maßgeblich beeinflussen. Ferner kann die Zell-Zell-Interaktion bei einigen Zelltypen einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten und die Organisation von Zellpopulationen nehmen. Je nach Zelltyp ist z. B. die Standardkulturoberfläche einer Corona-behandelten Polystyren Kulturflasche nicht ausreichend für ein adhärentes Wachstum. Adhäsionsvermittelnde Proteine (z. B. Gelatine [30, 138], Pro-

teinmischungen der extrazellulären Matrix [35, 139], Fibronectin [61], u.a.) werden in diesen Fällen für eine Beschichtung der Kulturoberfläche benutzt. Liegt eine nur unzureichend spezialisierte Mikroumgebung vor, treten je nach Zelltyp unterschiedliche Reaktionen auf. Durch das Ausbleiben der Zell-Matrix-Interaktion erfolgt bei einigen Zelllinien eine verstärkte Zell-Zell-Interaktion, die eine Bildung von dreidimensionalen Sphäroiden hervorruft [140]. Bei anderen Zelltypen führt dies jedoch zu einer speziellen Art der Apoptose, die mit dem Begriff *Anoikis* bezeichnet wird. Die Anoikis wird ausgelöst, wenn sich die Zellen nicht mehr in ihrer normalen in-vivo-Umgebung befinden und kein Zell-Matrix Kontakt möglich ist [141].

An dieser Stelle soll ein Überblick über wichtige Zell-Matrix und Zell-Matrix Interaktionen gegeben werden, wobei ein besonderer Fokus auf das Biomaterial Alginate gelegt wird, das in dieser Arbeit als GS verwendet wird.



**Abbildung 4: ORGANISATION VON ZELLEN UND GEWEBEN.**

Die Eigenschaften eines Substrats, die die Zell- und Gewebeorganisation beeinflussen, lassen sich unterteilen in chemische Eigenschaften, mechanische Eigenschaften und topographische Eigenschaften (nach [142]).

### 2.2.1 Benetzbarkeit (Hydrophobizität/Hydrophilität)

Die Benetzbarkeit der Oberfläche ist eine der wichtigsten Eigenschaften für die zelluläre Reaktion [143]. Studien haben gezeigt, dass das Maß der Adhäsion von Zellen mit der Hydrophilität der Oberfläche einhergeht.

### 2.2.2 Freie Oberflächenenergie

Die freie Oberflächenenergie beeinflusst das Adhäsionsverhalten von Zellen. Es gilt hier der Konsens, dass Oberflächen mit einer geringeren freien Oberflächenenergie (bis  $40 \text{ mJ/m}^2$ ) eine Adhäsion und Ausbreitung von Zellen verhindert und im Umkehrschluss eine hohe freie Oberflächenenergie (ab  $50 \text{ mJ/m}^2$ ) [144] Adhäsion und Ausbreitung zur Folge hat. Dies kann nach Lih *et al.* dahingehend verallgemeinert werden, dass eine Zelladhäsion signifikant geringer auf Oberflächen mit einer niedrigen im Vergleich zu einer hohen freien Oberflächenenergie ist [144].

### 2.2.3 Proteinadsorption

Die Interaktion von Zellen mit Oberflächen erfolgt über eine Kaskade von Adsorptionsereignissen an der Oberfläche [145]. Wird eine Zellsuspension mit einer Oberfläche kontaktiert, so adsorbieren zunächst die Wassermoleküle in einer Mono- oder Bilage. In einem nächsten Schritt lagern sich geladene Ionen wie z. B.  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{Na}^+$  an. Danach adsorbieren die im Medium enthaltenen Proteine an der hydratisierten Oberfläche. Die Anreicherung von Proteinen an Oberflächen wird auch als *Vroman Effekt* bezeichnet [146,



147]. Bei der Adsorption der Proteine können je nach Benetzbarkeit unterschiedliche Konformationen des Proteins vorliegen. Proteine besitzen in der Regel in physiologischen Medien eine globuläre Struktur mit einem hydrophoben Kern. Die Faltung der Proteine hat ebenso zur Folge, dass geladene bzw. hydrophile Aminosäuren zur wässrigen Lösung ausgerichtet sind. Bei einer hydrophilen Oberfläche adsorbieren diese Proteine durch ionische bzw. polare Interaktion mit der Oberfläche, wobei die native Konformation weitestgehend erhalten bleibt. Bei hydrophoben Oberflächen erfolgt eine Änderung der Konformation, bei der sich die hydrophoben Aminosäurereste des Zentrums an die Oberfläche anlagern [145].

#### 2.2.4 Ladung (Elektrostatische Interaktion)

Bei negativer Ladung der Oberfläche wird eine Adhäsion von Zellen nicht erwartet, da sowohl Zellen als auch Oberfläche negativ geladen sind und eine elektrostatische Repulsion erfolgt [148]. Die Ladung ist spezifisch und variiert demnach bei verschiedenen Zelltypen und ist durch die Glykane und deren Sialinsäuren in der sog. Glykokalyx bestimmt [149]. Diese ist im Allgemeinen negativ geladen [150-152]. Ebenso wird von einer bevorzugten Adsorption von Fibronectin und Vitronectin auf positiv geladenen Oberflächen berichtet [153]. In der gleichen Studie gehen diese einher mit der geringsten Adhäsion von CHO-Zellen auf Polyethylen mit -COOH (Carboxyl) Funktionalisierung und der höchsten Adhäsion auf Polyethylen mit -CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub> (Amid) Funktionalisierung [153]. In ähnlicher Weise wird der negative Effekt von -COOH Gruppen von Li *et al.* beschrieben. Das Migrationsverhalten von Zellen hat ebenso gezeigt, dass C17.2 Zellen in Bereiche des Substrats mit geringer -COOH-Dichte migrieren [154]. Im Gegensatz hierzu zeigen Arima *et al.* in ihrer Studie, dass HUVEC-Zellen auf Oberflächen mit *self-assembled monolayer* (SAM) bei -NH<sub>2</sub> und -COOH-SAMs in gleicherweise adhären, jedoch eine geringere Interaktion auf -OH-SAMs aufzeigen [155]. Demnach ist nicht die Art der Ladung selbst, sondern vielmehr die Ladungsdichte auf der Oberfläche für die Adhäsion entscheidend [156].

#### 2.2.5 Rauigkeit (Topographie)

Bei der Beschaffenheit der Oberfläche zeichnen sich Ba<sup>2+</sup>-Alginat durch eine besonders hohe Rauigkeit gegenüber den übrigen Hydrogelen aus [157]. Durch weitere REM-Analysen konnten sie ebenso zeigen, dass bei einer Inkubation mit fetalem Kälberserum die raue Struktur überdeckt wird. Topographische Eigenschaften auf den Alginaten können bei einfachen Zelltypen, wie z. B. Fibroblasten, eine Adhäsion hervorrufen. Zimmermann *et al.* berichten über eine Adhäsion von Fibroblasten auf Alginat-Hydrogelen, wenn die Oberfläche zusätzlich mit Bariumkristallen beschossen und so die Rauigkeit erhöht wurde [158, 159]. Ebenso kann eine Adhäsion von Fibroblasten auf Mikrostrukturen (z. B. Furchen) auf dem ansonsten bioinerten Alginat erfolgen [82].

In einem Übersichtsartikel von Bacakova *et al.* wurden diese Beobachtungen in ähnlicher Weise für Biomaterialien verallgemeinert [160]. Hu *et al.* konnten ebenso zeigen, dass die Rauigkeit von Oberflächen, neben der Adhäsion, auch einen Einfluss auf die Genexpression hat [161].

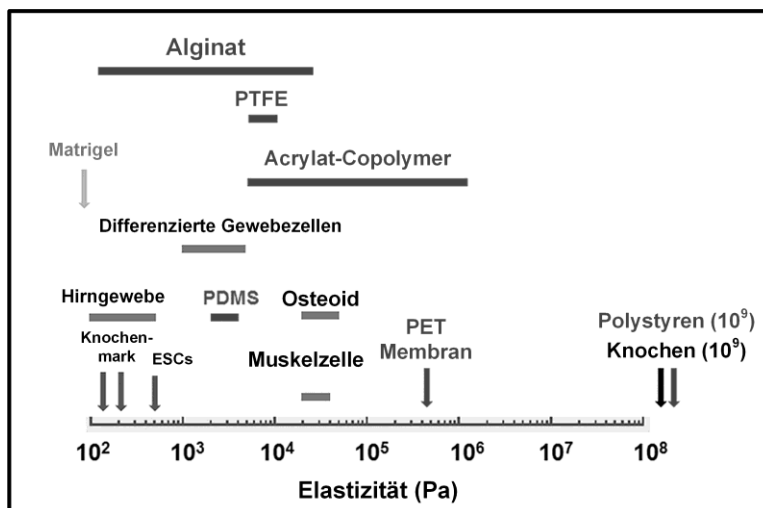
#### 2.2.6 Sterische Repulsion

Befinden sich auf der Oberfläche eines Materials Moleküle, die z. B. aufgrund ihrer Länge höchst mobil und flexibel sind, so kann dies dazu führen, dass eine Zelladhäsion unterbunden wird [144]. Ein Beispiel hierfür ist Polyethylenoxid, das je nach Molekülgröße eine Proteinadsorption auf Oberflächen verhindern kann und in der Folge dadurch eine Zelladhäsion unterbindet [162].

### 2.2.7 Mechanische Eigenschaften (Festigkeit und Elastizität)

In einer Arbeit von Higuchi *et al.* werden Polymeroberflächen gemäß ihrer Elastizität anhand von Literaturwerten zusammengetragen [163]. In der Zellkultur genutzte Polymermatrizen und Oberflächen besitzen demnach sehr unterschiedliche Elastizitäten. Matrigel besitzt eine sehr geringe Elastizität von etwa 100 - 200 Pa [164], was noch unterhalb der Elastizität von Fettgewebe oder Knochenmark liegt. Alginate-Hydrogele werden in einem Elastizitätsbereich von 180 - 20000 Pa [163, 165] eingeordnet, welcher jedoch je nach Vernetzungsmethode variieren kann [166]. Sie können damit ein weites Spektrum der Elastizitäten von biologischen Geweben abbilden [163]. Knochen besitzen mit 10 GPa den größten Elastizitätswert und liegen damit auch im Bereich von Polystyren, dem Material aus dem beispielsweise Zellkulturflaschen hergestellt werden. Die Elastizität von embryonalen Stammzellen wird mit 500 Pa angegeben [164]. Abbildung 5 illustriert die mechanischen Eigenschaften anhand der Elastizität von Geweben, Zellen und Polymeren [163].

Das E-Modul von den oftmals genutzten Mikroträgern Cytodex 3 wurde in einer Arbeit von Ceccarelli *et al.* mit einem Wert von 10 MPa modelliert [167]. Zellen sind in der Lage mit dem Adhäsionsapparat die Festigkeit ihrer unmittelbaren Umgebung sensorisch zu erfassen und intrazellulär zu verarbeiten [168, 169]. Untersuchungen von Buxboim *et al.* haben gezeigt, dass Zellen die Festigkeit ihrer Kulturfläche bis in eine Tiefe von 3,4  $\mu\text{m}$  erfassen können [170]. Die zelluläre Reaktion auf die Festigkeit kann Unterschiede bzgl. Morphologie [171, 172], Migration [171, 172], Proliferation [171] und Differenzierung [173] zur Folge haben.



**Abbildung 5: ELASTIZITÄT VON GEWEBEN, ZELLEN UND POLYMEREN.** Die Darstellung verdeutlicht, dass die Standard-Kulturoberfläche Polystyren durch seine Elastizität lediglich mit der von Knochen vergleichbar ist, wohingegen Alginate einen größeren Bereich von Geweben abbilden kann. (Abbildung nach [163], abgeändert).

### 2.2.8 Verhalten von Proteinen und Zellen bei Alginate-Hydrogelen

In einer Studie von Machida-Sano *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine Adsorption von FKS, Vitronektin und Fibronektin auf Alginate-Hydrogelen (vernetzt mit Kalzium) nur geringfügig erfolgt. Eine Modifikation des Alginats, die zu einer Steigerung der Hydrophobizität führte, zeigte bei gleichen Proteinen eine wesentlich höhere Proteinadsorption. Dies konnte auch durch eine gesteigerte Adhäsionsrate der Zellen untermauert werden [174].

In der biotechnologischen Anwendung von Alginate-Hydrogelen steht man somit vor einem Dilemma: Alginate ist in ultra-reiner Qualität bioinert und hervorragend geeignet für Untersuchungen bzgl. der Immunisation von Zellen. Die nativen Eigenschaften (Reinheit, Ladung, Hydrophilität) sind hierbei von großem Vorteil, um z. B. künstliche Organe zu entwickeln. Ferner besteht ein hohes Interesse neue zweidimensionale und dreidimensionale Kultivierungsoberflächen aus biokompatiblen Materialien zu entwickeln, die für adhärenente Zellen genutzt werden können. Mehrere Eigenschaften der Alginate-Hydrogele (vernetzt mit  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Ba}^{2+}$ ) erlauben jedoch nicht die unmittelbare Anwendung des Hydrogels bei Adhärenz.

sions-abhängigen Zellen [157], sondern verlangen eine Modifikation zur Steigerung der Zell-Matrix-Interaktion [125].

Machida-Sano *et al.* untersuchten die Eigenschaften von Alginat-Hydrogelen hinsichtlich Zellwachstum, Proteinadsorption, Benetzbarkeit der Oberflächen, Oberflächenladung und Rauigkeit der Oberfläche [157, 175]. In den Untersuchungen nutzten sie unterschiedliche Vernetzerionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  und  $\text{Sr}^{2+}$ ) und konnten unterschiedliche Auswirkungen auf die oben beschriebenen Eigenschaften beobachten. Die Proteinadsorption war z. B. bei  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Sr}^{2+}$ -vernetztem Alginat geringer als bei den übrigen Vernetzerionen ( $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ). Diese Daten korrelierten ebenso mit der Adhäsion bzw. Proliferation der Zelllinie NHDF (*normal human dermal fibroblasts*) auf den unterschiedlichen Hydrogelen. Die Messung des Kontaktwinkels zeigte, dass Alginate, die mit trivalenten Kationen vernetzt wurden, einen wesentlich höheren Kontaktwinkel aufweisen als Alginate, die mit divalenten Kationen vernetzt wurden, was letztendlich auf eine höhere Hydrophobizität der Oberfläche bei  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{Al}^{3+}$  schließen lässt. Der geringste Kontaktwinkel wurde bei  $\text{Ba}^{2+}$ -vernetztem Alginat gemessen. Die Ladung der Oberfläche war bei allen Hydrogelen ähnlich und lag bei etwa -45 bis -50 mV.

Die Adsorption der oben genannten Proteine auf der Kulturoberfläche ist von der Ladung und Benetzbarkeit abhängig [174]. Die hohe Hydrophilie sowie die negative Oberflächenladung [174, 176, 177] des Hydrogels können als Hauptursachen herangezogen werden [178]. Proteine, die im Kulturmedium enthalten sind, adsorbieren auf dieser Oberfläche nur sehr schlecht und können auch über eine längere Kultivierungsdauer keine Zelladhäsion hervorrufen [143].

### 2.2.9 Biologische Interaktionen

Die Formation und Organisation von Zellen und Geweben wird nach Schwarz *et al.* von Signalen beeinflusst die er in die Kategorien Chemie, Mechanik und Topographie einordnete [142]. Chemotaxis, Haptotaxis, *contact guidance*, Krümmung, Mechanotaxis, Durotaxis und Tensotaxis sind die daraus resultierenden Signale, die von Zellen erfasst werden können (siehe auch Abbildung 4).

Ein Übersichtsartikel von Mager *et al.* beschäftigt sich eingehend mit den chemischen Vorgängen von biologischen Membranen und den Biomaterialien selbst [149]. Auch sie stellen die Benetzbarkeit der Oberfläche, bestimmt durch Ladung, Polarisierbarkeit und Polarität funktioneller Gruppen auf der Oberfläche als einen wichtigen Faktor heraus. Bei den Membranproteinen von humanen mesenchymalen Stammzellen haben Docheva *et al.* in Übersichtsartikeln [179, 180] wichtige Rezeptoren zusammengetragen und listen z. B. bei den Zell-Matrix Rezeptoren mehrere Integrin Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  und  $\beta 5$  auf, die bei der Interaktion beteiligt sind. Docheva *et al.* betonen des Weiteren, dass die meisten Integrin-Interaktionen auf Ergebnissen von hMSCs auf zweidimensionalen und festen Oberflächen beruhen und dass die Interaktion auf dreidimensionalen Systemen unterschiedlich sein kann [180]. Bei humanen induziert pluripotenten Stammzellen (hiPSC) konnten Jin *et al.* Unterschiede in der Expression von Integrinen feststellen, indem sie Zellen auf Matrigel bzw. Synthemax kultivierten. Die Untereinheiten  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  wurden bei beiden ECM-Mischungen stark exprimiert wohingegen  $\alpha V\beta 5$  nur auf Matrigel stark exprimiert war [181]. Cromar *et al.* haben die Interaktion der ECM mit vorhandenen Datensätzen annotiert und fanden insgesamt 357 Schlüsselgene und 524 weitere Gene, die in Kontext der ECM gebracht werden können. Mehr als 30 Module sind nach dieser Studie für die Organisation der ECM definierbar [182]. Die Quantifizierung der Interaktion von Zellen mit Gerüststrukturen anhand des Adhäsionsverhaltens und der Proliferation liefert Erkenntnisse über die Biokompatibilität der Gerüststruktur [183, 184].

## 2.3 Zellsysteme

Zellen zur Herstellung von Modellsystemen oder biohybride Systeme aus Zellen und Gerüststrukturen stehen in unterschiedlicher Komplexität und therapeutischer Relevanz zur Verfügung. Eine grobe Unterteilung kann in unsterbliche Zelllinien, multipotente Stammzellen und pluripotente Stammzellen erfolgen. Die Reihenfolge spiegelt sowohl die „zeitliche Entwicklung“ als auch die steigende Komplexität und Ansprüche an die in-vitro-Kultivierung wider.

### 2.3.1 Immortalisierte Zelllinien

Immortalisierte Zelllinien sind die am häufigsten verwendeten Zellsysteme in der zellbiologischen Forschung, was sich durch eine Datenbankabfrage in PubMed mit der „HeLa“-Linie [185] zeigt. Aufgrund der relativ einfachen und kostengünstigen Kultivierung sind sie Gegenstand zellbiologischer Forschung. Bei Tumorzelllinien wurden zur Standardisierung der Experimente Kollektionen verschiedener Linien zusammengestellt, die für Screenings genutzt werden können [186]. Man muss hierbei jedoch beachten, dass sich Tumorzelllinien von immortalisierten Zelllinien unterscheiden [187]. Immortalisierte Zelllinien können aus Tumorbiopsien gewonnen werden (siehe z. B. [188] und [189]), bzw. durch virale Gene [190] oder chemische Faktoren (z. B. 3-Methylcholanthren) [191] immortalisiert werden. Die erste Zelllinie, die in vitro immortalisiert wurde, waren murine Fibroblasten des sog. Klon 929 aus dem L-Stamm [191]. Heute sind diese Zellen unter dem Namen L929 (Abbildung 6 a) kommerziell erhältlich. Dies ermöglicht eine von Gewebespenden unabhängige Durchführung von Experimenten. Durch ihre reproduzierbare Kultivierung und die damit verbundene Zellqualität werden diese Zellen z. B. in genormten Zytotoxizitätsuntersuchungen (DIN EN ISO 10993-5) genutzt. Biologische Mechanismen wie Zellteilung [192], Migration unter biochemisch-physikalischer Behandlung [193], sowie molekulare Prozesse können mit diesen Zellen untersucht werden [190].

Nachdem zweidimensionale Modellsysteme viele Jahrzehnte dieses Feld bestimmten, geht der Trend seit einigen Jahren hin zu dreidimensionalen Zellsystemen. Derartige Zellagglomerate bilden die strukturellen Gewebeeigenschaften nativer (in vivo) Tumore in vitro ähnlicher ab [194]. Gerade bei der Entwicklung von Medikamenten können die Ergebnisse aus zweidimensionalen Tests oftmals nicht übertragen werden, da diese die Diffusivität, Kompaktheit, Zell-Zell-Kontakten und ECM nicht korrekt simulieren [194]. Dreidimensionale Agglomerate können viele native Eigenschaften von Tumorgewebe nachbilden [47, 195, 196]. Methoden für die Herstellung der Tumormodelle wie z. B. im hängenden Tropfen werden zu diesem Zweck immer ausgereifter und effizienter [6, 43, 197-199]. Bei neuen Ansätzen der Kryokonservierung können diese Zellen genutzt werden, da sie auf kryogene Temperaturen reagieren [200]. Dennoch muss man je nach Untersuchung berücksichtigen, dass es sich um veränderte Zellen handelt, die sich z. B. membranphysiologisch von normalen Zellen unterscheidet. Die Mechanik des Zytoskeletts von Tumorzellen ist oftmals so verändert, dass diese durch sehr enge Topographien migrieren können und dadurch ein spezifisches Migrationsverhalten aufzeigen können [201, 202].

### 2.3.2 Multipotente Stammzellen

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen immortalisierten Zelllinien, sind adulte Stammzellen von hoher Relevanz für die regenerative Medizin. Diese Zellen werden als multipotent bezeichnet, da sie in bestimmte spezialisierte Zelltypen eines Gewebes differenzieren können. Sie liegen in undifferenziertem Zustand im (differenzierten) Gewebe vor und erneuern sich über den gesamten Lebenszeitraum des Organismus [203]. Bei den sog. humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSCs) handelt es sich um einen speziellen Typ adulter Stammzellen. Entdeckt wurden die hMSC (Abbildung 6 b) Mitte der siebziger Jahre von Friedenstein *et al.* [204]. Die Begriffe *colony forming units-fibroblasts* (CFUs-F), *marrow stromal cells*, *mesenchymal stem cells* und *multipotent mesenchymal stromal cells* werden in der Literatur für diese Zell-

typen benutzt, was zum Teil eine Recherche schwierig gestaltet und zu einem Informationsverlust führen kann [205]. Humane mesenchymale Stammzellen können aus unterschiedlichen Geweben, wie z. B. Knochenmark, Blut oder Fettgewebe bei adultem Gewebe oder Nabelschnurgewebe, Nabelschnurblut oder der Plazenta bei neonatalem Gewebe isoliert werden [26, 206-210]. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit des biologischen Materials und dem sehr jungen Spenderalter werden hMSCs aus dem Nabelschnurgewebe (sog. Wharton'sche Sulze, engl.: *Wharton's Jelly*) besondere Aufmerksamkeit gewidmet, da sowohl eine hohe Zellzahl, als auch exzellente Qualität vorliegt [210-212].

Mesenchymale Stammzellen besitzen ein hohes Anforderungsprofil bzgl. ihrer unmittelbaren zellulären Umgebung. Eine Adhärenz auf Plastikoberflächen ist zwar ein Definitionsmerkmal von hMSCs [213], jedoch können Unterschiede bzgl. des Verhaltens als auch der Morphologie und des Zytoskeletts festgestellt werden, wenn diese auf verschiedenen ECM-Proteinen kultiviert werden [214]. Die Komplexität der Interaktion von mesenchymalen Stammzellen mit ihrer Umgebung wird durch eine Studie von Neuss *et al.* verdeutlicht, bei der mehrere hMSC-Typen mit Biomaterialien kontaktiert wurden. Eine universale Biokompatibilität konnte nicht festgestellt werden. Vielmehr wurde deutlich, dass für jeden Stammzelltyp die Biokompatibilität bzgl. der Materialien getestet werden muss [215, 216]. Eine Manipulation der Wachstumsoberfläche durch Zugabe von Wachstumsfaktoren und/oder chemischer Liganden, kann zur Imitation der nativen ECM beitragen und Proliferation, Migration und Differenzierung maßgeblich beeinflussen und ist bei Ansätzen des TE von gleicher Bedeutung wie die Zellquelle selbst [217]. Hao *et al.* konnten im Zusammenhang mit hMSCs aus der Wharton'schen Sulze zeigen, dass ein gewonnenes Extrakt aus diesem nativen Material die in-vitro-Kultivierung signifikant verbessern kann und z. B. die Seneszenz der Zellen verlangsamt [218]. Insbesondere bei Zellen mit mesenchymalen Ursprung wird auch von einer negativen Beeinflussung der Vitalität berichtet, wenn diese in Umgebungen ohne Adhäsionsmöglichkeiten kultiviert werden [219-221]. Nuttelman *et al.* untersuchten auf diesem Hintergrund den Einfluss unterschiedlicher PEG-Hydrogelformulierungen mit enthaltener RGD-Peptidsequenz den Einfluss auf die Vitalität und Apoptose immobilisierter hMSCs. Immobilisierte hMSCs zeigten dabei eine um 60% höhere Vitalität in den PEG-Hydrogelen, wenn die Hydrogele mit RGD-Peptiden modifiziert wurde [221]. Hauptverantwortlich für dieses Verhalten ist die Integrin-vermittelte Adhäsion der Zellen auf dem Substrat, was zu einer intrazellulären Signalkaskade führt. Diese lässt sich jedoch nicht für alle adulten Stammzellen verallgemeinern, da unterschiedliche Profile an Oberflächenrezeptoren vorliegen und letztendlich für die einzelnen adulten Stammzelltypen separat untersucht werden müssen [179, 180, 222, 223]. Analog beeinflussen die mechanischen Eigenschaften der Kulturoberfläche die Zellmorphologie [169, 173, 224, 225], wobei nicht die mechanischen Eigenschaften des Substrats direkt von den Zellen detektiert werden, sondern über die Interaktion von Proteinschicht und Matrix [226]. Sie stellen dabei heraus, dass die Zellen keinen direkten Kontakt zur Matrix haben, sondern nur indirekt über die Proteine, auf denen sie adhären und die kovalent an die Matrix gekoppelt sind.

Trotz der fortschreitenden Nutzung von hMSCs in medizinischen Studien, werden von Bianco *et al.* einige Kritikpunkte aufgeworfen. Die Autoren kritisieren zum einen die Regulation von klinischen Studien von Stammzell-Therapien in Europa und dabei insbesondere die intravenöse Applikation von hMSCs zur Behandlung von beispielsweise neuronaler Erkrankungen. Sie vertreten dabei die Meinung, dass die wissenschaftliche Begründung des Nutzens einer solchen Therapie vollkommen unklar und nicht getestet ist. Ferner kritisieren sie die Einstufung von mesenchymalen Stammzellen als *Transplantat*, was im Gegensatz zu einer Einstufung als *Medikament* zu einer Verringerung von Auflagen und Bestimmungen bzgl. der Sicherheit und formaler Studien führt. [227]. In einem weiteren Artikel erweitert er seine Kritik, dass eine intravenöse Applikation zur Behandlung von Herzinfarkten, Nierenversagen, Diabetes, Parkinson, etc. durchgeführt wird, wobei ein biologischer Mechanismus zur Behandlung durch hMSCs nicht eindeutig belegt ist [228]. Die aufgeworfene Kritik an der Stammzell-Therapie mit hMSCs, die in den beiden Artikeln mit *Alchemie* und *Trial and Error* verglichen wird, führte zu einer regen Diskussion unter den Wissenschaftlern [229-231]. Die Applikation von Stammzellen deren Nutzen bei der Behandlung von

Krankheiten nicht eindeutig geklärt ist, führt auch zu einem ethischen Aspekt dieser Therapieform [232]. Dieser wird in den Zusammenhang mit kommerziellen Stammzell-Therapien gebracht, die zu einer Art „Stammzell-Tourismus“ geführt haben [233].

### 2.3.3 Pluripotente Stammzellen

Eine besondere Bedeutung haben in den letzten Jahren die pluripotenten Stammzellen (PSC) erhalten. Diese sind aufgrund ihrer zellulären Eigenschaften in der Lage, in Zelltypen der drei Keimblätter (endoderm, mesoderm und ectoderm) zu differenzieren. Unter optimalen Kultivierungsbedingungen bleibt ihr pluripotenter Charakter erhalten, eine spontane Differenzierung kann jedoch auch hier auftreten. Man unterscheidet bei der PSC zwischen embryonalen (Abbildung 6 c) und induzierten pluripotenten Stammzellen (Abbildung 6 d). Die Aufnahme der hESC in Abbildung 6 c entstand unter der 16. und 44. Genehmigung des Robert-Koch-Instituts (§6 des Stammzellgesetzes, StZG).

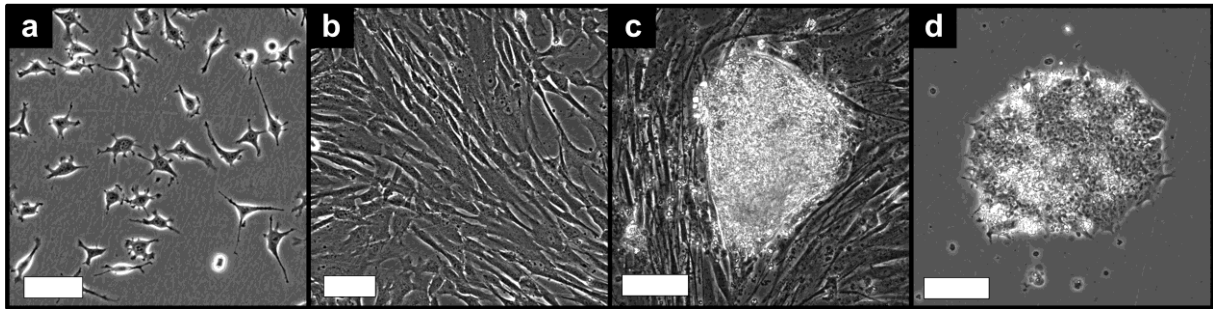
1998 veröffentlichten Thompson *et al.* eine Studie, die erstmalig die erfolgreiche Isolierung von hESC-Zellen aus einer Blastozyste beschreibt, die als Zelllinie genutzt werden können [30]. In Anlehnung an Protokolle für die Kultivierung muriner embryonaler Stammzellen, werden diese in Ko-Kultur mit PMEF gezüchtet, um die pluripotenten Eigenschaften der Zellen zu erhalten. Eine PMEF-freie Kultur auf Matrigel erfolgt mit konditioniertem Medium, d. h. Kulturmedium, das zuvor zusammen mit PMEF kultiviert wurde und die Faktoren der Zellen im Überstand enthalten sind [234]. Die Kultivierungsform ist PMEF-frei, jedoch nicht xeno-frei. Die Kultivierung der hESC erfolgt adhärent in Form von multizellulären Kolonien. Während der Kultivierung erfolgt ein Säubern der Kultur durch manuelles Entfernen differenzierter Bereiche; das Passagieren der Zellen erfolgt durch mechanisches Fragmentieren der einzelnen Kolonien und enzymatischer Behandlung [235], aber auch in Form von Einzelzellen [139]. Das Differenzierungspotenzial, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren, konnte ebenso wie die Bildung von Teratomen bei Injektion in Mäuse nachgewiesen werden [30].

Gerade das Phänomen der Teratombildung war einer der Hauptgründe, dass klinische Studien basierend auf diesen Zellen kaum durchgeführt wurden und werden [33]. Erst 2009, erfolgte die erste klinische Studie mit hESC-abgeleiteten neuronalen Zellen zur Therapie von Rückenmarksverletzungen, deren Start auch wegen aufgetretener Cysten bei Mäusen in Vorstudien verzögert wurde [236]. Weitere Studien sind aktuell zur Therapie der trockenen altersbedingten Makuladegeneration [237], der Stargardt‘ Makula Dystrophie [238], sowie von Typ-1 Diabetes [239] angemeldet bzw. zugelassen. In allen Studien wurden dabei aus hESC differenzierte Zellen verwendet. Es besteht bei diesen Zellen eine ethische Diskussion, da die Zellen aus der 5-7 Tage alten Blastozyste von ungeborenen Embryonen entnommen werden müssen und die Blastozyste dadurch zerstört wird [32]. Hierdurch ist die Forschung stark reguliert und bedarf in Deutschland der Prüfung der Zentralen Ethikkommission für Stammzellforschung“ (ZES) und der Genehmigung durch das Robert-Koch-Institut [240].

Im Gegensatz hierzu werden die humanen induziert pluripotenten Stammzellen aus somatischen Körperzellen hergestellt. Im Jahr 2007 veröffentlichten Takahashi *et al.* eine Studie, in der sie zeigten, dass es möglich ist, humane adulte dermale Fibroblasten durch retrovirale Transduktion mit vier Faktoren (Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4) in pluripotente Stammzellen umzuprogrammieren, die z. B. in Morphologie, Proliferation, Oberflächenmarkern, Genexpression, Differenzierungspotenzial und Teratombildung mit humanen embryonalen Stammzellen vergleichbar sind [35, 241]. Kurze Zeit später veröffentlichten auch Yu *et al.* ähnliche Ergebnisse und schlussfolgerten u.a., dass diese Zellen die ethische Frage durch die Nutzung von hESC lösen können, da durch diese Methode keine Embryonen zerstört werden müssen [242]. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgt, ähnlich wie bei hESCs, in multizellulären Kolonien und kann sowohl mit PMEF [242], als auch auf Matrigel ohne PMEF zum Erhalt der Pluripotenz erfolgen [139]. Die Expansion und Passage der Zellen kann entweder in Aggregaten [139], aber auch durch Zugabe von Faktoren, die die Apoptose verhindern, als Einzelzell-Suspension erfolgen [243]. Zur Vorbereitung der

therapeutischen Anwendung dieser Zellen werden sowohl PMEF, als auch Matrigel in vielen Kultivierungsprotokollen bereits durch das rekombinant herstellbare Vitronektin ersetzt, das eine xeno-freie Expansion unter chemisch definierten Bedingungen der Zellen impliziert [37].

Bereits in den beiden ersten beiden Veröffentlichungen [35, 242] war man sich des Potenzials zur Nutzung dieser Zellen für Wirkstoffforschung, Untersuchung von Krankheitsmechanismen, etc. bewusst, da patienten- und krankheitsspezifische pluripotente Stammzellen hergestellt werden können [35, 242]. Dies hat sich, retrospektiv betrachtet, bewahrheitet [36, 244, 245], da mittlerweile Differenzierungsprotokolle entwickelt wurden, die es erlauben hiPSCs kardial oder neuronal zu differenzieren und dadurch krankheitsspezifische Zellmodelle für Kardiomyopathien [246] oder Alzheimer [247] herzustellen.



**Abbildung 6: ZELLSYSTEME.**

*a* Immortalisierte murine Fibroblasten (L929), *b* humane mesenchymale Stammzellen aus der Wharton'schen Sulze (hMSC), *c* humane embryonale Stammzellen (hESC) in Ko-Kultur mit sog. Feederzellen (PMEF) und *d* humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC). Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast der Bilder erhöht. Maßstabsbalken: 100  $\mu\text{m}$ . Hinweis: Die Aufnahme der hESC in *c* entstand unter der 16. und 44. Genehmigung des Robert-Koch-Instituts (§6 des Stammzellgesetzes, StZG).

Neben der Optimierung der Expansion von pluripotenten Stammzellen bei gleichzeitigem Erhalt der Pluripotenz, beschäftigen sich viele Forschergruppen mit der Entwicklung neuer Gerüststrukturen für hPSC-basierte Modellsysteme [217, 248-255]. Erkenntnisse über das Zusammenspiel von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktion führen dabei zu Kultivierungssystemen, die weit über die zweidimensionale Standard-Plastikoberfläche hinausgehen.

## 2.4 Dokumentation und Analyse strukturbildender zellulärer Prozesse

Die zeitlichen Abläufe in der Natur bzw. Zellbiologie umspannen insgesamt ein sehr großes Spektrum. Im zellulären Bereich, der morphologisch ersichtlich ist, sind Abläufe wie die Zellteilung vertreten, die in einem definierten Rhythmus bei murinen embryonalen Stammzellen alle 4-5 h stattfindet ([19]; BNID 109063), bei HeLa-Zellen jedoch etwa 16 h dauern ([19], BNID (Bionumbers ID) 103804). Die Migrationsgeschwindigkeit von L929 Fibroblasten beträgt etwa 0,5  $\mu\text{m}/\text{min}$  ([19], BNID 106808). Die Austauschzeit der humanen Epidermis beträgt durchschnittlich 26 bis 27 Tage ([19], BNID 109215), die Dauer der Differenzierung von Keratinozyten dauert dabei etwa 14 Tage ([19], BNID 111965). Im Verlauf eines Lebens ereignen sich insgesamt  $1^{16}$  Zellteilungen im menschlichen Körper ([19], BNID 108562).

Schon diese wenigen Beispiele verdeutlichen die Komplexität von zellulärem Verhalten und die damit verbundenen strukturbildenden Prozesse. Schon recht früh hat sich die Wissenschaft mit der zeitlichen Abfolge in der Biologie beschäftigt, die sich durch immer bessere optische Technologien von der makroskopischen bis letztendlich zur mikroskopischen Untersuchung auf zellulärer Ebene entwickelt hat.

### 2.4.1 Historische Betrachtung der Dokumentation biologischer Prozesse

Die ersten Studien von biologischen Objekten im weiteren Sinne erfolgten durch Eadwaerd Muybridge im Jahr 1892. Er kombinierte mehrere einzelne Kameras, um so die recht schnellen Bewegungen von Tieren

(galoppierendes Pferd, Bison, Elefant, Hund) zu erfassen. Durch die dadurch mögliche hohe Bildaufnahme rate konnte z. B. bei Bewegung des Pferdes im Galopp festgestellt werden, dass das Pferd zu einem bestimmten Zeitpunkt des Galopps keinen Bodenkontakt mehr hat [256]. Étienne-Jules Marey, beeinflusst durch die Arbeiten von Muybridge, studierte die Bewegungsabläufe von Lebewesen in der Luft und auf dem Land. Er war in diesem Bereich auch erfinderisch tätig und entwickelte für die Erfassung von schnellen Bewegungsabläufen die Chronophotographische Flinte [257].

Die historische Entwicklung der Dokumentation und Analyse biologischer Prozesse auf zellulärer Ebene findet seine Anfänge durch die histologischen Untersuchungen an Gewebeschnitten. Durch Paul Ehrlich wurden diese nach 1870 durch die Nutzung spezifischer Färbemethoden [258] weiterentwickelt und als Basis für die Entwicklung von Therapeutika verwendet. Die Wissenschaftler hatten jedoch schon zu dieser Zeit das Bestreben, an funktionalen biologischen Präparaten zu forschen [259]. Ein Pionier hierfür war Jean Comandon, der sowohl mit Gewebeschnitten, als auch mit der Technik der Mikrocinematographie, ein Prototyp der modernen Zeitraffer-Mikroskopie, arbeitete [260]. Die Kombination eines Mikroskops und einer Kamera war zudem der Beginn der bildgebenden Verfahren in den Lebenswissenschaften [261]. Mit der Untersuchung von Blutzellen mit Malaria-Erregern konnte Comandan seinerzeit Aufsehen erregen und war von dem Nutzen dieser Entdeckung überzeugt [262]. Julius Ries gelang es 1907 zum ersten Mal die Befruchtung in einer Zeitraffer-Aufnahme zu dokumentieren [259]. Ries hatte bei der Erstellung des Films pädagogische Ziele, da er seinen Studenten zellbiologische Grundlagen anschaulich vermitteln wollte [263]. In einer Zeit, wo nur wenige Studenten Zugang zu Laboren hatten, war das (neue) Medium Film für die Veranschaulichung von langsamen biologischen Prozessen bestens geeignet. Die Studenten von Ries konnten so an bewegten Mikroskopiebildern nachvollziehen, dass der Ursprung von Zellen wiederum Zellen sind und dass ganze Organismen, in diesem Fall der Seeigel, nur aus einzelnen Zellen bestehen.

#### **2.4.2 Stand der Technik: automatisierte Lebendzell-Mikroskopie**

Moderne Systeme für die Lebendzell-Mikroskopie sind in unterschiedlichen Varianten verfügbar, die je nach System unterschiedliche Anforderungen erfüllen. Prinzipiell kann heute jedes Lichtmikroskop mit einer Kamera und einem PC mit entsprechender Hardware zu einem Lebendzell-Mikroskop umgerüstet werden. Der PC übernimmt als einzige Aufgabe die Aufnahme und Speicherung der Bilder. Mit einer zusätzlichen Inkubationskammer können physiologische Bedingungen für die Zellkulturen (Proben) aufrechterhalten werden (in der Regel 5% CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchtigkeit und 37°C), wodurch man dann in der Lage ist, eine Beobachtung der Zellen über einen bestimmten (limitierten) Zeitraum durchzuführen [264]. Ferner verfügt ein derartiges System über keinerlei Motorisierung was bedeutet, dass z. B. nur ein einziger Punkt, eine einzige Vergrößerung oder auch nur ein Modus (Durchlicht- oder Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden kann. Nach und nach konnten alle Komponenten eines Mikroskops durch Motorisierung und Entwicklung von Softwareschnittstellen automatisiert werden, so dass letztendlich multidimensionale Zeitraffer-Aufnahmen hiermit möglich sind [264, 265]. Die Limitierungen solcher Systeme sind hauptsächlich bei der Stabilität bei Langzeituntersuchungen (z. B. Fokusdrift durch z. B. Temperaturschwankungen) [266], aber auch durch die Peripheriegeräte gegeben, da hier Hardware von unterschiedlichen Anbietern in einem System kombiniert und von einer Software gesteuert werden müssen [267]. Eine Übersicht von derartigen Systemen ist in Tabelle 2 zu finden. Nach dem derzeitigen Stand der Technik können nahezu alle gängigen Zellkulturgefäße mittels der Lebendzell-Mikroskopie genutzt werden. Der Unterschied liegt dabei in der Qualität, d. h. optischen und zeitlichen Qualität der Zeitrafferaufnahmen.

Die genutzten Zellkulturgefäße stellen in der automatisierten Lebendzell-Mikroskopie eine nicht zu vernachlässigende Komponente dar. Unterschiedliche Wachstumsflächen, Volumina und Kompartimente sind hier die Hauptunterscheidungsmerkmale. Bei der Expansion und Kultivierung von Zellen werden standardmäßig Zellkulturflaschen benutzt. Zellkulturflaschen haben den Vorteil, dass sie über eine große Wachstumsfläche verfügen und so eine hohe Zahl von Zellen gewonnen werden kann. Durch die Dimensi-



onen sind sie jedoch nur selten in der automatisierten Zellkultur und Lebendzell-Mikroskopie zu finden, da hier z. B. eine Robotik vorhanden sein muss, um die Flaschen in den Geräten zu transportieren.

**Tabelle 2:** Marktübersicht kommerzieller Mikroskopiesysteme (Stand: 2016).

Hersteller	System	Modi	Quelle
Nikon Instruments	Biostation IM	PH, FL, TL	[268]
Europe BV	Biostation CT	PH, FL, TL	
PAN-SysTech GmbH	PANSYS3000	PH, FL, TL	[269]
	PANSYS4000	PH, FL, TL	
Perkin Elmer Inc.	Opera		[270, 271]
	Operetta		
Essen Bioscience Inc.	Incucyte Zoom	PH, FL, TL	[272]
	Incucyte Ex		
GE Healthcare	DeltaVision		[273]
Carl Zeiss AG	Lightsheet Z.1	FL	[274]
	CellObserver		
NanoEnTec Inc.	JuLi FL	HF, FL, TL	[275]
	JuLi Stage	HF, FL, TL	

Abkürzung: PH: Phasenkontrast, FL: Fluoreszenz, TL: Timelapse, HF: Hellfeld

Ein Beispiel hierfür ist z. B. das Lebendzell-System Biostation CT von Nikon [268]. Die Verwendung von miniaturisierten Zellkulturgefäßen bei Screenings (z. B. Zytotoxizitätsassays) hat den Vorteil, dass eine große Anzahl von Konditionen parallel untersucht werden können. Nach Kultivierung werden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt bzw. der Umsatz eines Substrats zu einem fluoreszierenden Produkt gemessen. Die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten geben dann Aufschluss über den Einfluss der untersuchten Substanzen auf die Zellen [276], jedoch ohne mikroskopische Aufnahmen. Mikrotiterplatten können in entsprechenden Geräten auch für die parallele Untersuchung von Zellen mittels Lebendzell-Mikroskopie verwendet werden. Dies hat jedoch einige Nachteile, wie z. B. die limitierte Wachstumsfläche, optische Qualität (Reflexionen durch den Flüssigkeitsmeniskus an den Rändern der Töpfchen), Limitierung der zeitlichen Auflösung bei Multipunkt-Aufnahmen oder auch die Tatsache, dass die Töpfchen und damit die Konditionen nicht vollständig voneinander getrennt sind. In verschiedenen Studien konnte durch Lee *et al.* gezeigt werden, dass z. B. ein Sauerstoffgradient von den Randbereichen zum Zentrum der Platte vorliegt. Für die von Lee *et al.* verwendeten Endothelzellen (aus der umbilikalen Vene) bedeutete dies eine höhere Wachstumsrate der Zellen im Zentrum der Platte verglichen mit den Randbereichen [277]. Flüchtige Substanzen, die als Zusatz im Medium enthalten sind, könnten über die Gasphase andere Töpfchen *kontaminieren* und so falsche oder irreführende Ergebnisse liefern [278]. Durch die hohe Anzahl von Töpfchen und damit theoretisch möglichen Konditionen verringert sich automatisch die maximale Bildaufnahmerate im Kontext der Lebendzell-Mikroskopie. Geht man von 96 Töpfchen aus, die mittels automatisierter Lebendzell-Mikroskopie erfasst werden sollen und von jedem Töpfchen 5 Bilder gemacht werden sollen, so umfasst ein einziger Zeitpunkt 480 Bilder. Vom ersten Punkt bis zum letzten Punkt läge demnach eine Zeitspanne von etwa 100 Minuten, wenn man pro Punkt 20 Sekunden einrechnet. Eine Steigerung der Bildaufnahmerate ist bei dieser Art der Kultivierung nur durch eine Verringerung der Punkte pro Töpfchen oder durch eine Verringerung der Anzahl der Konditionen (= Töpfchen) zu erreichen. Eine Ausnahme stellt das Screening mit Hilfe von *Microarrays* dar. Neumann *et al.* konnten so z. B. in einer

Screening-Studie zeigen, dass mit *Microarrays* eine sehr große Zahl an Substanzen (siRNA) mit hoher zeitlicher Auflösung untersucht werden kann [265]. Auf den ca. 400 µm großen Spots konnten etwa 50 Zellen beobachtet werden. Eine Übertragung auf komplexere Zellsysteme, gerade in Bezug auf das *Tissue Engineering*, würde sich bei diesen Größenordnungen jedoch schwierig gestalten. In den letzten Jahren wurden spezielle Lebendzell-Systeme entwickelt, die als „All-in-one“ Lösung vertrieben werden. Diese sind so konfiguriert, dass eine Langzeituntersuchung von Zellen unter stabilen Bedingungen möglich ist, gleichzeitig eine Adaptation an spezielle experimentelle Anforderungen kaum oder gar nicht realisierbar ist. Tabelle 2 zeigt eine Auflistung von verfügbaren Mikroskopiesystemen, mit denen automatisierte Zellkulturen über die Zeit dokumentiert werden können.

### 2.4.3 Stand der Technik: rechnergestützte Bildanalyse

Die Analyse von multidimensionalen zeitaufgelösten Mikroskopiedaten (z.B. Zeit, Ort, Fluoreszenz) stellt den Flaschenhals dieser Methode dar. Die „Übersetzung“ der Bildinformation in quantitative Daten, oftmals auch Datenreduktion genannt, ist manuell möglich, aber durch die Datenmenge sehr zeitaufwendig. Eine Automatisierung durch Bildanalyse-Algorithmen wird immer häufiger auf biologische Fragestellungen angewendet, aber oftmals für eine Fragestellung spezialisiert oder nur in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten biologischen Proben anwendbar ist.

Traditionell sind Zellzahlbestimmung [279], Proliferation [276], Durchflusszytometrie [280] und Expressionsanalysen von Genen [281] Methoden, die in der Zellbiologie etabliert sind. Dennoch sind diese Methoden in der Regel invasiv, erfolgen zum Endpunkt des Experiments und sind mit einer Zerstörung der biologischen Probe verbunden. Die zeitliche Information im Detail geht dabei verloren. In die Analyse selbst fließt eine (teilweise unbewusste) Interpretation des Experten ein, wodurch diese Art der Analyse ein hohes Maß an Subjektivität besitzt. Ferner ist die händische Analyse dieser Bilder oftmals sehr zeitaufwendig und auch durch gewisse Faktoren fehlerbehaftet [282-284].

**Tabelle 3:** Marktübersicht kommerzieller und Open-Source Bildanalysewerkzeugen (Auswahl, Stand: 2016).

Bezeichnung	Art	Modus	Quelle
ImageJ	Open-source	PH, FL, TL*	[285, 286]
CellProfiler	Open-source	PH, FL, TL*	[287, 288]
CellProfiler Analyst	Open-source	-	[288]
Ilastik	Open-source	PH, FL	[289, 290]
SVCCell RS	Kommerziell	PH, FL, TL	[291, 292]
Matlab	Kommerziell	PH, FL, TL*	[293]
EbImage	Open-source	FL, TL*	[294, 295]
OpenCV	Open-source	PH, FL	[296]
NIS-Elements	Kommerziell	PH*, FL, TL	[297]
Definiens Studio	Kommerziell	FL	[298]
Wimasis	Kommerziell	PH, FL, TL	[299]
PHANTAST	Open-source	PH, TL*	[300]
Metamorph	Kommerziell	FL, TL*	[301]

Abkürzung: PH: Phasenkontrast, FL: Fluoreszenz, TL: Timelapse, \*: mit Einschränkungen

Bei der rechnergestützten Bildanalyse können zwei Konzepte unterschieden werden: die manuelle Analyse von Bildern durch einen Experten und die automatisierte Bildanalyse durch Computerhardware. Dem Experten stehen verschiedene kommerzielle oder *open-source* Softwarelösungen zur Verfügung, die er für die Analyse nutzen kann. Es stehen Funktionen zur Verfügung, womit der Experte den biologischen Inhalt im

Bild markieren kann (z. B. durch Umranden einer Zelle) und somit eine sog. *Region-of-interest (ROI)* erzeugt, deren Eigenschaften anschließend extrahiert werden kann. Bei einer markierten Zelle sind dies z. B. der Flächeninhalt, die Intensität oder daraus abgeleitete Eigenschaften (*features*). Programme wie ImageJ [266, 267] oder NIS-Elements [280] arbeiten nach diesem Prinzip.

In Softwarewerkzeugen für die automatisierte Analyse von Bilddaten stehen ähnliche Funktionen zur Bildanalyse zur Verfügung, mit dem Unterschied, dass für einen Bilddatensatz zunächst eine Art Protokoll aufgesetzt werden muss, das auf jedes Bild angewendet wird. Die Protokolle müssen so aufgestellt sein, dass eine mögliche Inhomogenität zwischen verschiedenen Bildern abgefangen werden kann. Vergleichbare Bilddaten sind bei dieser Methode ein Vorteil und unmittelbar mit der automatisierten Mikroskopie verknüpft. Die Möglichkeit einer manuellen Analyse besteht bei diesen Programmen in der Regel nicht. Beispiele hierfür sind Cellprofiler [269, 270] und SVCCell RS [273, 274].

Erst in den letzten Jahren stieg die Zahl der Veröffentlichungen und Softwareplattformen über und für die quantitative Auswertung von Phasenkontrast Mikroskopiebildern [302]. Es handelt sich dabei in den meisten Fällen auch nicht um Untersuchungen mit biologischem Hintergrund, vielmehr werden neue Ansätze für die Segmentierung (Klassifizierung jedes Pixels eines Bildes in entweder „biologischer Vordergrund“ oder „Hintergrund“) nicht markierter Phasenkontrastbilder vorgestellt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über verfügbare Bildanalysewerkzeuge.

Erstmals erwähnt wird die quantitative Phasenkontrast-Mikroskopie von Curl *et al.* vor etwa 12 Jahren [303, 304]. In ihren Arbeiten beschäftigten sie sich noch mit den Grundlagen dieser Technik, die in der Folge in weiteren Publikationen durch verbesserte Algorithmen ständig weiterentwickelt wurden. Ambriz-Colín *et al.* untersuchten beispielsweise Methoden, um aus Phasenkontrastbildern den biologischen Vordergrund zu detektieren [305]. Sie beschränkten sich dabei auf Eigenschaften, die direkt aus dem Bild abgeleitet werden konnten, wie z. B. die statistische Anordnung der Grauwerte [305]. Im weiteren Verlauf wurde die Detektion des biologischen Vordergrunds, sowie die korrekte Segmentierung von sich berührenden Objekten immer weiter verbessert [306]. Durch die Nutzung des maschinellen Lernens kann nun auch über die Textur der biologischen Objekte eine Klassifizierung von biologischem Vorder- und Hintergrund durchgeführt werden [307, 308]. In Softwarepaketen wird diese Technologie dem Anwender mit vordefinierten Analyseroutinen zur Verfügung gestellt, so dass keine Programmierkenntnisse zur Analyse notwendig sind [291]. Ferner erlaubt das maschinelle Lernen, in Kombination mit berechneten zellulären Eigenschaften, die automatische Klassifizierung von Phänotypen [309].



# 3. Materialien und Methoden

---

## 3.1 Zellsysteme

### 3.1.1 L929 Fibroblasten

Murine Fibroblasten (L929, DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland) wurden in einem Medium aus *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM, Gibco), 10% fetalem Kälberserum (FKS, Gibco) und 1 g/ml Gentamycin in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, USA) kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS (-/-) gewaschen und dann mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02% in PBS) inkubiert. Das vollständige Ablösen der Zellen von der Kulturoberfläche erfolgte durch wiederholtes Überspülen der Wachstumsfläche mit Kulturmedium. Die Fibroblasten wurden in einem Verhältnis 1:10 (v/v) in eine neue T75er Flasche ausgesät.

### 3.1.2 Humane mesenchymale Stammzellen

Humane mesenchymale Stammzellen (PromoCell GmbH, Heidelberg) aus der Wharton'schen Sulze (engl.: *Wharton's Jelly*) wurden in einem Medium aus DMEM/F-12 (Verhältnis 1:1, Gibco), 10% FKS, 100 Units/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) und 1 ng/ml bFGF (*basic fibroblast growth factor*, Gibco) in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> (Corning®, NY, USA) kultiviert. Die Zellpassage erfolgte in der Regel einmal pro Woche, wenn eine Konfluenz von 80% des Zellrasens erreicht war. Die Trypsinierung der Zellen erfolgte wie bei den L929-Fibroblasten. Die Inokulation erfolgte mit einer Zelldichte von mindestens 1000 Zellen/cm<sup>2</sup>. Die hMSC-Kultur wurde bis zu maximal einer Passagenzahl von 15 geführt.

### 3.1.3 Humane induziert pluripotente Stammzellen

#### Wicell

Die pluripotenten Stammzellen hiPSC Foreskin-2 (WiCell Research Institute, Madison, WI, USA) wurden mit dem mTeSR-1 Medium Kit (Basalmedium mit Supplement, Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich) und 1% Penicillin/Streptavidin in Petrischalen mit Matrigelbeschichtung kultiviert. Eine Beschichtung mit Matrigel (Corning Inc., Twerksbury, MA, USA) gelöst in DMEM/F12 (Gibco) erfolgte für mindestens 2 h vor Inokulation (0,01 mg/cm<sup>2</sup>). Die Passage erfolgte mit TrypLE zur Dissoziation der Kolonien bzw. mit einer Dispase-Lösung (1 U/ml, Stemcell Technologies, Grenoble, Frankreich) zur Fragmentierung

der Kolonien. Die Zellen wurden dann wieder in neue Matrigel-beschichtete Kulturschalen ausgesät. Differenzierte Bereiche wurden zwischen zwei Passagen mit einer Spitze mechanisch entfernt. Bei einer Inokulation als Einzelzellsuspension wurde das Kulturmedium zusätzlich mit 10  $\mu$ M ROCK-Inhibitor Y-27632 (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Je nach Experiment wurde der Inhibitor nach 4 h oder 24 h durch einen Medienwechsel entfernt oder verblieb während des gesamten Experiments im Kulturmedium.

### **ER19/18**

Die Linie ER19/18 (bereitgestellt von Prof. Dr. Jürgen Winkler, Universität Erlangen) wurde analog zur Line WiCell kultiviert und passagiert.

### **AXAi**

Die Zelllinie AXAi (Axiogenesis, Köln, Deutschland) wurden vom Hersteller einmal pro Woche in Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 175 cm<sup>2</sup> geliefert. Bis zur Nutzung erfolgte die Kultivierung im zur Verfügung gestellten Kulturmedium „AX-N8“ und wurde regelmäßig gewechselt. Für die Versuche wurde der Zellrasen vereinzelt, indem die Zellen zunächst mit DMEM/F12 gewaschen und dann mit TrypLE für mindestens 9 min bei 37°C von der Kulturoberfläche gelöst und mit Kulturmedium verdünnt wurden. Die Zellen wurden dann nach einem Zentrifugationsschritt (3 min bei 800 rpm) gewaschen und in Kulturmedium mit zusätzlich zugefügten ROCK Inhibitor in Suspension aufgenommen und ausgesät.

#### **3.1.4 hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten**

Cor.4U (Axiogenesis AG, Köln, Deutschland), deren Ursprung humane hiPSC sind, wurden in dem vom Hersteller bereitgestellten Kulturmedium Cor.4U Medium (mit FKS) kultiviert. Bis zur Nutzung der Zellen wurde 1-2x die Woche ein vollständiger Medienwechsel durchgeführt. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Waschen der Zellen in PBS mit 2 mM EDTA (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), enzymatisches Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02% in PBS, Gibco) bei 37°C für maximal 5 min, um Zellschädigungen zu minimieren.

## **3.2 Zellkulturtechniken**

### **3.2.1 Allgemein**

#### **Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde, wenn nicht anders angegeben, mit einer Neubauer Zählkammer (*improved*) durchgeführt. Die Kammer wurde gereinigt, mit einem Deckglas abgedeckt und pro Hälfte 10  $\mu$ l der Zellsuspension pipettiert. Es wurden die Zellen in den 4 Großquadraten (jeweils unterteilt in 16 Quadrate) unter dem Mikroskop ausgezählt. Der Mittelwert aus den 4 Großquadraten wurde mit  $1 \times 10^4$  multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

#### **Vitalitätsfärbung**

Die Bestimmung der Vitalität der Zellen wurde über die Membranintegrität bestimmt. Hierfür wurden 8  $\mu$ l Fluoreszeindiacetat (FDA, 1 mg/ml in Aceton) und 50  $\mu$ l Ethidiumbromid (EB, 5 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O) Basalmedium oder PBS gegeben und die Zellen für mindestens 5 min in dieser Lösung inkubiert. Die Auswertung erfolgt durch die Zuordnung der Farbstoffe: FDA ist membrangängig und wird in lebenden Zellen enzymatisch umgesetzt, was in einem Fluoreszenzsignal resultiert (FITC-Filter). EB hingegen ist nicht

membrangängig und kann nur mit der DNA interkalieren, was mit einem Fluoreszenzsignal einhergeht (TexasRed-Filter), wenn die Membran perforiert, die Zelle demnach nicht mehr vital ist. Ferner wurde auch die Trypanblau-Färbung angewendet, bei der die sterilfiltrierte Stocklösung (1:1, v/v) mit der Zellsuspension gemischt wird. Die Auswertung erfolgt analog zur Ethidiumbromid-Färbung: wird eine Zelle blau gefärbt, so ist die Membran nicht mehr intakt, die Zelle folglich tot. Nicht blau-gefärbte Zellen werden als lebend interpretiert.

### **Vitalität von 3D-Aggregaten (Sphäroide)**

Die Vitalität von multizellulären Aggregaten wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität der Aggregate der FDA-Färbung, sowie der EB-Färbung ermittelt. Das Verhältnis von der mittleren Intensität von FDA und der Gesamtintensität beider Fluoreszenzen multipliziert mit 100 ergibt den Vitalitätswert in Prozent. Zum Ausgleich der Hintergrundfluoreszenz wurde anhand einer selektierten Fläche der Wert berechnet und vom eigentlichen Vitalitätswert abgezogen.

### **Stoffwechselaktivität**

Die Stoffwechselaktivität wurde mit dem alamarBlue®-Farbstoff (Invitrogen/Life Technologies) gemessen. Kulturmedium wird mit 10% (v/v) des auf Resazurin basierenden Farbstoffs vorbereitet und nach Stimulation der Zellen (z. B. Inkubation in zu untersuchender Substanz) mit den Zellen für eine bestimmte Zeit (4 h) lichtgeschützt kultiviert. Je nach Zustand bzw. Anzahl der Zellen wird mehr Resazurin zu Resorufin [276] enzymatisch umgewandelt. Das transformierte Molekül kann anhand des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Zur Normierung wurde Kulturmedium mit 10% alamarBlue® (v/v) ohne Zellen, sowie unbehandelte Zellen und DMSO-behandelte Zellen als Kontrollen mitgeführt. Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mit einem Multifunktions-Plattenleser Infinite Pro (Tecan, Maennedorf, Schweiz) mit einer Anregungswellenlänge von 560 nm und Emissionswellenlänge von 610 nm. Pro Näpfchen einer Mikrotiterplatte wurden 9 Positionen gemessen und deren Werte gemittelt.

### **RT-qPCR**

Für die Bestimmung der Genexpression wurden der Zellen mit dem RNeasy Micro Kit (Qiagen, Heldenheim) gemäß Herstellerprotokoll behandelt und lysiert. Die RNA wurde gemäß dem Protokoll isoliert und mit dem NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) quantifiziert. Es folgte die Herstellung der cDNA mittels des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), sowie des Thermo Cyclers SimpliAmp (Applied Biosystems). Die cDNA wurde dann für die Quantifizierung vorbereitet und mit den Assays für Nanog (Hs04399610), Sox2 (Hs01053049) und Sox17 (Hs00751752), sowie der endogenen Kontrolle Gapdh im Quantstudio 7 Flex mit den jeweiligen Kontrollen quantifiziert (alle Applied Biosystems). Als Kalibrator dienten Proben, die vor Aussaat der Zellen von den unterschiedlichen Proben genommen wurden („t0“).

## **3.3 Biomaterial Alginat**

Für die Untersuchungen mit Alginat-Hydrogelen wurde ultra hoch viskoses (UHV) Alginat verwendet, das durch einen speziellen Aufreinigungs- und Extraktionsprozess in qualitativ hochwertiger Form vorliegt. In dieser Arbeit werden Alginat der Spezies *Lessonia nigrescens* und *Lessonia trabeculata* verwendet, deren Rohmaterial an der Chilenischen Küste gesammelt und am Fraunhofer IBMT extrahiert wurden. Eine detaillierte Beschreibung der Extraktion ist in [82] gegeben.

### 3.3.1 Herstellung von Alginatlösungen

Für die Herstellung der Alginatlösungen werden die Alginatgranulate in einer sterilen isotonen NaCl-Lösung gelöst. Für die Herstellung einer 0,7%igen Alginatlösung wird Alginatgranulat abgewogen und das Volumen an NaCl gemäß der Formel

$$Volumen_{NaCl}[ml] = \left( \frac{m(\text{Alginatgranulat})[g]}{0,07} \right) \cdot 10$$

hinzugefügt. Bei einem Gewicht von 0,3 g Granulat und einer Zielkonzentration von 0,7% müsste das Granulat in 42,85 ml NaCl gelöst werden. Je nach anzusetzendem Volumen werden 15 ml bzw. 50 ml Zentrifugenröhrchen verwendet. Die Lösung erfolgt auf dem Orbitalrotator mit 10-15 rpm in der Regel über Nacht bzw. bis sich das Granulat vollständig gelöst hat. Die Alginat LN und LT werden getrennt voneinander angesetzt und erst im gelösten Zustand mit einander vermischt.

### 3.3.2 Vernetzerlösung

Sofern nicht anders angegeben, wurde in dieser Arbeit zur Vernetzung des Alginats eine BaCl<sub>2</sub>-Lösung verwendet, die aus folgenden Komponenten besteht: 20 mM BaCl<sub>2</sub>, 115 mM NaCl und 5 mM L-Histidin. Die Stoffe wurden auf einem Magnetprüher in ddH<sub>2</sub>O gelöst, auf 300 (± 10) mosmol/kg eingestellt und sterilfiltriert.

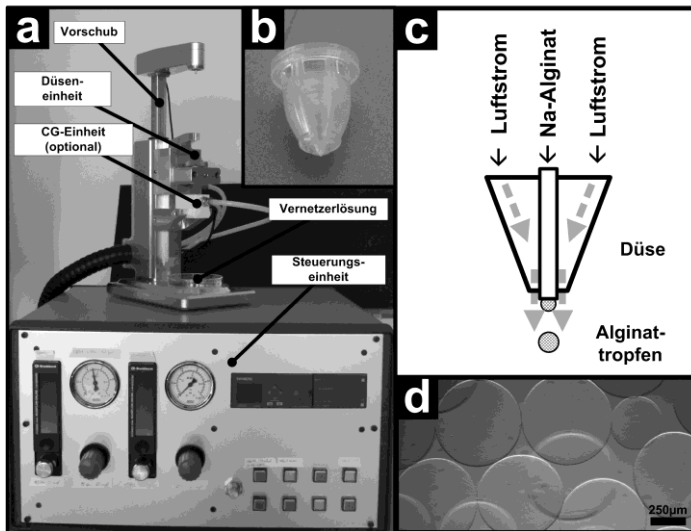
### 3.3.3 Herstellung von Alginatkugeln

Die Herstellung der Alginatkugeln erfolgte gemäß einem von Zimmermann et al. vorgestellten Verfahrens [82]. Für die Herstellung der Alginatkugeln (Abbildung 7) wird die Alginatlösung in eine 1 ml Spritze luftblasenfrei aufgezogen und in die Verkapselungsanlage (Abbildung 7 a) zusammen mit der Düse (Abbildung 7 b) gesteckt. Die Alginatlösung wird nun automatisch mit einem Vorschub durch die Düse transportiert und durch den koaxialen Luftstrom am Auslass der Düse der Alginattropfen erzeugt (Abbildung 7 c). Die Größe des Alginattropfens hängt neben der Viskosität der Lösung auch von dem angelegten Luftstrom ab. Je höher der Luftstrom, desto kleiner die produzierten Alginattropfen. Für die Herstellung von Alginatkugeln mit einem Durchmesser von 500 µm wird eine 0,7%ige Alginatlösung (LNT) mit 1,5 ml/min transportiert und in einer Lösung mit 20 mM BaCl<sub>2</sub> eingetropf. Nach 15 min werden die Kugeln (Abbildung 7 d) aus der BaCl<sub>2</sub>-Lösung entfernt und zweimal mit einer NaCl-Lösung (0,9%) zur Entfernung überschüssigen Bariums gewaschen. Die Eigenschaften von Alginat bzgl. der physiologischen Bedingungen werden durch die Apparatur nicht beeinflusst. Es können neben reinen Alginatkugeln für die Herstellung von Mikroträgern auch zellularisierte Alginatkugeln hergestellt werden.

### 3.3.4 Herstellung von Alginatmembranen

Die Herstellung von Alginatmembranen bzw. Beschichtungen von Oberflächen mit Alginat erfolgt, wenn nicht anders angegeben in 35 mm Kulturschalen, Zellkultur-behandelt (Corning, NY, USA). Die Oberfläche aus Korona-behandeltem Polystyren wird zunächst mit Poly-L-Lysin (pLL, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) beschichtet (1 ml pro Kulturschale, Inkubation für 30 min bei 37°C). Danach wird das pLL vollständig aus der Kulturschale abgesaugt und unter der Sterilbank getrocknet. Auf die nun positiv geladene Oberfläche wird 1 ml Alginat pipettiert und gleichmäßig in der Schale durch Rotieren verteilt. Die Vernetzung erfolgt üblicherweise mit einer 20 mM BaCl<sub>2</sub>-Lösung für mindestens 15 min. Nach erfolgter Inkubation wird die BaCl<sub>2</sub>-Lösung entfernt und die Probe zweimal mit einer NaCl-Lösung gewaschen (0,9%ig). In diesem Zustand besitzt die Alginatmembran die bekannten bioinerten Eigenschaften, d. h. eine zelluläre Interaktion in Form der Adhäsion sollte nicht eintreten.





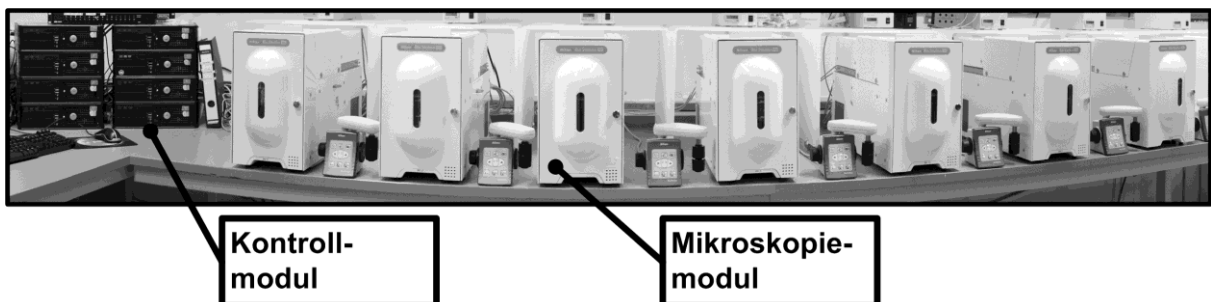
**Abbildung 7: APPARATUR ZUR HERSTELLUNG VON ALGINATKUGELN.**

**a** Apparatur zur Herstellung von Alginatkugeln mittels koaxialen Luftstrom. Mit der Apparatur können UHV-Alginate semi-automatisch dosiert werden und mit einer 1 ml Spritze kleinere Chargen an Alginatkugeln hergestellt werden. Der Luftstrom kann in der Steuerungseinheit eingestellt werden. Steuerungseinheit und Verkapselungseinheit sind durch einen 1m langen Kabelkanal verbunden, sodass die Steuerungseinheit außerhalb und der Verkapselungseinheit innerhalb einer Sterilbank betrieben werden kann um einen sterilen Prozess zu ermöglichen. **b** Die Düse, durch die das Alginat transportiert wird, wird mittels Spritzguss hergestellt und ist als Einmal-Artikel ausgelegt. **c** Schematische Darstellung der Funktionsweise der Düse. In einem zentralen Kanal wird das Alginat durch konstanten Vortrieb durch die Düse transportiert. Durch eine umliegende Kammer strömt der angelegte Luftstrom und trifft an deren Ausgang auf den mit Alginat gefüllten Kanal. Es kommt durch den Luftstrom zu einem Abriss des Tropfens. **d** Produzierte Alginatkugeln mit der Apparatur nach Vernetzung in einer Lösung mit  $\text{BaCl}_2$  (20mM). Abbildung abgeändert aus [310].

### 3.4 System zur parallelisierten automatisierten Lebendzell-Mikroskopie

#### 3.4.1 Optische Module

Das Mikroskopiesystem (Abbildung 8) ist in mehrere Module unterteilt. Zum einen steht eine größere Anzahl von automatisierten Lebendzell-Mikroskopen zur Verfügung. Das System ist so ausgelegt, dass die Mikroskope nach Bedarf aktiviert werden können, sprich für ein Experiment genutzt werden können oder nicht. Für eine Funktionalität des Systems ist es nicht zwingend erforderlich, dass jedes einzelne Mikroskop aktiv ist. Gemäß diesen Eigenschaften ist der Begriff *Cloud* oder *Imaging-Cloud* anwendbar. Eine *Cloud* zeichnet sich dadurch aus, dass Ressourcen (Speicher- bzw. Rechenkapazität) dem System hinzugeschaltet werden können, wenn der Bedarf hierfür gegeben ist. In jedem Mikroskop (Nikon Biostation IM, Düsseldorf, Deutschland) befindet sich eine einzige Petrischale (Durchmesser 35 mm) mit einer Zellkultur mit festgelegten Kultivierungsbedingungen. Die physiologischen Bedingungen (5%  $\text{CO}_2$ , 95% Luftfeuchtigkeit und  $37^\circ\text{C}$ ) werden durch das einzelne Mikroskop hergestellt. Jedes einzelne Mikroskop ist separat an einen Kontroll-PC angeschlossen, der sowohl die Steuerung als auch die temporäre Datenspeicherung übernimmt.



**Abbildung 8: PARALLELISERTES SYSTEM FÜR DIE UNTERSUCHUNG VON LEBENDEN ZELLEN UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN.**

Das skalierbare System besteht aus einzelnen Mikroskopen und kann bei Bedarf in der Anzahl der Mikroskope reduziert bzw. erweitert werden.

### 3.4.2 Optische Auflösung

Die optische Auflösung der Mikroskope gibt Aufschluss über die zellbiologischen Strukturen, die untersucht werden können. Mit der Formel

$$d_{\text{BioIM}} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA_{\text{Objektiv}}}$$

kann für die Mikroskope eine Auflösung von

$$d_{\text{BioIM}} = \frac{620 \text{ nm}}{2 \cdot 0,5} = 620 \text{ nm}$$

bestimmt werden. Demnach können Strukturen, die 620 nm oder mehr voneinander entfernt sind, mit den Mikroskopen aufgelöst werden.

## 3.5 Rechnergestützte Bildanalyse

### 3.5.1 Manuell

Manuelle Bildanalysen wurden, wenn nicht anders angegeben mit der Software NIS-Elements 3.xx (Nikon Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt.

### 3.5.2 Automatisiert

Für die automatisierten Ansätze der Offline-Analyse der Mikroskopiebilder wurde das *open source* Softwarepaket CellProfiler [287] in Verbindung mit dem Klassifizierungsmodul ilastik [290] verwendet. Alle Bildanalyseroutinen („*pipelines*“) wurden für die jeweiligen Analysen eigenständig aufgesetzt. Die quantitativen Daten wurden im Dateiformat „.csv“ exportiert. Als weiteres Werkzeug wurde das kommerzielle Softwarepaket Nikon CT-AS [291] mit vorimplementierten Routinen („*recipies*“) zur Bestimmung der Konfluenz verwendet.

Für die Prozessierung der Bilder und Daten wurden mehrere Skripte benutzt, um einen hohen Grad der Automatisierung zu erreichen. Diese wurden in *R* und *Python* implementiert und ebenso auf die Befehlszeilenstruktur von Microsoft Windows zurückgegriffen (sog. *Batch-Dateien* .bat).

### 3.5.3 Simulation von Bildartefakten und Folgen für Texturerkennung

Der Einfluss von artifiziellen Bildartefakten zur Simulation, z. B. von Unschärfe, wurde anhand von adhärenen hiPSC-Kolonien durchgeführt. Mit CellProfiler wurden dabei zunächst die Bilder mit Filtern modifiziert und danach mit der bereits angewendeten Cellprofiler/ilastik Routine analysiert (siehe Anhang, Seite 193). Die verwendeten Modifikationen waren neben dem unveränderten Originalbild, das gespiegelte Bild, nach Kantendetektion Sobel, nach Invertierung der Grauwerte, nach Skalierung (Zusammenfassung von Grauwerten 2, 2.5, 5 und 10) und nach Gauss' scher Weichzeichnung (Pixelement 5, 10, 15 und 20).

## 3.6 Untersuchungen zu strukturbildenden zellulären Prozessen ohne Gerüststruktur

### 3.6.1 Kultivierung und Analyse von L929 Fibroblasten

#### Kultivierungsbedingungen

In diesem Versuch wurden  $5 \times 10^4$  Zellen in eine TCPS-Petrischale gegeben und für 48 h mittels Lebendzell-Mikroskopie beobachtet (alle 15 min ein Bild). Die Zellen wurden dabei in unterschiedlichen Medien kultiviert: Standard-Kulturmedium, Kulturmedium mit 3% DMSO, und Kulturmedium ohne FKS. Die Bildsequenzen dieses Versuches wurden mit CellProfiler in Kombination mit ilastik analysiert. An dieser Stelle wird die Vorgehensweise der Analyse detailliert beschrieben.

#### Vorbereitung der Analyse

Die generierten Rohdaten (ids/ics Format) werden mit der Biostation IM Software exportiert und jedes Bild im png-Format abgespeichert. Für jeden einzelnen Punkt wird dadurch ein Ordner erstellt und die Bilder für jeden einzelnen Zeitpunkt gespeichert. Der übergeordnete Ordner ist der Ordner des Experiments. Alle Konditionen und Experimente sind in einem Ordner abgelegt. Die Analyse erfolgt mit einer zuvor entwickelten Pipeline, die u.a. die Klassifikation der Pixel mit ilastik enthält.

#### Klassifizierung der Pixel mit ilastik

Zur Bestimmung von biologischem Vordergrund und Hintergrund wurde ein Trainings-Datensatz mit dem Programm ilastik [290] annotiert, indem Bereiche der Kulturschale (grün) und Bereiche der Zellen (rot) markiert wurden. Anhand statistischer Texturmerkmale berechnet das Programm für die entsprechenden Bildbereiche Wahrscheinlichkeiten, zu welcher Klasse der Bereich gehört. Dieses Grauwertbild wird dann im nächsten Schritt für die weitere Segmentierung über Schwellwerte genutzt.

#### Analyse der Bilddaten mit CellProfiler

Der Gesamtdatensatz enthält insgesamt 83376 einzelne Bilder, der sich aus drei Konditionen und jeweils drei unabhängigen Experimenten zusammensetzt. Für die Analyse wird der Datensatz zentral auf einem Server abgelegt, damit mehrere Arbeitsrechner gleichzeitig zugreifen können und die Berechnung verteilt durchgeführt wird. Jedes Einzelexperiment wird durch einen PC durchgeführt, auf dem jeweils zwei Instanzen von CellProfiler parallel ablaufen (siehe Anhang, Seite 193). Die Analyse eines Punktes (Koordinaten) mit insgesamt 193 Zeitpunkten benötigt hier ca. eine Stunde. Damit ist die Analyse der Einzelpunkte (insgesamt 48 pro Experiment) in 24 h abgearbeitet. Durch die Nutzung mehrerer Workstations die mit dem gleichen Prinzip die anderen Experimente analysieren, ändert sich diese Gesamtzeit nicht. Neben den annotierten Bilddaten werden csv-Dateien erstellt, die die berechneten Werte für das jeweilige Mikroskopiebild enthalten. Für jeden Beobachtungspunkt des Datensatzes wird eine separate csv-Datei generiert (insgesamt 432 Dateien).

#### Post-Prozessierung der Daten

Für die Post-Prozessierung der Daten (csv-Dateien) wird ein Skript mit R erstellt, um die einzelnen Dateien aus der Ordnerstruktur heraus auszulesen, die Triplikate der unterschiedlichen Konditionen zu kombinieren und zelluläre Eigenschaften gegen die Zeit aufzutragen.

### 3.6.2 Untersuchungen zum Proliferations- und Adhäsionsverhalten von mesenchymalen Stammzellen

#### Mesenchymale Stammzellen auf Standard TCPS-Oberfläche

Mesenchymale Stammzellen (hMSCs, siehe Abschnitt 3.1.2) wurden mit einer Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen in TCPS-Petrischalen (35 mm Durchmesser, Corning) in 2 ml Medium pipettiert. Die Schalen wurden mittels Biostation IM für 48 h kultiviert, wobei alle 15 min von allen möglichen Positionen ein Bild aufgenommen wurde. Die aufgenommenen Bildsequenzen wurden mit CellProfiler/ilastik analysiert (siehe Anhang, Seite 194), um die Konfluenz der Kulturen zu bestimmen.

#### Mesenchymale Stammzellen auf TCPS-Oberfläche mit polykationischer Beschichtung

TCPS-Petrischalen mit einem Durchmesser von 35 mm (Corning) wurden mit pLL (0,01% in H<sub>2</sub>O, Sigma-Aldrich Chemie GmbH) für 30 min bei 37°C inkubiert und beschichtet. Nach Absaugen der pLL-Lösung wurde die Schale unter der Sterilbank getrocknet. Die pLL-beschichtete Oberfläche wurde dann im Zellversuch im Vergleich zu der unbeschichteten TCPS-Oberfläche untersucht. Mesenchymale Stammzellen (hMSCs, siehe Abschnitt 3.1.2) wurden mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$  pro Petrischale inokuliert und das Experiment nach Adhäsion der Zellen (etwa 1 h nach Inokulation) in den automatisierten Mikroskopen gestartet. Die Kulturen wurden über 72 h beobachtet und alle 15 min ein Bild pro Position aufgenommen. Die Analyse der Bildsequenzen erfolgte mit CellProfiler/ilastik.

### 3.6.3 Untersuchungen zum Proliferations- und Adhäsionsverhalten von humanen induziert pluripotenten Stammzellen

Die Untersuchung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen mittels der Lebendzell-Mikroskopie kann einen Beitrag zur automatisierten Detektion bzw. Quantifizierung der Adhäsion und Proliferation dieses Zellsystems liefern. Bei der Kultivierung und der Expansion von hiPSC steht, neben dem Erhalt der Pluripotenz, die Adhäsion einer Kolonie im Vordergrund. Für die Detektion bzw. Quantifizierung der Adhäsionsrate können im Allgemeinen mehrere Parameter herangezogen werden. Sicherlich ist gerade im zeitlichen Verlauf die detektierte Fläche ein geeigneter Parameter für die Quantifizierung. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob weitere Parameter durch die Zeitrafferaufnahmen aus den Bildern abgeleitet werden können, aus denen weitere Aussagen über die beobachtete Kolonie getroffen werden können. Bei dem Wachstum der Kolonie sind neben der Koloniegröße auch die Kolonieränder von Interesse, da hier eine subjektive Aussage über die Qualität der Kolonie gemacht wird. Ebenso könnte die Textur der Kolonie unterstützend für die Quantifizierung sein, da sich je nach Zustand (adhärent/nicht adhärent) die Textur dieser beiden Klassen stark unterscheidet. Für diese Untersuchung wurden im parallelisierten Mikroskopiesystem Kolonien observiert, danach die Bilddaten analysiert und anschließend die Daten auf geeignete Parameter hin evaluiert. Es entstand hierdurch ein Arbeitsablauf, bei dem sowohl der experimentelle Teil, als auch die anschließende Analyse der Daten zum Großteil automatisiert *auf Knopfdruck* abläuft. Die automatisierte Bildanalyse erfolgt mit CellProfiler und einer zuvor definierten Bildanalyse-Pipeline (siehe Anhang, Seite 194), die Annotation der Daten erfolgt mit Skripten, die in R geschrieben wurden.

Die Adhäsion und die Proliferation induziert pluripotenter Stammzellen ist neben dem Erhalt der Pluripotenz eine der wichtigsten Eigenschaften, wenn man die Funktionalität der Kolonien untersucht. Bei der herkömmlichen Untersuchung mittels manueller Mikroskopie, bei der wenige bestimmte Zeitpunkte zur Dokumentation und Analyse ausgewählt werden, können jedoch nur wenige Aussagen über die gesamten Vorgänge des Adhäsionsverhaltens getroffen werden. Die Gesamtentwicklung dieses Prozesses bleibt aufgrund der schlechten zeitlichen Auflösung verborgen. Für Hochdurchsatzexperimente (z. B. Screenings) ist diese Art der Analyse nur bedingt anwendbar, da z. B. die Quantifizierung durch manuelle Auswertung

einen hohen zeitlichen Aufwand verlangt. Der Parameter, der für die Quantifizierung herangezogen wird beschränkt sich hier in der Regel auf die Fläche der Kolonie. In den folgenden Experimenten soll untersucht werden, ob für eine Quantifizierung weitere Parameter hinzugezogen werden können. Ferner soll überprüft werden, welche zusätzlichen Informationen aus den Daten gewonnen werden können und ob eine Quantifizierung auch ohne Segmentierung möglich ist. Hierfür sollen Textur-Parameter evaluiert werden.

### Aussaat von hiPSC für Lebendzell-Mikroskopie

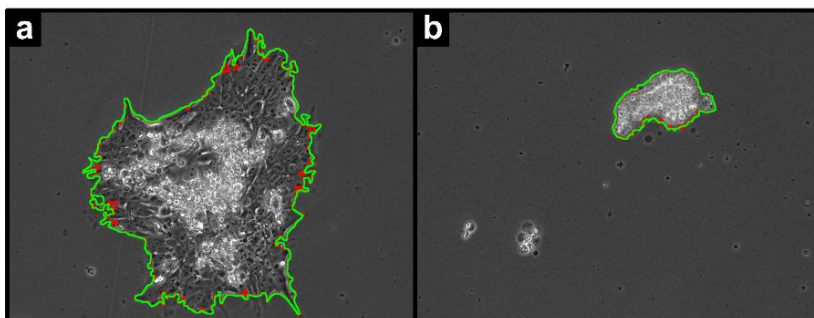
Die humanen induziert pluripotenten Stammzellen wurden in Matrigel-beschichtete Kulturschalen (35 mm Durchmesser, Corning, *treated*) gegeben und verteilt. Es wurde versucht, möglichst viele Kolonien in der Mitte der Kulturschale anzusiedeln, damit eine hohe Zahl von Kolonien beobachtet werden kann.

### Lebendzell-Mikroskopie von hiPSC

Die Kulturschalen werden in die Biostation IM gestellt, die zuvor auf 37°C vorgeheizt wurde, ebenso wird das Ventil für die CO<sub>2</sub> geöffnet. In der Kulturschale werden die Punkte definiert, die über den Experimentzeitraum beobachtet werden sollen. Das eingestellte Zeitintervall beträgt bei allen Durchgängen 15 min und die Gesamtdauer beträgt 48 h.

### Computergestützte Analyse der Zeitrafferaufnahmen von hiPSC

Nach Ablauf des eingestellten Intervalls werden die Rohdaten (ids/ics) in das png-Bildformat (8 bit, 1200x1600 Pixel) exportiert. Um die Rechenzeit zu minimieren erfolgt eine Reduzierung der Bildgröße um 50% mittels xview (Neuberechnung mit Lanczos) und eine Umwandlung in 8 bit Graustufen (Parameter: 256). Die transformierten Bilder werden dann auf einen zentralen Server kopiert, um sie von mehreren Analyseinstanzen zugänglich zu machen. Im Arbeitsverzeichnis wird ein zusätzlicher Ordner *OUTPUT* angelegt, indem für jeden einzelnen Punkt ein weiterer Ordner angelegt wird. (z. B. *P1* für Punkt 1). Mit einem Python-Skript wird eine Batch-Datei für das Programm CellProfiler erzeugt. Je nach Anzahl der zu analysierenden Punkte wird der Datensatz aufgeteilt, um die Berechnungen auf mehreren Rechnern durchführen zu können. Die Bildanalyse Routinen für hiPSC Zellen mit CellProfiler werden ebenso im Arbeitsverzeichnis in dem Ordner *classifier* zur Verfügung gestellt. In diesem ist die *Pipeline* für CellProfiler und die darin benutzte Pixelklassifizierung von *ilastik* enthalten. Die Einstellungen für die Features wurden auf *Texture* und *Medium* gesetzt.



**Abbildung 9: MORPHOLOGIEN VON AGGREGIERTEN HIPSC.**  
*a* Adhärenente und proliferierende Kolonie auf einer ECM-beschichteten Plastikoberfläche.  
*b* Nicht adhärenente hiPSC Kolonie auf einer ECM-beschichteten Plastikoberfläche.

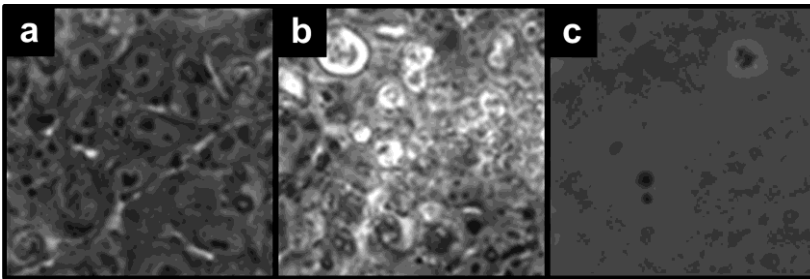
Die Pipeline für CellProfiler umfasst eine Liste von Funktionen, die auf verbreiteten Algorithmen der Bildverarbeitung basieren. Für die Analyse der hiPSC werden durch die Pipeline neben der Fläche der detektierten Objekte auch weitere Parameter aus Textur und Intensität des Originalbildes bestimmt. Mit dieser Pipeline können ca. drei Bilder pro Minute und Instanz verarbeitet werden. Typischerweise werden zwei Instanzen pro PC verwendet und drei PCs zur Analyse im Verbund genutzt. Eine detaillierte Beschreibung der CellProfiler-Pipeline ist im Anhang auf Seite 194 zu finden. Abbildung 9 a zeigt die Detek-

tion (grüner Rand) einer adhärennten Kolonie bzw. einer nicht adhärennten Kolonie (Abbildung 9 b). Neben den Features der Form der detektierten Objekte, wurde ebenso die Textur der Objekte in die Analyse inkludiert. Um weitere Parameter für die Objektive Beurteilung und Analyse des Koloniewachstums evaluieren zu können ist dieser Parameter mit den implementierten Haralick Features höchst interessant, da damit z. B. das Altern von *C. elegans* objektiv analysiert werden konnte [311].

### Evaluation von Texturparametern mit hiPSC-Datensatz

Für die Analyse von Eigenschaften der Textur von hiPSC wurde ein Datensatz charakteristischer Ausschnitte der Kolonien erstellt. Durch eine manuelle Klassifizierung lassen sich stark vereinfacht drei charakteristische Regionen ermitteln (Abbildung 10):

- Adhärennte Zellen
- Abgerundete Zellen
- Hintergrund



**Abbildung 10:** EINTEILUNG DER TEXTUREN IN hiPSC-PROBEN IN DREI KLASSEN.

*a* adhärennte benachbarte hiPSC,  
*b* abgerundete hiPSC und  
*c* Kultivierungsoberfläche.

Für die automatisierte Analyse und Klassifizierung wurden die Bilder von hiPSC mit ImageMagick (Befehl: `convert -crop 100x100 *.png [ZIELPFAD]\subImage\_%d.png`) in kleinere Bilder (100x100px) zerteilt und die Textur bestimmt. Mit CellProfiler wurde eine Pipeline erstellt um diese Bildausschnitte anhand der Textur zu klassifizieren. Der so generierte Datensatz umfasst insgesamt 3504 Bilder im png-Format. Die CellProfiler-Pipeline zur Analyse der Textur ist auf Seite 194 im Anhang zu finden.

### 3.6.4 Untersuchung des zellulären Verhaltens von dissoziierten hiPSC-Kolonien

hiPSC-Kolonien (WiCell, siehe Abschnitt 3.1.3) wurden für die Versuche dissoziiert und mit 10  $\mu$ M ROCK-Inhibitor Y-27632 (Merck, Darmstadt, Deutschland) der Zellsuspension zugefügt. Die Inokulation erfolgte in Matrigel-beschichteten 35 mm Petrischalen (Corning) mit einer Zellzahl von entweder  $1 \times 10^5$  Zellen oder  $4 \times 10^5$  Zellen. Nach 4 h oder 24 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt, um den ROCK-Inhibitor zu entfernen. Die nicht adhärennten Zellen in dem abgenommenen Kulturmedium wurden mit dem Scepter™ 2.0 Cell Counter (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert. Danach wurden die Proben mittels der Lebendzell-Mikroskopie (Biostation IM) über 48 h beobachtet und das Konfluenzverhalten mittels CellProfiler analysiert.

## 3.7 Modifikation von Alginat-basierten Gerüststrukturen

### 3.7.1 Calciumphosphat Nanopartikel

Die in dieser Arbeit verwendeten Calciumphosphat Nanopartikel (CaP-NP) wurden von der Arbeitsgruppe (Prof. Dr. Matthias Epple, Universität Duisburg-Essen) im Rahmen des DFG SPP 1327. Die Herstellung der TRITC markierten CaP-NP erfolgte gemäß [310] und wurde als 0,3 mg/ml (entsprechend der Calciumphosphat-Menge) Dispersion in Wasser zur Verfügung gestellt.

### Modifikation von planaren Alginaten und Zelladhäsionsassay

Zur Untersuchung der Modifikation von Alginat-Hydrogelen, wurden Oberflächen gemäß Abschnitt 3.3.4 hergestellt. Bei einer Kondition wurde die standardmäßig verwendete  $\text{BaCl}_2$ -Lösung mit der CaP-NP Dispersion verdünnt (Verhältnis 1:1, v/v). Die Alginatmembran wurde mit dieser Dispersion vernetzt. Als Kontrollen wurde eine Standard Alginatmembran, vernetzt mit  $\text{BaCl}_2$  (20mM), sowie eine TCPS Oberfläche (Corning, NY, USA) genutzt. Zur Untersuchung der Modifikation wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Kulturschale (35 mm Durchmesser) ausgesät und mit der Biostation IM über 24 h beobachtet (alle 15 min Bildaufnahme). Die Adhäsionsrate der Zellen nach 24 h auf den verschiedenen Oberflächen (TCPS, Alginat–CaP-NP, Alginat +CaP-NP) wurde danach manuell ausgewertet.

### Modifikation von Alginatkugeln beim Herstellungsprozess

Die direkte Übertragung von CaP-NP auf Alginatkugeln wurde mit einer Lösung von LNT-Alginat (0,7% v/v, 1:1 Mischung) untersucht. Das gelöste Alginat wurde mit dem in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Aufbau zu Kugeln prozessiert. Als Vernetzerlösungen wurden eine  $\text{BaCl}_2$ -Lösung (20 mM), eine CaP-NP Dispersion (0,3 mg/ml), sowie eine Mischung aus beiden Lösungen (10 mM  $\text{BaCl}_2$  und 0,15 mg/ml CaP-NP) verwendet. Ebenso wurden Verdünnungen der CaP-NP Dispersion (0,1 mg/ml und 0,2 mg/ml, verdünnt mit ddH<sub>2</sub>O) zur Vernetzung untersucht. Mit einem eingestellten Luftstrom von 1,5 l/min wurden Alginatkugeln mit einem Durchmesser von etwa 600  $\mu\text{m}$  hergestellt. Die Alginatkugeln wurden nach fünfzehnminütiger Vernetzung (bei Raumtemperatur) mit einer NaCl-Lösung (0,9% w/v) gewaschen und gelagert. Die Größe der Alginatkugeln wurde direkt nach der Herstellung und nach 4 Tagen Lagerung über den Äquivalent-Durchmesser mit der Software NIS-Elements quantifiziert. Der Äquivalent-Durchmesser ist die Projektion der gemessenen Fläche auf den Durchmesser eines Einheitskreises mit diesem Durchmesser.

### Kultivierungsform des „hängenden Tropfens“ mit CaP-NP modifizierten Alginatkugeln

Alginatkugeln wurden mit der im vorherigen Abschnitt genutzten Methode mit  $\text{BaCl}_2$  (20 mM),  $\text{BaCl}_2$  mit CaP-NP (10 mM  $\text{BaCl}_2$ , 0,15 mg/ml) hergestellt („Mikroträger“). Als zusätzliche Kontrolle wurden kommerziell erhältliche Kollagen-beschichtete Mikroträger (GEM<sup>TM</sup>, Global Cell Solutions, Charlottesville, USA) in den Experimenten mitgeführt. Für diese Experimente wurden in einem kommerziell erhältlichen Zellkulturgefäß für die „hängende Tropfen“-Kultur verwendet (GravityPLUS<sup>TM</sup>, InSphero AG, Schlieren, Schweiz). Mikroträger und Zellen (hMSCs) wurden in einem Tropfenvolumen von 40  $\mu\text{l}$  kultiviert. Die Zellzahl pro Tropfen wurde auf 4000 Zellen eingestellt. Die Proben wurden für 5 Tage kultiviert und nach FDA/EB-Färbung dokumentiert.

### 3.7.2 Fibrilläre Alginat-Oberflächen

Die Modifikation von Alginaten durch Einführung struktureller Features soll anhand *fibrillärer Alginat-Oberflächen* untersucht werden. Die hierbei zugrundeliegende Hypothese beruht darauf, dass durch Topographien eine Zelladhäsion hervorgerufen werden kann. Die Strukturierung selbst erfolgt durch Adaptation eines von Hsu *et al.* veröffentlichten Protokolls für Polypropylen [312].

#### Herstellung fibrillärer Alginat-Oberflächen

Zur Herstellung der fibrillären Oberflächen wurde LT-Alginat (0,7%, v/w, gelöst in isotoner NaCl-Lösung) mit einem Volumen von 250  $\mu\text{l}$  in eine unbehandelte 10 cm Petrischale (Corning) getropft. Auf das (flüssige) Alginat wurde dann im nächsten Schritt eine hydrophile, poröse Membran (25 mm Durchmesser, Whatman Nucleopore Track-Etched Membrane, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) aufgelegt und auf

eine vollständige Benetzung geachtet, bei der die Poren mit Alginat gefüllt wurden. Zur initialen Vernetzung wurde 1 ml einer 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) auf die Oberseite der Membran pipettiert und 10 min zur Vernetzung bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Vernetzung der Alginatmembran wurden weitere 4 ml dieser Lösung hinzugegeben, wobei die Alginatmembran vorsichtig angehoben wurde, um ein freies Schwimmen in der Vernetzerlösung herzustellen. Nach weiteren 15 min wurde die CaCl<sub>2</sub>-Lösung entfernt, die Alginatmembran (mit der porösen Membran) leicht antrocknen gelassen und in eine pLL-beschichtete Petrischale (35 mm Durchmesser, Corning) überführt. In der Petrischale wurde die poröse Membran mit einer Pinzette abgezogen. Bei den Experimenten wurden Membranen verwendet, die unterschiedliche Porendurchmesser aufwiesen (0,6 µm, 1,0 µm und 2,0 µm). Als Kontrolloberfläche wurde mit dem LT-Alginat analog zu Abschnitt 3.3.4 eine glatte Alginat-Oberfläche hergestellt. Ferner diente eine Standard TCPS-Petrischale (35 mm Durchmesser, Corning) als weitere Kontrolloberfläche.

### **Analyse des zellulären Verhaltens auf fibrillären Alginat-Oberflächen**

Der Einfluss des zellulären Verhaltens wurde mit L929-Fibroblasten (siehe Abschnitt 3.1.1) untersucht. Nach Herstellung der Oberflächen wurden diese mit 2 ml Zellsuspension mit  $5 \times 10^4$  Zellen/ml inokuliert und über 3 Tage in dem Lebendzell-Mikroskop Biostation CT (Nikon Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland) kultiviert und beobachtet. Die Analyse der Bilddaten erfolgte manuell mit der Software NIS-Elements (Nikon).

Zur Untersuchung der Zell-Matrix Interaktion wurden die Proben für die Rasterelektronen-Mikroskopie präpariert. Hierzu wurden die Proben mit PBS gewaschen und mit Natrium-Cacodylatpuffer mit 2% Glutaraldehyd (v/v) für mindestens 24 h fixiert. Die Proben wurden dann mit 2% Osmiumtetroxid (v/v) und 1% Tanninsäure (w/v) behandelt. Beide Lösungen wurden in 0,15 M Cacodylatpuffer angesetzt. Die Entwässerung der Proben erfolgte in einer aufsteigenden Ethanolreihe und die finale Trocknung mit Hexamethyldisilazan (HMDS, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland). Die Aufnahmen erfolgten nach Goldbeschichtung (Q150R ES, Quorum Technologies Ltd., East Grinstead, UK) mit einem EVO HD15 (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland).

### **3.7.3 Titanisierung von Alginat-Hydrogelen**

Die Modifikation von Alginaten erfolgt auf dem Hintergrund der bekannten Eigenschaften von Titan in der regenerativen und rekonstruktiven Medizin. Implantate werden aus Titan gefertigt oder mit Titan modifiziert, um eine Integration in bestehendes Gewebe zu erreichen. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften von Titan und dessen Legierungen wurde ein neuer Ansatz verfolgt, Alginat mittels Titan so zu modifizieren, sodass adhärente Zellen darauf kultiviert werden können. Die Titanisierung hat sich bereits bei anderen biomedizinischen Anwendungen bewährt [55, 313] wurde aber nach derzeitigem Kenntnisstand noch nicht zur Modifikation von Alginat-Hydrogelen verwendet. In diesem Abschnitt wird die Vorgehensweise zur Modifikation von Alginaten mit Titan beschrieben.

### **Vorbereitung der Oberflächen**

Für die Untersuchung werden Standardkulturschalen (*tissue-culture treated*) mit einem Durchmesser von 35mm (Corning, Life Technologies GmbH, Schnelldorf, Deutschland) verwendet. Folgende Oberflächen werden für die anschließende Kultivierung von mesenchymalen Stammzellen vorbereitet:

- TCPS-Oberfläche
- TCPS-Oberfläche für Titanisierung
- TCPS-Oberfläche mit Na-Alginat
- TCPS-Oberfläche mit Na Alginat für Titanisierung



- TCPS-Oberfläche mit Ba-Alginat
- TCPS-Oberfläche mit Ba-Alginat für Titanisierung

Für die Beschichtung mit Alginaten werden die Kulturschalen zuvor mit poly-L-Lysin beschichtet, das als Haftvermittler zwischen Alginat und Kulturschale fungiert. Hierfür wird 1 ml 0,01 % pLL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) in die Kulturschalen gegeben, 30 min bei 37°C inkubiert, danach entfernt und unter der Sterilbank zur Trocknung gelagert. Nach der Trocknung wird 1 ml einer 1:1 (v/v) Mischung von UHV-Alginat (LN und LT) in die Kulturschalen gegeben, gleichmäßig durch Drehen der Kulturschale verteilt, sodass die komplette Oberfläche bedeckt ist. Die Hälfte der Kulturschalen wird bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet (*Na-Alginat*, *Na-Alg*). Die andere Hälfte wird mit einer 20 mM BaCl<sub>2</sub> Lösung 15 min bei Raumtemperatur vernetzt und anschließend zweimal mit einer 0,9%igen NaCl Lösung gewaschen. Die Proben werden ebenfalls bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet (*Ba-Alginat*, *Ba-Alg*).

### **Titanisierung der Oberflächen**

Die Proben werden in der Folge von Prof. Dr. Guldner an der Universität Lübeck mit Titan beschichtet (*titanisiert*) [313]. Hierfür wird die Oberfläche aus der Kulturschale herausgeschnitten, um eine homogenere Titanisierung zu erzielen. Ein identischer Probensatz wird in St. Ingbert gelagert um später die titanierten Proben mit den nicht titanierten Proben vergleichen zu können.

### **Lebendzell-Mikroskopie von hMSCs auf den modifizierten Oberflächen**

Nach dem Rücktransport werden die Proben für die Lebendzell-Mikroskopie vorbereitet. Hierfür werden die Kulturflächen von ibidi-Kulturschalen herausgeschnitten und die zu analysierenden Oberflächen mit dem biokompatiblen Silikonkleber MED-1000 (NuSil Technology LLC.) verklebt. Die Aushärtung erfolgt für 10 min bei 80°C. Nach der Aushärtung werden die Proben für 15 min unter einer UV-Lampe sterilisiert, da eine vollständige aseptische Handhabung der Proben aufgrund der technischen Gegebenheiten nicht möglich ist. In die zusammengesetzten Kulturschalen werden  $1 \times 10^4$  humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, Kulturmedien und Kultivierung dieser Zellen gemäß Abschnitt 3.1.2) ausgesät (verfügbare Wachstumsfläche: 3,5 cm<sup>2</sup>). Die Proben werden per parallelisierter Lebendzell-Mikroskopie (siehe hierzu Abschnitt 3.4) unter physiologischen Bedingungen (Zeitraffereinstellungen: 10x Vergrößerung, Phasenkontrast, 50 h total, 15 min Intervalle) observiert. Danach wurden die Proben bis zum Zeitpunkt 72 h nach Inokulation in einem Brutschrank weiter kultiviert.

### **Analyse des zellulären Verhaltens auf titanierten Alginat-Oberflächen**

Die zelluläre Reaktion auf die modifizierten Alginat-Oberflächen wurde anhand der aufgenommenen Bildsequenzen manuell analysiert. Die morphologische Quantifizierung erfolgte zum Zeitpunkt 5 h nach Inokulation mit dem Softwarepaket NIS-Elements 3.x (Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland). Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Origin 8 (OriginLab©, Northampton, USA). Die Normalverteilung wird nach Shapiro-Wilk und Kolmogorov-Smirnoff und die Signifikanz über den Mann-Whitney Test überprüft.

### **Titanisierung von sphärischen Alginat-Oberflächen**

Neben der Titanisierung von zweidimensionalen Alginat-Oberflächen wird die Methode auf dreidimensionale Alginatkugeln übertragen. Die Alginatkugeln werden gemäß Abschnitt 3.3.2 hergestellt und mit unterschiedlichen Trocknungsmethoden entwässert. Dieser Schritt ist notwendig, da die Titanisierung im Vakuum erfolgen muss. Die Alginatkugeln werden nach Herstellung per Lufttrocknung über Nacht, kritischer

Punktrocknung (CPD 7501, Quorum Technologies, UK) und Gefriertrocknung entwässert. Die Gefriertrocknung wurde extern am Institut für Neue Materialien GmbH (Saarbrücken) durchgeführt. Die entwässerten Alginatkugeln werden zur Titanisierung in zwei zusammengesetzte *cell strainer* (Falcon™, Maschenweite 70 µm) gegeben, die mit Parafilm® M verbunden werden. Die Titanisierung erfolgte durch Prof. Dr. Norbert Guldner, Universität Lübeck. Nach erfolgter Titanisierung werden die Alginatkugeln in NaCl-Lösung rehydratisiert (0,9 % w/v). Bei den gefriergetrockneten Alginatkugeln wurde zusätzlich eine Entgasung im Exsikkator durchgeführt, da die Alginatkugeln durch eingeschlossene Luft nicht sedimentieren und auf der Oberfläche schwammen. Die zelluläre Reaktion wurde mittels „hängender Tropfen“-Kultur mit murinen L929 Fibroblasten und humanen mesenchymalen Stammzellen (Spezifikation zur Kultivierung siehe Abschnitt 3.1.1 bzw. 3.1.2) durchgeführt. Titanisierte und native (getrocknete) Alginatkugeln wurden mit der Zellsuspension von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml gemischt und in 20 µl Tropfen in den Deckel einer unbehandelten Petrischale (Durchmesser 10 cm) gegeben. Zur Verringerung der Austrocknung der Tropfen werden 10 ml PBS in den Boden der Kulturschale gegeben. Die Kultivierung erfolgt über insgesamt 5 Tage im Brutschrank. Die Tropfen werden per Phasenkontrastmikroskopie während der Kultivierung dokumentiert und nach 5 Tagen von der Kulturschale abgespült und mit Ethidiumbromid/FDA gefärbt. Die Endpunktanalyse erfolgt mit Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie.

### 3.7.4 Nicht-kovalente Modifikation von Alginaten mit ECM-Proteinen

Bei bestimmten Zellsystemen, wie z. B. hESC und hiPSC, wird zur Kultivierung ein komplexes Gemisch aus Proteinen der extrazellulären Matrix verwendet. Durch eine Mischung von Alginat und ECM-Proteinen (siehe hierzu [177]) soll untersucht werden, ob dies zu einer Änderung der Alginateigenschaften führen kann, die eine Adhäsion von Zellen ermöglicht.

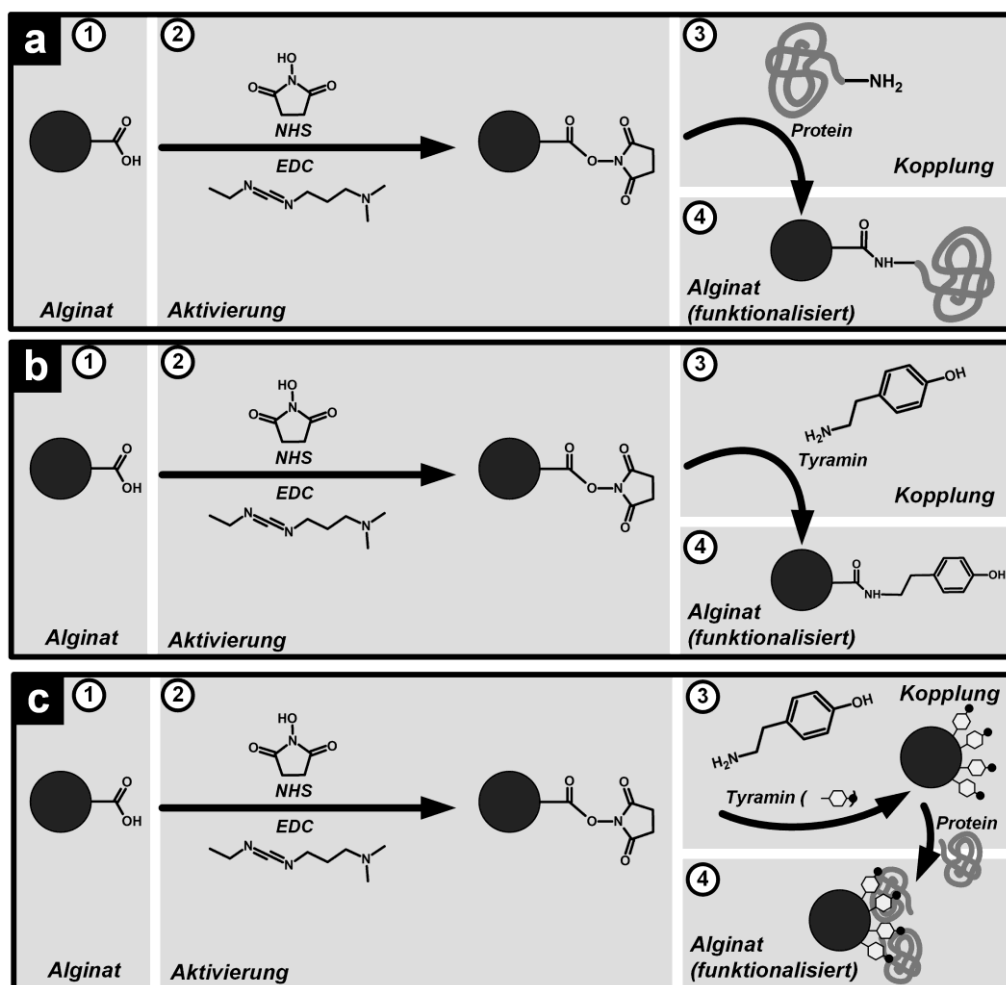
LNT-Alginat (0,7%, w/v, 1:1, v/v) wurde zunächst mit 2 mg/ml Matrigel™ (BD Biosciences, Bedford, USA) gemischt. In die Petrischale (35 mm Durchmesser, Corning), pLL-beschichtet, wurde zunächst 1 ml einer LNT-Alginatlösung ohne Matrigel gegeben und verteilt. Auf diese Schicht wurde dann die Alginat-Matrigel-Mischung (500 µl) aufpipettiert. Die erste Schicht ist notwendig, damit die Alginat-Matrigel-Mischung nicht mit der pLL-Schicht interagiert. Ebenso wurde eine Schale mit Alginat ohne Matrigel, sowie eine Petrischale mit Matrigel-Beschichtung vorbereitet. Die Petrischalen mit Alginat-Matrigel bzw. Alginat wurden dann bei 80°C für 15-20 min aufkonzentriert. Im nächsten Schritt wurden beide Proben mit 20 mM BaCl<sub>2</sub> für 15 min bei Raumtemperatur vernetzt und anschließend zweimal mit isotoner NaCl-Lösung gewaschen. Zur Untersuchung der Modifikation wurden hiPSC-Kolonien (WiCell, siehe Abschnitt 3.1.3) auf die Oberflächen gegeben und für 72 h kultiviert. Die Analyse der Kolonien erfolgte über die Morphologie (Fläche, Shapefactor und Zirkularität) manuell mit NIS-Elements.

### 3.7.5 Kovalente Modifikation von Alginaten

Die Biokonjugation der Alginatkugeln mit Proteinen erfolgte mit einer wässrigen Carbodiimid-Chemie, die bereits in mehreren Studien für die Biofunktionalisierung von Alginaten verwendet wurde [135, 314, 315]. In dieser Arbeit wurde diese Methode auf vernetzte Alginat-Hydrogele angewendet. Die Alginatbasierten Gerüststrukturen werden dabei zunächst mit einer Lösung bestehend aus sterilfiltriertem 200 mM N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethylcarbodiimid Hydrochlorid (EDC) und 50 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS, beide von Sigma-Aldrich, gelöst in ddH<sub>2</sub>O) aktiviert, bevor das zu konjugierende Molekül in Lösung auf die Oberfläche gegeben wird. In dieser Arbeit wurden Protokolle zur Kopplung von Kollagen I und Tyramin entwickelt, die mit einer Biofunktionalisierung einhergehen. Ferner wurde das mit Tyramin funktionalisierte Alginat zur weiteren Beschichtung über Adsorption mit Matrigel verwendet. Die verschiedenen Ansätze der Biofunktionalisierung sind in Abbildung 11 schematisch dargestellt.

## Kovalente Modifikation von Alginatmembranen mit Kollagen I

Die zelluläre Reaktion in Form der Adhäsion wurde im Kontext der Alginat-Mikroträger auf modifizierten zweidimensionalen Alginat-Oberflächen mittels der Lebendzell-Mikroskopie untersucht. Die Alginat-Oberflächen (in 35 mm Durchmesser TCPS Kulturschalen) wurden gemäß Abschnitt 3.3.4 hergestellt. Die verwendete pLL Konzentration betrug dabei 0,005%, die Vernetzung des Alginats (0,7% LNT, 1:1) wurde für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Die unmodifizierten Alginat-Oberflächen wurden nicht aktiviert und modifiziert und bis zu den weiteren Schritten in NaCl (0,9%) gelagert. Die mit NaCl gewaschenen Oberflächen wurden mit 1 ml 200 mM EDC und 50 mM NHS für 30 min bei Raumtemperatur aktiviert (Abbildung 11 a). Nach der Aktivierung wurde bei einem Satz der Proben die Aktivierungslösung entfernt, die Oberflächen einmal mit HEPES (0.1 M, pH 5.3) gewaschen und 1 ml der Kollagen I-Lösung (75 µg/ml in 0,1 M HEPES, pH 5,3) auf die Oberflächen gegeben. Im Gegensatz zu den Mikroträgern wurde hier eine zehnfach höhere Konzentration verwendet, um die statische Inkubation ohne Rühren auszugleichen. Eine Konzentration von 7,5 µg/ml hat in Vorversuchen keine ausreichende Adhäsion gezeigt.



**Abbildung 11: MODIFIKATION VON ALGINATEN MITTELS CARBODIIMIDEN.**

**a** Kovalente Kopplung von ECM-Proteinen. Die Kopplung von Proteinen erfolgt in vier Schritten. (1) Herstellung von Alginatkugeln mit koaxialem Luftstrom. (2) Aktivierung der Carboxylgruppen mit EDC und NHS in wässriger Lösung. (3) Kopplung von Proteinen in gepuffertem Medium an die aktivierten Gruppen des Alginats. (4) Verwendung der hergestellten Mikroträger für die Zellkultur. (Abbildung nach [316], abgeändert) **b** Kovalente Kopplung von Tyramin zur Steigerung der Hydrophobizität. Die Kopplung von Tyramin erfolgt in vier Schritten. (1) Herstellung von Alginatkugeln mit koaxialem Luftstrom. (2) Aktivierung der Carboxylgruppen mit EDC und NHS in wässriger Lösung. (3) Kopplung von Tyramin in gepuffertem Medium an die aktivierten Gruppen des Alginats. (4) Verwendung der hergestellten Mikroträger für die Zellkultur. **c** Kombination von **b** mit anschließender Protein-Adsorption. (1) Herstellung von Alginatkugeln mit koaxialem Luftstrom. (2) Aktivierung der Carboxylgruppen mit EDC und NHS in wässriger Lösung. (3) Kopplung von Tyramin in gepuffertem Medium an die aktivierten Gruppen des Alginats, sowie Inkubation in einer Proteinlösung zur Adsorption. (4) Verwendung der hergestellten Mikroträger für die Zellkultur (Abbildung nach [316], abgeändert).

### **Kovalente Modifikation von Alginatmembranen mit Tyramin**

Für die mit Tyramin zu modifizierenden Oberflächen (Abbildung 11 b) wurden jeweils 100 mg Tyramin abgewogen, mit der Aktivierungslösung (1 ml) extern gemischt, sterilfiltriert und wieder auf die Oberflächen gegeben. Alle Proben (Alginat-Kontrolle, Alginat+Kollagen I und Alginat+Tyramin) wurden über Nacht bei Raumtemperatur statisch inkubiert. Nach erfolgter Kopplung wurden die Proben zweimal mit NaCl gewaschen und bis zur Verwendung in 0,9% NaCl bei 4°C gelagert. Vor der Aussaat der Zellen werden die Proben zweimal mit DMEM/F12 Basalmedium gewaschen, wobei jeweils eine Inkubation für 30 min bei 37°C erfolgte. Diese Schritte sind notwendig, um das Hydrogel wieder in einen physiologischen pH Bereich zu bringen und Reste der Aktivierungslösung zu entfernen. Die Proben wurden dann für 15 min mit UV-Bestrahlung sterilisiert und anschließend zweimal mit hMSC-Kulturmedium gewaschen. Neben der unmodifizierten Alginat-Kontrolle wurde eine Standard TCPS Kulturschale als Kontrolle mitgeführt. Die hMSCs wurden mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  Zellen/Kulturschalen ( $5555 \text{ Zellen/cm}^2$ ) in 2 ml Kulturmedium auf die Oberflächen gegeben und parallel mit dem Lebendzell-Mikroskopie-System beobachtet. Die Zellen wurden für mindestens 15 h mit einem Intervall von 15 min mit 10-facher Vergrößerung beobachtet. Die Bildsequenzen wurden sowohl automatisiert mit CellProfiler, als auch manuell mit NIS-Elements analysiert.

### **Kovalente Kopplung von Matrigel an Alginatmembranen**

Die Kopplung von Matrigel direkt auf die Alginatmembranen erfolgte analog zur Kopplung von Kollagen I. Statt der Kollagen I-Lösung wurde eine 0,08 mg/ml Lösung Matrigel in DMEM/F-12 verwendet und 0,125 ml/cm<sup>2</sup> auf die Oberflächen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht. Die Proben wurden danach intensiv mit isotoner NaCl-Lösung und DMEM/F-12 gewaschen.

### **Kovalente Kopplung von Tyramin an Alginatmembranen mit Matrigelbeschichtung**

Für diesen Modifikationsansatz (Abbildung 11 c) wurde zunächst das oben beschriebene Protokoll für die Kopplung von Tyramin durchgeführt. Nach erfolgter Kopplung wurden die Oberflächen mit isotoner NaCl-Lösung und DMEM/F12 sorgfältig gewaschen. Matrigel wurde danach vorbereitet (1 mg in 12 ml DMEM/F12) und 1 ml dieser Lösung in die mit Alginat und Tyramin beschichtete 35 mm Schale gegeben. Bei größeren Kulturflächen wurde das Volumen entsprechend hochgerechnet. Die Oberflächen wurden dann für mindestens 4 h bei 37°C inkubiert, um eine Adsorption der Proteine auf der Oberfläche zu erreichen. Die Proben wurden dann mit DMEM/F12 gewaschen und durch 15 min UV-Bestrahlung sterilisiert.

### **Herstellung von Alginat-Mikroträger mit Kollagen I**

Es wurden dabei zwei verschiedene Ansätze verfolgt, die sich in ihren Reaktionsbedingungen unterscheiden. Bei dem ersten Ansatz („Standard“) wurde die Alginatkugeln abzentrifugiert und der Überstand (isotone Kochsalzlösung) verworfen. Die Alginatkugeln wurden dann mit einer 200 mM EDC/50 mM NHS-Lösung (gelöst in ddH<sub>2</sub>O, sterilfiltriert) mit einem Verhältnis 2:10 (Volumen Alginat zu Volumen Aktivierungslösung) auf einem Orbitalrotator (360° Rotation, 15 rpm) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die aktivierten Alginatkugeln wurden dann abzentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. 10 ml einer Kollagen I-Lösung (7,5 µg/ml, 0,1M HEPES, pH 5,2 ± 0,3) wurde dann auf die Alginatkugeln gegeben und der Ansatz über Nacht (15 h) bei Raumtemperatur auf dem Orbitalrotator (360° Rotation, 15 rpm) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die funktionalisierten Alginatkugeln („Mikroträger“) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit isotoner NaCl-Lösung gewaschen. Bis zur Verwendung wurden die Mikroträger in isotoner NaCl-Lösung bei 4°C gelagert.

Bei der zweiten Methode („konstant osmotischer Druck“) wurde die Biokonjugation analog durchgeführt, lediglich der HEPES-Puffer wurde mit NaCl auf eine Osmolarität von 300 mOsmol/kg eingestellt, sowie die Waschschriffe ausschließlich mit isotoner NaCl-Lösung durchgeführt.

### **Kovalente Kopplung von Tyramin an Alginatkugeln**

Die Untersuchung der Alginat-Konjugation mit Kollagen I erfolgte anhand der Kopplung des niedermolekularen Moleküls Tyramin. Das Standardprotokoll zur Aktivierung der Alginatkugeln wurde angewendet und, statt Kollagen I, das Molekül Tyramin verwendet. Durch die Größe und das Vorhandensein von nur einer funktionalen Gruppe zur Kopplung werden mögliche Artefakte wie z. B. die Ausbildung eines Kollagen I-Netzwerks durch einen Waschschriff mit neutralem pH-Wert ausgeschlossen. Es wird daher die Hypothese aufgestellt, dass die Bereitstellung einer chemischen Oberfläche, ähnlich der des TC Polystyren (TCPS) von Kulturgefäßen, eine attraktive Adhäsionsoberfläche für Zellen auf Alginat darstellen kann. Vashi *et al.* [317] beschreiben in ihrer Studie eine Modifikation der Kulturfläche mit Peptiden und berichten, dass die TCPS-Oberfläche chemisch mit Carboxyl- und Phenolgruppen beladen ist. Die Phenolgruppen entstehen dabei durch die Aktivierung der unbehandelten Polystyren Oberfläche mit Corona- bzw. Plasmabehandlung. Die Carboxylgruppen sind Bestandteil der Alginatpolymere und dienen gleichzeitig als reaktive Gruppe. Die Einführung von Phenolgruppen an das Alginat mittels der Carbodiimid-Reaktion soll mit dem Molekül Tyramin erfolgen, um die Hypothese zu überprüfen. Für diese Untersuchung wurden Alginatkugeln nach dem schon beschriebenen Verfahren hergestellt, anschließend mit der Carbodiimid-Methode aktiviert und mit Tyramin zur Kopplung inkubiert. Im Gegensatz zur herkömmlichen Methode wurde das Tyramin zur Aktivierungslösung direkt hinzugegeben (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland, 50% w/v). Ferner wurden in die Untersuchung weitere Kontrollen (native Alginatkugeln, Alginatkugeln nur aktiviert und Alginatkugeln nur mit Tyramin inkubiert) einbezogen. Im Anschluss an die Herstellung wurden hMSCs im „hängender Tropfen“-Kultur mit einer Zellzahl von 1000 Zellen pro 20 µl Tropfen auf den Mikroträgern kultiviert und die zelluläre Reaktion sowie die Durchmesser der Mikroträger analysiert. Da hMSCs per Definition Plastik-adhären sind, sollte im Falle einer erfolgreichen Reaktion eine zelluläre Reaktion in Form der Adhäsion erfolgen. Abbildung 11 b zeigt schematisch die Kopplung von Tyramin an Alginatkugeln.

### **Herstellung von Alginat-Mikroträgern mit Tyramin und Matrigelbeschichtung**

Hergestellte native Alginatkugeln wurden, wie zuvor bereits beschrieben, mit EDC/NHS aktiviert und Tyramin Hydrochlorid (40 mg/ml in HEPES, 0,1M, pH 5,2) über Nacht modifiziert. Die aktivierten Alginatkugeln wurden dann abzentrifugiert, zweimal mit NaCl gewaschen und dann mit Matrigel über Nacht beschichtet. Die funktionalisierten Mikroträger wurden mindestens zweimal in DMEM/F12 gewaschen und bei 4°C in DMEM/F12 bis zur Nutzung gelagert.

### **Untersuchungen zur Proliferation von hMSCs auf Kollagen I modifizierten Alginat-Oberflächen**

Die Untersuchung der Proliferation von hMSCs auf verschiedenen Oberflächen erfolgte in Standard T25 Zellkulturflaschen (Corning, NY, USA). Eine Kulturoberfläche wurde mit Kollagen I (Gibco, A1048301, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) beschichtet, indem eine Lösung von 75 µg/ml, gelöst in HEPES (pH 5,3, 0,1 M), für 15 h auf die TCPS Oberfläche gegeben wurde (entspricht 8,1 µg/cm<sup>2</sup>). Zum Vergleich wurde eine weitere Kulturflasche nur mit TCPS Oberfläche in den Experimenten genutzt. Die Beschichtung einer weiteren Kulturflasche mit modifiziertem Alginat erfolgte durch eine Beschichtung der Oberfläche mit pLL (0,001%) für mindestens 15 min bei 37°C, gefolgt von einer Beschichtung von Alginat mit anschließender Vernetzung mit einer BaCl<sub>2</sub>-Lösung (20 mM). Die Vernetzung erfolgte 15 min bei

Raumtemperatur. Die Alginat-Oberfläche wurde zweimal mit NaCl (0,9%) gewaschen und anschließend mit EDC/NHS (200 mM, 50 mM, gelöst in ddH<sub>2</sub>O) für 30 min bei Raumtemperatur aktiviert. Nach einmaligem Waschen der Oberfläche mit HEPES (pH 5,3, 0,1 M), wurde eine Kollagen I-Lösung (75 µg/ml pH 5,3, 0,1 M) auf die aktivierte Alginat-Oberfläche gegeben (entspricht 8,1 µg/cm<sup>2</sup>) und 15 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten mehrere Waschstschritte mit NaCl (einmal), und DMEM/F12 (zweimal). Zur Neutralisierung des pH-Werts des Hydrogels wurden die Oberflächen jeweils zweimal 30 min bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte eine UV-Behandlung zur Sterilisation der Oberflächen, die während dieser Zeit mit DMEM/F12 bedeckt waren. Vor Aussaat der Zellen wurde die Oberfläche nochmals mit hMSC-Kulturmedium gewaschen. Die inokulierte Zelldichte betrug zum Start des Experiments 3000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in 4 ml Kulturmedium. Während der Kultivierung über 5 Tage wurde jeweils an Tag 2 und Tag 4 ein Medienwechsel vorgenommen. Nach 5 Tagen wurde die Proliferation über die Anzahl der Nuklei mikroskopisch bestimmt. Die Zellen wurden hierfür in DMEM/F12 mit Hoechst33342 (2 µg/ml) für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Zellen in DMEM/F12 erfolgte die Aufnahme von mindestens 14 Fluoreszenzbildern pro Kulturflasche mit dem Filterblock DAPI. Zusätzlich wurden pro Flasche 5 Durchlichtaufnahmen zur Dokumentation aufgenommen.

Danach wurden die Zellen für 30 min mit 4 µM CellTracker Red CMTPX (Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) bei 37°C inkubiert. Nach Austausch der Färbelösung durch DMEM/F12 wurden 5 weitere Aufnahmen pro Flasche mit dem Filter DAPI (Nuklei) und TexasRed (Zytoplasma) gemacht. Die Analyse der Mikroskopiebilder erfolgte mit der Software CellProfiler.

### **Untersuchungen zur Adhäsion von hiPSCs auf modifizierten Alginat-Oberflächen**

Alginat-Oberflächen wurden, wie zuvor beschrieben, in 35 mm Petrischalen angesetzt und direkt mit Matrigel funktionalisiert, oder über kovalente Kopplung von Tyramin mit nachträglicher Matrigel-Beschichtung funktionalisiert. Als Kontrolle wurde die Standard-Kulturfläche TCPS mit Matrigelbeschichtung mitgeführt. AXAi-hiPSCs wurden gemäß Protokoll abgelöst und mit ROCKi ( $4,5 \times 10^5$  Zellen pro 35 mm Kulturschale) auf die Oberflächen gegeben. Die Proben wurden dann über 48 h mittels der Lebendzell-Mikroskopie beobachtet und Zeitraffer-Aufnahmen erstellt. Die Aufnahmen wurden anschließend mit ilastik und Cellprofiler, sowie R analysiert.

Zusätzlich wurden die Proben bis Tag 7 kultiviert und eine Antikörperfärbung durchgeführt. Die Proben wurden mit PBS gewaschen und danach mit 1% bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert. Antikörper gegen Tra1-81 (Alexa Fluor 488 Mouse anti-Human Tra1-81 Antigen, BD Pharmingen) wurden in einer 1:200 Verdünnung in der BSA-Lösung über Nacht bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Darauf wurde zusätzlich eine Antikörperfärbung gegen HESCA-2 (1:100 Verdünnung, MAB4406, MerckMillipore) durchgeführt. Die Proben wurden hierfür zunächst fixiert (BD Cytotfix, BD Biosciences). Die Proben wurden anschließend mit einem sekundären Antikörper inkubiert (Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488 conjugate, invitrogen) und nach erfolgten Waschstschritten in BSA-Lösung mit NucBlue (invitrogen) der Kern gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mittels der Biostation IM (Nikon).

### **Untersuchungen zur Proliferation von hiPSCs auf modifizierten Alginat-Oberflächen**

Alginat-Oberflächen wurden, wie zuvor beschrieben, in 35 mm Petrischalen angesetzt und direkt mit Matrigel funktionalisiert, oder über kovalente Kopplung von Tyramin mit nachträglicher Matrigel-Beschichtung funktionalisiert. Als Kontrolle wurde die Standard-Kulturfläche TCPS mit Matrigelbeschichtung mitgeführt. AXAi-hiPSCs wurden gemäß Protokoll abgelöst und mit ROCKi ( $2,5 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm Kulturschale) auf die Oberflächen gegeben und über 6 Tage kultiviert. Nach 24 h erfolgte der

erste Medienwechsel, bei dem die nicht adhärenen Zellen gezählt (Millipore Scepter) wurden. Nach 6 Tagen wurden die Zellen mit TrypLE abgelöst und ebenso gezählt, um die Proliferation zu bestimmen.

### Untersuchungen zur Adhäsion von hiPSC-CMs auf modifizierten Alginat-Oberflächen

Alginat-Oberflächen wurden, wie zuvor beschrieben, in 35 mm Petrischalen angesetzt und direkt mit Matrigel funktionalisiert. Als Kontrolle wurde die Standard-Kulturfläche TCPS mit Matrigelbeschichtung mitgeführt. hiPSC-CMs (Cor.4U, Axiogenesis) wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers abgelöst und auf die Oberflächen gegeben. Die Proben wurden über 14 Tage kultiviert und nach 1 d, 7 d und 14 d die Kontaktion mit der Biostation IM dokumentiert. Die Zeitrastersequenzen wurden mittels Cellprofiler analysiert und die Schlagfrequenz über die Änderung der Intensität über die Zeit abgeleitet.

Es folgte eine Antikörperfärbung gegen  $\alpha$ -Aktinin, um das Zytoskelett zu analysieren. Die Proben wurden hierfür zunächst fixiert (BD Cytifix, BD Biosciences). Vor der Färbung wurden die Proben mit PBS gewaschen und dann permeabilisiert (BD Perm Buffer, BD Biosciences), gefolgt von einer Inkubation in 1% BSA mit 0,2% Tween. Der primäre Antikörper (anti- $\alpha$  Actinin, Sarcomeric, 1:200 in der 1%igen BSA-Lösung, Sigma-Aldrich) wurde für mindestens 1 h mit den Proben inkubiert und nach weiteren Waschstschritten mit 1%iger BSA-Lösung durch den sekundären Antikörper ersetzt (Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488 conjugate, invitrogen, 1:200 in 1%iger BSA-Lösung). Nach einer Inkubation von 1 h wurde wieder mit 1%iger BSA-Lösung gewaschen und der Kern mit NucBlue gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mittels der Biostation IM (Nikon).

#### 3.7.6 Antikörperfärbung von Kollagen I modifizierter Alginat-Mikroträger

Die mit Kollagen I funktionalisierten Mikroträger wurden nach Herstellung mit PBS und der primäre Kollagen I-Antikörper (anti-Collagen, Ratte, Abcam, UK) in PBS (Verdünnung 1:400) mit den Mikroträgern über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erfolgtem Waschen der Mikroträger wurde der sekundäre Antikörper (goat anti-rat, igG, Alexa Fluor 488, Invitrogen) in einer 1:500-Verdünnung mit den Mikroträgern für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden gewaschen und mittels Konfokalmikroskopie (Nikon C1) dokumentiert.

#### 3.7.7 Charakterisierung der Mikroträger: Sedimentationsverhaltens und Dichte

Die Sedimentation verschiedener Mikroträger wurde experimentell bestimmt. Hierzu wurden Mikroträger in einem Glaskolben mit 0,9%-iger Kochsalzlösung gegeben und die Sedimentationsgeschwindigkeit beobachtet. Anhand der Svedberg-Gleichung [318] wurde die Dichte berechnet:

$$v = \frac{d^2(\rho_P - \rho_L) \times g}{18 \cdot \eta}$$

wobei  $v$  die Sedimentationsgeschwindigkeit,  $d$  der Durchmesser der Mikroträger,  $\rho_P$  die Dichte der Mikroträger,  $\rho_L$  die Dichte des Mediums,  $\eta$  die Viskosität des Mediums und  $g$  die Gravitationskraft darstellen.

Hieraus ergibt sich nach Umformen:

$$\rho_P = \frac{18 \cdot \eta \cdot v}{g \times d^2} + \rho_L$$

Für die Berechnungen werden folgende Werte für die einzelnen Variablen eingesetzt: Für die Viskosität des Mediums wird zur Vereinfachung die Viskosität  $n = 0,001002 \text{ kg/m}\cdot\text{s}$  von Wasser, für die Gravitationskraft  $g = 9,81 \text{ m/s}^2$  und die Dichte  $\rho_L = 1004,635 \text{ kg/m}^3$  des Mediums (0,9%ige NaCl-Lösung) angenommen. Die Durchmesser ergeben sich aus den analysierten Mikroträgern, ebenso wie die experimentell bestimmten Sedimentationsgeschwindigkeiten.

### 3.7.8 Charakterisierung der Mikroträger: Zytotoxizitätsanalyse der Aktivierungslösung (EDC/NHS) und aktivierter Mikroträger

Für die Bewertung der Zytotoxizität der Aktivierungslösung, als auch der aktivierten Mikroträger wurden Extrakte aus den aktivierten und nicht aktivierten Alginat-Mikroträgern (Standardprotokoll) hergestellt. Die zelluläre Reaktion wurde anhand eines alamarBlue<sup>®</sup>-Assay (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) quantifiziert. Für das Extrakt wurden aktivierte und nicht-aktivierte Mikroträger (3000 Mikroträger mit einem Durchmesser von 600 µm) in 4 ml Kulturmedium (für hMSCs) 24 h bei 37°C inkubiert und danach sterilfiltriert. Die verwendete Menge konnte so proportional zu den Expansionsversuchen eingestellt werden. Mesenchymale Stammzellen wurden für die Tests mit einer Zellzahl von 5000 Zellen/Töpfchen (entspricht etwa 15000 Zellen/cm<sup>2</sup>) in einer zellkulturbehandelten Mikrotiterplatte mit flachem Boden (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und für 24 h im Brutschrank bei physiologischen Bedingungen inkubiert. Das Kulturmedium wurde dann durch die Extrakte ersetzt (8 Töpfchen für jede Kondition). Die Proben wurden danach wiederum für 24 h bei physiologischen Bedingungen inkubiert. Nach erfolgter Exposition der Zellen mit den zu untersuchenden Stoffen wurden die Medien durch Kulturmedium mit 10% der alamarBlue<sup>®</sup>-Reagenz ersetzt und 4 h bei physiologischen Bedingungen inkubiert. Die das aus der Reaktion von Zellen und alamarBlue<sup>®</sup>-Reagenz entstehende Fluoreszenzsignal wurde mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (TECAN infinite<sup>®</sup> 200, Maennedorf, Schweiz) ausgelesen.

### 3.7.9 Adhärenente Suspensionskultur im durchmischten Bioreaktor

Die Kultivierung der Zellen auf Mikroträgern wurde in einem dafür speziell ausgelegten System durchgeführt. Der Biolevitator (Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) ermöglicht in zylinderförmigen, rotierenden Reaktionsgefäßen (mit Stromstörern) die Kultivierung unter kontrollierten physiologischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) mit bis zu vier Reaktionsgefäßen (Bioreaktoren). Für die Kultivierung wurde ein Rotationsprogramm für die Mikroträger definiert und die Kultivierung über 7 Tage durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf unterschiedlichen Mikroträgern. Neben Alginat-basierten Mikroträgern wurde zum Vergleich die Kultivierung auf Cytodex 1- und Cytodex 3-Mikroträgern (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnellendorf, Deutschland) durchgeführt. Die Herstellung und Beschichtung der Alginat-basierten Mikroträger mit Kollagen 1 erfolgte (Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) gemäß der in Abschnitt 3.7.5 beschriebenen Methoden. Die Alginat-basierten Mikroträger wurden in zwei Größendimensionen hergestellt, d. h. mit einem mittleren Durchmesser von 500 µm und 190 µm.

**Tabelle 4:** Parameter der Kultivierung im Biolevitator von hMSC auf Mikroträgern.

Programm	Parameter	Wert
Inokulation	Rotation speed	50 rpm
	Rotation period	5 s
	Rotation pause	2 s
	Agitation period	2 min
	Agitation pause	10 min
	Protocol duration	4 h
Kultivierung	Rotation speed	60 rpm
	Rotation period	5 s
	Rotation pause	3 s
	Protocol duration	7 d

Die Parameter der Kultivierung im Biolevitator beinhalten ein Programm für die Inokulation und für die Kultivierung und sind in Tabelle 4 dargestellt. Der verfügbare Magnet würde in den Experimenten nicht verwendet, da es sich nicht um magnetische Mikroträger handelt.



Die Kultivierung der Zellen erfolgte sowohl im Biolevitator auf Alginat- und Cytodex-Mikroträgern, als auch auf Kollagen I beschichteten Mikrotiterplatten mit 24 Nöpfchen (Nunc). Die Alginat-Mikroträger wurden mit dem in Abschnitt 3.7.5 beschriebenen Protokoll (Standard) funktionalisiert und in zwei verschiedenen Durchmessern (200 µm und 600 µm) bereitgestellt. Die Inokulationsparameter für alle Konditionen wurden auf 4000 Zellen pro cm<sup>2</sup> und 0,55 ml Kulturmedium pro cm<sup>2</sup> eingestellt. Die Anzahl der notwendigen Mikroträger für eine Fläche von 72 cm<sup>2</sup> wurde ausgehend von ihrem Durchmesser berechnet. Die Kultivierung im BioLevigator™ in den hierfür verfügbaren LeviTubes™ erfolgte demnach mit 40 ml Kulturmedium, 72 cm<sup>2</sup> Kulturoberfläche, bereitgestellt durch die Mikroträger und mit einem Inokulum von 2,88×10<sup>5</sup> Zellen. Die Medienwechsel von 50% wurden an Tag 3 und 5 der Kultivierung durchgeführt.

**3.7.10 Bestimmung der Zelladhäsion während der Inokulationsphase**

Die Inokulationsphase eines Mikroträger-basierten Kultivierungssystems ist von entscheidender Bedeutung, da eine effiziente Zelladhäsion während dieser Phase erfolgen muss. Die Zelladhäsion auf den verschiedenen Mikroträgern wurde nach 1, 2 und 3 h untersucht und dabei die Anzahl der Zellen pro Mikroträger lichtmikroskopisch bestimmt. Für die Bestimmung wurden aus den o. g. vier Konditionen Proben derart entnommen, so dass pro Messung 20 Mikroträger verfügbar waren.

**3.7.11 Mikroskopische Untersuchung der adhärenen Suspensionskultur**

Die Kultivierung erfolgte über 7 Tage und eine Probenentnahme erfolgte an Tag 1, 3, 6 und 7, bei der jeweils 100 µl zur Analyse entnommen wurden. Die Proben wurden mit 8 µl FDA in 5 ml DMEM/F-12 Basalmedium gefärbt und mittels Konfokal- und Durchlichtmikroskopie dokumentiert.

**3.7.12 Identitätsbestimmung der mesenchymalen Stammzellen mit Durchfluss-Zytometrie**

Nach den Experimenten wurden die Zellen in BD Phosflow™ Fix Buffer I™ (BD Biosciences, Heidelberg) fixiert und bis zur Analyse bei 4°C gelagert. Für jede Färbung werden 1×10<sup>5</sup> Zellen verwendet, die von der Fixationslösung in PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) mit 0,1% NaN<sub>3</sub> überführt werden. Pro 1×10<sup>5</sup> Zellen werden 2 µl Antikörper (Tabelle 5) hinzugegeben und die Zellen bei 4°C für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem Gerät BD FACSCalibur™ und der Analysesoftware BD CellQuest™ (BD Biosciences, Heidelberg). Für die Analyse wurde das Gate auf 10<sup>1</sup> relative Fluoreszenz Intensität gesetzt.

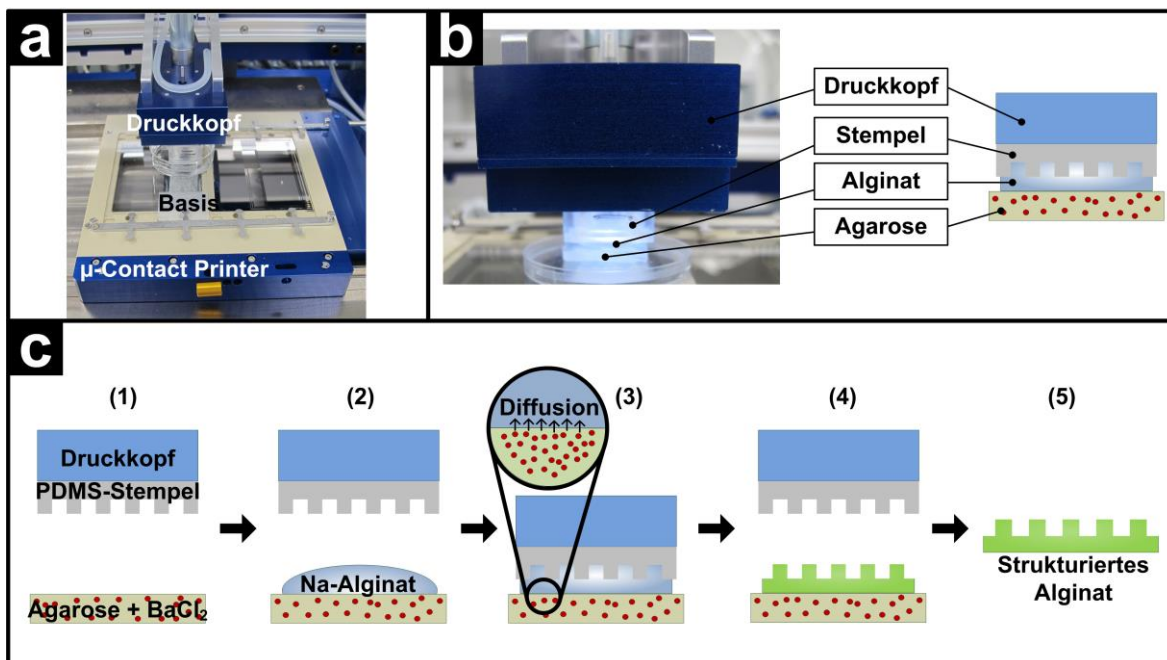
*Tabelle 5* Verwendete Antikörper für die Analyse der Identität der hMSCs.

Antigen	CD34	CD44	CD45	CD73	CD90	CD105	HLA-DR
Antikörper (BD Pharmingen, BD Biosciences)	555821	550989	555482	550257	555595	560839	555811
Konjugat	FITC	PE	FITC	PE	FITC	PE	FITC
Alias	gp 105-120	PGP-1 H-CAM Ly24	Leukocyte Common Antigen	Ecto-5'- nucleotidase	Thy-1	Endoglin	Human leukocyte Antigen
Typ	⊖	⊕	⊖	⊕	⊕	⊕	⊖

**3.7.13 Strukturierung von Alginat-Hydrogelen**

Die definierte Applikation von adhäsionsfördernden Proteinen wurde mittels µ-Contact Printing (µ-Contact Printer, GeSiM mbH, Rossendorf, Deutschland) in Vorversuchen durchgeführt. Auf strukturierte PDMS-Membranen wurde eine 1 mg/ml Lösung Oregon green markierter Gelatine (Sigma-Aldrich,

Schnelldorf, Deutschland) pipettiert und diese für mindestens 15 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Gelatine entfernt und mit der Trocknungseinheit des  $\mu$ -Contact Printers die angetrocknet. Danach wird der Stempel für 3 min auf eine unbehandelte PS Oberfläche kontaktiert und dadurch das Proteinmuster übertragen. Mittels der Lebendzell-Mikroskopie wurde das Verhalten von hMSCs beobachtet. Strukturierte Alginat-Hydrogele wurden mit Hilfe des  $\mu$ -Contact Printers (GeSiM, Rossendorf, Deutschland, Abbildung 12 a) hergestellt. Im Gegensatz zu der üblichen Vorgehensweise des  $\mu$ -contact printing (siehe hierzu den Übersichtsartikel von Whitesides [319]) wurde eine Modifizierung des Verfahrens vorgenommen, das in ähnlicher Weise von Franzesi *et al.* [93] bzw. Agarwal *et al.* [320] beschrieben wurde (siehe hierzu Abbildung 12 b). Zur Strukturierung wurde zunächst ein Agarosegel (4%, w/v) hergestellt, in dem die Vernetzerionen enthalten sind (100 mM BaCl<sub>2</sub>). Nach Erhitzung und Auflösen aller Komponenten wurde das flüssige Gel in Blöcke gegossen und bei 4°C ausgegärt. Die Agarose wurde zur Verwendung auf eine Höhe von 3 mm zurechtgeschnitten und gleichzeitig darauf geachtet, eine planare Oberfläche herzustellen. Dieser Block wurde dann als Basis in den  $\mu$ -Contact Printer positioniert. Zuvor angefertigte PDMS-Stempel dienten als Matrize und wurden vor Nutzung 1 min mit O<sub>2</sub>-Plasma (kinpen, neoplastools, Greifswald, Deutschland) hydrophilisiert.



**Abbildung 12: STRUKTURIERUNG VON ALGINATEN ZUR HERSTELLUNG VON ZWEIDIMENSIONALEN SCAFFOLDS.**

**a** Aufbau der Strukturierungsplattform zur Herstellung von Gerüststrukturen aus Alginaten. **b** Detailansicht des Druckkopfes während der Strukturierung mit den einzelnen Komponenten. **c** Generelle Prozessschritte zur Strukturierung von Alginat-Hydrogelen. (1) Positionierung von Druckkopf, Stempel und Agaroseblock zu Beginn des Prozesses. (2) Aufbringen einer Na-Alginatlösung auf den Agaroseblock. (3) Kontaktierung von Stempel und Alginatlösung durch den Druckkopf und Einleitung der Vernetzung durch Diffusion der Ba<sup>2+</sup>-Ionen aus der Agarose in das Alginat. (4) Ende der Strukturierung durch Anheben des Druckkopfes. (5) Isolation des strukturierten Alginats von der Strukturierungsplattform.

Zur Strukturierung wurde eine 1:1 Mischung aus UHV-Alginaten auf die Basis getropft und der Stempel zur Gelierung und Strukturierung mit dem Alginat kontaktiert. Das Alginatvolumen betrug 50  $\mu$ l, die Kontakthöhe wurde so eingestellt, dass sich der Tropfen bei Kontaktierung auf eine Fläche von etwa 5 mm ausdehnt. Abbildung 12 c zeigt den schematischen Ablauf der Strukturierung auf dem  $\mu$ -Contact Printer. Die Kontaktierung erfolgte über 3 min, um eine ausreichende Vernetzung des Hydrogels zu erreichen. Nach diesem Prozessschritt wurde das strukturierte Hydrogel in eine pLL beschichtete Kulturschale (Durchmesser 35 mm, Corning) mit einer Pinzette überführt. Der freie Bereich der Kulturschale wurde anschließend mit 500  $\mu$ l Alginatlösung bedeckt und 10 min bei Raumtemperatur mit 1 ml BaCl<sub>2</sub> (20 mM) zusammen mit dem strukturierten Alginat-Hydrogel vernetzt und die Schalen danach dreimal mit einer NaCl-Lösung (0,9% w/v) gewaschen.

Nach der zusätzlichen Vernetzung wurden die Alginat-Oberflächen chemisch funktionalisiert, um eine Zelladhäsion zu erreichen. Hierfür wurden die Proben mit EDC und NHS (200 mM/50 mM in ddH<sub>2</sub>O für 30 min bei Raumtemperatur aktiviert und anschließend Tyramin (0,1 g/ml in HEPES, 0,1M, pH 5,2) kovalent an das Alginat gebunden. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag sorgfältig mit NaCl (0,9%, w/v) und DMEM/F12 mehrmals gewaschen, um die Reaktanden zu entfernen und einen physiologischen pH-Wert herzustellen. Anschließend wurden die Proben mit Matrigel (0,12 mg/ml in DMEM/F12) bei 37°C über mindestens 2,5 h beschichtet. Die hergestellten Gerüststrukturen wurden dann für Zellversuche mit hMSC und Kardiomyozyten (Cor.4U) verwendet. Die Versuche mit hMSC wurden mit einer 5 stündigen Beobachtung mittels der Lebendzell-Mikroskopie gestartet, dann in den Brutschrank überführt und weiterkultiviert. Nach 24 h und 72 h erfolgten die mikroskopische Dokumentation, sowie die Fixierung eines Teils der Proben für eine REM-Analyse (BD Cytofix, BD Biosciences). Die REM-Präparation und Analyse wurde von Frau Dr. Alisa Katsen-Globa (IBMT) durchgeführt. Nach 72 h wurden die restlichen Proben gewaschen und fixiert (BD Cytofix, BD Biosciences), um sie für eine Zytoskelett-Färbung zu nutzen. Vor der Färbung wurden die Proben mit PBS gewaschen und dann permeabilisiert (BD Perm Buffer, BD Biosciences), gefolgt von einer Inkubation in 1% BSA mit 0,2% Tween. Der Farbstoff für F-Aktin (Bodipy FL Phalloidin, invitrogen) wurde für mindestens 1 h mit den Proben inkubiert, wieder mit 1%iger BSA-Lösung gewaschen und der Kern mit NucBlue gefärbt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mittels der Biostation IM (Nikon).

Die Versuche mit den hiPSC-CMs (Cor.4U, Axiogenesis) wurden mit einer Zellzahl von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Struktur durchgeführt. Es wurde bei der Inokulation darauf geachtet, dass eine größtmögliche Zellzahl im Bereich der Struktur sedimentiert. Die Kultivierung der Proben erfolgte über 3 Wochen, wobei nach 1 d, 3 d, 7 d, 14 d und 21 d eine Dokumentation der Proben (Bilder und Bildsequenzen) erfolgte (Eclipse TE 2000). Die Schlagfrequenz wurde aus den Bildsequenzen manuell bestimmt. Es folgte eine Antikörperfärbung gegen  $\alpha$ -Actinin, um das Zytoskelett zu analysieren. Die Proben wurden hierfür zunächst fixiert (BD Cytofix, BD Biosciences). Vor der Färbung wurden die Proben mit PBS gewaschen und dann permeabilisiert (BD Perm Buffer, BD Biosciences), gefolgt von einer Inkubation in 1% BSA mit 0,2% Tween. Der primäre Antikörper (anti- $\alpha$  Actinin, Sarcomeric, 1:200 in der 1%igen BSA-Lösung, Sigma-Aldrich) wurde für mindestens 1 h mit den Proben inkubiert und nach weiteren Waschschritten mit 1%iger BSA-Lösung durch den sekundären Antikörper ersetzt (Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor® 488 conjugate, Invitrogen, 1:200 in 1%iger BSA-Lösung). Nach einer Inkubation von 1 h wurde wieder mit 1%iger BSA-Lösung gewaschen und der Kern mit NucBlue gefärbt. Die Dokumentation der Proben erfolgte mittels Konfokalmikroskopie (Nikon C1).

### 3.8 Destruktion von Alginat-Gerüststrukturen

#### 3.8.1 Chemische Degradierung von Ba-Alginaten

Für die Untersuchungen zur chemischen Degradierung wurden Alginatkugeln wie bereits beschrieben hergestellt (Abschnitt 3.3.2). Zur Verbesserung des Kontrasts wurden die Alginatkugeln mit Alzianblau 8 GX (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Hierfür wurden 100  $\mu$ l des in 70%igem Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelösten Farbstoffs mit 1 ml Alginatkugelsuspension hinzugegeben und für eine Stunde auf einem Orbitalrotator (Micro-Bio-Tec Brand, Gießen, Deutschland) mit 8-10 rpm bei Raumtemperatur durchmischt. Danach wurden die Proben zweimal mit isotoner Kochsalzlösung gewaschen und bis zur Nutzung bei 4°C gelagert.

Für die Fixierung der Alginatkugeln während des Versuchs wurde ein Silikonblock (6×6×1 mm, L×B×H) aus Sylgard 184 (1:10, Dow Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland) hergestellt und 4 Löcher mit einem Durchmesser von 2 mm ausgestanzt, die als Kavität für die Alginatkugeln dienten. Der Block wurde in eine Petrischale (35 cm Durchmesser, Corning) gelegt und mit einer Silikonbarriere (flexiPERM, Greiner

Bio-ONE) umrandet. Zur besseren Benetzung wurde das hydrophobe Silikon vor der Versuchsdurchführung mit Argon-Plasma (kinpen, neoplas tools GmbH, Greifswald, Deutschland) hydrophilisiert. Es wurden Testlösungen aus  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (Merck), EDTA (Sigma-Aldrich) mit den Konzentrationen 100 mM, 50 mM und 10 mM hergestellt. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Sigma-Aldrich) wurde in den Konzentrationen 0,8%, 0,4% und 0,1% durch Verdünnung der 30%igen Ausgangslösung mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  angesetzt. Die Alginatlyase (Sigma-Aldrich) wurde mit PBS (mit  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ) in den Konzentrationen 0,5 mg/ml, 0,05 mg/ml und 0,005 mg/ml angesetzt. Bei allen Lösungen wurde ein Osmolarität von 300 ( $\pm 10$ ) mosmol/kg mit NaCl eingestellt. Weitere Kontrolllösungen unterschiedlicher Osmolarität wurden mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  durch Zugabe von NaCl hergestellt: 1 osmol/kg, 0 osmol/kg und 0,3 osmol/kg.

Der Einfluss der Lösungen wurde in dem Silikonblock mit 10 Alginatkugeln mikroskopisch untersucht (Nikon Eclipse TE 2000-E) und fand bei 37°C statt. Vor Zugabe der jeweiligen Lösungen wurden die Proben für etwa 2 min in isotoner NaCl Lösung dokumentiert. Ein Volumen von 200  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Lösung (ebenfalls 37°C) wurde, nach Absaugen der isotonen NaCl-Lösung, während der Aufnahme auf die Alginatkugeln pipettiert und für 30 min dokumentiert. Die Zugabe einer isotonen NaCl-Lösung (Raumtemperatur) erfolgte nach 33 min. Der Einfluss dieses Schrittes wurde für weitere 27 min dokumentiert und das Experiment nach insgesamt 60 min abgeschlossen. Der Einfluss der Lösungen wurde anhand der Änderung der Alginatkugelfläche (zweidimensionale Fläche des Querschnitts der Alginatkugel in der Fokusebene) manuell mittels NIS-Elements (Nikon GmbH) quantifiziert und auf die Ausgangsgröße normiert.

Für die Versuche mit Vorinkubation wurden die Alginatkugeln nach Herstellung in drei verschiedenen Medien über 14 Tage bei 37°C gelagert: fetales Kälberserum (100%, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Standard-Kulturmedium für L929-Fibroblasten mit 10% FKS (siehe Abschnitt 3.1.1), sowie isotone NaCl-Lösung. Die Untersuchung der Degradierung erfolgte mit 0,05 mg/ml AlgL und entsprach der bereits beschriebenen Vorgehensweise.

### 3.8.2 Enzymatische Degradierung von Na-Alginaten

Die enzymatische Degradierung von Na-Alginaten wurde mit der bereits zuvor genutzten AlgL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) durchgeführt. Sofern nichts Anderes angegeben wird, wurde das Enzym in PBS (mit  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ) gelöst. Die Degradierungsreaktion wurde mittels UV/vis Spektroskopie (DU® 720, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 235 nm analysiert. Die bei der Degradierung ablaufende  $\beta$ -Reaktion liefert als Produkt 4-Deoxy- $\alpha$ -L-Erythro-Hex-4-Enopyranuronosyluronat, dessen ungesättigtes Uronat bei 230-235 nm detektiert werden kann [121, 321, 322]. Die genutzten 1 ml UV-Küvetten (Brand, Weinheim, Deutschland) wurden im Photospektrometer mit einem Peltierelement auf konstanter Temperatur gehalten.

Für die Untersuchung der Mischverhältnisse von LN und LT wurden Alginat mit einer Konzentration von 0,1% (w/v) miteinander gemischt. 200  $\mu\text{l}$  Alginat wurden dann mit 600  $\mu\text{l}$  PBS (mit und ohne  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ) in der Küvette gemischt und in das Spektrometer gestellt, die eine dreiminütige Messung gestartet und innerhalb der ersten 10 s 200  $\mu\text{l}$  AlgL hinzugegeben (0,25 mg/ml, gelöst in isotoner NaCl-Lösung). Als Blank wurde die Absorbanz unmittelbar vor Zugabe der AlgL gemessen. Die Auswertung erfolgte durch Bestimmung der Steigung der Absorbanz pro Minute und wird hier als Produktbildungsrate (PBR) bezeichnet.

Zur weiteren Untersuchung wurden mehrere Alginatchargen aus LN und LT (0,5% gelöst in isotoner NaCl-Lösung) mit der AlgL degradiert. 100  $\mu\text{l}$  der Alginatlösung wurden mit 700  $\mu\text{l}$  PBS (mit  $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ ) in einer Küvette gemischt und, wie zuvor beschrieben, die Absorbanz aufgenommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  AlgL (0,25 mg/ml in PBS) gestartet. Es wurde danach sowohl die PBR, als auch die absolute Absorbanz nach 3 min bestimmt.

Die Beeinflussung der Degradierung durch interagierende Substanzen wurde am Beispiel des pLL untersucht. Verschiedene Konzentrationen einer 700  $\mu\text{L}$  pLL (gelöst in ddH<sub>2</sub>O, Konzentrationen ausgehend von 0,01%) wurden vorbereitet. Hinzugegeben wurde eine LNT-Alginat Mischung (1:1, v/v, 0,1% w/v, gelöst in isotoner NaCl-Lösung). Die Messung erfolgte wie zuvor beschrieben im UV/vis Photospektrometer. Zur Degradierung wurde AlgL (0,14mg/ml gelöst in PBS (mit Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup>)) zum Reaktionsansatz gegeben.

### 3.8.3 Enzymatische Degradierung von Ba-Alginaten

Wie bei den Na-Alginaten wurde die Degradierung bei den Ba-Alginaten ebenso photospektroskopisch verfolgt. Na-Alginat (Na-LN, Na-LT, Na-LNT, 0,1%, w/v), sowie mit BaCl<sub>2</sub>-vernetzte (20 mM, 15 min) Ba-Alginat (Ba-LN, Ba-LT, Ba-LNT) wurden in einem Volumen von 200  $\mu\text{L}$  mit 600  $\mu\text{L}$  PBS (mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) und 200  $\mu\text{L}$  AlgL (0,25 mg/ml, in PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die genutzten LNT-Alginat entsprechen einer 1:1 Mischung (v/v) aus LN und LT. Die Absorbanz der Ansätze wurde danach bei 235 nm gemessen.

### 3.8.4 Wiedergewinnung von adhären immobilisierten L929 Fibroblasten

L929 Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in TCPS-Petrischalen (35 mm, Corning Inc., NY, USA) ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wurde dann durch 1 ml pLL-Lösung (0,0005%, in PBS) ersetzt und die Proben für 15 min im Brutschrank inkubiert, um positive Ladungen auf die TCPS-Oberfläche und Zellen aufzubringen. Die pLL-Lösung wurde entfernt und 1 ml LNT-Alginat in die Kulturschalen pipettiert (0,7% w/v, 1:1 Mischung). Die Vernetzung des Alginats wurde mit 2 ml einer BaCl<sub>2</sub>-Lösung (20 mM) mit 15 min Inkubation im Brutschrank durchgeführt. Die BaCl<sub>2</sub>-Lösung wurde entfernt und die Proben zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Parallel zu diesen Konditionen wurden zwei Kontrollen hergestellt. Als Kontrolle dienten Proben, die nur mit pLL behandelt, jedoch nicht mit Alginat beschichtet wurden. Die Proben wurden mittels automatisierter Lebzell-Mikroskopie (Biostation IM, Nikon Instruments Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland) untersucht und nach 20 h 1ml Kulturmedium mit 1 ml Kulturmedium mit 1 mg/ml AlgL (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland) ausgetauscht, so dass eine AlgL-Konzentration von 0,5 mg/ml vorliegt (Austausch des normalen Kulturmediums). Die Proben wurden für einen weiteren Tag beobachtet, bevor sie aus den Biostation IMs entnommen und die Zellen geerntet wurden. Die Zellsuspensionen wurden dann 2:10 (v/v) mit Kulturmedium verdünnt, in Kulturflaschen (Corning, NY, USA) ausgesät und über drei Tage mit einem Medienwechsel 24 h nach Inokulation kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in der Biostation CT (Nikon Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit Aufnahme von Bildern der Kultur alle 2 h. Die Bildsequenzen wurden danach mit der Bildanalyse-Software CT-AS (Nikon Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit einem Universalmakro für die Konfluenzbestimmung analysiert. Nach erfolgter Kultivierung wurden aus den Proben (unbehandelt und rekultiviert) Zellsuspensionen hergestellt und 2000 Zellen pro Nöpfchen (24x) in eine Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben. In weiteren 24 Nöpfchen wurden die Zellen zusätzlich mit 20% DMSO (WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach; Deutschland) als Negativ-Kontrolle kultiviert. Nach 24 h Kultivierung im Brutschrank wurde das Medium durch frisches Kulturmedium mit 10% alamarBlue®-Reagenz (invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt und für 4 h im Brutschrank kultiviert. Als Nullprobe wurde das Kulturmedium mit 10% alamarBlue®-Reagenz ohne Zellen mitgeführt. Die Proben wurden mit dem Multifunktions-Plattenleser Infinite Pro (Tecan, Maennedorf, Schweiz) analysiert. Als Parameter wurden 560 nm als Anregungs- und 610 nm als Emissionswellenlänge verwendet. Pro Nöpfchen wurden 9 Positionen gemessen und der Mittelwert bestimmt. Die Werte wurden durch Subtraktion der Nullprobe normalisiert.

### 3.9 Ansätze für die Voraussetzung einer automatisierten Untersuchung von Gerüststrukturen

#### 3.9.1 Zellpatrone (CellCartridge)

Die Entwicklung der Zellpatrone basiert auf dem Kryo-Substrat ICEBREAKER (Perma Cryo Technologie GmbH, St. Ingbert, Deutschland), das durch ein Septum im Schraubverschluss modifiziert wurde. Hierdurch ist es möglich, die sog. Zellpatrone mit einer Kanüle an eine Mikrofluidik anzuschließen. Die Mikrofluidik besteht aus drei per PC steuerbaren Spritzenpumpen (neMESYS, cetoni GmbH, Korbussen, Deutschland). Eine Spritzenpumpe wurde für den Transport der Zellsuspension, eine für die Zufuhr von frischem Zellkulturmedium und eine weitere für den Abtransport von Zellkulturmedium verwendet. Um die Medien in und aus einer Petrischale zu transportieren, wurde ein Deckel aus Edelstahl mit mehreren Zugängen angefertigt. Bei der Versuchsdurchführung wurden zunächst zwei Zellsuspensionen (2 ml) mit  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in Kulturmedium mit 5% DMSO (v/v, WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland) in der Zellpatrone mit  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  (Ice Cube 14S, SY-LAB Geräte GmbH, Neupurkersdorf, Österreich) eingefroren (auf  $-80^\circ\text{C}$ ) und danach im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Eine Zellsuspension wurde dabei zur Bestimmung der Vitalität benutzt, eine weitere zur anschließenden mikrofluidischen Prozessierung und Lebendzell-Mikroskopie. Die Bestimmung der Vitalität erfolgte vor und nach Kryokonservierung mit einer Trypanblau-Färbung. Die Zellpatrone wurde nach dem Auftauen mit einer Kanüle an die Mikrofluidik angeschlossen und in die automatisierten Mikroskope (Nikon Biostation IM) transportiert. Mit mehreren Medienwechseln durch die Mikrofluidik wurde das Kryoprotektiv ausgewaschen und die Proben über 24 h beobachtet. Die Anzahl der Medienwechsel wurde in Vorversuchen anhand der Osmolarität des Kulturmediums optimiert (Osmomat 030, Gonotec GmbH, Berlin Deutschland). Zur Kontrolle wurde eine Petrischale (3,5 cm Durchmesser) mit  $2 \times 10^5$  Zellen inokuliert. Es wurden alle 5 min Bilder der Kulturen aufgenommen. Nach Ende des Experiments wurde das Konfluenzverhalten der Kulturen mittels CellProfiler ermittelt.

#### 3.9.2 Erweiterte Mikroskopie (Augmented Microscopy)

Die Prototypen für die augmentierte Mikroskopie wurden mit der Skriptsprache Python (Version 2.7, The Python Foundation, [www.python.org](http://www.python.org)) implementiert. Der erste Prototyp (siehe Anhang, Seite 196) wurde auf Basis eines Inversmikroskop (TS-100, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) mit Phasenkontrast und einer mit Python ansteuerbaren USB-Kamera (DFK 72AUC02, The Imaging Source Europe GmbH, Bremen, Deutschland) implementiert. Die Implementierung wurde anhand von adhärenenten hiPSCs (Axio-genesis, Köln, Deutschland) in T175 Kulturflaschen, als auch auf Matrigel modifiziertem Alginat evaluiert.

Der zweite Prototyp (siehe Anhang, Seite 196) wurde in ähnlicher Weise mit der Skriptsprache implementiert und fokussierte auf die Analyse kontrahierender Kardiomyozyten. Als Basis fungierte die Geräteplattform der Biostation IM (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) mit 10-facher Vergrößerung, da hier physiologische Bedingungen während der Beobachtung aufrechterhalten werden können. Die notwendige Modifikation des Mikroskops bestand in dem Austausch der Originalkamera mit der bereits o. g. USB-Kamera. Die Evaluation des Prototyps erfolgte mittels adhärenter Kardiomyozyten auf Matrigel-beschichteten Petrischalen (35 mm Durchmesser, Corning Inc., NY, USA) bzw. auf Matrigel-modifizierten Alginat-Gerüststrukturen. Beide Prototypen wurden auf einem Standard-PC (Intel Pentium Dual Core 2,0 GHz, 2,0 GB RAM) implementiert.

### 3.9.3 Mini-GMP Labor im Beutel

Die Untersuchungen erfolgten im Rahmen des Fraunhofer Projekts „WISA LabBag“. Die Prototypen der Beutelsysteme wurden von den Projektpartnern des Fraunhofer IST, Fraunhofer IVV-DD und Fraunhofer IVV-FS hergestellt und für die Versuche zur Verfügung gestellt. Im Vorfeld wurden vom Fraunhofer IBMT zellbiologisch relevante Spezifikationen erarbeitet, die in die Konstruktion des Prototyps einfließen. Der hier verwendete Prototyp stellt durch die Nutzung einer Schale als Basis, sowie einer funktionalisierten Folie, eine Vorstufe des Beutelsystems dar. Die aufgesiegelte Folie wurde vom Fraunhofer IST mit einer hydrophoben Schicht modifiziert, auf die hydrophilen Spots mit einem Durchmesser von 6 mm aufgebracht wurden. In die Schale, die als Reservoir für das Kulturmedium dient, wurde ein Schraubverschluss eingelassen, um die Medien mit einer Pipette in bzw. aus dem Beutel zu befördern. Die Prototypen wurden mittels UV-Bestrahlung (15 min, beide Seiten) sterilisiert. Die Formierung von „hängenden Tropfen“ als Kultivierungssystem zur Herstellung von hiPSC-Aggregaten wurde mit den hiPSCs AXAi und ER19/18 evaluiert. Die hiPSC-Kolonien wurden zur Inokulation mit TrypLE dissoziiert und mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml in die Beutel gegeben. Das verwendete Inokulationsvolumen betrug 10 ml pro Beutel. Pro Versuchsserie wurden fünf Beutel je Zelllinie verwendet. Die Zellsuspension wurde vorsichtig über die chemisch strukturierte Folie geschwenkt (Folie nach unten gerichtet), um die hydrophilen Spots mit der Zellsuspension zu benetzen. Der Beutel wurde dann herumgedreht (Folie nach oben gerichtet und so die Kultivierungsform des „hängenden Tropfens“ eingestellt. Parallel wurden manuell gesetzte „hängende Tropfen“ in einer 10 cm Petrischale mitgeführt. Es wurden mit der o. g. Zellsuspension manuell 20  $\mu$ l Tropfen auf den Deckel einer Petrischale gesetzt, und dieser auf die Schale aufgesetzt, so dass die Tropfen „hängen“. Die Schale wurde zur Verringerung der Verdunstung mit 10 ml DMEM/F12 befüllt. Als 2D-Kontrolle diente eine Matrigel-beschichtete Petrischale (6 cm Durchmesser), die mit  $5 \times 10^5$  Zellen in 5ml Kulturmedium inokuliert wurde. In die Kulturmedien wurde ROCK-Inhibitor zur Verminderung der Apoptose gegeben. Die Proben wurden für 72 h im Brutschrank kultiviert.

Die Morphologie der Aggregation wurde nach 24 h und 72 h mikroskopisch dokumentiert und manuell ausgewertet (NIS-Elements, Nikon Instruments Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland). Eine Überprüfung der Membranintegration erfolgte durch eine FDA/EB Färbung (siehe Abschnitt 3.2.1).

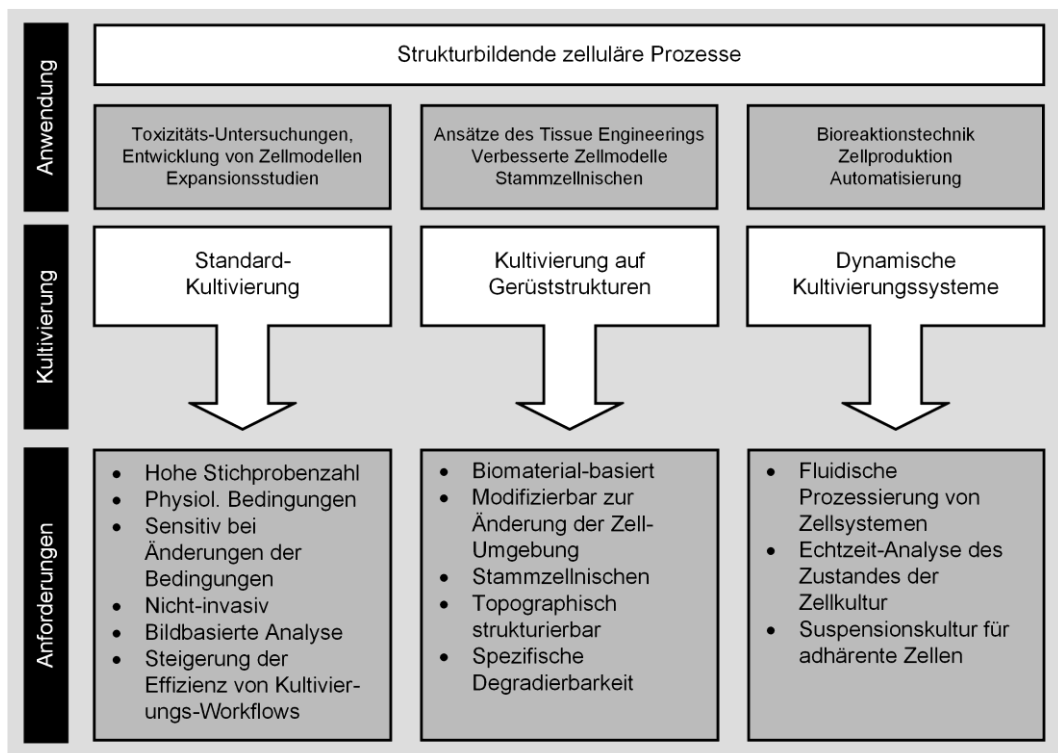
Die Möglichkeit, Gerüststrukturen in dem Beutel-basierten System zu optimieren wurde anhand von Alginate-basierten Mikroträgern (siehe 3.7.5) und hiPSC (AXAi, siehe Absatz 3.1.3) untersucht. Das Verhältnis Zellen zu Oberfläche wurde auf  $6 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  eingestellt und als 10 ml Suspension vorbereitet. Analog zu den Versuchen ohne Mikroträger wurde die Suspension in die Beutel transferiert und die hängenden Tropfen durch vorsichtiges Schwenken über das Spot-Layout erzeugt. Die restliche Suspension wurde aus dem Beutel entfernt und der Boden mit 10 ml Basalmedium befüllt. Die Beutel wurden über 48 h kultiviert, die Aggregate geerntet und mit FDA/EB (siehe Abschnitt 3.2.1) gefärbt, um die Zellen zu detektieren.





# 4. Ergebnisse

Zu Beginn dieser Arbeit wurden strukturbildende zelluläre Prozesse in den Kontext biotechnologischer Anwendungen gesetzt und gemäß ihrer Kultivierungsform charakterisiert (siehe Abbildung 13). Die Anwendungen lassen sich in drei Kultivierungsformen klassifizieren (Standard, auf Gerüststrukturen und dynamisch) die eine bestimmte Anforderungen erfüllen müssen um therapeutisch relevante Zellsysteme (wie z. B. hMSCs oder hiPSCs) kultivieren zu können. Im Laufe dieser Arbeit sollen für diese Kultivierungsformen und die definierten Anforderungen Lösungsansätze untersucht werden. Bei der Standard-Kultivierung wird der Fokus auf der Untersuchung und Entwicklung von nicht-invasiven bildgebenden Verfahren zur Analyse von zellulärem Verhalten liegen. Die Kultivierung von Gerüststrukturen befasst sich eingehend mit der Modifikation (Biofunktionalisierung), aber auch Degradierung von Alginat-Hydrogelen. Schließlich soll auf Grundlage der erzielten Ergebnisse ein Transfer auf dynamische Kultivierungssysteme erfolgen.



**Abbildung 13: ÜBERSICHT VON STRUKTURBILDENDEN ZELLULÄREN PROZESSEN IM KONTEXT DER VORLIEGENDEN ARBEIT.** Strukturbildenden zelluläre Prozesse sind in den unterschiedlichsten biotechnologischen Anwendungen präsent. Bei der Standard-Kultivierung, der Kultivierung auf Gerüststrukturen, aber auch in dynamischen Kultivierungssystemen liegt weiterhin erhebliches Optimierungspotenzial, das in dieser Arbeit untersucht werden soll. Anhand der definierten Anforderungen sollen hierfür Lösungsansätze entwickelt werden.

Zunächst soll die Implementierung und Evaluation eines neuen parallelisierten Lebendzell-Mikroskopieansatzes dargestellt werden. Diese Methodik soll im weiteren Verlauf zur Untersuchung des zellulären Verhaltens auf modifizierten Alginate-Hydrogelen genutzt werden. Weiter werden dann Untersuchungen beschrieben, die auf eine Biofunktionalisierung von ultra-hoch viskosen Alginaten abzielen. Die vielversprechendste Methode soll dann für weitere Untersuchungen zu strukturbildenden zellulären Prozessen genutzt werden. Ferner soll geklärt werden, inwieweit sich diese Gerüststrukturen degradieren lassen, um Zellsysteme für weitere Prozessschritte zugänglich zu machen. Abschließend sollen Ansätze untersucht werden, die eine automatisierte Herstellung von Zellmodellen unterstützen können.

#### **4.1 Implementierung und Charakterisierung eines quantitativen Systems für die Untersuchung zellulärer strukturbildender Prozesse**

Dieser Teil der Arbeit befasst sich mit der Entwicklung eines Mikroskopie-Systems für die Untersuchung von dynamischen zellulären Prozessen. Das System (Abschnitt 3.4) wird aus technischer und biologischer Sicht charakterisiert und es werden Kerneigenschaften herausgearbeitet. Im weiteren Verlauf dieses Abschnitts werden Arbeitsabläufe zur Analyse dynamischer zellulärer Prozesse unter der Verwendung verschiedener Zellsysteme präsentiert und schließlich untersucht, inwieweit sich aus Zeitrafferaufnahmen aus einem parallelisierten Mikroskopiesystems biologische Fragestellungen beantworten lassen.

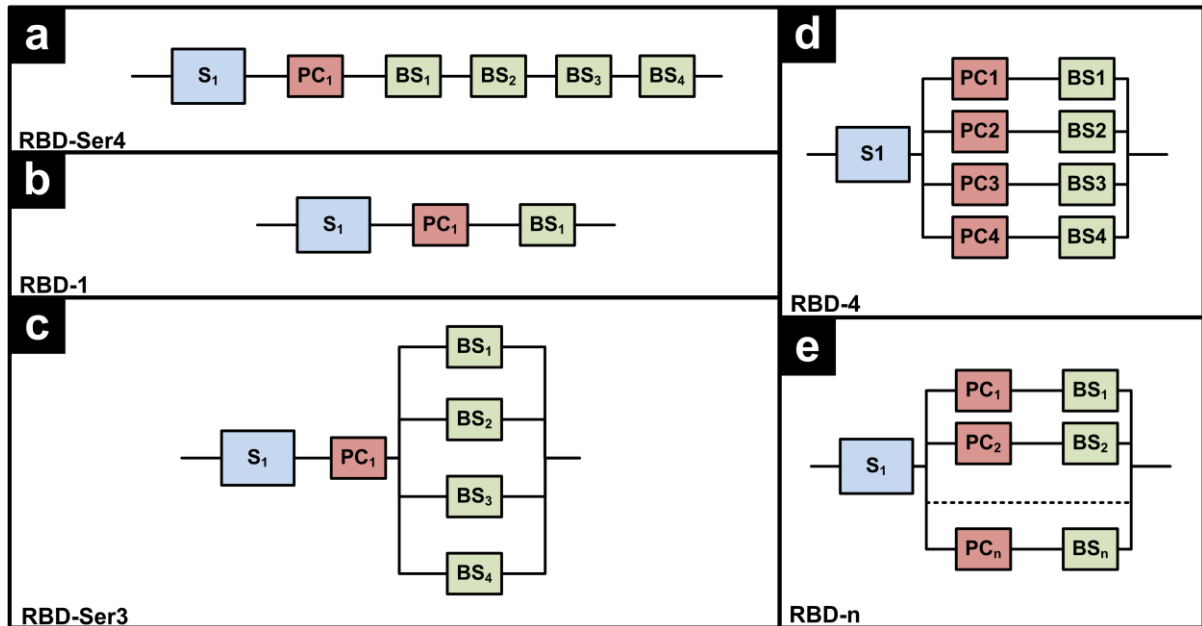
##### **4.1.1 Implementierung und Charakterisierung eines Mikroskopie-Systems für zelluläre strukturbildende Prozesse.**

##### **4.1.2 Integration in Laborinfrastruktur**

Die Integration eines Mikroskopiesystems in eine bestehende Laborinfrastruktur mit modularen automatisierten Mikroskopen konnte erfolgreich etabliert werden. Die einzelnen Mikroskope werden von einem zentralen Arbeitsplatz gesteuert, dem, entsprechend der Anzahl der Mikroskope, ein Steuerungs-PC zugeordnet ist. Dies erschien auf den ersten Blick nachteilig, da hierfür ein entsprechender Platz vorhanden sein musste, hat sich jedoch bei den experimentellen Arbeiten durchaus bewährt. Die einzelnen Module konnten jeweils für verschiedene Konditionen, aber auch für die parallele, unabhängige Untersuchung gleicher Konditionen zur Erhöhung der biologischen Stichprobe verwendet werden. Durch die Modularität konnten einzelne Geräte aus dem System entfernt (z. B. Nutzung in anderen Laboren, Reparaturen, etc.) werden, ohne die Funktionalität zu beeinträchtigen.

##### **4.1.3 Verfügbarkeit des Systems**

Die Verfügbarkeit eines Systems ist ein wichtiger Parameter, um die gewünschten Prozesse effizient ausführen zu können. Die Mikroskopiesysteme ließen sich anhand eines Blockdiagramms abstrahieren, wie in Abbildung 14 gezeigt ist. Die Anordnung des Mikroskopiesystems dieser Arbeit ist in Abbildung 14 d bzw. e dargestellt.



**Abbildung 14: AUSEFALLSICHERHEITS-BLOCKDIAGRAMM (RBD) DES MIKROSKOPIESYSTEMS.**  
*a* System mit 4 seriell angeordneten Komponenten. *b* System mit einer Komponente. *c* System mit 4 parallel angeordneten Komponenten und einem PC. *d* System mit 4 parallel angeordneten Komponenten und einem jeweils zugeordneten PC. *e* System mit *n* parallel angeordneten Komponenten. Abkürzungen: S = Stromversorgung, PC = Steuer-PC, BS=Mikroskopie-Modul.

Bei seriellen Systemen (vgl. Abbildung 14 a, b und c) berechnet sich die Verfügbarkeit nach der Formel [323]:

$$R_S = R_1 \cdot R_2 \cdot \dots \cdot R_N = \prod_{i=1}^N R_i$$

Ist die Verfügbarkeit in allen Komponenten ( $R_S$ ) gleich, so gilt demnach

$$R_S = R^N$$

Für ein redundantes System, welches erst komplett ausfällt, wenn alle Komponenten ( $R_i$ ) ausfallen, gilt die Abschätzung [323]

$$R_S = 1 - \prod_{i=1}^N (1 - R_i)$$

Das Mikroskopiesystem, besteht aus drei Hauptkomponenten, die entweder seriell, parallel oder kombiniert, angeordnet sind. Bei einer Zuverlässigkeit von 95% für jede Komponente (vereinfachte Annahme), ergibt sich aus den Formeln, unter der Annahme, dass die Strom- und CO<sub>2</sub>-Versorgung konstant verfügbar ist, folgende Gesamtzuverlässigkeit des Systems:

### Beispiel 1 – Serielle Anordnung der Mikroskope

Die serielle Anordnung von Komponenten hat für die Zuverlässigkeit des Systems einen starken Einfluss. Beispielsweise ist bei einer Virtualisierung aller Mikroskope mit einem zentralen Server der Steuerungs-PC

$$R_{\text{seriell}} = 0,95 \cdot 0,95 \cdot 0,95 \cdot 0,95 = 0,95^4 = 0,814$$

## Beispiel 2 – Parallele Anordnung der Mikroskope

Durch die parallele Anordnung eines Systems kann eine Steigerung der Zuverlässigkeit erreicht werden. Die Übertragung dieser Abstraktion auf das reale Beispiel der automatisierten Mikroskopie kann dies illustrieren. Bei seriellen Systemen (beispielsweise der Inkubationsroboter Biostation CT) hat ein Ausfall einer Hardwarekomponente (z. B. Beleuchtungseinheit, Roboterarm) einen Ausfall des Komplettsystems zur Folge, da keine Redundanz besteht. Die Proben können nicht mehr *nacheinander* in dem System prozessiert werden. Anders gestaltet sich dies bei einem System, das aus mehreren redundanten Einheiten besteht. Parallelisierte Mikroskope können auch bei einem Ausfall einer Mikroskopeinheit die übrigen Proben weiter prozessieren, da sie als unabhängige Subsysteme arbeiten. Die in Beispiel 1 gezeigte Konfiguration würde bei einer parallelen Anordnung eine Zuverlässigkeit von

$$R_{parallel} = 1 - 0,05^4 = 0,9999$$

vorliegen.

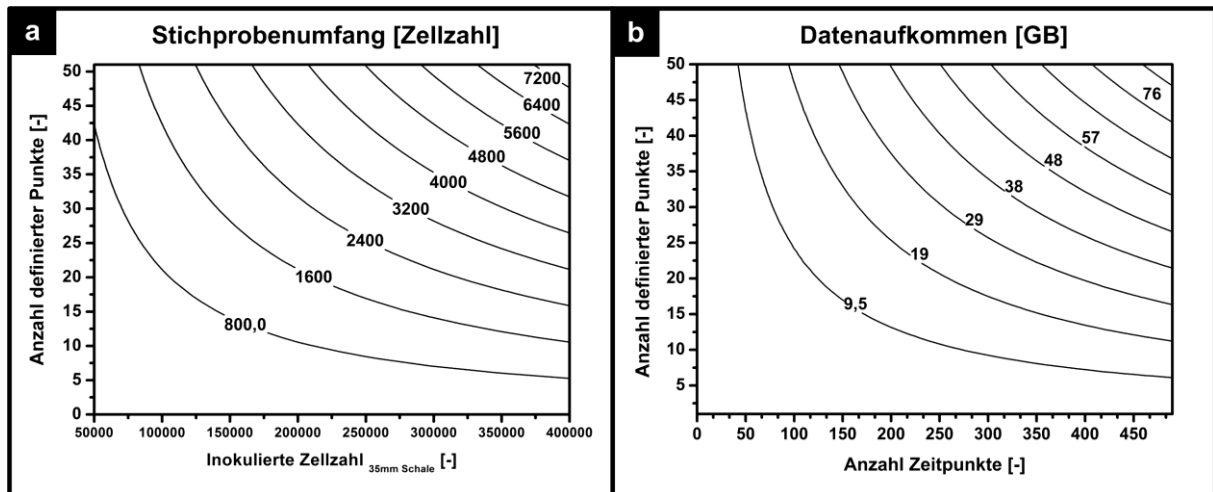
### 4.1.4 Experimentelle Setups und Skalierbarkeit

Die Untersuchung von Zellkulturen unter bestimmten Bedingungen konnte mit dem Mikroskopiesystem auf mehrere Arten erfolgen. Die erste Variante beinhaltete die Untersuchung einer bestimmten Kondition in einem Mikroskop. Hierdurch können so viele Konditionen untersucht werden, wie Mikroskope zur Verfügung stehen. Die zweite Variante beinhaltete die parallelisierte (redundante) Untersuchung einer einzigen Kondition. Der Vorteil dieser Vorgehensweise besteht in der höheren Ausfallsicherheit, sowie des größeren Stichprobenumfangs der in einem einzigen Ansatz generiert werden konnte. Je nach Art und Umfang des Mikroskopie-Systems sind auch Kombinationen der Setups möglich.

Die Skalierbarkeit des Systems blieb durch den Aufbau des Gesamtsystems erhalten. Die zentralen Elemente wie Versorgung mit CO<sub>2</sub>, Steuerungs-PC und Datenspeicher sind nahezu beliebig erweiterbar. Ebenso sind die einzelnen Mikroskopiemodule aus dem System entfernbar, wie z. B. in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, ohne dass die Gesamtfunktionalität beeinträchtigt wird. Das Entfernen einer Einheit kann zum einen für eine Kooperation bzw. eine Multi-Center Studie oder auch für Reparaturen erfolgen. Das System ist somit hoch- und runterskalierbar und erhält dadurch eine hohe Flexibilität bei der Planung von Experimenten.

### 4.1.5 Biologische Stichprobe und Datenvolumen

Für das implementierte Mikroskopiesystem wurden sowohl die absolute Zellzahl, die beobachtet werden kann, als auch das aufkommende Datenvolumen abgeschätzt (Abbildung 15 a). Je nach Anzahl von inokulierten Zellen und beobachteten Bildausschnitten ist bereits mit einem Mikroskop eine sehr große biologische Stichprobe realisierbar, die sich durch die Anzahl der Mikroskope entsprechend vervielfachen lässt (mehr Punkte). Bei einer Inokulation von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Petrischale sind bei einer Anzahl von 35 Punkten etwa 2000 Einzelzellen im Datensatz enthalten. Die Wahrscheinlichkeit auch (seltene) biologische Ereignisse zu beobachten, wird durch die hohe Anzahl an beobachteten Zellen erhöht. Bei einem fiktiven zellulären Ereignis, das nur bei 2% der Zellen einer Kultur auftritt, sind bei dieser Stichprobe zumindest 40 Datensätze des Ereignisses auswertbar. Die Herausforderung dabei besteht in der Detektion des Ereignisses selbst, da eine manuelle Analyse nicht effizient erfolgen kann, eine automatisierte Analyse jedoch, je nach Ereignis, mit einer Art künstlicher Intelligenz ausgestattet werden muss, damit beispielsweise unbekanntes zelluläre Ereignisse als solche detektiert werden können.



**Abbildung 15: ABSCHÄTZUNGEN STICHPROBE (ZELLZAHL) UND DATENVOLUMEN.**

**a** Abschätzung des Stichprobenumfangs in Abhängigkeit von inokulierten Zellen und definierten Punkten. Die Werte basieren auf der Wachstumsfläche von  $9 \text{ cm}^2$  (35 mm Kulturschale) und zehnfacher Vergrößerung. Die Punkte können in einem einzelnen Mikroskopiemodul oder einem Mikroskopieensemble definiert sein. Bei einer inokulierten Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  Zellen und 15 definierten Punkten kann beispielsweise abgeschätzt werden, dass bei Start des Experiments 800 Zellen beobachtet werden können. **b** Abschätzung des Datenaufkommens in Abhängigkeit von der Anzahl der Zeitpunkte und der Anzahl der definierten Punkte. Die Werte basieren auf Experimenten mit einem Mikroskopiemodus (Phasenkontrast) und einer Auflösung von  $1600 \times 1200 \text{ px}$ . Bei einem Experiment mit 200 Zeitpunkten und 25 definierten Punkten kann beispielsweise ein Datenvolumen von 19 GB abgeschätzt werden.

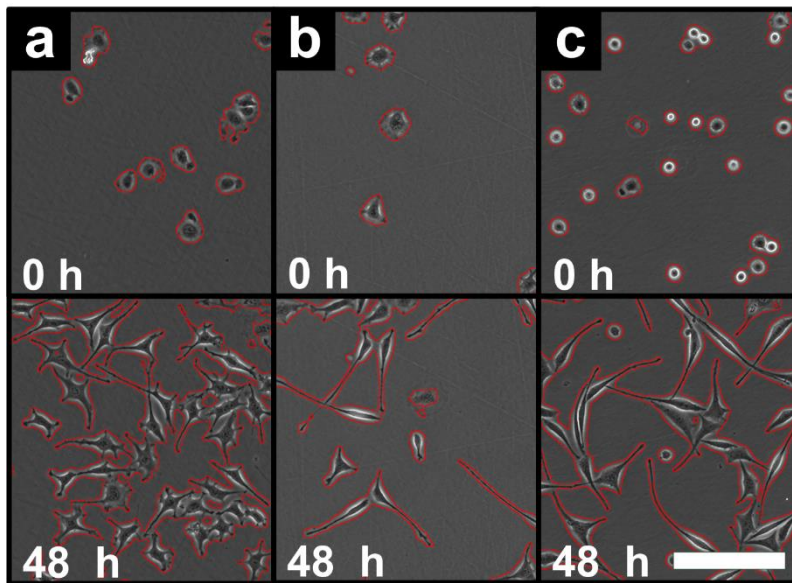
Bei einem parallelisierten Mikroskopiesystem stellt das Volumen der produzierten Datenmengen (vgl. Abbildung 15 b) ebenso eine wichtige Rolle dar, da die Datenmengen auf Servern gespeichert werden müssen. Bei reiner Phasenkontrast-Mikroskopie ohne Fluoreszenzkanäle sind bei einer Anzahl von 200 Zeitpunkten (Wert für z.B. ein durchschnittliches zweitägiges Experiment), bei 40 definierten Punkten etwa 30 GB an Rohdaten zu erwarten, die für eine Analyse in Bilddateien umgewandelt werden müssen. Bei einer Nutzung von drei Modulen des Mikroskopiesystems kommen somit bei einem einzigen Experiment 0,1 TB zusammen. Serverinfrastruktur und Backupstrategie müssen für diese Menge entsprechend ausgelegt sein, um z. B. eine Langzeitspeicherung garantieren zu können. Die Handhabung dieser Datensätze, sowie deren Analyse spielt neben dem eigentlichen Experiment eine große Rolle, da die Arbeitsabläufe darauf abgestimmt werden müssen. Die initialen Experimente fokussieren daher nicht nur auf die zellbiologischen Fragestellungen, sondern stellen auch eine Untersuchung der Arbeitsabläufe für die Handhabung und Analyse solcher Datenmengen dar. Exemplarisch soll diese Untersuchung anhand von strukturbildenden Prozessen ohne Gerüststruktur erfolgen.

## 4.2 Untersuchung von strukturbildenden zellulären Prozessen ohne Gerüststruktur

In diesem Abschnitt werden strukturbildende Prozesse von verschiedenen zellulären Systemen ohne die Anwesenheit von komplexen Gerüststrukturen untersucht. Die durchgeführten Experimente und auch die entwickelten Methoden sollen zur Optimierung der in den Folgekapiteln beschriebenen Gerüststrukturen dienen. Die verwendeten Zellsysteme sind in diesem Feld weit verbreitet, unterscheiden sich aber in der Komplexität ihrer Kultivierungsumgebung signifikant. Murine L929 Fibroblasten sind eine sehr gute Zelllinie, um erste Entscheidungen über die Qualität einer Kultivierungsform zu erhalten, da diese nur minimale Ansprüche an ihre ECM haben und eine reproduzierbare Kultivierung erlauben.

#### 4.2.1 Adhäsionsverhalten von Fibroblasten mittels qPH-Mikroskopie

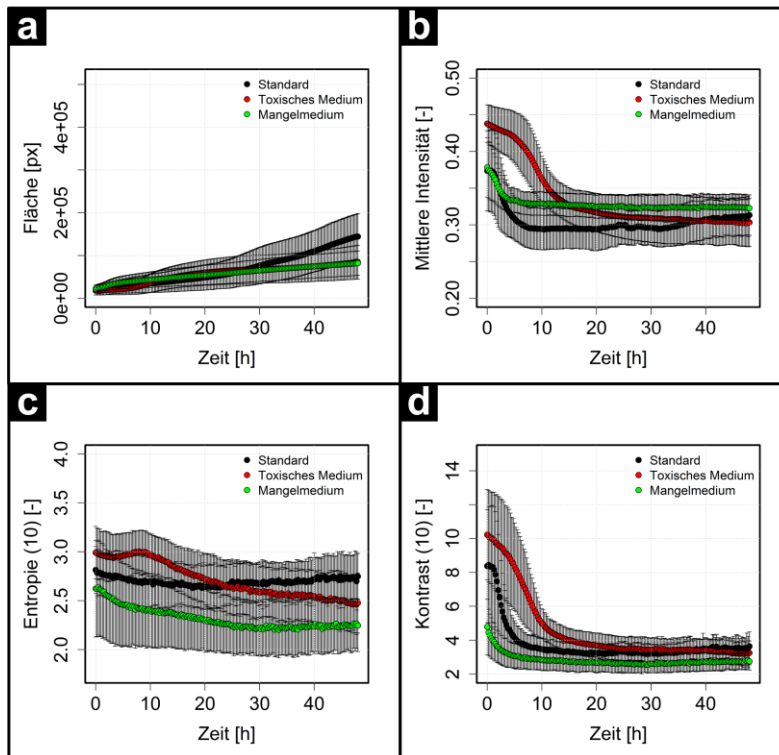
Die Kultivierung erfolgte im Standardkulturmedium, in Kulturmedium ohne FKS und in Standardkulturmedium mit 3% DMSO. Die Wahl der Medien wurde so gewählt, dass bestimmte Effekte der Zellen sehr wahrscheinlich waren, sei es durch den Entzug des Serums oder die (toxische) Wirkung von DMSO. Die Untersuchung erfolgte in einem parallelisierten Ansatz mit dem implementierten Mikroskopiesystem, wobei pro Kondition und Experiment 48 Punkte auf der Kulturschale beobachtet wurden. Die Analyse des zellulären Verhaltens erfolgte manuell, sowie durch automatisierte Bildanalyse. Bei der automatisierten Bildanalyse wurden zwei Ansätze verfolgt, bei denen es zu prüfen galt, ob die erzielten Resultate mit dem realen Zellverhalten korrelierten.



**Abbildung 16: MORPHOLOGIE DER FIBROBLASTEN BEI UNTERSCHIEDLICHEN KULTIVIERUNGSMEDIEN.**  
*a* Fibroblasten in Standardkulturmedium nach 0 bzw. 48 h Inkubation.  
*b* Fibroblasten in Kulturmedium ohne Serum nach 0 bzw. 48 h Inkubation.  
*c* Fibroblasten in Standardkulturmedium mit 3% DMSO nach 0 bzw. 48 h Inkubation. Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

Die Kultivierung der Fibroblasten in Standardkulturmedium (*Standard*, siehe Abbildung 16 a) wurde als Referenzkondition verwendet. Bei der manuellen Analyse der Bildsequenzen erkannte man das typische Verhalten von adhären Zellen: unmittelbar nach der Inokulation lagen die Zellen abgerundet auf der Kulturoberfläche und begannen innerhalb der ersten 1-3 h auf der Oberfläche zu adhären und sich auszubreiten. Nach dieser Phase begannen die Zellen auf der Kulturoberfläche zu migrieren und zu proliferieren, was zu einer Zunahme der Zellfläche auf der Kulturoberfläche führte. Es war eine für Fibroblasten als typisch zu bezeichnende Morphologie zu erkennen, d. h. ein zentraler Zellkörper mit Kern und mehr als drei Lamellipodien (*Scheinfüßchen*). Ebenso fand man eine gestreckte Morphologie vor, bei der sich die Fibroblasten spindelförmig ausbreiteten. Die Mitose der Fibroblasten zeichnete sich durch eine kurzzeitige Änderung der Morphologie aus, bei der sich eine adhären Zelle abkugelte (Prophase, Metaphase und Anaphase), sich langsam teilte (frühe und späte Telophase) und Mutter- und Tochterzelle wieder auf dem Substrat adhären (Interphase). Die Zellen besaßen bei der Zellteilung, wie auch kurz nach Inokulation, eine hohe Intensität, hervorgerufen durch einen weißen Rand (engl.: *halo*), der durch den genutzten Phasenkontrast zustande kommt.

Die Kultivierung der Fibroblasten in Medium ohne fetales Kälberserum, FKS, (*Mangelmedium*, siehe Abbildung 16 b) zeigte eine schnellere Adhäsion und Ausbreitung der Zellen auf der Kulturoberfläche. Die Zellen waren schon zu Beginn des Experiments ausgebreitet. Im Gegensatz zum Standardkulturmedium war nur ein geringes Migrationsverhalten der Zellen zu beobachten und ebenso waren kaum Zellteilungen zu verzeichnen. Über die Zeit gesehen war die Morphologie ähnlich zu der im Standardkulturmedium, mit der Ausnahme, dass die Fibroblasten im Mangelmedium extrem lange Ausläufer bildeten.



**Abbildung 17: VERLAUF DER EIGENSCHAFTEN IN DEN KULTUREN ÜBER DIE ZEIT MIT SEGMENTIERUNG.**

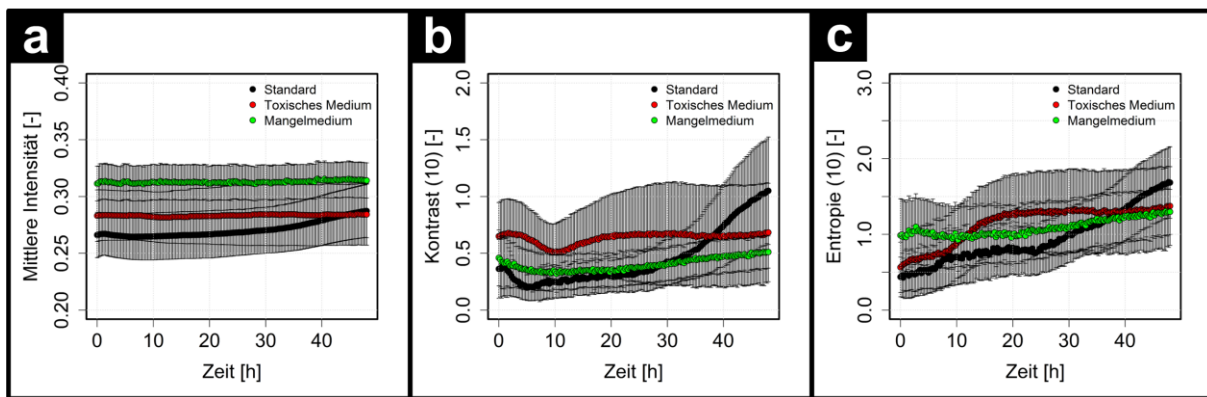
*a* Fläche der Zellen (Konfluenz) über die Zeit, *b* Mittlere Intensität der Zellfläche über die Zeit, *c* Kontrast der Zellfläche über die Zeit, *d* Entropie der Zellfläche über die Zeit. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3 \times 48$ .

Bei der Kultivierung der Zellen in Kulturmedium mit 3% DMSO (toxisches Medium, siehe Abbildung 16 c) war eine morphologische, als auch eine Änderung des generellen Zellverhaltens zu beobachten. Die Zellen blieben lange in einem abgerundeten Zustand, bevor sie auf der Kulturfläche adhärten. Nach der Adhäsion war eine für Fibroblasten atypische Morphologie zu beobachten. Die Zellen wuchsen spindelförmig mit teilweise extrem langen Membranfortsätzen. Ebenso war eine Migration und Proliferation der Zellen kaum zu beobachten. Auffällig war die Bildung von Vesikeln im Zellinnern.

Zur quantitativen Bestimmung des Verlaufs der untersuchten Kulturen wurde ein Prozess entwickelt, der automatisch die Einzelbilder segmentiert, quantifiziert und Graphen zur Analyse ausgibt. Die segmentierte Fläche wurde zur Analyse der Konfluenz verwendet, die als Maß für die Adhäsion und Proliferation genutzt werden konnte. Abbildung 17 a zeigt den Verlauf der bewachsenen Kulturfläche, also des sog. biologischen Vordergrunds. Die Ergebnisse spiegeln die Beobachtungen wider, die bereits durch die manuelle Analyse der Bildsequenzen gemacht wurden. Die Zellen im Standard-Kulturmedium adhärten und begannen sich nach etwa 10 h zu teilen, was sich in einer Zunahme der Konfluenz äußerte. Bei dem Medium ohne FKS erfolgte ebenso eine Adhäsion, durch die fehlenden Faktoren des Serums erfolgte jedoch keine Proliferation der Zellen und die Konfluenzkurve stagnierte bzw. stieg nur minimal an. Ähnliches konnte bei einem Standard-Kulturmedium mit FKS beobachtet werden, was zusätzlich mit 3% DMSO versetzt wurde. Dieser Zusatz bewirkte gemäß den Daten, dass die Zellen adhärten, jedoch keine Proliferation aufwiesen, da die Konfluenzkurve ebenfalls stagnierte. In der Phase kurz nach Inokulation konnte eine weitere stationäre Phase gemessen werden, die auf den verlängerten Adhäsionsprozess schließen ließ, der bereits in den Bildsequenzen beobachtet werden konnte. Zusätzlich zur Fläche wurde die mittlere Intensität des biologischen Vordergrunds quantifiziert (Abbildung 17 b). Diese gab Aufschluss über mindestens zwei Zustände: nicht adhärente Zellen (hohe Intensität) und adhärente Zellen (niedrige Intensität). Die Daten ließen auch hier die biologischen Prozesse ableiten: die Kulturen mit Standard-Kulturmedium bzw. Medium ohne FKS zeigten direkt zu Beginn einen Abfall der Intensitätswerte, was auf den Adhäsionsprozess zurückzuführen war. Danach stagnierten die Werte, da die Zellen in diesem Zustand verblieben und mögliche Teilungen, bei denen die Zellen wiederum eine hohe Intensität hatten, durch die mittlere Intensität nicht erfasst werden konnten. Die mittlere Intensität bei den Kulturen im Standard-



Kulturmedium stieg nach etwa 30 h wieder leicht an, was z. B. auf die steigenden Zell-Zell-Kontakte zurückzuführen war (beobachtet in der manuellen Auswertung der Bildsequenzen), die mit einem hellen Bereich zwischen den Zellen einherging. Bei den Kulturen mit 3% DMSO stagnierte die mittlere Intensität zu Beginn der Zeitreihe, was durch die verzögerte Adhäsion zu erklären ist. Durch die folgende langsame Ausbreitung der Zellen fiel auch dieser Wert auf etwa das Niveau der Standard-Kultur. Abbildung 17 c zeigt den Verlauf der Entropie in den untersuchten Bedingungen. In Standard-Kulturmedium und Kulturmedium ohne FKS war der Kurvenverlauf leicht abfallend bzw. stagnierte nach kurzer Zeit. Bei der Kultivierung der Zellen in Medium mit 3% DMSO war in der initialen Phase der Kultivierung ein leichter Anstieg der Werte zu beobachten, die dann abfallen und stagnierten. Die verzögerte Adhäsion konnte somit durch die Entropie unter diesen Bedingungen abgebildet werden. Bei der Analyse des Kontrastes der segmentierten Bereiche war bei allen Kurvenverläufen ein Abfallen der Werte zu beobachten, die dann in eine stationäre Phase bis zum Ende des Experiments übergingen (Abbildung 17 d). Der Abfall der Werte erfolgte in Korrelation mit dem manuell beobachteten Zellverhalten während der Adhäsion. Die Zellen mit Kulturmedium ohne FKS adhärten am schnellsten, gefolgt von den Zellen in Standard-Kulturmedium. Der Kurvenverlauf mit der geringsten Steigung lag bei den Zellen in Kulturmedium mit 3% DMSO vor. Auch hier wurde die verzögerte Adhäsionszeit durch den Verlauf des Kontrasts über die Zeit abgebildet.



**Abbildung 18:** VERLAUF DER EIGENSCHAFTEN IN L929-KULTUREN ÜBER DIE ZEIT OHNE SEGMENTIERUNG.

*a* Mittlere Intensität der Gesamtbilder über die Zeit, *b* Kontrast der Gesamtbilder über die Zeit, *c* Entropie der Gesamtbilder über die Zeit. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3 \times 48$ .

Eine weitere Analyse wurde ohne Segmentierung mit den Eigenschaften des Gesamtbilds durchgeführt und mittlere Intensität, Kontrast und Entropie über den Verlauf des Experiments bestimmt (Abbildung 18). Bei der Quantifizierung der mittleren Intensität des Gesamtbilds war bei dem Kulturmedium ohne FKS bzw. mit 3% DMSO ein stagnierender Kurvenverlauf zu beobachten, der auf die ausbleibende Proliferation schließen lässt. Helle abgerundete Zellen zu Beginn, insbesondere bei der Kultivierung in 3% DMSO, spiegelten sich nicht im Kurvenverlauf wider. In Standardkulturmedium war dieser Verlauf ähnlich, wobei nach 24 h ein Anstieg der Intensität zu verzeichnen war (Abbildung 18 a). Dieser Anstieg korrelierte mit der beginnenden Proliferation der Zellen, die dann, charakteristisch für den Phasenkontrast, einen weißen Rand besaßen, der sich in der Konsequenz aufaddierte und durch den Intensitätswert detektiert wurde. Der Kontrast des Gesamtbildes hingegen zeigte unterschiedliche Kurvenverläufe (Abbildung 18 b). Beim Medium ohne FKS erfolgte nach einem Abfall zu Beginn ein stetiger Anstieg der Werte. Bei dem Kulturmedium mit 3% DMSO fiel der Kontrastwert zunächst ab, steigt dann wieder an und stagnierte dann auf diesem Niveau. Dies lässt sich mit der Adhäsionsphase und Ausbreitung der Zellen korrelieren. Analog konnte dieser Verlauf auch bei dem Standard-Kulturmedium beobachtet werden, wobei sich nach der stationären Phase ein Anstieg der Werte anschloss, die mit der Proliferation korrelierte. Bei der Entropie des Gesamtbildes ließen sich ähnliche Verläufe beobachten (Abbildung 18 c). In Kulturmedium ohne FKS änderte sich die Entropie nur minimal und war durch einen leichten Anstieg der Werte gekennzeichnet. Einen charakteristischen Kurvenverlauf konnte man bei Medium mit 3% DMSO beobachten. Die Entropie



stieg zunächst verzögert an, zeigte dann einen rapiden Anstieg, der von einer stationären Phase mit zum Experimentende gefolgt wurde. In Standardkulturmedium war ein langsamer Anstieg der Entropie bis 24 h nach Beginn des Experiments zu verzeichnen, der in der Folge stärker anstieg. Die beginnende Zellproliferation ging mit diesem Verlauf, wie zuvor bei dem Kontrast beobachtet, einher.

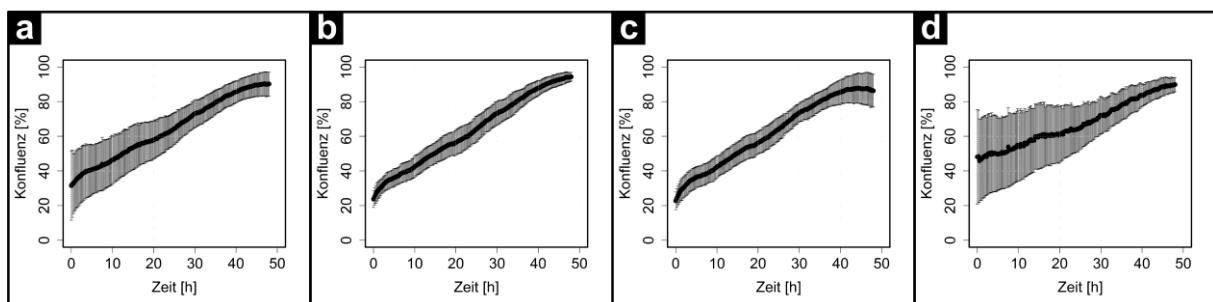
Abschließend kann anhand der Ergebnisse geschlussfolgert werden, dass durch die Hinzunahme von sowohl Texturereigenschaften der segmentierten Fläche, als auch des Gesamtbildes, Informationen über den Zustand der Kultur abgeleitet werden können, die aus der Analyse der konfluenten Fläche nicht abgebildet werden. Insbesondere die benötigte Zeit zur Adhäsion und die einsetzende Proliferation der Zellen können hierdurch bestimmt werden. Ferner ist die Gesamtbildanalyse eine schnelle und effiziente Methode, um Unterschiede in den Kulturen durch den Verlauf zu detektieren.

#### 4.2.2 Adhäsionsverhalten von multipotenten Stammzellen mittels qPH-Mikroskopie

In diesem Teil soll untersucht werden, ob eine Kombination von automatisierter Lebendzell-Mikroskopie und automatisierter Bildanalyse bei mesenchymalen Stammzellen (hMSC) geeignet ist, um das biologische Verhalten auf Oberflächen abzuleiten. Es soll hierbei zunächst das Verhalten auf Plastik-Oberflächen untersucht werden.

##### Adhäsionsverhalten auf TCPS Oberfläche

Die hMSCs wurden auf TCPS Oberflächen kultiviert und analog zu dem vorherigen Abschnitt die aufgenommenen Bildsequenzen analysiert. Die Analyse (siehe Abbildung 19 a-d) zeigte, dass der Verlauf der Kulturen mittels dieser Methode sehr gut abgebildet werden konnte. Abbildung 19 a und b zeigen ähnliche Verläufe von zwei unabhängigen Experimenten, bei denen 3 Phasen abgeleitet werden konnten. In den ersten Stunden (bis ca. 5 h) war ein starker Anstieg der Konfluenz zu verzeichnen, was nach Durchsicht der Bilddaten die Adhäsionsphase der Zellen beinhaltete. Es folgte eine Phase des linearen Wachstums, dem Ausbreiten und Proliferation der Zellen, der in einem Gleichgewichtszustand (vollständiges Ausfüllen des Bildausschnitts) endete. Der vergleichbare Startpunkt der Konfluenz (ca. 20%) ließ zusätzlich auf eine vergleichbare Zellzahl schließen. Das dritte Experiment in Abbildung 19 d zeigte hingegen nur zwei detektierbare Phasen mit einer flacheren Steigung im linearen Bereich. Höhere Schwankungen zwischen den einzelnen Punkten konnten gemessen werden. Aufgrund des teilweise sehr geringen Kontrastes der Zellen zur Wachstumsoberfläche bedingt durch die Flachheit der Zellen sind Artefakte im Bereich der Zellränder zu verzeichnen, die zu einer Untersegmentierung führen.



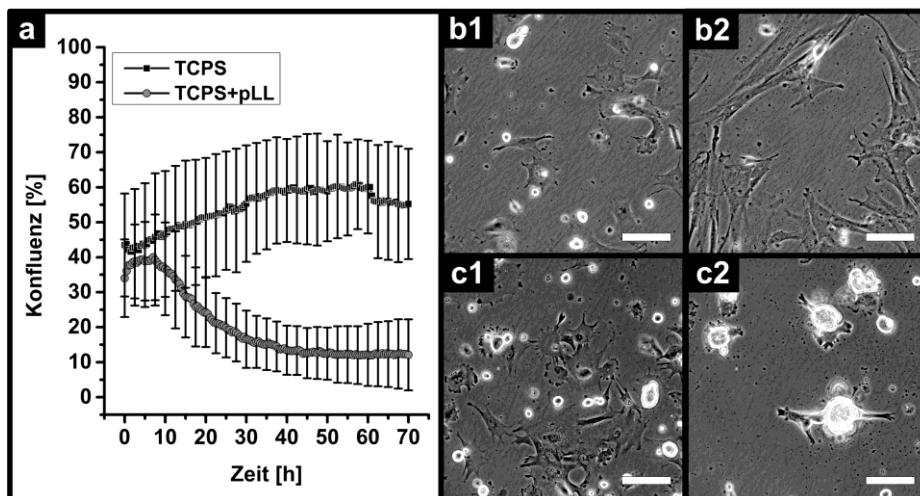
**Abbildung 19: KONFLUENZVERHALTEN VON hMSCs AUF TCPS OBERFLÄCHE.**

**a** Konfluenzverhalten über die Zeit der in **b-d** dargestellten Verläufe, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD. Ausgehend von den ausgewählten FOVs sind geringe Schwankungen zu beobachten, die die biologische Aussage, der Ausbreitung und Proliferation der Zellen nicht beeinflusst. Anhand der Daten kann ein stetiges Wachstum des Zellrasens abgeleitet werden.

### Adhäsionsverhalten auf polykationischen Oberflächen

Nachdem im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass das Verhalten von hMSC-Kulturen generell mittels qPH-Mikroskopie analysiert werden kann, sollte im weiteren Verlauf überprüft werden, ob diese Methode sensitiv gegenüber Änderungen der zellulären Umgebung ist, um diese Ergebnisse in die spätere Entwicklung der Gerüststrukturen einfließen zu lassen. Die Zellen wurden auf einer positiven Oberfläche (mit pLL) im Vergleich zur Standard TCPS Oberfläche kultiviert und die resultierenden Bildsequenzen analysiert. Die hieraus abgeleiteten Verläufe der Konfluenz zeigten, wie bereits im vorherigen Abschnitt, ein stetiges Ansteigen der Werte, wenn die Zellen auf Standard TCPS kultiviert wurden. Bei einer zusätzlichen Beschichtung von TCPS mit pLL war ein anderer Verlauf zu verzeichnen. Die Werte stiegen zunächst an, fielen jedoch nach 5 h kontinuierlich ab (siehe Abbildung 20 a).

Zieht man den Verlauf der Konfluenz der Kultur auf pLL-TCPS für die Analyse in Betracht, so ist insbesondere das Verhalten der Zellen im Zeitraum 7 h bis 20 h nach Inokulation interessant, da hier offensichtlich eine Änderung des Konfluenzverhaltens eintrat. Aufgrund der Daten kann man davon ausgehen, dass die Zellen entweder absterben oder sich von der Oberfläche wieder ablösen. Anhand der Bilddaten konnte diese Änderung weiter aufgeklärt werden. Die Zellen adhärten und breiteten sich auf der Oberfläche aus (Abbildung 20 c1), ähnlich wie auf der Standard-TCPS Oberfläche (Abbildung 20 b1 und b2). Danach lösten sich die Zellen von der Oberfläche ab, jedoch nicht in Form von Einzelzellen. Zellen, die über die Oberfläche migrierten, interagierten dabei mit weiteren Zellen, die noch auf der Oberfläche adhärten (Abbildung 20 c2). Im weiteren Kultivierungsverlauf bildeten sich auf diese Art kleinere multizelluläre Aggregate, die letztendlich den Abfall der Konfluenzwerte erklärten. Interessant hierbei war, dass die Aggregate durch die untere Zellschicht noch immer an der Oberfläche minimal adhärten.



**Abbildung 20: MESENCHYMALE STAMMZELLEN AUF POLYKATIONISCHER OBERFLÄCHE.**

**a** Verlauf der Konfluenz von hMSCs auf Standard TCPS (stetiges Wachstum) und pLL-beschichtetem TCPS (Anstieg mit folgendem Abfallen der Konfluenzwerte), dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=4$ . **b** Morphologien der hMSC auf Standard TCPS, **c** Morphologien der hMSCs auf pLL-TCPS. Bild 1: 0 h, Bild 2: 54,5 h. Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast verändert. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m.

#### 4.2.3 Adhäsionsverhalten von pluripotenten, multizellulären hiPSCs mittels qPH-Mikroskopie

Dieser Abschnitt behandelt die Untersuchung des Verhaltens von multizellulären hiPSC mittels der Lebzell-Mikroskopie. Die Analyse des Adhäsions- und Wachstumsverhaltens dieser Zellen ist ein wichtiger biologischer Wert für die Charakterisierung von Kulturoberflächen, Kulturmedien oder Zellexpansionsmethoden.

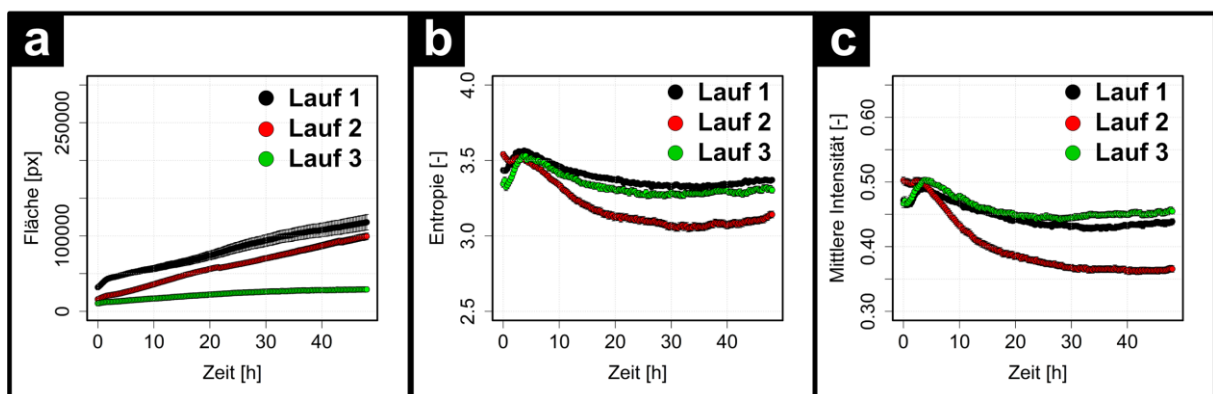
## Manuelle Beobachtungen

Das zelluläre Verhalten während der Adhäsions- und Expansionsphase wurde zunächst manuell begutachtet. Die Entscheidung, ob eine Kolonie adhärierte oder nicht, ist bei manueller Betrachtung trivial. Die Kolonien sedimentierten nach Aussaat auf der beschichteten Kulturoberfläche, adhärten und breiteten sich in der Folge aus. Nicht adhärierende Kolonien hingegen blieben morphologisch kolonieförmig in Suspension. Eine Dynamik der Kolonie, hervorgerufen durch die lebenden Zellen in der Kolonie konnte bei den Kolonien, die nicht adhärten nur begrenzt festgestellt werden. Nach einer bestimmten Zeit war die Kolonie statisch und desintegrierte. Eine Veränderung der Koloniefäche über die Zeit war nicht mehr zu beobachten.

## Automatisierung der Bildanalyse

Auch bei diesen Zellsystemen konnte der bereits zuvor entwickelte Arbeitsablauf zur Bildanalyse angewendet werden. Die Mikroskopbilder wurden, wie bereits in Abschnitt 4.2.1 gezeigt, mit *ilastik* klassifiziert und die quantitativen Daten mit Cellprofiler berechnet. Die Prozessierung der Daten mit der Skriptsprache R wurde erfolgreich adaptiert und konnte sowohl für die einzelnen Bildsequenzen, als auch für die Zusammenfassung aller Daten genutzt werden. Analyse von hiPSC-Kolonien über die Zeit mit Segmentierung.

Abbildung 21 a zeigt, dass bei Lauf 1 und 3, im Gegensatz zu Lauf 2, eine verringerte Adhäsion der Zellen vorlag. Dies korrelierte mit der manuellen Analyse der Daten, bei der beobachtet wurde, dass mehr Kolonien in Lauf 2 anwuchsen. Zog man weitere Eigenschaften der segmentierten Fläche, wie die Entropie (Abbildung 21 b) und mittlere Intensität (Abbildung 21 c) hinzu, so wurde diese Beobachtung weiter untermauert. Die größte Änderung der Entropie lag bei Lauf 2 vor, was die Ausbreitung widerspiegelte. Der Kurvenverlauf der mittleren Intensität war ähnlich. Durch die morphologischen Eigenschaften lagen mehr ausgebreitete dunkle Zellen vor, was mit einer geringen mittleren Intensität einherging. Im Gegensatz hierzu war bei Lauf 1 und 3 eine höhere mittlere Intensität zu verzeichnen, was von den hellen, nicht adhären Zellen hervorgerufen wurde. Sowohl bei der Entropie, als auch bei der mittleren Intensität war ein charakteristischer Peak am Anfang des Experiments zu beobachten. Dieser spiegelte die Adhäsionsphase der Kolonien wider und konnte auf einen Zeitraum von 5 bis 15 h eingegrenzt werden. Diese Information war dagegen bei der Konfluenzanalyse (Abbildung 21 a) nicht extrahierbar.

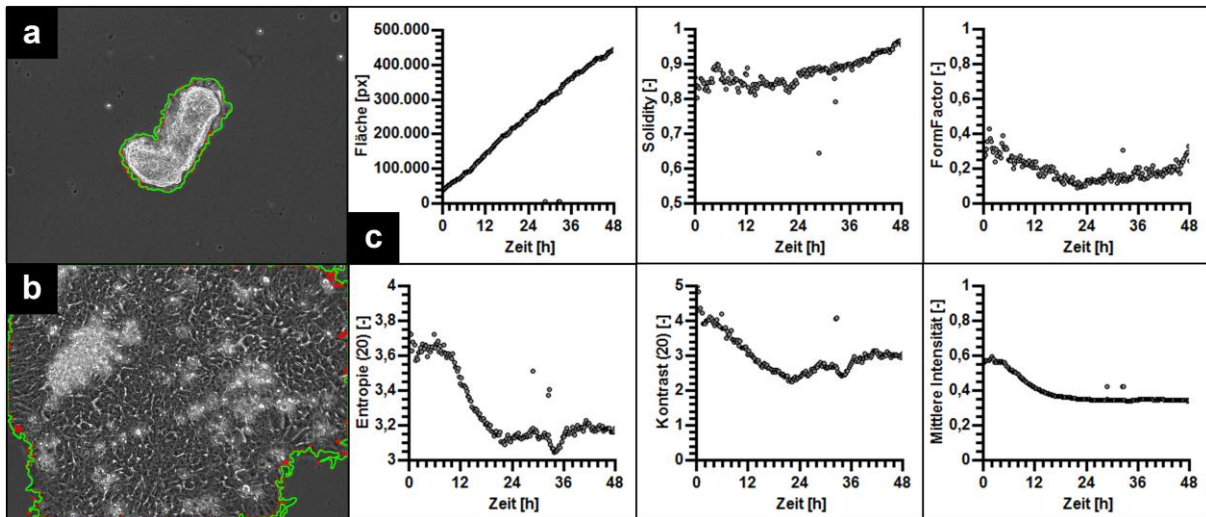


**Abbildung 21:** ANALYSE DER DREI UNTERSUCHTEN PASSAGEN ÜBER DIE ZEIT.

**a** Verlauf der detektierten Fläche über die Zeit als Mittelwert der observierten Ausschnitte  $\pm$  SEM der einzelnen Läufe.

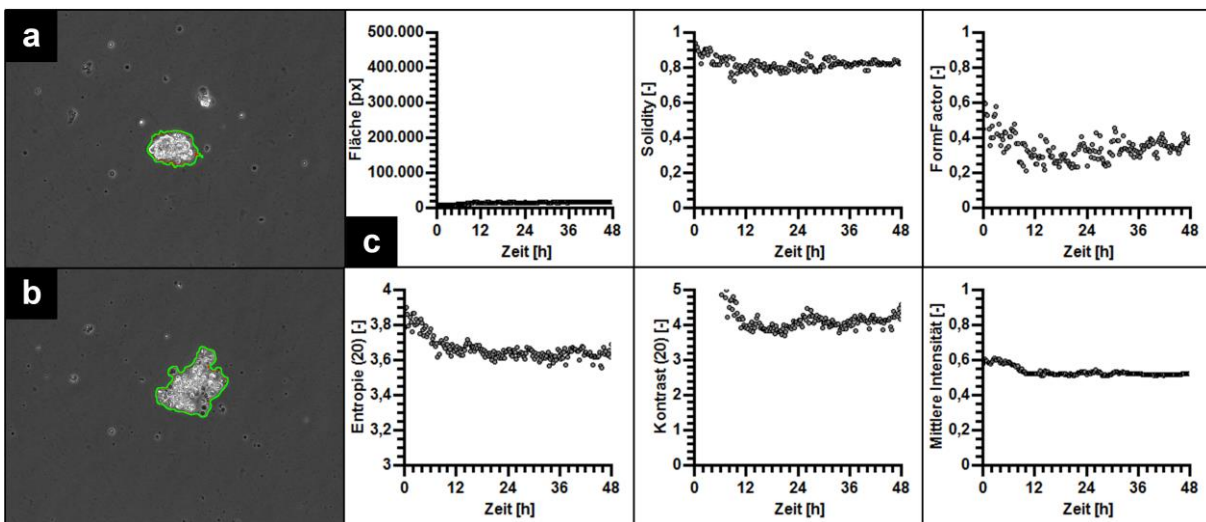
**b** Mittlere Entropie der detektierten hiPSC über die Zeit, dargestellt als Mittelwert der observierten Ausschnitte  $\pm$  SEM der einzelnen Läufe.

**c** Verlauf der mittleren Intensität der detektierten hiPSC über die Zeit, dargestellt als Mittelwert der observierten Ausschnitte  $\pm$  SEM. Der SEM wurde hier zur besseren Darstellung verwendet.



**Abbildung 22: ADHÄRIERENDE UND PROLIFERIERENDE hiPSC-KOLONIE.**

Bildanalyse von hiPSC und berechnete Parameter. **a** hiPSC zum Zeitpunkt  $t=0$  h, **b** hiPSC zum Zeitpunkt  $t=48$  h. **c** Berechnete Parameter der segmentierten hiPSC über die Zeit.



**Abbildung 23: NICHT ADHÄRIERENDE hiPSC-KOLONIE.**

Bildanalyse von hiPSC und berechnete Parameter:

**a** hiPSC zum Zeitpunkt  $t=0$  h, **b** hiPSC zum Zeitpunkt  $t=48$  h. **c** Berechnete Parameter der segmentierten hiPSC über die Zeit.

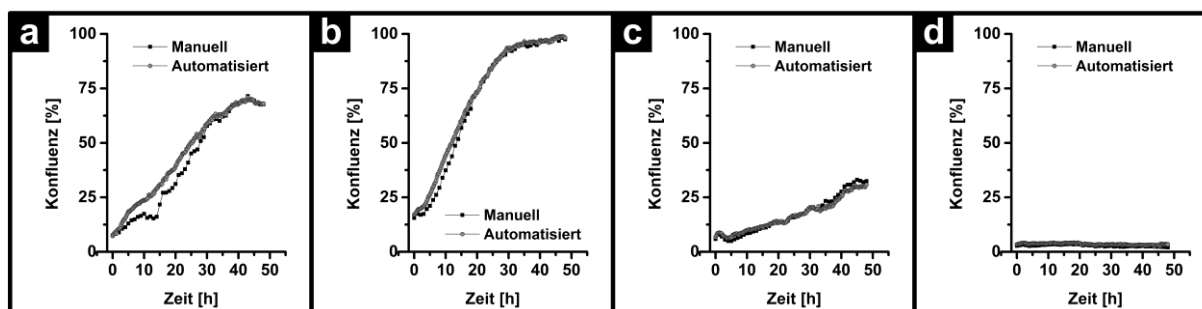
Eine detailliertere Betrachtung des Wachstumsverhaltens von Kolonien anhand der Evaluation mehrerer morphologischer und Textur-basierter Parameter bestätigte diese Beobachtung. Abbildung 22 zeigt den Verlauf mehrerer Parameter am Beispiel einer adhätierenden und proliferierenden Kolonie. Abbildung 23 zeigt dagegen eine nicht adhätierende Kolonie. Die Parameter Fläche (*Area*), *Solidity*, *Formfactor*, *Entropie*, *Kontrast* und *mittlere Intensität* (Erläuterung siehe Anhang, Seite 195) wurden vergleichend betrachtet. Die charakteristischsten Kurvenverläufe waren bei Fläche, Entropie und Intensität zu verzeichnen und sind in Abbildung 21 als Mittelwerte der Läufe illustriert. Die übrigen Parameter lieferten zwar auch Informationen über die Morphologie, waren jedoch durch die Größe der Kolonie nur eingeschränkt nutzbar. Dies traf dann zu, wenn die Kolonie beispielsweise die Ränder des Bildausschnitts erreicht, da die meisten morphologischen Parameter den Randbereich des untersuchten Objekts charakterisieren.

Die Analyse der Konfluenz der hiPSC Kolonien zeigte, dass die Methode auch für die Analyse des Adhäsionsverhaltens von diesem Zellsystem geeignet war und der vollständige Arbeitsablauf der Bildanalyse

durchgeführt werden konnte. Die hier erhobenen Daten zeigten jedoch auch, dass bei den verschiedenen Läufen unterschiedliche Wachstumsverhalten beobachtet werden können.

### Vergleich automatisierte Analyse vs. manuelle Analyse

Der Vergleich manuelle gegen automatisierte Auswertung lieferte Rückschlüsse über die Genauigkeit der Methoden. Abbildung 24 zeigt die Auswertung von Bildsequenzen mit hiPSCs, die sowohl manuell, als auch automatisiert analysiert wurden. Die Wachstumskurve in Abbildung 24 a zeigt größere Unterschiede im Bereich von 5 bis 25 h die etwa in einem Bereich von 10-15% liegen. Im weiteren Verlauf nähern sich die Werte wieder an und verlaufen nahezu parallel.



**Abbildung 24: MANUELLE VS. AUTOMATISIERTE AUSWERTUNG.**

**a** Größere Abweichungen von etwa 10-15% zwischen den Zeitpunkten 10-20 h. Geringe Unterschiede zeigten sich bei den Datensätzen mit einer **b** normal wachsenden Kolonie, **c** langsam wachsenden Kolonie und **d** nicht adhärenente Kolonie.

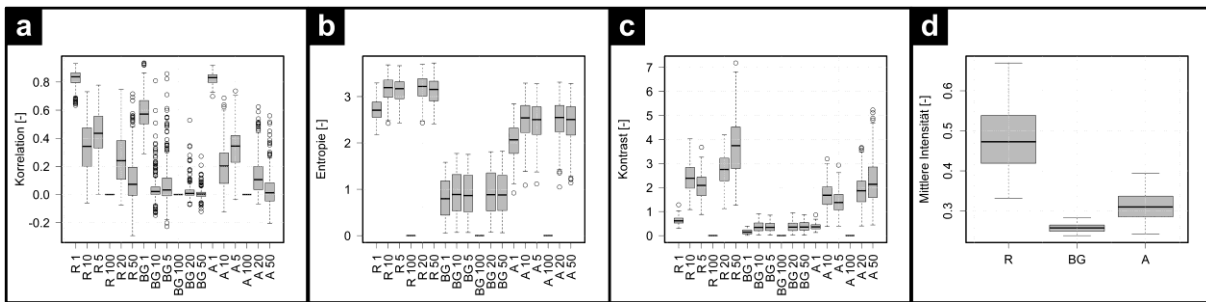
Die subjektive Klassifizierung von Bereichen am Rand der Kolonie führte hierbei zu diesem Ergebnis. Die weiteren untersuchten Kolonien (siehe Abbildung 24 b-c) zeigten solche Unterschiede nicht: sowohl der Kurvenverlauf als auch die Einzelpunkte korrelieren hier mit einem nur geringen Unterschied von etwa 1%. Die Vergleichbarkeit der Methoden wurde auch durch die hohe Korrelation von nicht adhärenente Kolonien (Abbildung 24 d) bestätigt. Tabelle 6 zeigt die prozentualen Unterschiede der Messungen, berechnet aus dem Mittelwert aller Datenpaare. Die Unterschiede fielen generell sehr gering aus und belegen die hohe Korrelation von manueller und automatisierter Analyse. Die Messungen belegten ferner, dass die hier implementierte automatisierte Analyse des Koloniewachstums mit der manuellen Analyse eines zellbiologischen Experten fast identische Daten generiert. Die Erhöhung des Durchsatzes und die dafür benötigte Zeit verschieben die Vorteile jedoch auf die Seite der automatisierten Analyse.

**Tabelle 6:** Vergleich von manueller und automatisierter Auswertung anhand der Differenz der beiden Messungen. Gezeigt ist der Mittelwert aller Bildpaare  $\pm$  SD ( $n=49$ ).

Kolonie ID	Ursprungsgröße [ $\mu\text{m}^2$ ]	Prozentuale mittlere Abweichung der Konfluenz von manueller und automatisierter Analyse [%]	SD mittlere Abweichung von manueller und automatisierter Analyse [%]
V1_P4 (Abb. 24 a)	23133	-4,5	3,8
V3_P4	21815	0,8	1,2
V3_P7	12134	1,5	1,0
V1_P8 (Abb. 24 b)	47607	-2,7	2,5
V1_P21 (Abb. 24 d)	8357	-0,7	0,3
V2_P15	6073	1,8	1,6
V1_P26	30220	0,2	2,1
V1_P9 (Abb. 24 c)	17924	-0,1	1,5

## Evaluation von Texturparametern für die Charakterisierung von hiPSC

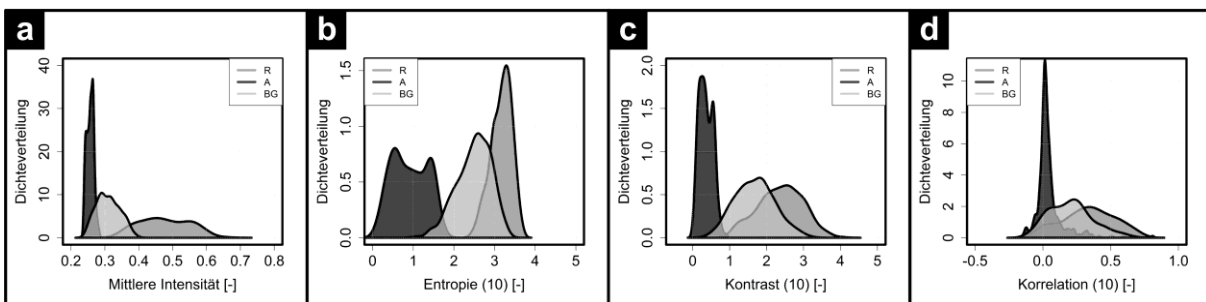
Die Analyse von hiPSC Zellsystemen anhand von Textur-Parametern stellt einen neuen Ansatz in diesem Feld dar. Es ist offensichtlich, dass hiPSC-Kolonien je nach zellulärem Zustand eine unterschiedliche Textur besitzen. Ebenso ist ein Unterschied bei dem Vergleich der Textur von Kulturschale und biologischer Probe erkennbar. Unter Berücksichtigung der zuvor durchgeführten Experimente, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Vorgänge während der Kultivierung von hiPSC nicht nur durch morphologische Parameter, sondern auch durch Textur-Parameter abgebildet werden können. Zur Überprüfung der Hypothese wurden Teilausschnitte von hiPSC Phasenkontrastbildern mit einer Dimension von  $100 \times 100$ px erzeugt und in die Kategorien „rund“ (R), „Hintergrund“ (BG) und „adhärent“ (A) eingeteilt und vorsortiert. Mittels CellProfiler wurden die Bildausschnitte ohne Segmentierung prozessiert und die extrahierten Textur-Parameter analysiert.



**Abbildung 25:** TEXTUR hiPSC ANHAND VERSCHIEDENER TEXTUR-EIGENSCHAFTEN UND PARAMETER DER GLCM UND DER INTENSITÄT.

*a* Korrelation, *b* Entropie, *c* Mittlere Intensität und *d* Kontrast. Abkürzungen R=abgerundete Zellen, BG=Hintergrund, A=adhärenten Zellen.

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der Bildanalyse bzgl. der Parameter Korrelation, Entropie, mittlere Intensität und Kontrast (Erklärung der Parameter im Anhang, Seite 195). Die Grauwertmatrix (*Gray-level co-occurrence matrix*, GLCM) wurde mit unterschiedlichen Pixelabständen (1, 5, 10, 20, 50 und 100) berechnet. Der aus der GLCM berechnete Parameter Korrelation (Abbildung 25 a) zeigt, dass die 3 Klassen durch die Korrelation nicht in ein eindeutiges Wertespektrum eingeordnet werden können und sehr hohe Variationen durch den gewählten Abstand für die Berechnung der GLCM hervorgerufen werden. Analoge Messergebnisse konnten bei der Bestimmung des Kontrasts erzielt werden (Abbildung 25 c). Durch die Anwendung der Formel für die Entropie ergaben sich eindeutige Werte für die drei Klassen (Abbildung 25 b). Die Bilder mit runden Zellen haben, nahezu unabhängig von der Wahl des Pixel-zu-Pixel-Abstandes, für die Berechnung der GLCM, einen sehr hohen Entropiewert. Einen etwas geringeren Wert wiesen die Bilder mit den adhärennten hiPSC auf. Den geringsten Entropiewert wies der Hintergrund auf.

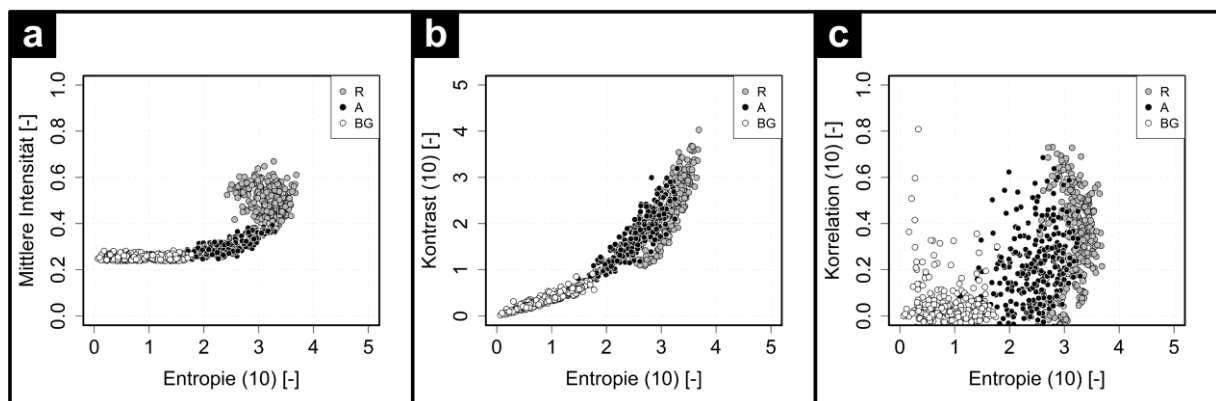


**Abbildung 26:** TEXTUR hiPSC ANHAND VERSCHIEDENER TEXTUR-EIGENSCHAFTEN UND PARAMETER DER GLCM.

*a* Mittlere Intensität, *b* Entropie, *c* Kontrast und *d* Korrelation als Verteilungen der Bildausschnitte mit runden Zellen („R“, dunkelgrau), adhärennten Zellen („A“, schwarz) und dem Hintergrund („BG“, hellgrau).

Der Hintergrund, d. h. die Kulturoberfläche zeigte ein homogenes Bild, mit nur wenigen Unregelmäßigkeiten. Dahingehend war durch die Ausbildung von biologischen Strukturen der Wert des Chaos in der Konsequenz bei den runden und den adhärenen Zellen höher angesiedelt. Bei der mittleren Intensität spiegelte sich diese Anordnung ebenfalls wider (Abbildung 25 d).

Die daraus ermittelten Parameter der Textur und Intensität erlaubten die Aufstellung von Regeln zur Charakterisierung, die für die spätere Anwendung z. B. auf die Gesamtkolonie bzw. den Zeitverlauf einer Kolonie während des Experiments genutzt werden konnten. Bei den partitionierten Mikroskopiebildern zeigten sich mehrere Parameter, die für die Ableitung von Regeln geeignet sind. Die mittlere Intensität, Entropie, Korrelation und der Kontrast, sowie die Kombination dieser Parameter erlaubten eine Unterscheidung von Hintergrund, adhärenen Zellen und abgerundeter Zellen. Jeder Parameter für sich gesehen erlaubte eine Klassifizierung in mindestens zwei Klassen. Eine differenziertere Analyse war aufgrund der Überlagerung der Parameter in bestimmten Wertebereichen nicht möglich. Abbildung 26 zeigt die ermittelten Histogramme der Texturparameter mit den entsprechenden biologischen Objekten. Abbildung 26 a zeigt die Verteilung der mittleren Intensität der drei untersuchten Klassen. Bilder, die Hintergrund und adhärenente Zellen beinhalteten, besaßen ihre Maxima im Bereich von 0,25 bis 0,35, also im Bereich der Pixel von niedriger Intensität. Die runden Zellen hingegen zeigten eine breite Intensitätsverteilung von 0,35 bis 0,65, wobei die Breite der Verteilung durch die Mischung von runden Zellen, adhärenen Zellen und Hintergrund zustande kam. Eine Trennung kann z. B. bei einer mittleren Intensität von 0,4 vorgenommen werden. Die Entropie (Abbildung 26 b) zeigt durch die Dichteplots eine mögliche Separation von Vorder- und Hintergrund bei einem Wert von 2,0. Der Dichteplot des Hintergrunds zeigt eine bimodale Verteilung, was sich durch die Menge an Bildern mit minimalem Zellbewuchs oder Debris erklären lässt. Ebenso zeigt der Dichteplot der adhärenen Zellen zwei lokale Maxima, wobei eines im Bereich der runden Zellen angesiedelt ist. Hierbei handelt es sich um die Bilder, auf denen sich sowohl adhärenente als auch runde Zellen befanden. Der Kontrast der Bilder (Abbildung 26 c) zeigte analoge Verteilungen zur Entropie.



**Abbildung 27:** TEXTURBASIERTE ANALYSE hiPSC ZWEIER PARAMETER MITTELS STREUDIAGRAMMEN.

**a** Mittlere Intensität gegen Entropie, **b** Kontrast gegen Entropie und **c** Korrelation gegen Entropie. Dargestellt sind jeweils die Daten von Hintergrund („BG“, weiß), runden Zellen („Rund“, hellgrau) und adhärenen Zellen („Adhärenent“, schwarz). Durch die Definition von Intervallen können biologischer Hintergrund und Vordergrund sehr gut voneinander separiert werden. Eine Separation von runden und adhärenen Zellen ist in ähnliche Weise möglich.

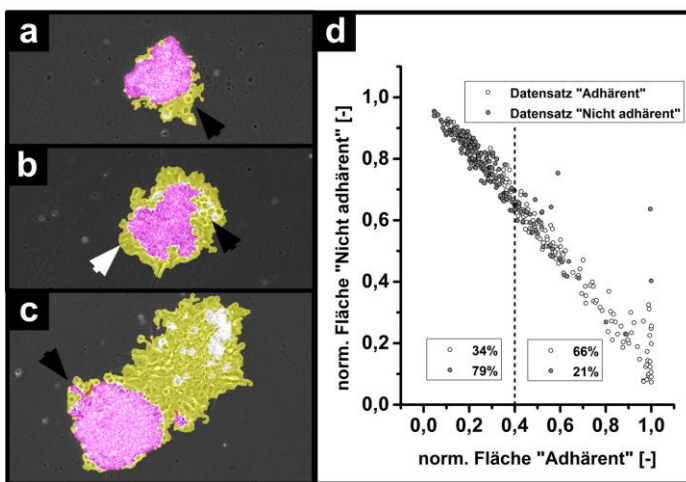
Bei der Korrelation zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Dichteplots (Abbildung 26 d). Hintergrund und runde Zellen lassen sich durch zwei definierte Peaks voneinander unterscheiden. Die Menge der Bilder mit adhärenen Zellen erstreckte sich von dem Wertebereich des Hintergrunds über den Wertebereich der runden Zellen.

Bei der mittleren Intensität ließt sich eine Unterscheidung von Hintergrund und Vordergrund bei 0,25 herauslesen. Analog war eine Unterscheidung von Vordergrund und Hintergrund durch den Kontrast bei einem Wert von 0,8 möglich. Insgesamt zeigte die Texturanalyse über die Dichteverteilung, dass nur zwei von drei Klassen eindeutig unterschieden werden konnten. Für eine genauere Klassifizierung war daher



die Kombination von mehreren Parametern notwendig. Hierfür wurden die Parameter in Streudiagrammen gegeneinander aufgetragen. Die Graphen in Abbildung 27 zeigen die Streudiagramme von Entropie gegen Korrelation, Entropie gegen Kontrast und Entropie gegen mittlere Intensität. Bei dem Streudiagramm Entropie gegen Korrelation lässt sich keine eindeutige Klassifizierung in die drei Klassen vornehmen. Vertretbar ist hierbei eine Klassifizierung, die allein auf der Entropie basiert: 0,0 bis 2,0: Hintergrund 2,0 bis 3,0: Adhärenz Zellen und 3,0 bis 4,0: Runde Zellen. Für diese Art der Klassifizierung wird der Parameter der Korrelation jedoch nicht benötigt. Eine ähnliche Klassifizierung kann ebenso durch die Werte aus den Diagrammen in Abbildung 25 abgeleitet werden.

Die Untersuchung zeigte, dass sich mit den Parametern Entropie und mittlere Intensität eine biologische Information eindeutig ableiten lässt. Da es sich hier jedoch um Bildfragmente handelte, stellte sich anschließend die Frage, ob und wie sich dies auf eine komplette Kolonie übertragen lässt, da diese nicht nur aus adhärenz oder runden Zellen besteht, sondern sich in einem bestimmten Anteil aus beiden Typen zusammensetzt.



**Abbildung 28:** SEGMENTIERUNG VON HiPSC-KOLONIEN ZUR KLASSIFIKATION DER ADHÄSION.

**a** Nicht adhärenz Kolonie mit überlagerter Vorhersage der nicht adhärenz (magenta), adhärenz (gelb) und nicht eindeutigen Bereiche (weiß). Sich ablösende Zellen im Randbereich der Kolonie werden als adhärenz klassifiziert (schwarze Pfeilspitze).

**b** Adhärenz Kolonie mit überlagerter Vorhersage nicht adhärenz und adhärenz Koloniebereiche. Adhärenz Bereiche (weiße Pfeilspitze) und sich ablösende Zellen (schwarze Pfeilspitze) werden als adhärenz klassifiziert.

**c** Adhärenz Kolonie mit überlagerter Vorhersage nicht adhärenz und adhärenz Koloniebereiche. Adhärenz Bereiche (weiße Pfeilspitze) und sich ablösende Zellen (schwarze Pfeilspitze) werden als adhärenz klassifiziert.

**d** Streudiagramm der detektierten Bereiche einer Kolonie normiert auf die Koloniefäche mit Indikation des tatsächlichen Koloniezustands durch die Farbe des Datenpunkts. Eine eindeutige Unterscheidung beider Zustände ist nicht ersichtlich. Durch die Einführung eines Schwellenwerts von 0,4 bzgl. der adhärenz Fläche kann bei 66% der adhärenz Kolonien der Zustand korrekt vorhergesagt werden.  $n=374$ .

## Untersuchungen zur Detektion von adhärenz Kolonien

Zur Machbarkeit einer automatisierten Detektion von adhärenz Kolonien wurde ein Datensatz von 374 Kolonien automatisiert ausgewertet und manuell in „adhärenz“ und „nicht adhärenz“ klassifiziert. Der Ansatz beruht auf der Idee, dass die Kolonien aus adhärenz Zellen und weißen runden Zellen bestehen, die bei der Analyse des Verlaufs nicht voneinander separiert werden müssen. Von einer Kolonie sollten in dieser Untersuchung beide Bereiche segmentiert werden und anhand dieser Daten überprüft werden, ob eine Aussage über den Zustand der Adhärenz ohne Zeitinformation bzw. zeitlichen Verlauf getroffen werden kann. Die Untersuchungen knüpfen daher an die Ergebnisse der Texturanalyse kleinerer Ausschnitte (vgl. Abbildung 25) an, bei der gezeigt werden konnte, dass eine Unterscheidung von adhärenz und abgerundeten Zellbereichen durch die Textur möglich ist. Die Information, ob die Koloniefäche zu einem vorherigen Zeitpunkt geringer war im Vergleich zu dem untersuchten Zeitpunkt, wurde hierbei bewusst nicht hinzugezogen. Die Ergebnisse der Analyse (durchgeführt mit ilastik/Cellprofiler) zeigen dabei, dass sowohl nicht adhärenz Bereiche, als auch die Kolonie selbst sehr gut detektiert werden können (Abbildung 28 a, b). Ebenso wurde der adhärenz Bereich bei größeren Kolonien (Abbildung 28 c), sowie

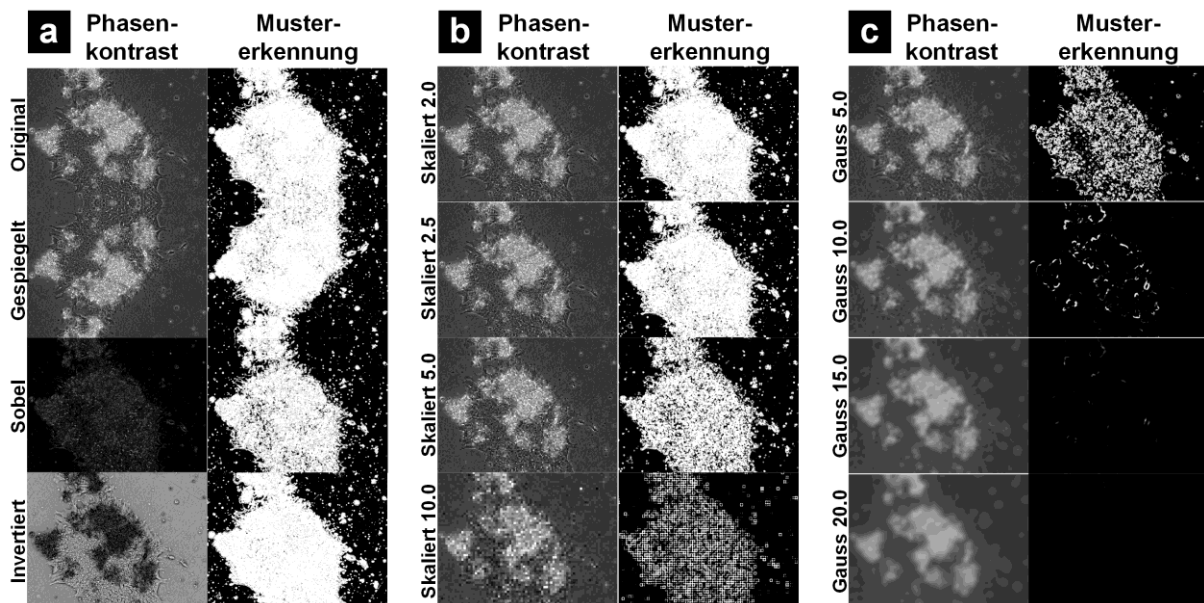


die sich von der Kolonie ablösenden, dunklen Objekte, als adhärenter Bereich klassifiziert und in die Analyse als Artefakt eingebracht.

Für die Detektion der Adhärenz, insbesondere von kleinen Kolonien ging dies einher mit einer nicht eindeutigen Aussage über den Zustand der Adhärenz der Kolonie, da hier auch nur kleine adhärenente Bereiche vorliegen können (vgl. Abbildung 28 b). Bei größeren Kolonien fiel dieser Falsch-positive Randbereich weniger ins Gewicht und eine Vorhersage war dadurch verlässlicher. Durch die Normierung der beiden klassifizierten Flächen auf die Gesamtfläche der Kolonie und die Auftragung in einem Streudiagramm wurde untersucht, ob hierdurch eine Verbesserung der Vorhersage getroffen werden kann (Abbildung 28 d). Es bestätigte sich hierbei die Beobachtung, dass keine eindeutige Einschätzung erfolgen kann und beide Koloniezustände sich von den Datenpunkten überlappen. Durch die Einführung eines Schwellwert größer als 0,4 (40% der Kolonie besteht aus adhärenenten Zellen), konnten 66% des Datensatzes korrekt als adhärenent klassifiziert werden. Unterhalb dieses Schwellwerts lagen damit die nicht-adhärenenten Zellen, die dadurch zu 79% korrekt vorhergesagt werden konnten.

### Simulation von Bildartefakten: Phasenkontrast-Mikroskopie von hiPSC

Die Robustheit der Bildanalyse gegenüber suboptimalen Bildeigenschaften wurde anhand von artifiziell eingeführter Bildartefakte überprüft. Die Klassifizierung von Pixeln, die die Basis für die Segmentierung der biologischen Bilddaten darstellt, zeigt an diesen Beispielen die Stabilität gegenüber Artefakten, die bei der Bildaufnahme entstehen können (Abbildung 29 a-c). Die berechneten *Probability Maps* zeigen Werte von 0 bis 1 (dargestellt als Grauwertbild mit schwarz als geringe Texturübereinstimmung und weiß als hohe Texturübereinstimmung).

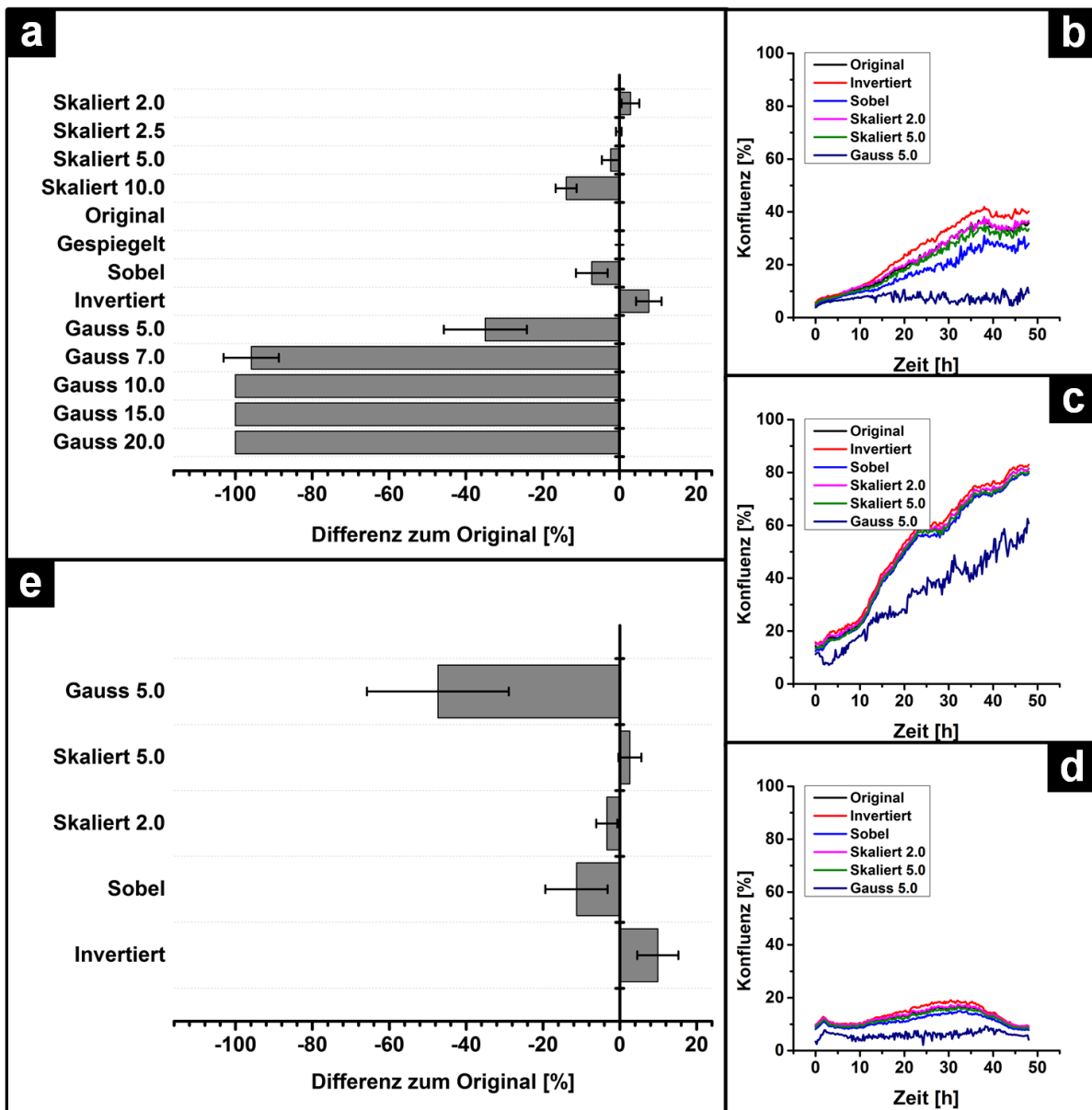


**Abbildung 29:** SIMULIERTE ARTEFAKTE BEI PHASENKONTRASTBILDERN MIT hiPSC.

**a** Modifikation des Originalbildes mit Operationen wie Spiegelung, Kantenerkennung oder Invertierung. **b** Modifikation des Originalbildes durch Skalierung. **c** Modifikation des Originalbildes durch einen Gauß-Filter. Die linke Spalte zeigt die angewendeten Modifikationen, die rechte Spalte die in der Bildanalyse integrierte Mustererkennung durch ilastik. Die gezeigten artifiziellen Modifikationen des Originalbildes illustrieren die starke Beeinträchtigung der Bildanalyse durch den Gauß-Filter; eine Art Simulation einer optischen Defokussierung der Probe.

Ebenso wurde durch die Klassifizierung des invertierten Bildes deutlich, dass eine Unterscheidung von Vor- und Hintergrund durch die Textur von dem Farbraum unabhängig sein kann. Die *Skalierung*, im Endeffekt eine Komprimierung von Bildern, erlaubt bis zu einem bestimmten Grad weiterhin eine funktionierende Analyse der Daten, auch wenn eine Anpassung in den Funktionen nötig war. Ein besonderer Fokus musste dabei auf die Modifikationen *Sobel* und *Invertierung* gelegt werden, da diese eine offensichtliche

Änderung des Originalbildes darstellten. Durch eine Analyse nur mit Intensitäts-basierten Schwellenwerten wären diese Bilder nicht mehr mit der genutzten Analyse-Routine auswertbar gewesen, da eine komplette Verschiebung der Intensitätswerte und der Parameter der Segmentierung (z. B. typische Objektgrößen) in den auszuwertenden Bildern vorlag. Die Anwendung der Gauss'schen Weichzeichnung simulierte prinzipiell eine fehlerhafte Fokussierung der biologischen Probe. Dieses Artefakt kann zum einen aufgrund voreingestellter z-Höhe der Fokussierungseinheit als auch durch einen Drift der Fokusebene (z. B. Ausdehnung von Materialien über die Zeit) auftreten. Hier zeigte sich bei einem relativ kleinen Element für die Weichzeichnung (5 px) eine starke Veränderung der *Probability Map*. Bei einem Element von 7 px traten erste Fragmentierungen auf. Ab einem Element von 10 px konnte aus der resultierenden Berechnung kein realistisches biologisches Objekt mehr abgeleitet werden.



**Abbildung 30:** EINFLUSS VON ARTEFAKTEN AUF DIE SEGMENTIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON hiPSC-KOLONIEN.

**a** Unterschiede im Vergleich zum Original bei Bildern mit Artefakten. Über- und Untersegmentierungen sind geringer ausgeprägt bei Skaliert 10, 5, 2,5 und 2, sowie bei Sobel. Eine Untersegmentierung liegt bei den Gauss'schen Artefakten 20, 15, 10, 7 und 5 vor. **b**, **c** und **d** zeigen jeweils die Konfluenz-Entwicklung einer hiPSC-Kolonie ohne und mit Artefakten. **e** Mittlere Abweichung der Konfluenz der jeweiligen Artefakte zum Originalbild.

Die Quantifizierung des Einflusses der eingefügten Artefakte in die Originalbilder erfolgte anhand der Detektion der Koloniefäche mit der bereits entwickelten Analyseroutine mit CellProfiler. Die detektierte Fläche des Originalbildes wurde dabei als Referenz festgelegt und die Unterschiede auf diesen Referenzwert prozentual berechnet. Abbildung 30 a zeigt die Differenz zum Original von allen in Abbildung 29 dargestellten Artefakten. Die Gauss'sche Weichzeichnung zeigte hierbei die schlechtesten Ergebnisse im Vergleich zum Originalbild. Bereits bei einer Weichzeichnung mit 5 px lag eine 40%ige Untersegmentierung vor. Bei den Weichzeichnungen mit einer größeren Artefaktdimension (7, 10, 15 und 20 px) wurde durch die Analyseroutine keine hiPSC-Kolonie mehr detektiert, was in einer Untersegmentierung von 99-100% resultierte. Skalierte man die Originalbilder hoch und runter, fasst also mehrere Pixelintensitäten zusammen, so erhielt man dennoch akzeptable Werte, die im Bereich von +1,5% (Skaliert 2) bis -16% (Skaliert 10) lagen. Die Bilder nach der Kantendetektion mit Sobel führen zu Koloniegrößen, die sich um -8% Prozent vom Original unterscheiden. Eine Invertierung der Pixelintensitäten (Invertiert) lieferte interessanterweise Werte, die sich lediglich um +8% unterscheiden. Die Invertierung war dahingehend interessant, da sich die Ausgangsbilder der Analyse sehr deutlich voneinander unterschieden (siehe Abbildung 29). Hier zeigte sich der Vorteil einer Pixelklassifizierung anhand von Texturen im Gegensatz zu Intensitäten. Eine Rotation des Originalbildes führte nur zu minimalen Unterschieden im Vergleich zum Originalbild (< 1%).

Aufgrund dieser Untersuchung wurde der Verlauf von vollständigen Bildsequenzen untersucht. Abbildung 30 b – d zeigt die unterschiedlichen Resultate in Anwesenheit der Artefakte (Original, Skaliert 2, Skaliert 5, Invertiert, Sobel und Gauss 5). Der in Abbildung 30 a gezeigte Trend setzte sich hierbei fort: mit Ausnahme von *Gauss 5* waren die berechneten Wachstumskurven der hiPSC-Kolonien mit entsprechenden Unter- bzw.- Übersegmentierung untereinander vergleichbar. Die Form des Kurvenverlaufs stimmte bis auf einen Offset überein. Die Gauss'sche Weichzeichnung mit der Artefaktdimension von 5 px führte zu einem Kurvenverlauf, der das tatsächliche biologische Verhalten der hiPSC-Kolonie nicht mehr rekonstruieren ließ.

**Tabelle 7:** Dateigröße der Bilder in kB nach Anwendung von Artefakten. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD, n=8).

Artefakt	Mittlere Dateigröße [kB] ( $\pm$ SD, n=8)		Speicherbedarf im Vergleich zum Original [%]
Original	253,02	$\pm$ 42,0	100
Sobel	250,79	$\pm$ 47,68	99,1
Gauss 10	85,51	$\pm$ 20,16	33,8
Gauss 15	64,13	$\pm$ 17,61	25,3
Gauss 20	54,71	$\pm$ 15,84	21,6
Gauss 5	135,11	$\pm$ 27,62	53,4
Gauss 7	110,24	$\pm$ 22,92	43,6
Invertiert	267,69	$\pm$ 40,03	105,8
Gespiegelt	252,91	$\pm$ 42,26	100
Skaliert 10	10,28	$\pm$ 0,96	4,1
Skaliert 5	27,26	$\pm$ 3,47	10,8
Skaliert 2,5	74,87	$\pm$ 9,25	29,6
Skaliert 2	99,63	$\pm$ 14,63	39,4

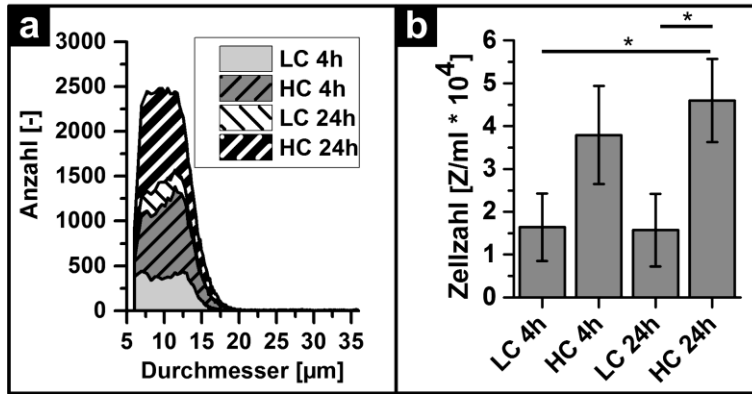
Die Differenz der kompletten Bildsequenzen zum Original sind in Abbildung 30 e aufgetragen. Hierfür wurde für jeden Zeitpunkt und simuliertes Artefakt die Differenz der Fläche der detektierten Objekte zum Original berechnet und der Mittelwert aus allen Differenzen bestimmt. Die Differenzen sind vergleichbar mit denen aus Abbildung 30 a.

Die Invertierung des Originals resultierte in einer Differenz von 9,9% ( $\pm 5,4\%$ ), die Kantendetektion *Sobel* in einer Differenz von -11,3% ( $\pm 8,1\%$ ), *Gauss 5* unterschied sich um -47,3% ( $\pm 18,5\%$ ), *skaliert 2* um 2,6% ( $\pm 3,0\%$ ) und *skaliert 5* um -3,3% ( $\pm 2,7\%$ ). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass insbesondere Gauss'sche Weichzeichnungen zu einem Scheitern der Bildanalyse führen und damit mit einem Informationsverlust einhergehen. Bei der automatisierten Mikroskopie können diese Arten von Artefakten z. B. in Form des sog. Fokusdrifts auftreten. Die durchgeführte Skalierung tritt beispielsweise durch Komprimierung der Bilddaten nach Beendigung des Experiments auf. Hierdurch kann eine Datenreduktion erfolgen (vgl. Tabelle 7). Durch die Skalierung kann die Dateigröße des einzelnen Bildes auf 4% (*Skaliert 10*) bis 40% (*Skaliert 2*) reduziert werden. Eine Komprimierung kann Vorteile bei der Quantifizierung der Bildinformation bringen in der Form, dass die Bildgröße z. B. um die Hälfte reduziert wird. Ein resultierender Vorteil bei Kopiervorgängen und der Speicherung der Bilddaten auf Servern im Sinne der Langzeitarchivierung ist hierdurch offensichtlich.

Ebenso war eine Reduzierung des Speicherbedarfs der Bilder bei der Gauss'schen Weichzeichnung auf 53% bis 21% festzustellen, die jedoch aufgrund des Informationsverlustes bei der Datenanalyse keinen Vorteil bringen würde. Die durchgeführte Kantendetektion mit dem Sobel-Operator führte nur zu einer vernachlässigbaren Datenreduktion von etwa 1%. Die verbliebenen Modifikationen *Gespiegelt* bzw. *Invertiert* führten zu keiner Reduzierung der Datenmenge, bei letzterer Modifikation erfolgte eine Vergrößerung der Dateigröße von etwa 6%.

#### 4.2.4 Adhäsionsverhalten von dissoziierten hiPSCs-Kolonien mittels qPH-Mikroskopie

Die Besiedelung von Oberflächen mit hiPSC kann entweder durch kleine multizelluläre Zellaggregate oder durch Einzelzellen erfolgen. Zellaggregate haben den Vorteil, dass sie gemäß der Vorgehensweise bei der Passage in einem Zellverbund bleiben und die Zell-Zell Kontakte weitestgehend erhalten bleiben. Ebenso sind die Zellen bei dieser Vorgehensweise geringem mechanischem und enzymatischem Stress ausgesetzt. Ein Problem stellt hierbei die Einstellbarkeit der Zellzahl, sowie die Verteilung der Agglomerate auf der Kulturoberfläche dar. Die Lösung für diese Limitierung ist die Dissoziation von hiPSC Kolonien in Einzelzellen. Um die Apoptose der dissoziierten hiPSC zu unterbinden, bedarf es jedoch der Zugabe des sog. ROCK Inhibitors (ROCKi), der intrazelluläre Signalkaskaden, die die Apoptose auslösen, unterbindet. In diesem Abschnitt sollen zum einen der Einfluss der Zellkonzentration und die Inkubationszeit des ROCKi mittels der Lebendzell-Mikroskopie untersucht werden, um daraus Empfehlungen für die Kultivierung von hiPSC auf Gerüststrukturen und eine automatisierte Zellkultivierung abzuleiten. Ferner soll überprüft werden, inwieweit eine automatisierte Analyse des zellulären Verhaltens die biologischen Abläufe wiedergeben kann.



**Abbildung 31:** ADHÄSIONSRATE VON DISSOZIIERTEN hiPSC-KOLONIEN NACH INKUBATION MIT ROCK INHIBITOR BEI UNTERSCHIEDLICHEN ZELLKONZENTRATIONEN.

**a** Exemplarische Histogramme der nicht adhärenen Zellen eines Versuchs. LC =  $1 \times 10^5$  Zellen, HC =  $4 \times 10^5$  Zellen und 4 h = 4 h ROCKi Inkubation und 24 h = 24 h ROCKi Inkubation.

**b** Nicht adhärenen Zellen nach ROCKi Inkubation. Die Anzahl nicht adhärenen Zellen ist proportional zur Inokulationszellzahl, die ROCKi Inkubationszeit spielt hierbei eine untergeordnete Rolle. Gezeigt ist die Zellzahl als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten. Stichproben sind normalverteilt nach Kolmogorov-Smirnoff, \*:  $p < 0,05$ , t-Test)

### Dissoziation und Inokulation von hiPSC-Kolonien

Für die Untersuchungen wurden zwei Zellkonzentrationen und zwei Inkubationszeiträume des ROCKi eingestellt. Je  $1 \times 10^5$  bzw.  $4 \times 10^5$  Zellen wurden nach Dissoziation in eine mit Matrigel beschichtete Kulturschale gegeben und nach 4 h bzw. 24 h durch Standardkulturmedium ausgetauscht. Bei dem Medienwechsel wurden ebenso alle nicht adhärenen bzw. toten Zellen aus der Kulturschale entfernt und quantifiziert. Die Proben wurden dann über 48 h mit der Lebendzell-Mikroskopie untersucht. Abbildung 31 a zeigt exemplarisch ein Histogramm des Durchmessers der nicht adhärenen Zellen im entfernten Medium. Das Histogramm verdeutlicht, dass die entnommenen Zellen ähnliche Verteilungen aufwiesen. Die Quantifizierung der entfernten Zellen ist in Abbildung 31 b dargestellt. Hier wird deutlich, dass sich bei einer Inokulation von  $1 \times 10^5$  Zellen, absolut gesehen, weniger Zellen nach der ROCKi-Inkubation abgelöst haben. Prozentual gesehen haben sich im Vergleich etwa 5% weniger Zellen bei einer Zellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen abgelöst (siehe hierzu Tabelle 8). Ein statistisch signifikanter Unterschied lag bei den Konditionen LC 24h/HC 24h und LC 4h/HC 24h vor (siehe Abbildung 31 b).

**Tabelle 8:** Effizienz der Zelladhäsion bei unterschiedlich inokulierter Zellzahl und ROCKi Inkubationszeit.

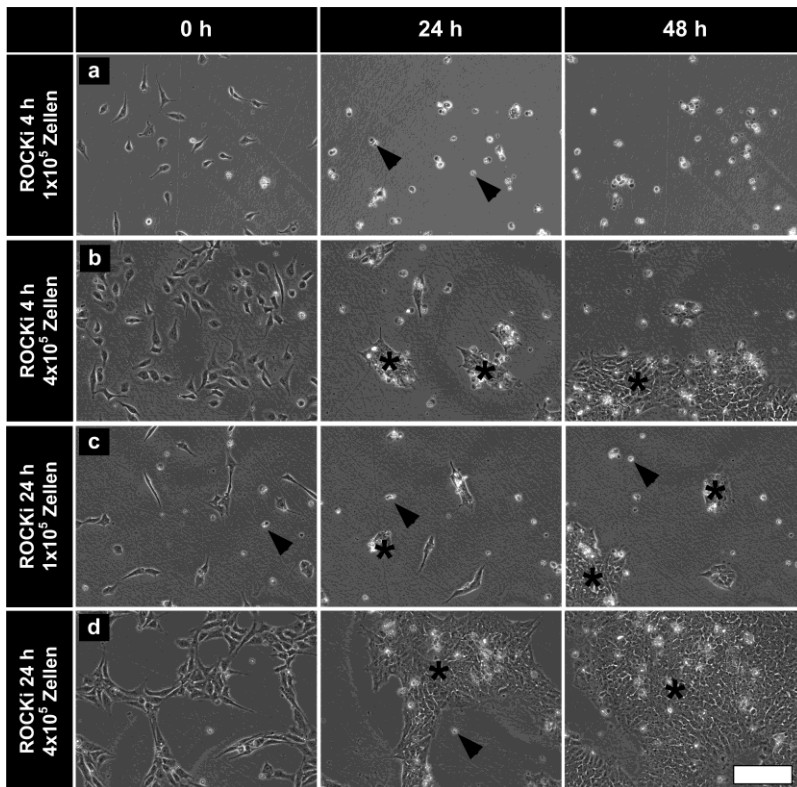
Konditionen	Ausgesäte	Verlust	Verlust
	Zellzahl [-]	abs. Zellzahl [-]	rel. Zellzahl [%]
LC 4h	$1 \times 10^5$	$16403 \pm 7888$	$16,4 \pm 7,9$
HC 4h	$4 \times 10^5$	$37933 \pm 11426$	$9,5 \pm 2,9$
LC 24h	$1 \times 10^5$	$15700 \pm 8487$	$15,7 \pm 8,5$
HC 24h	$4 \times 10^5$	$45967 \pm 9676$	$11,5 \pm 2,4$

### Manuelle Untersuchung des zellulären Verhaltens in Abhängigkeit der Zellkonzentration und ROCK-Inhibitor Inkubationszeit

Nach Durchführung der Lebendzell-Mikroskopie wurden die Proben zunächst manuell ausgewertet. Die in Abbildung 32 a-d gezeigten Aufnahmen zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h spiegeln die unterschiedlichen Verhaltensweisen der dissoziierten hiPSC unter den jeweiligen Konditionen deutlich wider. Bei einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen und einer ROCKi Inkubationszeit von 4 h lagen auf der Kulturfläche die Zellen mit relativ großem räumlichen Abstand zueinander vor (Abbildung 32 a). Nach dem Mediumwechsel und im weiteren Verlauf des Experiments zeigte sich, dass die Zellen sich ablösten und keine Kolonien

bildeten. Es war eine Blasenbildung an der Zellmembran deutlich zu erkennen, was auf ein apoptotisches Verhalten schließen ließ. Interessanterweise war bei kleineren Zellverbänden von drei bis fünf Zellen eine Art Kettenreaktion zu erkennen: Ist eine Zelle abgestorben, so wirkt sich dies auf die unmittelbar benachbarten Zellen aus, die in kurzer Zeit ebenso abstarben. Vereinzelt war auch zu beobachten, dass eine migrierende Zelle nach unmittelbarem Kontakt mit einer abgestorbenen Zelle die Apoptose einleitet und ebenso abstirbt. Bei gleicher Zellkonzentration, jedoch einer Inkubationszeit des ROCKi von 24 h (Abbildung 32 c) waren ähnliche Verhaltensweisen zu beobachten, mit dem Unterschied, dass sich unter dem Einfluss des ROCKi schon größere Zellverbände formieren konnten. Nach dem Medienwechsel sind dabei nur die kleinen Zellverbände von drei bis fünf Zellen kritisch und zeigten ein apoptotisches Verhalten, wenn es nicht zum Zusammenschluss mit einer Kolonie in unmittelbarer Umgebung kam.

Abbildung 32 b zeigt Ausschnitte der Kultivierung mit einer Zellkonzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen und einer ROCKi Inkubationsdauer von 4 h. Die Zellen lagen nach dem Medienwechsel nicht als Zellverbände im engeren Sinne vor, lagen aber räumlich gesehen, in kurzer Distanz zueinander. Nach ROCKi Entfernung war eine morphologische Änderung zu beobachten und eine sukzessive Formierung zu Kolonien. Hierbei kam es zunächst zu netzwerkartigen Zellanordnungen, die mit der *Tube-formation* von Epithelzellen vergleichbar sind. Diese Formation wurde durch die Agglomeration der Zellen zu Kolonien aufgehoben. Auch bei dieser Kondition waren apoptotische Zellen zu beobachten, die sich in kritischer geringer Zellzahl nicht in einer bestimmten Zeit in einen größeren Zellverbund integrieren konnten. Bei einer Zellkonzentration von  $4 \times 10^5$  Zellen und 24 h Inkubationszeit des ROCKi (Abbildung 32 d) war nach dem Medienwechsel ein stark ausgeprägtes Netzwerk an hiPSC zu erkennen, die unmittelbaren Zell-Zell Kontakt hatten. Kurz nach dem Medienwechsel erfolgte, kombiniert mit einer morphologischen Änderung, die Formation von flächigen Kolonien. Absterbende Zellen waren kaum zu beobachten und konnten aufgrund der Zellzahl auch nicht in den Zusammenhang mit einer kritischen Zahl von Zell-Zell-Kontakten in Verbindung gebracht werden.



**Abbildung 32: ZEITREIHEN DISSOZIIERTER hiPSC IN ABHÄNGIGKEIT DER ZELLDICHTE UND ROCKi INKUBATIONSZEIT.**

**a**  $1 \times 10^5$  Zellen und 4 h ROCKi Inkubation. Die Zellen liegen vereinzelt auf der Kulturfläche vor, sterben dann im weiteren Verlauf ab.

**b**  $4 \times 10^5$  Zellen und 4 h ROCKi Inkubation. Die Zellen liegen in höherer Dichte vereinzelt auf der Kulturfläche vor und bilden über die Zeit Kolonien.

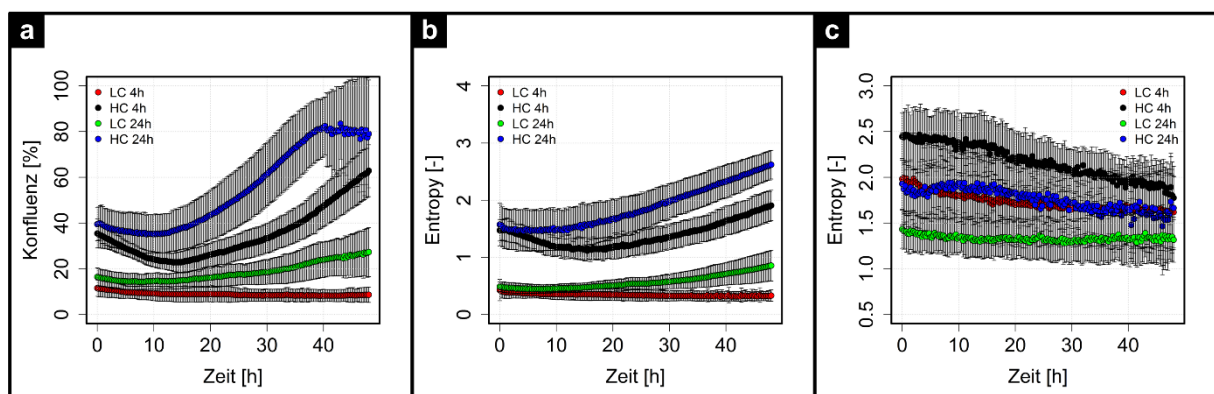
**c**  $1 \times 10^5$  Zellen und 24 h ROCKi Inkubation. Kleinere Zellverbände haben sich bereits formiert und bilden über die Zeit größere Kolonien.

**d**  $4 \times 10^5$  Zellen und 24 h ROCKi Inkubation. Es haben sich bereits größere Zellverbände in einer Netzwerk-ähnlichen Struktur formiert, die sich im weiteren Verlauf zu großflächigen Kolonien ausbilden. Pfeilspitze: abgelöste Zellen, Stern: multizelluläre Kolonien. Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ .

### Automatisierte Untersuchung des zellulären Verhaltens in Abhängigkeit der Zellkonzentration und ROCKi-Inkubationszeit

Nach der manuellen Analyse wurde untersucht, ob das zelluläre Verhalten auch mit automatisierten Methoden möglich ist. Die Bildanalyse wurde mittels einer implementierten Routine mit CellProfiler durchgeführt, in deren Anschluss die Analyse der Daten mit Skripten in R erfolgte. Die Quantifizierung der konfluenten Zellfläche zeigte deutliche Einflüsse der Zellkonzentration und der Inkubationszeit des ROCKi auf das Wachstumsverhalten der hiPSC (Abbildung 33 a). Dissoziierte hiPSC, die mit hohen Konzentrationen ausgesät wurden, wuchsen deutlich schneller und erreichten nach 48 h die größte konfluente Zellfläche (blaue und schwarze Kurve). In beiden Konditionen stagnierte bzw. fiel der Wert der Konfluenz zunächst, erreichte ein lokales Minimum und stieg dann wieder kontinuierlich an. Das lokale Minimum war bei HC 4 h bei etwa 15 h und bei HC 24 h bei etwa 12 h nach Start der Lebendzell-Mikroskopie bzw. nach Entfernen des ROCKi. Aus der manuellen Analyse ging hervor, dass bei diesen Konditionen zunächst eine Formierung von Kolonien erfolgte und teilweise Zellen abstarben. Bei HC 4 h wurde dieses Verhalten durch die fallende Konfluenz deutlich. Bei HC 24 h hingegen erfolgte hauptsächlich eine Formierung von Kolonien mit einhergehender morphologischer Änderung der Zellen. Die Konfluenz stagnierte in diesem Bereich, bevor dann eine Proliferation und Ausbreitung der Kolonien folgte. Bei den Konditionen LC 4 h und LC 24 h war das lokale Minimum nicht erkennbar. Bei LC 24 h fiel der Wert der Konfluenz zunächst leicht ab und stieg in der Folge bis zum Ende des Untersuchungszeitraums kontinuierlich an. Die Kondition LC 4 h zeigt dahingegen keine Zunahme der Konfluenz. Zu Beginn fiel der Wert der Konfluenz leicht ab und stagnierte dann bis zum Ende des Experiments. Dieser Verlauf entsprach der manuellen Analyse, bei der festgestellt wurde, dass wenige Zellverbände zu Beginn des Experiments aufgrund einer kritischen Zellzahl abstarben. Die Änderung der Konfluenz über die Zeit im linearen Bereich (zwischen 20 h und 30 h) konnte somit klassifiziert werden in  $HC\ 24h > HC\ 4h > LC\ 24h > LC\ 4h$ .

Mit der Quantifizierung der Entropie sollte ferner untersucht werden, ob sich das zelluläre Verhalten durch Textur-Eigenschaften des Bildes modellieren lässt. Abbildung 33 b zeigt den Verlauf der Entropie des Gesamtbildes (ohne vorherige Segmentierung) über die Zeit, wohingegen Abbildung 33 c die Entropie der detektierten Zellfläche quantifiziert. Die Quantifizierung des Verlaufs der Entropie über das Gesamtbild (ohne Segmentierung) in Abbildung 33 b zeigte ähnliche Charakteristika wie bei der Analyse der Konfluenz. Bei den Konditionen HC 4 h und HC 24 h war ebenso eine Änderung der Entropie festzustellen, die im Bereich der beobachteten Zeitpunkte lagen. Analog verhielten sich die Kurven bei den Konditionen LC 4 h und LC 24 h.



**Abbildung 33: AUTOMATISIERTE ANALYSE DES WACHSTUMSVERHALTENS VON DISSOZIIERTEN hiPSC ÜBER DIE ZEIT.**  
**a.** Konfluenzverhalten dissoziierter hiPSC anhand der Zellfläche. Gezeigt sind Mittelwerte und SD aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten mit je 19-20 beobachteten Bildausschnitten. **b** Verlauf der Entropie als Textur-Parameter des Gesamtbildes dissoziierter hiPSC. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten. **c** Verlauf der Entropie der detektierten Objekte über die Zeit. Eine genaue Erläuterung ist im Text gegeben. Gezeigt sind Mittelwerte und SD aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten mit je 19-20 beobachteten Bildausschnitten. In allen Graphen sind  $LC = 1 \times 10^5$  Zellen,  $HC = 4 \times 10^5$  Zellen und  $4\ h = 4\ h$  ROCKi Inkubation und  $24\ h = 24\ h$  ROCKi Inkubation.

Die detektierten Werte ließen sich ebenso auf die biologischen Gegebenheiten übertragen. Die Entropie, als Maß für die Homogenität der Textur, war zum Zeitpunkt  $t = 0$  h bei den jeweiligen Zellkonzentrationen vergleichbar. Dies erklärte sich durch die ähnlich dichte Bedeckung der Oberfläche mit Zellen. Bei den niedrigen Konzentrationen war jedoch mehr unbewachsene Kulturoberfläche sichtbar, die, auf die Textur bezogen, homogener war. Bei entsprechend höherer Zellzahl verringerte sich diese Fläche, was eine höhere Entropie zur Folge hatte. Durch die Art der Kondition erfolgte dann eine kontinuierliche Ausbreitung der Zellen, die, auf die Textur bezogen, eine Verringerung der Homogenität zur Folge hatte. Bei der Kondition LC 4 h erfolgte keine Steigerung der Entropie über die Zeit, was letztendlich als Ausbleiben der Proliferation und Formierung von Kolonien gedeutet werden konnte. Ähnlich wie bei der Konfluenz ergab sich auch hier die Reihenfolge  $HC\ 24h > HC\ 4h > LC\ 24h > LC\ 4h$ . In Abbildung 33 c wird die Entropie der Zellfläche selbst quantifiziert, d. h. ohne die Kulturfläche. Die Daten ließen hier jedoch keine eindeutige Zuordnung zum biologischen Verhalten zu. Bei den Konditionen HC 4 h und LC 4 h war ein kontinuierlich fallender Wert der Entropie zu beobachten, wohingegen bei HC 24 h und LC 24 h ein stagnierender Wert festzustellen war.

Die Ergebnisse zeigten, dass derartige biologische Prozessen mittels nicht-invasiver Bildanalyse sowohl mit Segmentierung (Parameter: Konfluenz), als auch ohne Segmentierung durch Analyse des Gesamtbildes (Parameter: Entropie) abgebildet werden konnten. Ferner war bei den Untersuchungen eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen ableitbar, die eine hohe Zellkonzentration mit entweder kurzer oder langer Inkubationszeit mit ROCK-Inhibitor beinhaltet.

### 4.3 Untersuchung von strukturbildenden zellulären Prozessen mit neuartigen Gerüststrukturen

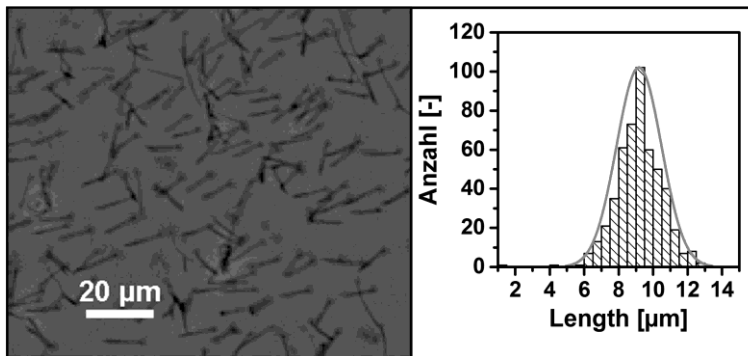
In diesem Teil der Arbeit werden die Ergebnisse im Zusammenhang mit Gerüststrukturen dargestellt. Die Gerüststrukturen basieren dabei auf Alginat-Hydrogelen, die entweder als zweidimensionale Matrix oder als sphärische Mikroträger mit den Zellen interagieren. Es werden verschiedene Ansätze untersucht, um letztendlich auf die Methode zu fokussieren, die es erlaubt flexibel UHV-Alginat zu biofunktionalisieren und in Prozessen des *Tissue Engineerings* anzuwenden. Dabei werden Ansätze zur topographischen Strukturierung, nanopartikulären Beschichtung, anorganischen Beschichtung, nicht-kovalenten Modifikation sowie kovalenten Modifikation untersucht.

#### 4.3.1 Fibrilläre Alginat-Oberflächen

*Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines vorbereiteten Manuskripts zur Veröffentlichung [324].*

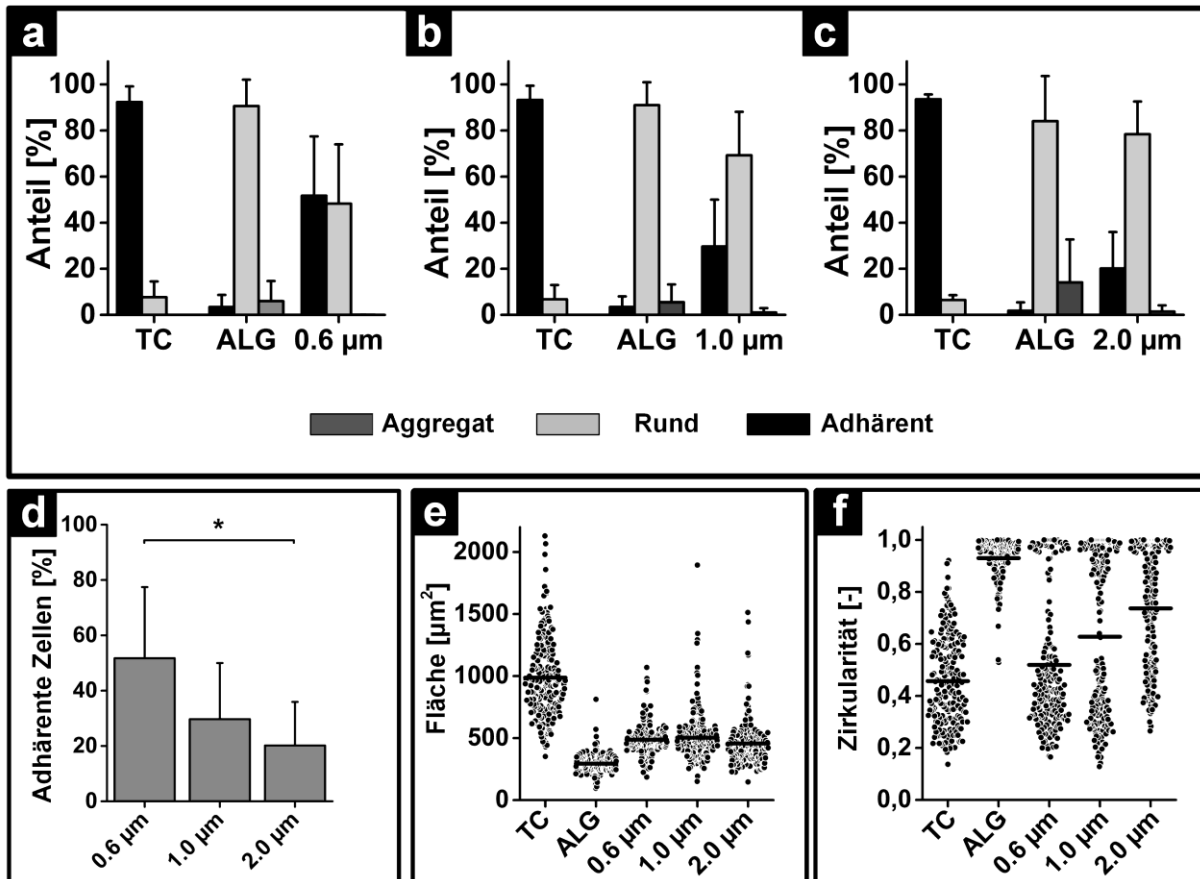
In diesem Kapitel wird untersucht, ob eine mikrostrukturierte Alginat-Oberfläche das Adhäsionsverhalten von murinen Fibroblasten beeinflussen kann. Die Strukturierung des Alginats erfolgte mit Standard-Labormaterialien und konnte dadurch ohne komplexe Vorbereitungen durchgeführt werden. Der in Abschnitt 3.7.2 beschriebene Strukturierungsprozess erfolgte vollständig unter physiologischen Bedingungen, so dass eine hohe Kompatibilität bei empfindlichen Zellen auch weiterhin gegeben ist. Die Alginat-Oberflächen enthielten topographische Merkmale (Fasern), die mit der beschriebenen Methode aufgebracht wurden. Durch die Möglichkeit, Membranen mit unterschiedlichem Porendurchmesser zu beziehen, erlaubte diese Methode individuelle Anpassungen an das zellbiologische Experiment. Die auf der Alginatmembran entstandenen Fasern hatten bei einem Durchmesser von  $2\ \mu\text{m}$  eine Länge von  $9,2 \pm 1,2\ \mu\text{m}$  (siehe **Abbildung 34**) und zeichneten sich damit auch durch eine homogene Faserlänge aus.





**Abbildung 34: LÄNGE DER FASERN AUF ALGINAT-GERÜSTSTRUKTUREN.** Die Länge der Fasern bei Fasern mit einem Durchmesser von  $2\ \mu\text{m}$  befinden sich in einem Bereich von  $7\ \text{bis}\ 12\ \mu\text{m}$  und im Mittel  $9,2 \pm 1,3\ \mu\text{m}$  ( $n=500$ ).

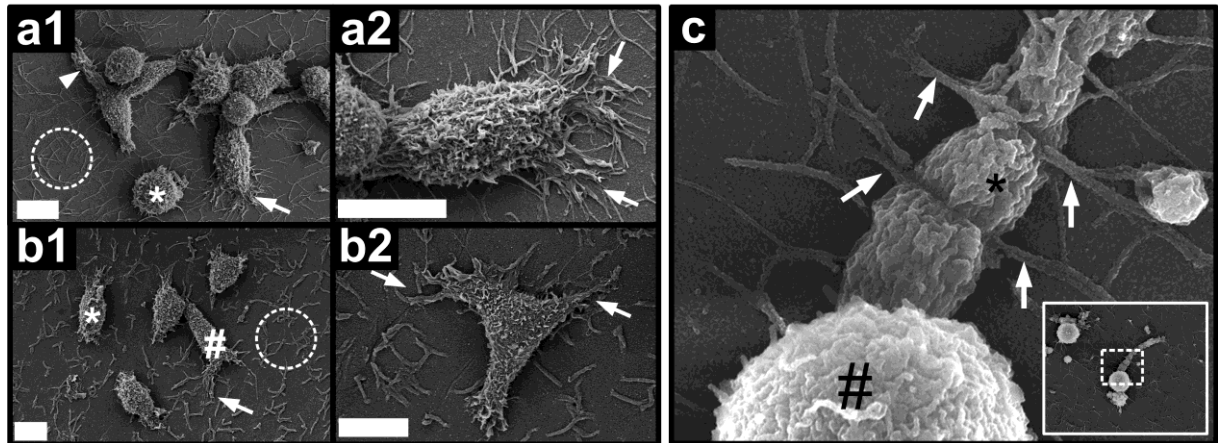
Das zelluläre Verhalten der fibrillären Alginat-Oberflächen wurde anhand von murinen Fibroblasten untersucht. Für die Quantifizierung der Zellreaktion wurden drei Klassifizierungen eingeführt: adhärent, rund und aggregiert. Die höchste Adhäsionsrate konnte auf der Standard-Polystyren Oberfläche (TCPS) mit 90% adhärenter Zellen bei lediglich 8% abgerundeter Zellen verzeichnet werden. Auf nativer, unstrukturierter Alginat-Oberfläche lag der Anteil adhärenter Zellen bei 4%, wohingegen der Anteil der runden Zellen bei 85% lag. Insbesondere bei dieser Oberfläche beeinflusste die Aggregation die Anzahl der Einzelzellen. Auf den strukturierten Alginat-Oberflächen konnte die größte Anzahl adhärenter Fibroblasten auf den Alginaten mit Fasern eines Durchmessers von  $0,6\ \mu\text{m}$  beobachtet werden ( $51,7 \pm 25,7\%$ , Abbildung 35 a). Auf der Oberfläche mit Fasern des Durchmessers  $1,0\ \mu\text{m}$  waren  $29,7 \pm 20,3\%$  der Zellen adhärent (Abbildung 35 b). Die niedrigste Adhäsionsrate wurde auf den Oberflächen mit Fasern des Durchmessers  $2,0\ \mu\text{m}$  gemessen ( $20,2 \pm 15,8\%$ , Abbildung 35 c). Insgesamt gesehen war demnach die Adhäsionsrate durch die Texturierung im Vergleich zum unstrukturierten Alginat erhöht in der Reihenfolge  $0,6\ \mu\text{m} > 1,0\ \mu\text{m} > 2,0\ \mu\text{m}$  (Abbildung 35 d). Zusätzlich wurde die Morphologie der Fibroblasten zur Untersuchung des zellulären Verhaltens analysiert. Die Fläche (Abbildung 35 e) und die Zirkularität (Abbildung 35 f, perfekter Kreis bei einem Wert von 1,0 (Wertebereich: zwischen 1 und 0, dimensionslos) der Zellen geben dabei weiteren Aufschluss über die Interaktion mit der verfügbaren Oberfläche. Auf den (harten) TCPS-Oberflächen lagen die Fibroblasten extrem ausgebreitet (Zellfläche  $987 \pm 324\ \mu\text{m}^2$ ) und mit einer unregelmäßigen Morphologie (Zirkularität  $0,46 \pm 0,17$ ) vor. Im Gegensatz hierzu waren die Zellen auf dem nativen unstrukturierten Alginat nur minimal ausgebreitet (Fläche  $294 \pm 76\ \mu\text{m}^2$ ), was sich ebenso in der runden Morphologie widerspiegelte (Zirkularität  $0,93 \pm 0,07$ ). Auf den mit Fasern strukturierten Alginaten war die Fläche um etwa 50% geringer, verglichen mit der auf der TCPS-Oberfläche ( $0,6\ \mu\text{m}$ :  $487 \pm 128\ \mu\text{m}^2$ ,  $1,0\ \mu\text{m}$ :  $504 \pm 198\ \mu\text{m}^2$ ,  $2,0\ \mu\text{m}$ :  $456 \pm 176\ \mu\text{m}^2$ ). Die mittlere Zirkularität der Fibroblasten lag bei den strukturierten Alginat-Oberflächen zwischen der von den Fibroblasten auf TCPS und der von unstrukturiertem Alginat ( $0,6\ \mu\text{m}$ :  $0,52 \pm 0,26$ ,  $1,0\ \mu\text{m}$ :  $0,63 \pm 0,30$ ,  $2,0\ \mu\text{m}$ :  $0,74 \pm 0,23$ ).



**Abbildung 35: QUANTIFIZIERUNG DER ZELLULÄREN REAKTION AUF STRUKTURIERTE ALGINAT-OBERFLÄCHEN.** Anteil adhärenter Fibroblasten auf **a** Alginate mit 0,6 µm Strukturen, **b** Alginate mit 1,0 µm Strukturen **c** Alginate mit 2,0 µm Strukturen jeweils im Vergleich zu TCPS (TC) und unstrukturiertem Alginate (ALG). Gezeigt sind die Adhäsionsraten von  $n=3-4$  Experimenten. **d** Adhärenzrate extrahiert aus **a-c** im direkten Vergleich. **e** Morphologische Analyse der Zelladhäsion anhand der Zellfläche und **f** anhand der Zirkularität der Zellen. Gezeigt sind die Daten aus  $n=3$  Experimenten mit  $N>200$  analysierten Zellen. Die horizontalen Balken in **e** und **f** markieren den Mittelwert des Datensatzes.

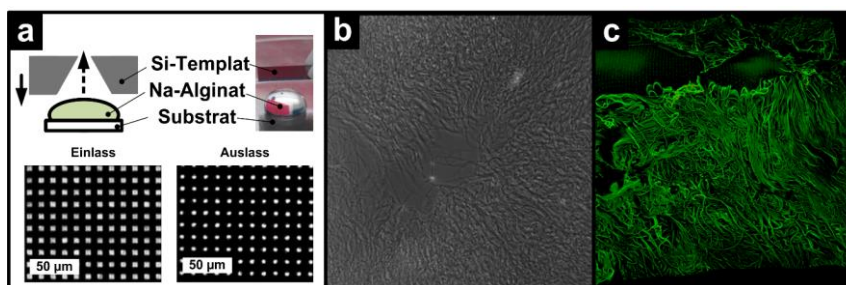
Anhand der Daten konnte gefolgert werden, dass die Strukturierung das Adhäsionsverhalten auf den strukturierten Alginate-Hydrogelen positiv beeinflusste und im Vergleich zu den nativen Alginaten verbessert werden konnte, es aber nicht an das der TCPS-Oberfläche heranreichte.

Zur weiteren Analyse der Morphologie wurden Proben mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM, Abbildung 36) untersucht. Hierdurch konnte die direkte Interaktion der Fibroblasten mit den Fasern bestätigt werden. Die Zellen interagierten dabei insbesondere mit ihren Membranfortsätzen (Filipodien) mit den Fasern und nutzten diese als Art Verankerung (Abbildung 36 a, b). Neben dieser konnte noch eine weitere interessante Interaktion beobachtet werden. Fibroblasten, die adhärenz, aber nicht ausgebreitet auf der Oberfläche vorlagen, bildeten lange, schlauchartige Membranausstülpungen (Abbildung 36 c). Fasern, die nicht aufgerichtet auf der Oberfläche vorlagen, sondern auf der Alginate-Oberfläche auflagern, führten dazu, dass Membranfortsätze durch dieses Geflecht hindurchwuchsen und sich die beschriebene Membranstruktur bildete. Hierdurch waren die Zellen auf der Oberfläche zwar nicht ausgebreitet, aber dennoch fixiert.



**Abbildung 36:** INTERAKTION DER FIBROBLASTEN MIT DER STRUKTURIERTEN ALGINAT-OBERFLÄCHE. **a** Fibroblasten auf Alginaten mit 0,6 µm Fasern. **a1** Strukturiertes Alginat (weißer gestrichelter Kreis) und Interaktion Fibroblasten mit Filopodien/Lamellipodium mit den Alginatfasern (weißer Pfeil) Neben den ausgebreiteten Fibroblasten zeigt das Bild auch einen adhären, jedoch nicht ausgebreiteten Fibroblasten (weißer Stern). **a2** Detailansicht der Interaktion. **b** Interaktion auf Alginaten mit 2,0 µm Fasern mit. **b1** Strukturiertes Alginat (weißer gestrichelter Kreis) und Interaktion Fibroblasten mit Filopodien/Lamellipodium mit den Alginatfasern (weißer Pfeil). minimal adhärenter Fibroblast (weißer Stern) und ausgebreiteter Fibroblast (weiße Raute). **b2** Detailansicht der Interaktion. **c** Ausbildung von Membranfortsätzen (Stern) von runden Zellen (Raute). Die Membranausstülpung wird von aufliegenden Fasern (Pfeile) fixiert. Maßstabsbalken in **a** und **b**: 10 µm.

Zusammenfassend konnte diese Strukturierungsmethode sehr gut genutzt werden, um Alginat mit sehr einfachen Mitteln in einem Größenbereich zu strukturieren, der auch mit Methoden der Mikrosystemtechnik nur mit hohem Aufwand erzielt werden kann. Einfache Zellsysteme wie Fibroblasten reagierten auf diese Strukturierung mit einer gesteigerten Adhäsion, wenn man diese mit nativem, unstrukturiertem Alginat vergleicht. Die Übertragung auf nicht planare Gerüststrukturen wie z. B. Alginat-Mikroträger ist hierbei jedoch der limitierende Faktor, da hierfür das Eintropfen in eine Lösung mit Vernetzer-Ionen nicht in Frage kommt. Aus diesem Grund wurde diese Strukturierungsmethode in dieser Arbeit nicht weiterverfolgt, auch wenn sie die Grundlage für Gerüststrukturen für neuartige Zellmodelle bieten könnte. Dies wurde in ersten Experimenten mit einer Modifikation des Verfahrens aufgezeigt. Nach Ersetzen der porösen Membranen durch ein Siliziumsieb (SmartMembranes GmbH, Halle/Saale, Deutschland) konnten ebenfalls planare Alginat-Gerüststrukturen mit Fasern modifiziert werden. Durch die Verwendung einer dickeren Membran konnte die Faserlänge deutlich gesteigert werden und es entstand ein hochkomplexes Geflecht von Alginatfasern.



**Abbildung 37:** ÜBERTRAGUNG DER STRUKTURIERUNGSMETHODE ZUR HERSTELLUNG KOMPLEXER ALGINAT-GERÜSTSTRUKTUREN.

**a** Illustration der Methode. **b** Phasenkontrastaufnahme der erzeugten Geflecht-artigen Alginat-Gerüststrukturen. **c** Fluoreszenzaufnahme der Geflecht-artigen Alginat-Gerüststrukturen nach Färbung mit FITC-markiertem pLL mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie.

Abbildung 37 a zeigt das Prinzip dieser Methode auf. Die Geflecht-artigen Strukturen (Abbildung 37 b, c) sind nach erster Analyse mit denen vergleichbar, die beispielsweise durch Elektro-Spinnen erzeugt werden, haben jedoch durch die angewendete Methode den Vorteil, dass die Fasern auf der Oberfläche mit

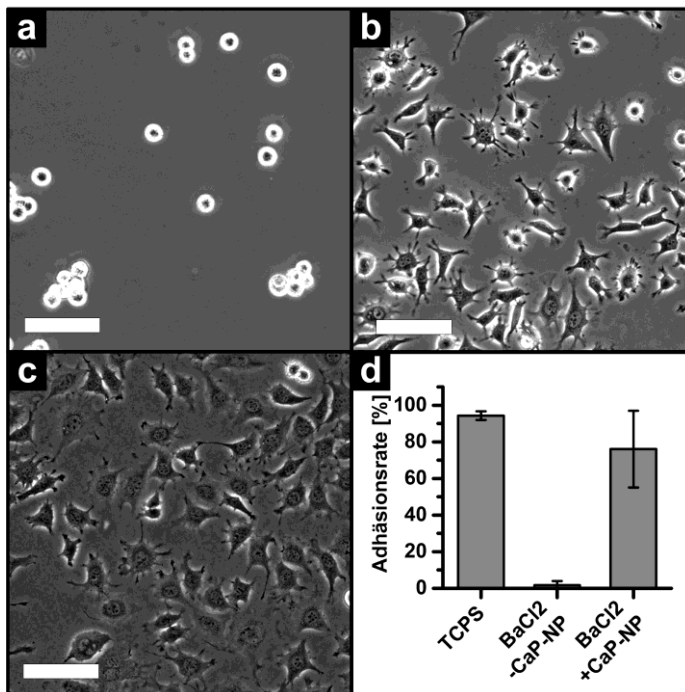
dem Alginat verankert sind. Auf diese Weise erhält man eine Gerüststruktur, die für die Entwicklung neuartiger dreidimensionaler Zellmodelle exzellent geeignet ist.

### 4.3.2 Nanopartikel-beladene Alginat-Oberflächen

*Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil einer Veröffentlichung [310]*

Nach der zuvor beschriebenen Modifikation der Alginat-Oberfläche mit Fasern (Textur), die zwar eine Verbesserung der Adhäsion von Fibroblasten hervorrief, jedoch auf planare Oberflächen beschränkt war, sollte die Möglichkeit einer Modifikation mit funktionalisierten Nanopartikeln untersucht werden. CaP-Nanopartikel wurden dabei während der Vernetzung des Hydrogels zur Modifikation beigelegt.

Die Kultivierung von L929 Fibroblasten zeigte eine Biofunktionalisierung der Oberfläche für dieses Zellsystem. Die Fibroblasten adhärten nach weniger als einer Stunde auf der modifizierten Alginat-Oberfläche. Auf un behandelter Alginat-Oberfläche hatten die Zellen keinen Anreiz zur Adhäsion und eine Agglomeration war die Folge.



**Abbildung 38: ZELLULÄRE REAKTION VON FIBROBLASTEN AUF ALGINAT-HYDROGELEN IM ZUSAMMENHANG MIT CaP-NANOPARTIKEL.**  
**a** Zelluläre Reaktion auf unbeladenen Alginat-Oberflächen. Die Zellen zeigen keine Reaktion in Form einer Adhäsion und tendieren zu Agglomeration durch Zell-Zell-Interaktion.  
**b** Zelluläre Reaktion auf mit CaP-Nanopartikel beladenen Alginat-Oberflächen. Die Zellen sind in der Lage mit der Oberfläche in Form der Adhäsion zu interagieren.  
**c** Zelluläre Reaktion auf Standard TCPS Oberfläche. Die Zellen adhärten und zeigen eine starke Ausbreitung.  
**d** Quantifizierung der Adhäsionsrate nach 24 h Kultivierung. Die höchste Adhäsionsrate konnte auf der TCPS Oberfläche („TCPS“) gemessen werden, die geringste auf der unmodifizierten Alginat-Oberfläche („BaCl<sub>2</sub>-CaP-NP“). Bei der mit CaP-Nanopartikel beladenen Oberfläche („BaCl<sub>2</sub>+CaP-NP“) konnte eine Adhäsionsrate von mehr als 75% gemessen werden. Gezeigt sind die Adhäsionsraten als Mittelwert ± SD (n=3 Experimente). Skala in a, b, c: 200 µm. Abbildung aus [310], abgeändert. Der Kontrast wurde zur besseren Darstellung erhöht.

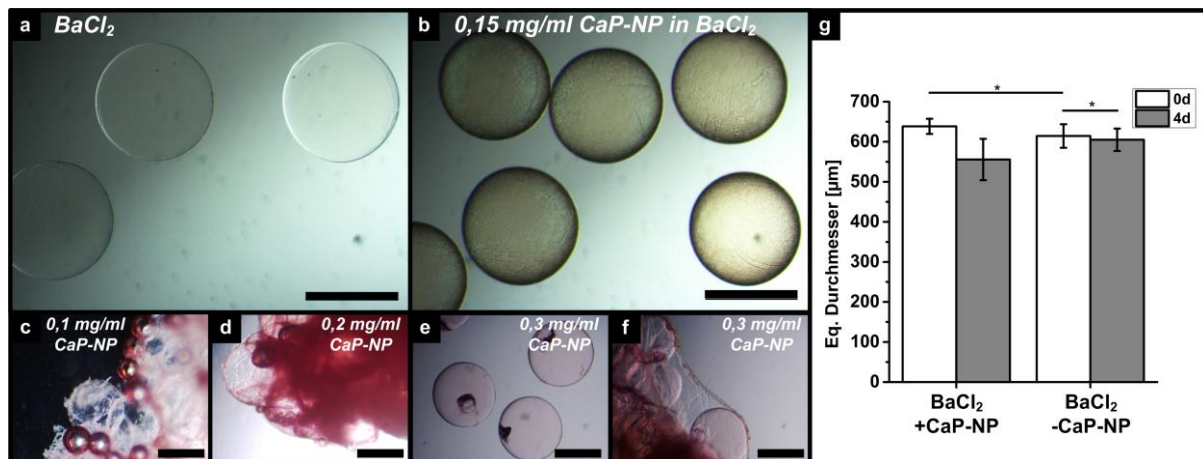
Für diese Untersuchung wurden insgesamt drei Konditionen herangezogen: TCPS-Oberfläche, Alginat-Oberfläche (nativ) und Alginat-Oberfläche mit 0,3 mg/ml CaP-Nanopartikel. Die Zeitrafferaufnahmen zeigten eine eindeutige Reaktion der Zellen auf die modifizierten Alginat-Oberflächen (Abbildung 38 b). Nach einer Stunde war eine Adhäsion der Zellen zu beobachten. Die TCPS-Oberfläche begünstigte ebenso die Zelladhäsion (Abbildung 38 c), im Gegensatz zur reinen Alginat-Oberfläche, auf der keine zelluläre Reaktion in Form einer Adhäsion zu erkennen war (Abbildung 38 a). Die Adhäsionsrate (Abbildung 38 d) der Fibroblasten nach 24 h auf der Standard-Kulturoberfläche („TCPS“) lag bei  $94,4 \pm 2,4\%$ , bei der nativen Alginat-Oberfläche („BaCl<sub>2</sub>-CaP-NP“) bei  $0 \pm 0\%$  und auf der mit CaP-Nanopartikel-beladenen Alginat-Oberfläche („BaCl<sub>2</sub>+CaP-NP“) bei  $76,1 \pm 21,0\%$ . Die vergleichsweise hohe Standardabweichung war durch einen Versuchsansatz zu erklären, bei dem nur eine niedrige Adhäsionsrate, wohingegen bei den zwei anderen Durchläufen eine hohe Adhäsionsrate gemessen wurde. Die Art der Ausbreitung auf den mit CaP-Nanopartikel-beladenen Alginat-Oberflächen unterschied sich rein qualitativ ebenso von der auf den Standard-Kulturschalen. Soweit dies durch die zweidimensionalen Aufnahmen der Phasenkontrastmikroskopie erkennbar ist, waren die Zellen auf der harten Plastikoberfläche mehr ausgebreitet und flacher, wo-

hingegen sie auf der der weicheren CaP-Nanopartikel-beladenen Alginat-Oberfläche weniger ausgebreitet und voluminöser erschienen.

Die Daten belegten, dass eine Modifikation mit nanopartikulären Systemen wie CaP-Nanopartikel erreicht werden konnte. Diese (unspezifische) Funktionalität reichte aus, um die Adhäsion eines einfachen Zellsystems (L929 Fibroblasten) auf Alginat-Hydrogeloberflächen zu ermöglichen. In den sich anschließenden Experimenten sollte untersucht werden, ob diese Funktionalität für die Kultivierung von komplexeren Zellsystemen wie z. B. hMSCs ausreicht. Hierzu sollte zunächst untersucht werden, inwieweit sich die CaP-Nanopartikel auf Alginatkugeln übertragen lassen und wie im Falle des erfolgreichen Transfers die zelluläre Reaktion von hMSCs aussieht.

### Übertragung der CaP-Nanopartikel auf Oberflächen: Kugeln

Für die Übertragung standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung, bei denen die nativen Alginatkugeln in einer CaP-Nanopartikel Dispersion inkubiert wurden oder bei der die Alginattropfen bei dem Herstellungsschritt in einem Vernetzerbad geliert wurden, das bereits die CaP-Nanopartikel enthielt. Insbesondere die zweite Herstellungsmethode erlaubte die Integration der Beschichtung in den normalen Herstellungsprozess der Alginatkugeln. In Vorversuchen wurde ebenso festgestellt, dass eine Inkubation der Alginatkugeln in einer CaP-Nanopartikel Dispersion zu einem starken Schrumpfen der Kugeln führte, was durch noch freies Calcium zu erklären war. Basierend auf dem Wissen der chemischen und physikalischen Eigenschaften von CaP-Nanopartikeln und Alginat wurde die Hypothese überprüft, ob ein direktes Beladen der Alginatkugeln mit CaP-Nanopartikeln während des Herstellungsprozesses möglich ist. Abbildung 39 a-f zeigt Alginatkugeln, die in unterschiedlichen Vernetzungsbädern geliert wurden. Alginatkugeln, die in einem Fällbad mit 20 mM BaCl<sub>2</sub> geliert wurden, zeigten die nahezu einer perfekten Kugel entsprechenden Morphologien, mit einer sehr glatten Gestaltung der Oberfläche und einer vollständigen Transparenz (Abbildung 39 a). Bei einem Vernetzerbad mit 10 mM BaCl<sub>2</sub> mit 15 mg/ml CaP-NP konnten ebenfalls wohlgeformte Alginatkugeln hergestellt werden (Abbildung 39 b). Diese waren auf der Oberfläche stark strukturiert und zeichneten sich durch eine reduzierte Transparenz aus.



**Abbildung 39: ALGINATKUGELN MIT UNTERSCHIEDLICHER BELADUNG DURCH CAP-NANOPARTIKEL.**

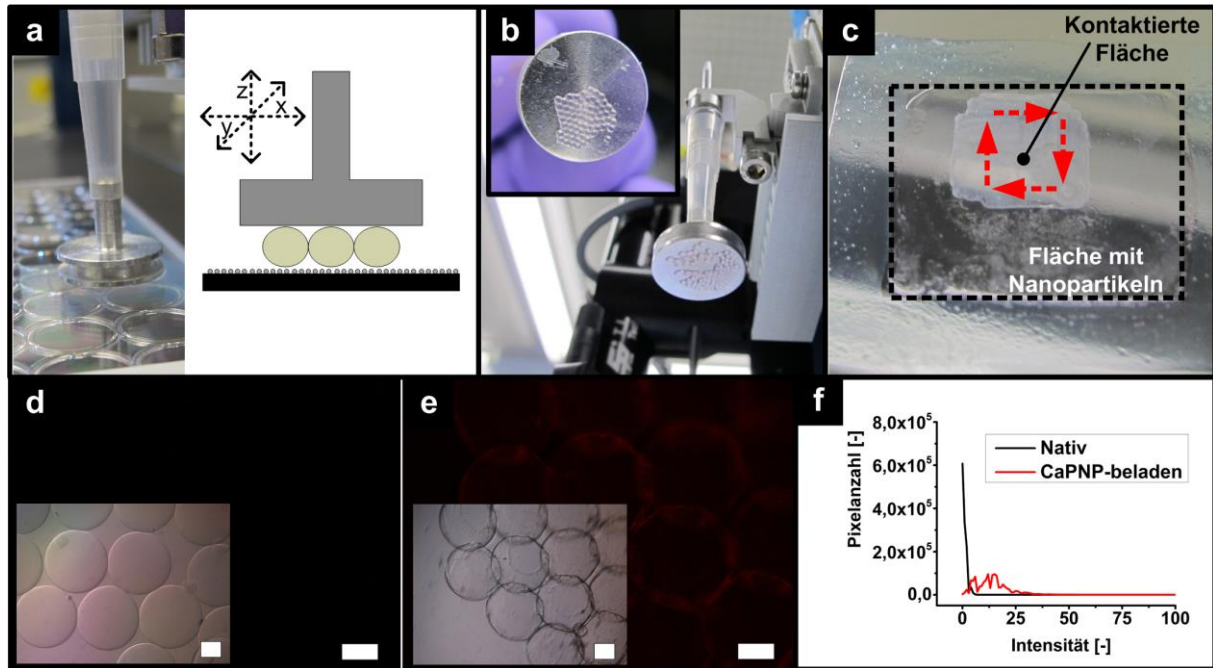
**a** Native Alginatkugeln ohne CaP-NP Beladung, **b** Alginatkugeln nach Beladung im Fällbad mit 0,15 mg/ml CaP-NP und 10 mM BaCl<sub>2</sub>. Reine CaP-NP Dispersionen mit **c** 0,1 mg/ml und **d** 0,2 mg/ml CaP-NP ermöglichen keine Herstellung von Alginatkugeln. Dispersionen mit einer Konzentration von **d**, **f** 0,3 mg/ml CaP-NP ermöglichen zwar die Herstellung von Alginatkugeln, diese jedoch nicht reproduzierbar. **g** Quantifizierung der Alginatkugeln anhand des Äquivalent-Durchmessers nach 0 d und 4 d. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD ( $n=3$ ). (\*): statistisch signifikant ( $p < 0,05$ , t-test). Skala in a-f: 500 µm. Abbildung aus [310], abgeändert.

Erfolgte die Vernetzung des Alginats nur in CaP-Nanopartikel Dispersionen ohne BaCl<sub>2</sub>, so war bei einer Konzentration von 0,1 mg/ml (siehe Abbildung 39 c) und 0,2 mg/ml (siehe Abbildung 39 d) keine Formation von Alginatkugeln zu beobachten. Die Abbildungen veranschaulichen deutlich, dass das Alginat zwar

minimal geliert und auch teilweise kugelförmige Hydrogele erkennbar sind, diese jedoch nicht sauber getrennt voneinander vorliegen. Bei einer Konzentration von 0,3 mg/ml (Abbildung 39 e) CaP-Nanopartikel konnten in einzelnen Experimenten voneinander getrennte Alginatkugeln beobachtet werden. Diese waren jedoch nicht reproduzierbar herstellbar, wie Abbildung 39 f illustriert. Auffällig war bei dieser Vernetzerlösung eine einseitige Deformation in Form eines Kranzes, sowie eine zusätzliche Alginatschicht um die agglomerierten Kugeln. Aus den Daten wurde ersichtlich, dass eine Mischung von CaP-Nanopartikeln nur mit einer 20 mM BaCl<sub>2</sub> Lösung zu beladenen Alginatkugeln führte. Die Stabilität dieser Kugeln wurde anhand des Äquivalent-Durchmessers direkt nach der Herstellung und nach 4 Tagen Inkubation quantifiziert (Abbildung 39 g). Hieraus wurde ersichtlich, dass die Kugeln in diesem Zeitraum stabil waren, sich im Fall der mit CaP-Nanopartikel beladenen Alginatkugeln aber von der Ausgangsgröße signifikant unterschieden (Tag 0:  $638,5 \pm 19,0 \mu\text{m}$ , Tag 4:  $555,7 \pm 51,7 \mu\text{m}$ ). Die nativen Alginatkugeln unterschieden sich dahingegen nicht signifikant, wenn man den Durchmesser nach Herstellung bzw. nach 4 Tagen vergleicht (Tag 0:  $614,3 \pm 29,3 \mu\text{m}$ , Tag 4:  $604,9 \pm 28,0 \mu\text{m}$ ). Ebenso unterschieden sich die Äquivalent-Durchmesser der nativen Alginatkugeln und die der CaP-Nanopartikel beladenen Alginatkugeln signifikant nach der Herstellung. Für die Übertragung wurde ein Prototyp entwickelt, der Nanopartikel von einer planaren (nanostrukturierten) Oberfläche auf native Alginatkugeln übertragen soll. Basierend auf dem GeSiM Nanoplotter (GeSiM mbH, Rossendorf, Deutschland) wurde mit der Halterung für die sog. *passive tip* ein Stempel aus Aluminium an den in x, y, und z beweglichen Roboterkopf ein Werkzeug implementiert (Abbildung 40 a). Mit diesem Werkzeug ließen sich Alginatkugeln definiert mit einer NP-beladenen Oberfläche horizontal kontaktieren (z-Richtung) und gleichzeitig lateral über diese Oberfläche bewegen (x- und y-Richtung).

Durch den genutzten Aluminiumstempel und den sich um die Alginatkugeln befindlichen Flüssigkeitsfilm adhärten die Alginatkugeln an dem Metall, was eine leichte Handhabung garantierte (Abbildung 40 b). Die Hardware des Nanoplotters ist über eine Schnittstelle vollständig kontrollierbar und ermöglichte die Implementierung von Verfahrenswegen, mit denen die Alginatkugeln über die abgeschiedenen Nanopartikel bewegt werden sollten. Abbildung 40 c zeigt die NP-Oberfläche nach Durchführung der Übertragung. Deutlich zu erkennen ist die Fläche mit veränderter Transparenz, in der der Fahrweg des Roboterarms mit roten Pfeilen annotiert wurde. Insgesamt wurde diese Bewegung viermal wiederholt. Durch die Nutzung von TRITC-modifizierten Nanopartikeln konnte der Transfer verifiziert werden. Abbildung 40 d zeigt eine Fluoreszenzaufnahme mit dem *Texas Red* Filter, auf der kein Fluoreszenzsignal detektierbar war, wohingegen das Fluoreszenzbild in Abbildung 40 e ein deutliches Signal an der Oberfläche der Alginatkugeln aufwies. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Histogramme des roten Bildkanals exportiert und in einem Diagramm dargestellt (Abbildung 40 f). Das Histogramm der nativen Alginatkugeln wies die meisten Pixelintensitäten im Bereich von etwa 0-10 auf, wohingegen bei den Alginatkugeln nach der Transferprozedur die Pixelintensitäten im Bereich von 0-50 lagen, was mit der erfolgreichen Übertragung der CaP-NP einherging. Wie in Abbildung 40 e zu erkennen ist, war die Form der Alginatkugeln durch die Prozessierung nicht signifikant verändert, was auf eine optimal eingestellte Höhe von Stempel und NP-Oberfläche schließen ließ. Dennoch wurden vereinzelt deformierte Alginatkugeln beobachtet, die möglicherweise durch den Stempel gequetscht wurden. In weiteren Entwicklungsstufen des Prototyps könnte ein flexibler Objektisch diese Problematik lösen, indem bei Kontaktierung die Kraft nicht auf die Alginatkugeln allein ausgeübt wird, sondern auch durch den Objektisch abgefedert wird, um ein Zerquetschen zu vermeiden. Kombiniert man die Ergebnisse aus diesem Abschnitt, so ist festzuhalten, dass Alginat mit CaP-Nanopartikeln zur Zelladhäsion funktionalisiert und Alginatkugeln ebenso stabil mit einem alternativen Vernetzungsbad mit CaP-Nanopartikeln beladen werden konnten.





**Abbildung 40: ROBOTER-GESTÜTZTE ÜBERTRAGUNG VON CAP-NANOPARTIKELN VON EINER OBERFLÄCHE AUF ALGINATKUGELN.**

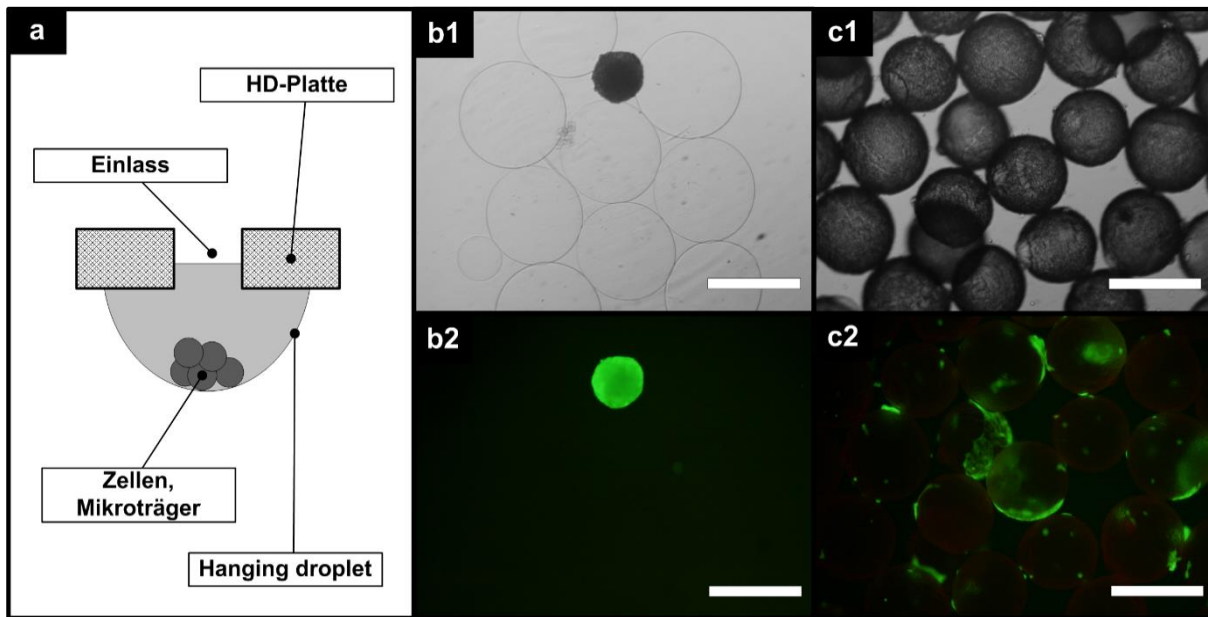
**a** Prinzip der Übertragung von abgeschiedenen Nanopartikel auf Alginatkugeln. Die Kugeln werden mit einem Stempel aus Aluminium mit der Nanopartikel-beladenen Oberfläche kontaktiert und mit dem Stempel in x- bzw. y-Richtung bewegt. **b** Die Alginatkugeln adsorbieren („kleben“) durch einen noch minimal vorhandenen Flüssigkeitsfilm an dem Aluminium-Stempel, was einen Transfer zur und von der Nanopartikel-beladenen Oberfläche erleichtert. **c** Oberfläche mit abgeschiedenen Nanopartikeln nach dem Transfer. Der Bereich mit Nanopartikeln ist durch die schwarze gestrichelte Linie markiert. Der Bereich, in dem die Alginatkugeln kontaktiert wurden, ist durch die veränderte Lichtbrechung deutlich erkennbar. Die roten Pfeile zeigen das Bewegungsmuster zur Übertragung an. **d** Native Alginatkugeln ohne Nanopartikel, **e** Alginatkugeln nach durchgeführter Übertragung. Die Bilder in **d** und **e** zeigen Fluoreszenzaufnahmen mit dem Texas Red Filter, die kleinen Bilder die entsprechenden Durchlichtaufnahmen. Durch die Modifikation der Nanopartikel mit Rhodamin ist eine Übertragung mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar. **f** Die Histogramme der Intensität des roten Kanals aus **d** (schwarze Linie) bzw. **e** (rote Linie) illustrieren die Übertragung durch die Verschiebung des Histogramms. Maßstab in **d** und **e**: 200  $\mu\text{m}$ . Abbildung aus [310], abgeändert.

### Untersuchungen zur Nutzung CaP-Nanopartikel-beladener Alginatkugeln als Mikroträger

Die mit CaP-Nanopartikel-beladenen Alginat-Mikroträger wurden aufgrund der vorangegangenen Experimente im „hängenden Tropfen“ (Abbildung 41 a) in Verbindung mit hMSCs untersucht. Die Kultivierungsform des „hängenden Tropfen“ wurde gewählt, um eine direkte Kontaktierung der Zellen mit der modifizierten Oberfläche zu realisieren und „Nebeneffekte“ wie eine Plastikadhäsion auszuschließen.

Auf den nativen Alginat-Mikroträgern (ohne Nanopartikel) erfolgte eine Aggregatbildung aufgrund fehlender Zell-Matrix-Interaktionsmöglichkeiten (Abbildung 41 b1, b2). Wurden die Zellen zusammen mit CaP-Nanopartikel funktionalisierter Alginat-Mikroträger kultiviert, so konnte man ein verändertes Verhalten beobachten. Wie in Abbildung 41 c1 und c2 gezeigt, interagierten die Zellen mit den Mikroträgern. Im Vergleich zu den nicht modifizierten Mikroträgern erfolgte eine Zelladhäsion, die wie in Abbildung 41 c2 zu erkennen ist auch zu einer Ausbreitung der Zellen führen kann. Insgesamt konnte eine gesteigerte Adhäsion beobachtet werden, die jedoch nicht generell zu einer Ausbreitung der Zellen auf den Mikroträgern führte. Mikroträger, die als Kontrolle mitgeführt wurden und für eine adhärenzte Kultur ausgelegt sind (nicht aufgeführt), zeigten, dass bei optimaler Funktionalisierung ein vollständiger Bewuchs der Mikroträger mit ausgebreiteten Zellen möglich war. Die durchgeführten Vitalitätsfärbungen (Abbildung 41 c2) belegten die weiterhin vorhandenen biokompatiblen Eigenschaften der Alginat-Mikroträger, die mit CaPNP modifiziert wurden.

Die in diesem Kapitel beschriebene Modifikation zeichnete sich durch ihre direkte Integrationsmöglichkeit in den Herstellungsprozess der Alginate-Mikroträger aus. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, eine Funktionalisierung während der Mikroträger-Herstellung zu erreichen. Einfache Zellsysteme, wie murine Fibroblasten konnten auf diesen Alginate-Oberflächen adhären und sich ausbreiten, wohingegen anspruchsvollere Zellsysteme wie hMSCs zwar adhärten, sich aber nicht ausbreiteten. Trotz der Vorteile dieser Methode wurde eine weitere Optimierung, z. B. in Form einer Funktionalisierung der Nanopartikel mit Proteinen der extrazellulären Matrix, nicht weiter verfolgt und eine neuartige Methode der Metallisierung von Alginate-Hydrogelen untersucht, die im folgenden Kapitel beschrieben wird.



**Abbildung 41:** ALGINAT-MIKROTRÄGER MODIFIZIERT MIT PEI CAP-NANOPARTIKELN (MARKIERT MIT TRITC).  
**a** Schematischer Aufbau der Kultivierungsmethode „Hängender Tropfen“. **b** Zelluläre Reaktion von hMSCs auf native Alginate-Mikroträger nach 4 Tagen im „Hängenden Tropfen“. **c** Zelluläre Reaktion von hMSCs auf PEI-CaP-Nanopartikel Alginate-Mikroträger nach 4 Tagen im „hängenden Tropfen“. **b1**, **c1** Durchlichtmikroskopie, **b2**, **c2** Fluoreszenzmikroskopie (Triple-Band Filter). Maßstabsbalken: 500 µm. Abbildung aus [310], abgeändert.

### 4.3.3 Metallisierte Alginate-Oberflächen

*Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines Manuskripts zur Veröffentlichung [325].*

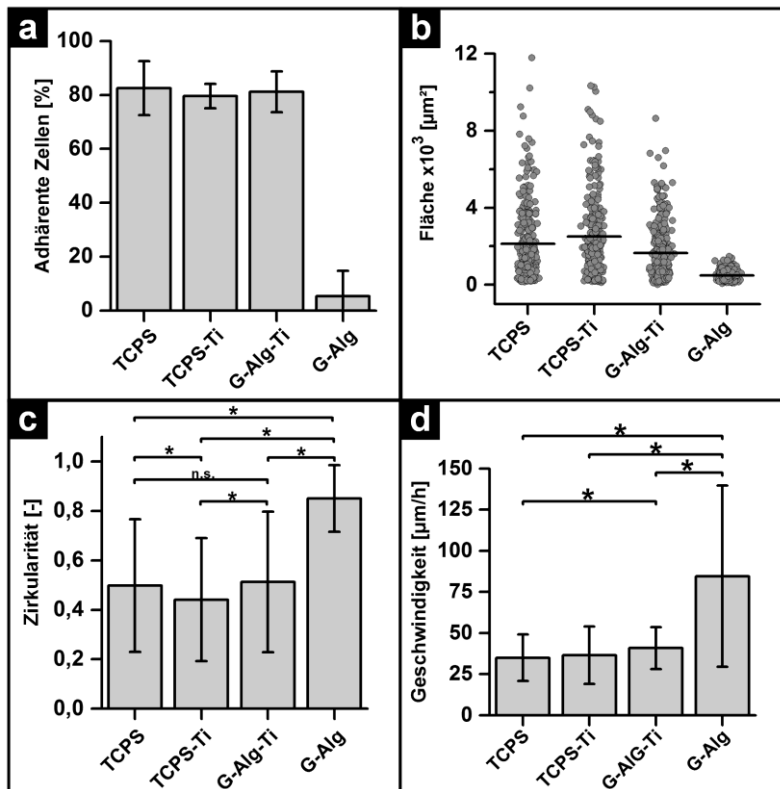
In diesem Ansatz wurde die Idee verfolgt, die Eigenschaften des Titans mit denen des Alginats zu verbinden um eine Biofunktionalisierung zu realisieren. Bei den Untersuchungen dieser Oberflächenmodifikation zeigte sich zu Beginn, dass die Ansätze mit nicht geliertem Alginate ein Ablösen der Alginatschicht nach Kontaktierung mit der Zellsuspension zur Folge hatte und diese Kondition generell nicht kompatibel zur Kultivierung von adhären Zellen ist. Sie wurde daher nicht weiter betrachtet und der Fokus auf die Analyse des TCPS bzw. gelierten Alginats mit und ohne Metallisierung gesetzt.

#### Verhalten von mesenchymalen Stammzellen auf metallisiertem Alginate bzgl. der Morphologie

Die Morphologie der mesenchymalen Stammzellen wurde 5 h nach Inokulation analysiert. Dieser Zeitpunkt wurde ausgewählt, da hier eine Adhäsion der Zellen weitestgehend abgeschlossen ist. Abbildung 42 a zeigt die Adhäsionsrate der Zellen zu diesem Zeitpunkt auf den verschiedenen Oberflächen. Die geringste Adhäsionsrate mit weniger als 5% konnte auf den nativen vernetzten Alginate-Oberflächen (G-Alg) gemessen werden. Auf den Oberflächen TCPS, titanisiertem TCPS-Ti und titanisiertem vernetztem Alginate (G-Alg-Ti) waren vergleichbar hohe Adhäsionsraten von etwa 80% zu verzeichnen. Die Fläche der analy-



sierten Zellen auf der TCPS-Oberfläche war am größten ( $2129 \pm 2730 \mu\text{m}^2$ ), gefolgt von TCPS-Ti ( $2501 \pm 2543 \mu\text{m}^2$ ), G-Alg-Ti ( $1655 \pm 1428 \mu\text{m}^2$ ) und G-Alg ( $490 \pm 261 \mu\text{m}^2$ ). Abbildung 42 b zeigt den Vergleich der unterschiedlichen Oberflächen und deren Einfluss auf die Zellfläche. Bei der Zellfläche ist zu beachten, dass diese bei hMSCs allgemein sehr heterogen in einer Population ist. Die Zirkularität (*circularity*, Abbildung 42 c) der Zellen auf den Oberflächen TCPS, TCPS-Ti und G-Alg-Ti lag zwischen 0,51 und 0,44, wohingegen bei den Zellen auf unbehandelten G-Alg eine Zirkularität von 0,85 zu verzeichnen war. Insgesamt konnte anhand dieser Daten gefolgert werden, dass die Titanisierung von vernetztem Alginate eine ähnliche Interaktion der Zellen erlaubte, wie das z. B. auf Standard-TCPS der Fall ist.



**Abbildung 42:** ANALYSE DES ZELLULÄREN VERHALTENS AUF TI-ALGINAT OBERFLÄCHEN.

**a** Anteil adhärenter Zellen auf den verschiedenen Oberflächen (n=3).  
**b** Fläche der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen, dargestellt als Punktwolke. Werte über  $12000 \mu\text{m}^2$  sind in dem Graphen nicht dargestellt, wurden in der statistischen Analyse aber berücksichtigt. Die horizontale Linie in den jeweiligen Punktwolken markiert den Mittelwert (n=3, 337 < N < 360).  
**c** Zirkularität der Zellen als morphologische Analyse, (n=3, 337 < N < 360).  
**d** Migrations-Geschwindigkeit der Zellen auf den verschiedenen Oberflächen (n=3, N=77). Die statistische Signifikanz wurde in **b** und **c** mit dem Mann-Whitney Test und in **d** mit dem Two-Sample t-test durchgeführt. \* = statistisch signifikant, n.s. = statistisch nicht signifikant.

### Verhalten von mesenchymalen Stammzellen auf Ti-Alginat bzgl. der Migration

Durch die Quantifizierung der Migration kann ebenso eine Aussage über die Attraktivität der Kulturflächen getroffen werden, da die Migrationsgeschwindigkeit u. U. mit der Zell-Matrix Interaktion korreliert. Auf den Oberflächen TCPS, TCPS-Ti und G-Alg-Ti konnten insgesamt vergleichbare Geschwindigkeiten gemessen werden (TCPS:  $35,0 \pm 14,2 \mu\text{m}/\text{h}$ , TCPS-Ti:  $36,6 \pm 17,4 \mu\text{m}/\text{h}$ , G-Alg-Ti:  $40,8 \pm 12,8 \mu\text{m}/\text{h}$ ) im Gegensatz zu G-Alg mit TCPS-Ti:  $85,7 \pm 55,0 \mu\text{m}/\text{h}$  (Abbildung 42 d). Bei der Migrationsgeschwindigkeit auf G-Alg war zusätzlich festzustellen, dass keine Interaktion von Zellen und Alginate eine zusätzliche Bewegung der Zellen durch Konvektion bzw. Unebenheiten durch die Hydrogel-Oberfläche förderte. Die Ergebnisse zeigten, dass durch die Titanisierung der Alginate-Oberflächen hMSCs auf Alginate adhären konnten und es schloss sich die Frage nach der Übertragbarkeit auf dreidimensionale Hydrogele an. Wie auch bei den im vorherigen Abschnitt untersuchten Oberflächen mussten die Hydrogele vor der Titanisierung entwässert werden, um im Vakuum beschichtet werden zu können. Die Experimente mit den Hydrogelen auf Oberflächen haben gezeigt, dass bei der Entwässerung von Alginate-Membranen die Verringerung und bei der Rehydratisierung die Vergrößerung des Volumens in vertikaler Richtung verläuft. So war bei der Entwässerung z. B. kein Ablösen des Hydrogels von den Rändern der Petrischale zu verzeichnen. Dies war bei der Rehydratisierung von entscheidendem Vorteil, da somit die Titanbeschichtung nur geringfügig verändert wurde. Auch konnte speziell bei der titanisierten Oberfläche nach Rehydratisierung z. B. keine Bildung größerer Risse o.ä. beobachtet werden. Anders sah dieser Sachverhalt bei den dreidimensionalen

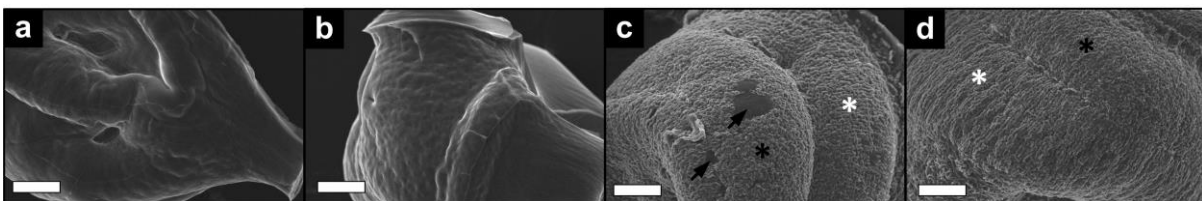
Alginatkugeln aus. Durch die dreidimensionale Form erfolgten die Entwässerung und damit der Volumenverlust gleichmäßig über die Kugel. Das Volumen der Kugel verringerte sich je nach Trocknung auf bis zu 20% des nativen (rehydratisierten) Volumens. In der Konsequenz wurde auch nur dieser Teil der Oberfläche rehydratisiert.

### Trocknung von Alginatkugeln

Die Trocknung von Alginatkugeln für die Funktionalisierung der Oberfläche musste hinsichtlich der Erhaltung der Oberfläche erfolgen. Durch die notwendigen Schritte der Trocknung und Rehydratisierung vor bzw. nach der Titanisierung, war die Beladung durch Titan von der Oberfläche im getrockneten Zustand abhängig. Die Trocknung von Alginatkugeln „an der Luft“ führte zu einer Reduzierung der Oberfläche auf unter 20% im Vergleich zum nativen Zustand. Weitere Trocknungsverfahren, die auch in der Literatur für Alginatkugeln beschrieben sind, waren die Lyophilisierung und die kritische Punkttrocknung. Bei Betrachtung der getrockneten Alginatkugeln unter dem Mikroskop wurde deutlich, dass es bei der Art der Trocknung zu einem unterschiedlichen Trocknungsergebnis kam. Bei kritischer Punkttrocknung waren die getrockneten Alginatkugeln an der Oberfläche glatt jedoch stark in ihrer Größe reduziert (35% im Vergleich zur Ausgangsgröße). Die Alginatkugeln, die durch Gefriertrocknung behandelt wurden, zeigten eine hohe Rauigkeit, waren jedoch um ein Vielfaches größer (78% im Vergleich zur Ausgangsgröße) im Vergleich zu den Alginatkugeln, die mit kritischer Punkttrocknung prozessiert wurden. Die Gefriertrocknung bot daher die Möglichkeit, eine Trocknung von Alginat unter größtmöglicher Beibehaltung der Größe der Kugel durchzuführen.

### Übertragung der Metallisierung auf sphärische Alginat-Mikroträger

Nach der erfolgreichen Titanisierung des Hydrogels und der damit einhergehenden Steigerung der Adhäsion von Zellen lag es nahe, dieses Verfahren auch auf Alginatkugeln zu übertragen. Hierbei lagen die offensichtlichen kritischen Schritte in der Trocknung und der Rehydratisierung der Alginatkugeln. Experimentell konnte belegt werden, dass die Alginatkugeln nach erfolgter Trocknung durch Inkubation in z. B. Medium rehydratisieren und ihr ursprüngliches Volumen wieder annahmen. Die Kugeln besaßen vor Trocknung einen Durchmesser von 300-400  $\mu\text{m}$ , nach der Trocknung einen Durchmesser von 100-150  $\mu\text{m}$  und nach erfolgter Rehydratisierung wiederum einen Durchmesser von 300-500  $\mu\text{m}$ . Eine Abschätzung der Oberfläche von getrockneten und rehydratisierten Alginatkugeln ( $4 \cdot \pi \cdot r^2$ ) zeigte, dass die getrockneten Kugeln nur noch 17% der Oberfläche besaßen im Vergleich zu den hydratisierten Kugeln. Dies würde z. B. bedeuten, dass bei einer Behandlung der Kugeln im getrockneten Zustand, wie es z. B. bei der Titanisierung erfolgt, nur ein Bruchteil der Oberfläche der Kugeln im hydratisierten Zustand tatsächlich titanisiert war. Durch die Rehydratisierung quollen die Alginatkugeln auf und fraktionierten die titanisierte Oberfläche. Der Abstand der titanisierten Stellen beträgt im Mittel 4,23  $\mu\text{m}$  ( $\pm 2,29 \mu\text{m}$ ).



**Abbildung 43: REM-AUFNAHME TI-KUGELN.**

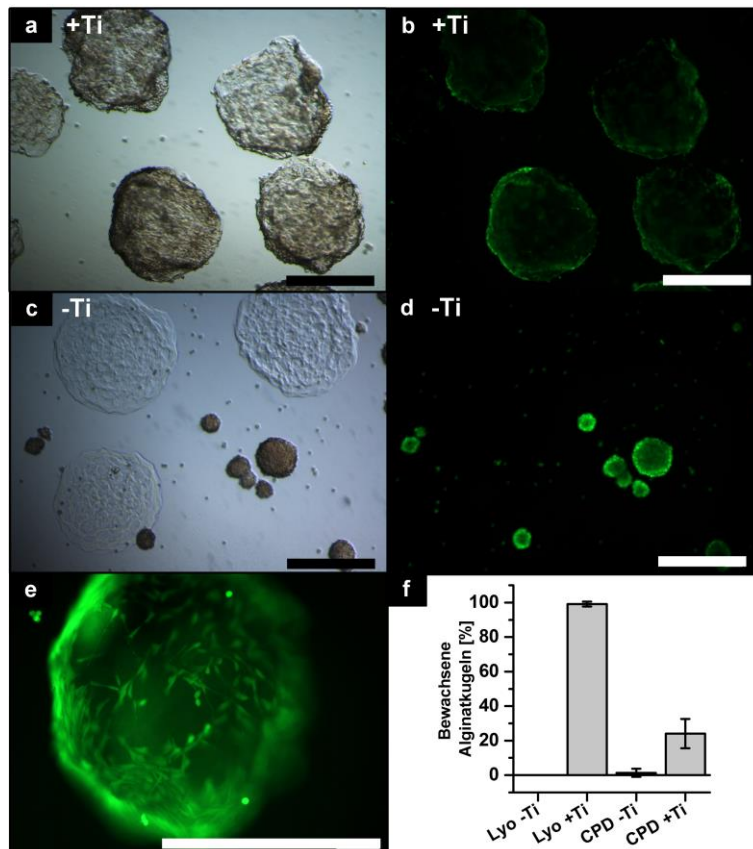
*a und b* Native Alginat-Mikroträger ohne Modifikation. Eindeutig ist die glatte Oberfläche zu erkennen. Die unregelmäßige Struktur der Mikroträger ist durch die Trocknung zu erklären. *c und d* Alginat-Mikroträger nach Titanisierung. Im Vergleich zu den nativen Mikroträgern ist eine höhere Rauigkeit der Oberfläche zu erkennen. Weiße Sterne: Bereiche mit paralleler Strukturierung der Oberfläche. Schwarze Sterne: Unregelmäßige Strukturierung der Oberfläche. Pfeile in *a* markieren Bereiche, in denen keine Titanisierung erfolgt ist. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

Kleinere Zellen wie z. B. L929 Fibroblasten besitzen im abgerundeten Zustand einen Durchmesser von 8-10 µm und sollten daher mit den titanisierten Stellen interagieren können.

Für hMSC, die größer sind als L929 Fibroblasten sollte dies ebenso gelten. Bei genauerer Betrachtung der Oberflächenbeschaffenheit mittels REM ließ sich im Vergleich zur sehr glatten Oberfläche nativer Alginatkugeln (Abbildung 43 a, b) bei den titanisierten Alginatkugeln eine Steigerung der Rauigkeit auf der Oberfläche (Abbildung 43 c, d) beobachten. Durch die Rehydratisierung äußerte sich dies nicht flächig, sondern als schuppenartige Merkmale auf den Alginatkugeln. Diese Schuppen konnten auch im rehydratisierten Zustand unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden, sodass ein Artefakt ausgeschlossen werden konnte. Die Schuppen lagen stabil auf der Oberfläche vor, so dass sie die Trocknung während der Präparation für die REM-Aufnahmen überstanden.

**Adhäsionsverhalten von Fibroblasten auf metallisierten Alginatkugeln**

Die Interaktion von Fibroblasten mit titanisierten Alginatkugeln ist in Abbildung 44 dargestellt. Die geringste Interaktion konnte auf den unmodifizierten Alginatkugeln beobachtet werden (-Ti, Abbildung 44 c, d). Sowohl auf den lyophilisierten, als auch auf den CPD-getrockneten Alginatkugeln war nur eine geringe Zellinteraktion zu verzeichnen, die sich in einem Bewuchs von weniger als 5% (Abbildung 44 f) widerspiegelte. Die Zellen bildeten in der Konsequenz mehrere kleinere Aggregate, die sich nicht in Interaktion mit den Alginatkugeln befanden. Bei den titanisierten Alginatkugeln war eine exzellente Interaktion im Falle der lyophilisierten Alginatkugeln (+Ti, Abbildung 44 a, b, e) zu beobachten (>95% bewachsene Alginatkugeln). Die Zellen adhärten auf der Oberfläche der Alginatkugeln bis zu einem konfluenten Bewuchs. Bei den CPD-getrockneten Alginatkugeln war zwar im Vergleich zu den unmodifizierten Alginatkugeln eine verbesserte Interaktion zu beobachten (> 20% bewachsene Alginatkugeln), die jedoch im Vergleich zu den lyophilisierten Alginatkugeln deutlich geringer ausfiel.



**Abbildung 44: INTERAKTION VON L929 FIBROBLASTEN MIT TITANISIERTEN, GERIERTGETROCKNETEN ALGINATKUGELN, KULTIViert FÜR 5 TAGE IM „HÄNGENDEN TROPFEN“.**  
*a* Durchlichtaufnahme bewachsener Alginatkugeln mit Fibroblasten. Durch die Titanisierung erscheinen die Alginatkugeln dunkel. *b* Fluoreszenzaufnahme (FITC) von *a*. Durch die FDA-Färbung wird die Adhäsion der Zellen auf den Alginatkugeln deutlich. *c* Durchlichtaufnahme unbewachsener, lyophilisierter Alginatkugeln. Die Zellen aggregieren zwischen den Alginatkugeln. *d* Fluoreszenzaufnahme (FITC) von *c*. Durch die FDA-Färbung wird deutlich, dass keine adhären Zellen auf den Alginatkugeln vorliegen, sondern Aggregate bilden. *e* zeigt eine Detailaufnahme (Fluoreszenzaufnahme, FITC) FDA-gefärbter Fibroblasten auf titanisierten Alginatkugeln. Die Morphologie der Fibroblasten verdeutlicht die Interaktion mit der modifizierten Oberfläche. *f* Quantifizierung der Interaktion von L929 Fibroblasten auf titanisierten Alginatkugeln nach Tag 5 in „hängender Tropfen“-Kultur, dargestellt als Mittelwert ± SD, n=3. Maßstabsbalken: 500 µm. Abkürzungen: Lyo: lyophilisiert, CPD: Kritisch-Punkt-Trocknung, Ti: ohne Titanisierung, +Ti: mit Titanisierung.

#### 4.3.4 Nicht-kovalenten ECM-Alginat Gerüststrukturen

*Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines Manuskripts in Vorbereitung zur Veröffentlichung [325].*

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Modifikationen beschrieben, die eine unspezifische Biofunktionalisierung, d. h. ohne biochemische Signale beinhaltete. Die zelluläre Reaktion in Form der Adhäsion konnte dadurch zwar gesteigert werden, ist jedoch auf einfache Zellsysteme begrenzt. In diesem Abschnitt wird daher die Biofunktionalisierung von Alginat-Hydrogelen durch eine nicht-kovalente Mischung mit Proteinen und damit biochemischen Signalen der extrazellulären Matrix untersucht. Durch die Herstellung dieser Mischungen wird untersucht, ob eine zelluläre Antwort in Form der Adhäsion erreicht werden kann.

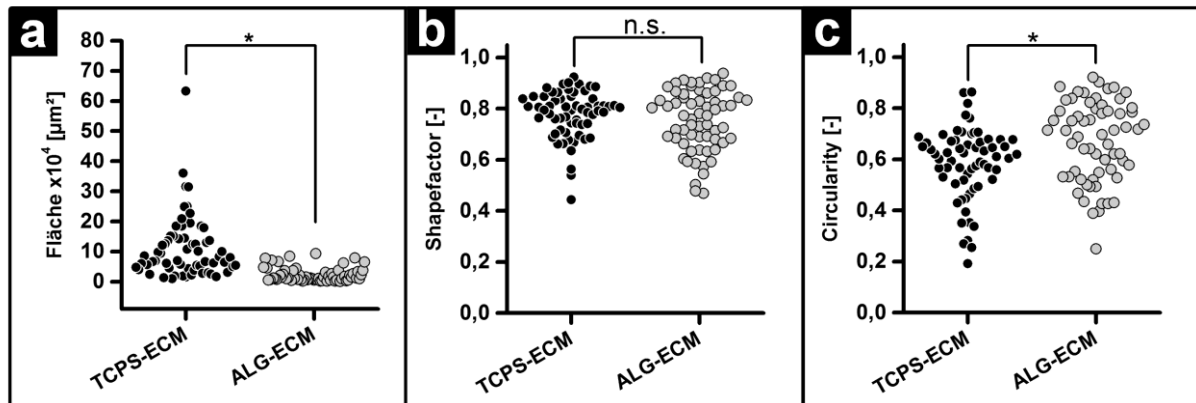
#### Hydrogele aus Alginat-ECM Mischungen

Die produzierten Hydrogele zeigten nach der Aufkonzentrierung unterschiedliche Eigenschaften. Die Hydrogele ohne ECM-Zusatz zeigten bei der Zugabe von Barium die bekannten Benetzungseigenschaften. Der Flüssigkeitsfilm verteilte sich gleichmäßig auf dem Hydrogel in der Kulturschale. Bei der Alginat-ECM Mischung war eine Benetzung zu beobachten, die auf eine höhere Hydrophobizität der Oberfläche schließen ließ. Der Flüssigkeitsfilm bildete Tropfen, die auch bei der Dispensierung von Wasser auf hydrophoben Oberflächen beobachtet werden konnte. Betrachtet man die einzelnen Komponenten des Alginat-ECM Gemisches, so liegen hier negativ geladene Polysaccharide und eine Mischung aus verschiedenen Proteinen vor. Laminin, Kollagen IV und Entactin bilden, neben weiteren Faktoren, die Hauptbestandteile der Proteinmischung [326]. Insbesondere Kollagen besitzt eine Vielzahl hydrophober Aminosäuren, die darauf schließen lassen, dass durch die Rehydratisierung diese Proteine an der Oberfläche des Alginat-Hydrogels vorlagen. Die Bereitstellung einer Basis aus reinem Alginat war bei der Herstellung dieser Art von Hydrogelen notwendig, da experimentelle Vorarbeiten gezeigt hatten, dass eine Alginat-ECM Mischung unter bestimmten Bedingungen auch mit der polykationischen Verbindungsschicht aus poly-L-Lysin interagiert. Wurde eine Lösung aus Alginat mit 1 mg/ml ECM direkt auf die Verbindungsschicht gegeben und mit einer 20 mM BaCl<sub>2</sub>-Lösung vernetzt, so entstand eine schwammartige Struktur. Diese wurde durch die zusätzliche Alginatschicht ohne Protein vermieden.

#### Adhäsionsverhalten von hiPSC auf Alginat-ECM Hydrogelen

Nach Inokulation der hiPSC Kolonien wurden die Proben mittels automatisierter Lebendzell-Mikroskopie für 24h beobachtet. Hierbei konnten zwei Arten von Interaktion mit der Oberfläche beobachtet werden. Zum einen adhärten die Kolonien und formten dicht gepackte Kolonien. Zum anderen kam es zu einer vollständigen Dissoziation der Kolonien, bei der sich einzelne Zellen aus der Kolonie ablösten und teilweise als einzelne adhärenente Zellen mit der Oberfläche interagierten. Abbildung 45 a zeigt den Vergleich von hiPSC-Kolonien auf ECM (Matrigel) beschichtetem TCPS und Alginat-ECM Mischungen. Die Fläche der Kolonien auf der TCPS-ECM Oberfläche ( $111573,4 \mu\text{m}^2 \pm 104364,4 \mu\text{m}^2$ ) war dabei signifikant unterschiedlich (Whitney-Mann-Test,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zu den Alginat-ECM Oberflächen ( $23075,9 \mu\text{m}^2 \pm 23261,8 \mu\text{m}^2$ ). Die morphologische Analyse der Kolonien erfolgte über den sog. *shapefactor* (Werte zwischen 0 und 1) und die sog. Zirkularität (*circularity* Werte zwischen 0 und 1). Die Analyse des *shapefactor* impliziert ein Maß für die Regelmäßigkeit der gemessenen Objekte. Sehr regelmäßige Formen haben einen hohen *shapefactor*, wohingegen unregelmäßige (z. B. sternförmig) Objekte einen niedrigen *shapefactor* besitzen. Bei den untersuchten Oberflächen unterschieden sich diese Werte nur gering ( $0,77 \pm 0,09$  bzw.  $0,75 \pm 0,12$ ) und waren nicht signifikant unterschiedlich (Whitney-Mann-Test,  $p < 0,05$ ), so dass die Regelmäßigkeit vergleichbar war (vgl. Abbildung 45 b). Die Werte der Zirkularität waren bei den Kolonien auf der TCPS-ECM Oberfläche niedriger im Vergleich zu denen der Alginat-ECM Oberfläche ( $0,58 \pm 0,14$  bzw.  $0,67 \pm 0,16$ ), so dass hier die Kolonien im Mittel etwas runder waren. Dies

zeigt sich ebenso in der graphischen Darstellung der beiden Populationen, bei der eine größere Anzahl von Objekten eine Zirkularität zwischen 0,7 und 0,9 besitzen (vgl. Abbildung 45 c). Die Adhäsion der hiPSC-Kolonien war somit auf den Alginate-ECM Oberflächen möglich und erschien als einfache Methode, Alginate derart zu modifizieren, dass auch komplexe Zellsysteme darauf kultiviert werden konnten. Die Daten, insbesondere die Fläche und die Zirkularität der Kolonien zeigten jedoch, dass ein signifikanter Unterschied zur Standard-Kulturoberfläche in der Morphologie bestand (Whitney-Mann-Test,  $p < 0,05$ ). Die nicht kovalente Modifikation des Alginats durch Aufkonzentrierung konnte möglicherweise zu lokalen Unterschieden bzgl. der Verteilung von Alginate und ECM auf der Oberfläche führen, die das Adhäsionsverhalten der Zellen beeinflusste.



**Abbildung 45: hiPSC auf ALG-ECM.**

**a** Fläche von hiPSC Kolonien auf TCPS mit Matrigel und Alginate-ECM. **b** Shapefactor von hiPSC Kolonien auf TCPS mit Matrigel (TCPS-ECM) und Alginate-ECM (ALG-ECM). **c** Zirkularität von hiPSC Kolonien auf TCPS mit Matrigel und Alginate-ECM. (Datenpunkte aus 4 Experimenten,  $n=63$ ). \* = statistisch signifikant bzw. n.s. = statistisch nicht signifikant ( $p < 0,05$ ), Whitney-Mann-Test.

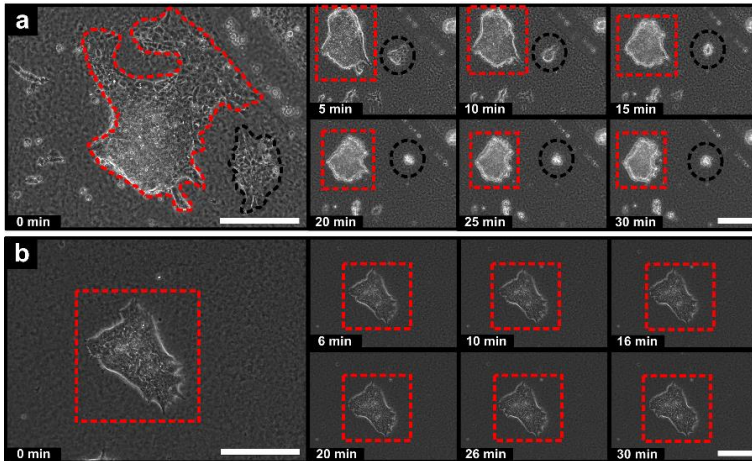
Weitere Untersuchungen mit diesem Kultivierungssystem, die mit AlgL durchgeführt wurden, bestätigten weiter diese Hypothese. Kolonien, die auf der Alginate-ECM Oberfläche kultiviert wurden, wurden mit AlgL behandelt, um die Alginate-Gerüststruktur zu degradieren. Voruntersuchungen (hier nicht dargestellt) haben gezeigt, dass die Vitalität der hiPSC-Kolonien durch Konzentrationen der AlgL im Bereich von 0,5 bis 2,0 mg/ml nicht beeinflusst wurde und für die Destruktion genutzt werden kann. Die Charakterisierung und Anwendung der Alginatlyase wird in einem späteren Teil dieser Arbeit detaillierter untersucht, soll jedoch durch den Bezug zur Modifikation als mögliche Anwendung bereits an dieser Stelle exemplarisch dargestellt werden. Mit diesen Experimenten galt es zu untersuchen, ob sich adhärenente Zellen durch die Destruktion des Biomaterials der GS und nicht durch die Anwendung proteolytischer Enzyme wie z. B. Trypsin von der Kulturoberfläche ablösen lassen. Dies ist von besonderem Interesse, da proteolytische Enzyme nicht nur die Zell-Matrix-Kontakte auflösen, sondern auch wichtige Proteine in der Zellmembran zerstören und dadurch das Schicksal der Zelle beeinflussen können.

### Degradierung der Alginate-ECM Gerüststruktur mit adhärenenten hiPSC

Die Durchführung wurde mit Hilfe der Lebendzell-Mikroskopie dokumentiert um die zelluläre Reaktion genauer interpretieren zu können. Die Behandlung der Proben wurden insgesamt 45 min durchgeführt, wobei 30 min per Zeitraffer-Mikroskopie dokumentiert wurden. Abbildung 46 a zeigt Kolonien, die sich vollständig von der Alginate-ECM Oberfläche ablösen. Interessanterweise war eine Desintegration der Kolonien in Einzelzellen nicht zu beobachten. Man beobachtete ein Ablösen der Zellen bei gleichzeitiger Agglomeration. Dies deutete auf eine rein Oberflächen-basierte Wirkweise des Enzyms hin, was die (Protein-basierten) Zell-Zell-Kontakte nicht beeinflusste. Ebenso waren bei der Alginate-ECM Oberfläche strukturelle Änderungen zu beobachten, die sich in einer lateralen Verschiebung der Kolonien äußerte. Eine vollständige Destruktion der Alginate-ECM Gerüststruktur erfolgte dahingegen nicht. Ferner lagen auf



der Alginate-ECM Oberfläche Positionen vor, auf denen die adhären Kolonien sich nicht ablösten. Abbildung 46 b zeigt eine solche Kolonie, die auch nach einer Inkubationszeit von 30 min vollständig ausgebreitet auf der Oberfläche vorlag. Da die übrigen Kolonien auf der Oberfläche dieses Verhalten nicht zeigten, deutet dies auf einen Oberflächenbereich hin, der nicht von der AlgL degradiert werden konnte und in der Konsequenz die Zell-Matrix-Kontakte weiterhin bestehen blieben. Letztendlich ist auch dies ein Anzeichen für lokale Differenzen in der Oberflächenbeschaffenheit, die bereits durch die morphologischen Daten (siehe Abbildung 45) postuliert wurden.

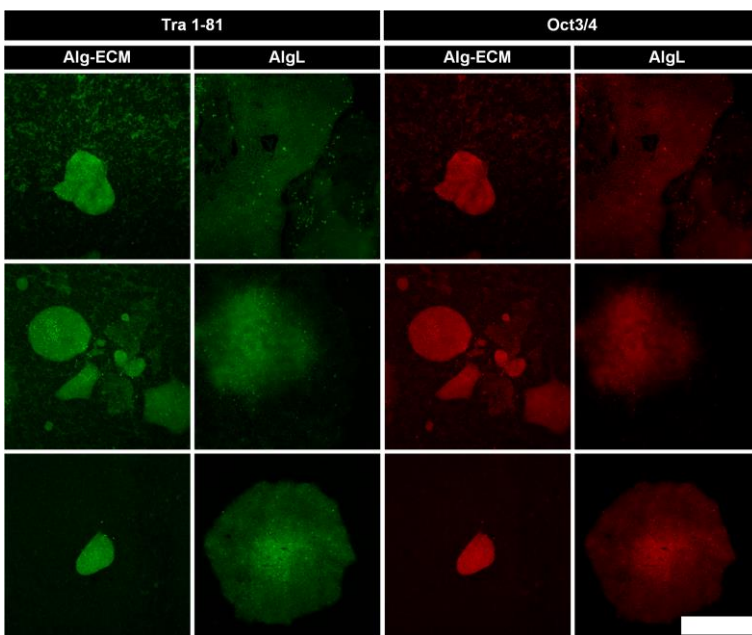


**Abbildung 46:** hiPSC-KOLONIEN WÄHREND DER INKUBATION MIT ALGINATLYASE AUF ALGINAT-ECM-OBERFLÄCHE.

*a* Agglomeration und Ablösen der hiPSC-Kolonien.  
*b* Kein Ablösen der hiPSC-Kolonie. Die umrandeten Bereiche markieren einzelne Kolonien im zeitlichen Verlauf. Die Positionsänderung erfolgte durch die initiale Wirkweise der Alginatlyase. Maßstab: 200 µm.

*Hinweis:* Die weitere Charakterisierung der Alginatlyase bei der katalytischen Umsetzung von UHV-Alginaten wird in einem späteren Teil der Arbeit untersucht (Abschnitt 4.4).

Nach erfolgter Rückgewinnung der hiPSCs von der Alginate-Gerüststruktur wurden die Zellen wieder auf der Standard-Kulturoberfläche (TCPS mit Matrigel-beschichtung) rekultiviert. Die Funktionalität bzgl. der Adhäsion ist durch die Behandlung nicht beeinflusst, so dass die Zellen wieder adhären und sich ausbreiten können. Die Zellen liegen weiterhin Kolonie-förmig vor, wenn auch kleinere Kolonien zur spontanen Differenzierung neigten. Mit der Analyse des Phänotyps konnten nach erfolgter Re-Kultivierung die Pluripotenzmarker Tra1-81 und Oct3/4 nachgewiesen werden, diese jedoch, verglichen mit den Kolonien auf dem Alginate-ECM Gemisch, eine geringere Intensität (Expression) besaßen (siehe Abbildung 47).



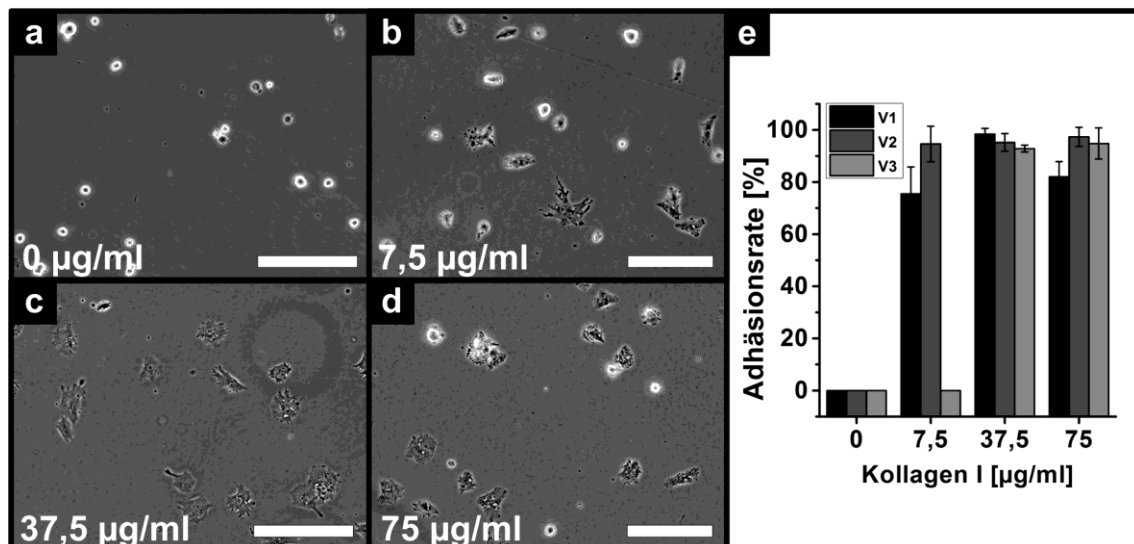
**Abbildung 47:** PLURIPOTENZ hiPSC AUF ALGINAT/ECM UND NACH ALGINATLYASE.

Gezeigt ist der immunzytochemische Nachweis der Pluripotenzmarker Tra1-81 und Oct3/4. Die Proben Alg-ECM wurden nach Tag 5, die Proben AlgL nach Tag 4 der Inokulation analysiert. Bei den rekultivierten hiPSCs nach Alginatlyase-Behandlung sind deutlich weniger positive Zellen zu verzeichnen. Maßstabsbalken: 500 µm.

### 4.3.5 Kovalent modifizierte Gerüststrukturen

*Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines Manuskripts in Vorbereitung zur Veröffentlichung [325], sowie Bestandteil eines bereits veröffentlichten Artikels [316].*

Die Steigerung der Zytokompatibilität auf Alginat-Mikroträgern konnte in den zuvor beschriebenen Experimenten und Methoden nicht dahingehend realisiert werden, dass eine Kultivierung von adhären Zellen effizient in gleicher Weise auf planaren, als auch sphärischen GS durchgeführt werden kann. Aufgrund dessen wird in diesem Abschnitt die Modifikation von Alginaten durch kovalente Kopplung von z. B. ECM-Proteine und deren Einsatzmöglichkeit in verschiedenen Kultivierungssystemen untersucht.



**Abbildung 48:** UNTERSUCHUNG DER ADHÄSION VON hMSCS IM VERLAUF DER INOKULATIONSPHASE.

Die Mikroskopiebilder zeigen die Adhäsion der Zellen 1 h nach Inokulation auf unterschiedlichen Kollagen I-Dichte:

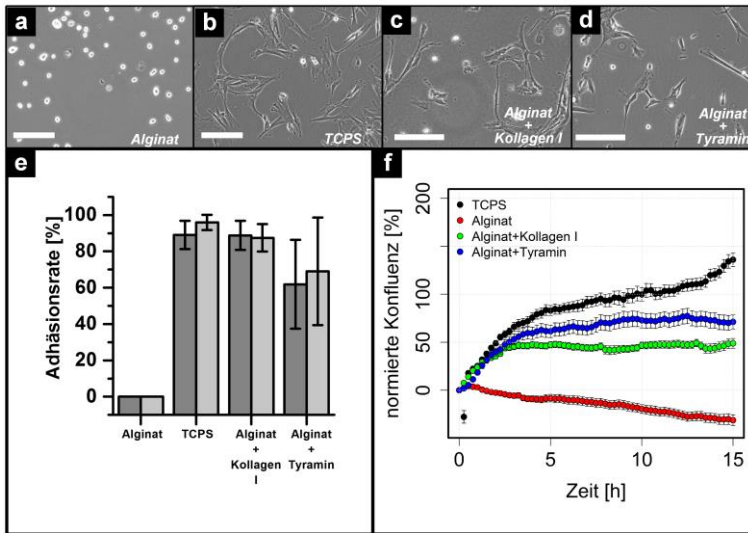
*a* 0 µg/ml, *b* 7,5 µg/ml, *c* 37,5 µg/ml und *d* 75 µg/ml. Die Zelladhäsion ist auf der Alginat-Oberfläche ohne Kollagen nicht zu beobachten, wohingegen sie bei 37,5 µg Kollagen I sehr schnell abläuft. Auf 7,5 µg/ml ist eine voranschreitende Adhäsion zu diesem Zeitpunkt zu beobachten, ebenso bei 75 µg/ml. *e* Quantifizierung der Adhäsionsrate nach 1 h. Bei 37,5 µg/ml und 75 µg/ml konnten reproduzierbar Adhäsionsraten von etwa 90% erreicht werden. Bei einer Konzentration von 7,5 µg/ml waren in zwei von drei Versuchen Adhäsionsraten von über 70% zu beobachten, wohingegen bei einer Durchführung keine Adhäsion der Zellen beobachtet wurde. Bei einer Konzentration von 0 µg/ml war keine Adhäsion zu beobachten. Gezeigt sind die Mittelwerte der Einzelerperimente ± SD, die aus jeweils 5 Bildausschnitten ermittelt wurden. Maßstabsbalken: 200 µm. (Abbildung nach [316], abgeändert).

### Untersuchung zur kovalenten Kopplung von Kollagen I auf zweidimensionalen Alginat-Gerüststrukturen

Der Einfluss des zellulären Verhaltens bei unterschiedlich verfügbarer Kollagen I-Dichte auf Alginatmembranen wurde anhand von vier verschiedenen Konzentrationen untersucht. Mit der Carbodiimid-Methode wurde auf die vorbereiteten Alginatmembranen in einer Kulturschale jeweils 0, 7,5, 37,5 und 75 µg/ml Kollagen I immobilisiert. Die zelluläre Reaktion von hMSCs wurde über 8 h mittels automatisierter Lebendzell-Mikroskopie beobachtet und anhand der Adhäsionsrate analysiert (Abbildung 48 e). Der Fokus lag bei dieser Untersuchung hauptsächlich auf den Vorgängen während und unmittelbar nach der Inokulationsphase, um diese Daten bei Erfolg weiter zu optimieren und auf sphärische GS übertragen zu können.

Die Ergebnisse der unmittelbaren Adhäsionsereignisse nach Aussaat der Zellen zeigten eine sehr schnelle Reaktion auf die modifizierten Hydrogele, die mit 37,5 µg/ml bzw. 75 µg/ml Kollagen I modifiziert wurden (Abbildung 48 c, d). Bei der nativen Alginat-Oberfläche war keine Adhäsion der Zellen beobachtet worden (Abbildung 48 a). Die Konzentration von 7,5 µg/ml zeigte bei zwei Versuchen eine gute Adhäsionsrate, jedoch war bei einem Versuchsdurchgang keine Adhäsion zu beobachten (Abbildung 48 b).

Ausgehend von der zuvor evaluierten Kollagen I-Konzentration (vgl. Abbildung 48) für die Modifikation von Alginatmembranen, wurde in weiteren Experimenten versucht, die Kopplungsreaktion zu verifizieren. Hierfür wurde zunächst ein Molekül gesucht, das keine Artefakte z. B. durch elektrostatische Interaktion oder eine Gelierung einführen kann. Tyramin, ein Molekül mit einem Molekulargewicht von weniger als 200 g/mol, wurde für diese Versuche verwendet. In Vorversuchen mit L929 Fibroblasten konnte bei einer Konzentration von 50% anteilig am verwendeten Alginatvolumen eine Adhäsion der Zellen beobachtet werden. Auf Grundlage dieser Konzentration wurde die Kopplungsreaktion, als auch das zelluläre Verhalten von hMSCs untersucht.

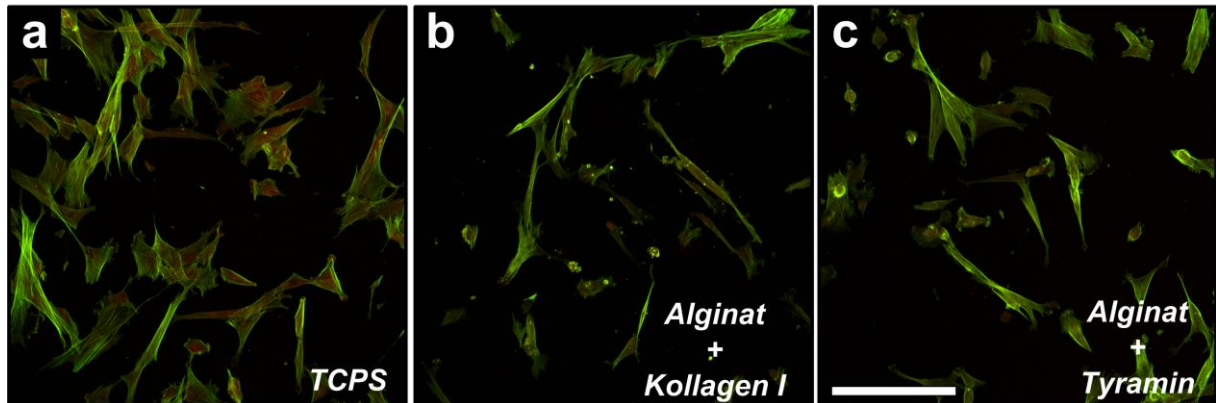


**Abbildung 49: ADHÄSIONSVERHALTEN VON hMSCs AUF (MODIFIZIERTEN) ALGINAT-OBERFLÄCHEN.**

**a** Auf nativem Alginat, **b** behandelter Polystyrenoerfläche, **c** Alginat mit Kollagen I modifiziert und **d** Alginat, mit Tyramin modifiziert, 15 h nach Inokulation. **e** Quantifizierung der Adhäsionsrate nach 6 h und 12 h nach Inokulation, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n=3$  Experimenten. **f** Verlauf der Ausbreitung der hMSCs über die Zeit. Gezeigt sind die normierten (auf den Anfangswert) Mittelwerte  $\pm$  SEM aus  $n=3$  Experimenten. Der SEM wurde in dieser Graphik zur besseren Übersicht verwendet. Maßstab: 200  $\mu$ m

Nach einer Kultivierungszeit von 15 h von hMSCs konnte auf nativem Alginat keine zelluläre Reaktion in Form der Adhäsion festgestellt werden (Abbildung 49 a). Wie schon in vorangegangenen Experimenten, lagen die Zellen abgerundet vor und zeigen eher den Trend zur Agglomeration durch Zell-Zell-Kontakte. Durch die kurze Kultivierungsdauer war dieses Verhalten nur selten zu beobachten. Im Gegensatz adhärten die Zellen auf den Oberflächen TCPS (Abbildung 49 b), Alginat mit Kollagen (Abbildung 49 c) und Alginat mit Tyramin (Abbildung 49 d). Die positive zelluläre Reaktion auf Tyramin war dabei besonders interessant, da diese indirekt auch die kovalente Kopplung der Moleküle belegt. Die Molekülgröße schließt Artefakte wie z. B. eine Gelbildung auf der Oberfläche aus. Zusätzlich konnte die Hypothese belegt werden, dass die chemische Imitierung von TCPS-Oberfläche durch Tyramin auf Alginat zu einer Adhäsion der Zellen führen kann. Vergleicht man die Adhäsionsraten nach 6 h bzw. 12 h auf den Oberflächen, so lagen, mit Ausnahme von Alginat (0% Adhäsionsrate, Abbildung 49 c), die Adhäsionsraten bei den restlichen Oberflächen bei mindestens 60%. Zellen auf TCPS zeigten dabei eine Adhäsionsrate von  $89,0 \pm 7,8\%$  (nach 6 h) und  $95,9 \pm 4,2\%$  (12 h), auf Alginat mit Tyramin  $61,9 \pm 24,4\%$  (nach 6 h) und  $69,0 \pm 29,6\%$  (nach 12 h) und auf Alginat mit Kollagen I  $88,8 \pm 8,1\%$  (6 h) und  $87,4 \pm 7,6\%$  (siehe Abbildung 49 d). Die Analyse der Gesamtzellfläche über die Zeit (Abbildung 49 f) zeigte die höchsten Werte bei der der TCPS-Oberfläche, sowie die niedrigsten bei der nativen Alginat-Oberfläche. Die Zellen auf den beiden modifizierten Alginat-Oberflächen hatten vergleichbar hohe Werte ähnlich der TCPS-Oberfläche. Der Unterschied von bioaktiver und bioinert wurde durch diese Analyse deutlich und korrelierte mit der manuellen Begutachtung der Proben (Abbildung 49 a-d) und mit den Werten der Adhäsionsanalyse (Abbildung 49 e). Die Untersuchung des Zytoskeletts nach diesem Versuch zeigte, dass sowohl auf der TCPS, als auch auf den mit Kollagen I und Tyramin modifizierten Alginat-Oberflächen Aktinfilamente in den Zellen ausgebildet wurden, wie Abbildung 50 a-c zeigt. Dies deutete trotz der elastischen Eigenschaften des Alginats auf eine starke Zell-Matrix Interaktion hin.

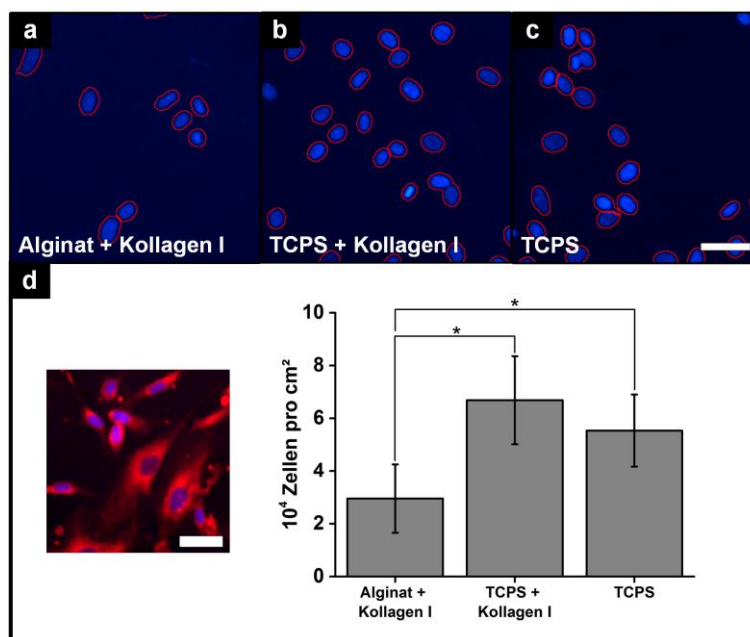




**Abbildung 50:** AUSBILDUNG DES ZYTOSKELETTS AUF MODIFIZIERTEN ALGINAT-OBERFLÄCHEN. **a** Zytoskelett von hMSCs auf TCPS, **b** Kollagen I modifiziertem Alginat und **c** Tyramin modifiziertem Alginat. Der grüne Fluoreszenzkanal zeigt F-Aktin, der rote Fluoreszenzkanal G-Aktin. Maßstab in c für alle Bilder: 200 µm.

### Untersuchung zur Proliferation auf Kollagen I-modifiziertem Alginat

Die Proliferation von hMSCs auf modifiziertem Alginat (Kollagen I) wurde im Vergleich zur TCPS Kulturoberfläche mit und ohne Kollagenbeschichtung weiter untersucht. Um mögliche Artefakte zu minimieren, wurde auf eine enzymatische Ablösung der Zellen verzichtet und stattdessen eine Bestimmung der Zellzahl durch Färbung der Nuklei durchgeführt (Abbildung 51 a-c). Die Zellzahl pro cm<sup>2</sup> betrug nach fünf Tagen Kultivierung auf dem modifizierten Alginat  $2,96 \times 10^4$  ( $\pm 1,30 \times 10^4$ ), auf TCPS  $5,53 \times 10^4$  ( $\pm 1,37 \times 10^4$ ) und auf Kollagen beschichtetem TCPS  $6,68 \times 10^4$  ( $\pm 1,67 \times 10^4$ ) Zellen pro cm<sup>2</sup> (Abbildung 51 d). Ausgehend von einer inokulierten Zelldichte von  $0,3 \times 10^4$  Zellen pro cm<sup>2</sup> wurde somit eine Expansion von  $9,9$  ( $\pm 4,3$ ) auf modifiziertem Alginat,  $22,3$  ( $\pm 5,6$ ) auf Kollagen beschichtetem TCPS und  $18,4$  ( $\pm 4,6$ ) auf TCPS erreicht. Die Proliferation der hMSCs auf modifiziertem Alginat unterschied sich signifikant von der auf TCPS bzw. mit Kollagen beschichtetem TCPS. Trotz diesem geänderten zellulären Verhalten gilt festzuhalten, dass die Modifikation des Alginats mit Kollagen I für hMSCs zu einer Steigerung der Biokompatibilität führt.



**Abbildung 51:** PROLIFERATION VON HMSCS AUF KOLLAGEN I MODIFIZIERTEM ALGINAT IM VERGLEICH ZU ANDEREN STANDARDKULTUROBERFLÄCHEN. **a-c** Segmentierung der Nuklei zur Bestimmung der Proliferation auf den Oberflächen Alginat modifiziert mit Kollagen I (Alginat + Kollagen I), Kollagen I beschichtetes TCPS (TCPS + Kollagen I) und Zellkultur behandeltes Polystyren (TCPS). **d** Quantifizierung der Zellzahl pro cm<sup>2</sup> nach 5 d Kultivierung auf den verschiedenen Oberflächen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 unabhängigen Experimenten mit zwei technischen Replikaten,  $n = 6$ . \* = statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), Whitney-Mann-Test, Maßstab: 50 µm.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die kovalente Modifikation des Alginats im Vergleich zu den zuvor untersuchten Modifikationen als aussichtsreichste Methode bestimmt, die eine erfolgreiche Modifikation von sphärischen Alginat-Gerüststrukturen erlauben könnte. Die Anforderungen an die Modifikation von

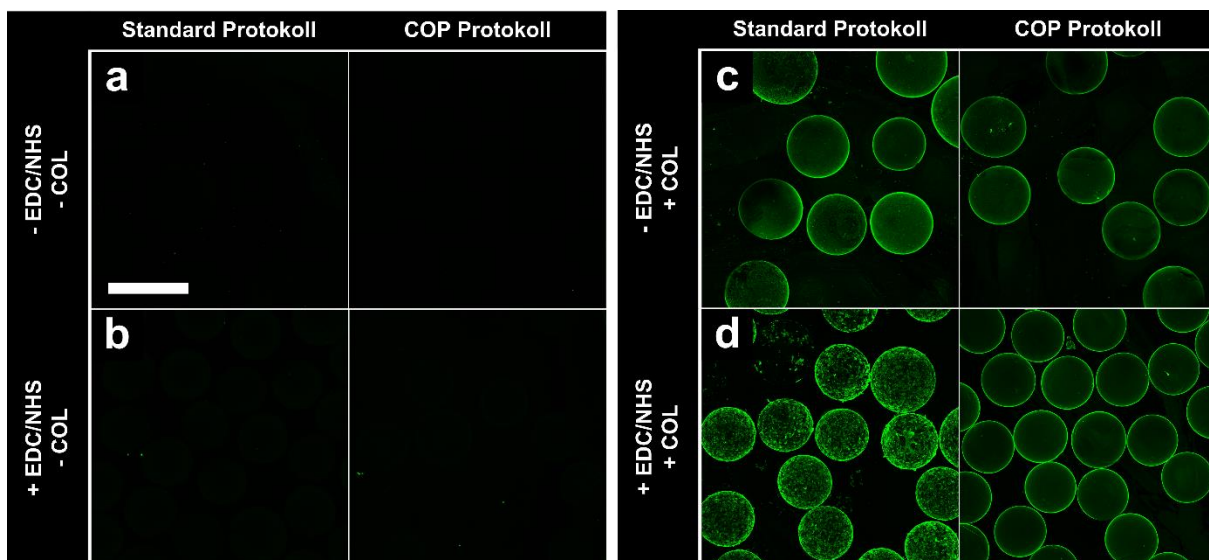
Alginatkugeln zu Alginat-Mikroträgern sind in bestimmten Punkten höher angesetzt, da beispielsweise der Einsatz in durchmischten Bioreaktoren eine schnelle Adhäsion der Zellen und eine stabile Ankopplung der Moleküle garantieren müssen. In den sich anschließenden Experimenten soll die Herstellung und Anwendung von Alginaten als Mikroträger etabliert und untersucht werden.

### Herstellung und Charakterisierung von ECM-modifizierten Alginat-Mikroträgern

Die Modifikation der planaren Alginat-Oberflächen wurde zunächst auf die Alginat-Mikroträger adaptiert und die entstandenen Mikroträger anhand ausgewählter Eigenschaften charakterisiert. Die Herstellung der Mikroträger erfolgte dabei zunächst auf dem Hintergrund der Kultivierung und Expansion von humanen mesenchymalen Stammzellen. Therapieansätze erfordern eine sehr hohe Zahl dieser Zellen, um sie letztendlich effektiv in-vivo einsetzen zu können. In der Folge werden die Ergebnisse eines Alginat-Mikroträgers dargestellt, dessen Biofunktionalisierung durch die kovalente Kopplung von Kollagen über die schon zuvor genutzte Carbodiimid-Chemie erfolgte.

#### Herstellung von bioaktiven Alginat-Mikroträgern

Die Herstellung erfolgte über eine wässrige Carbodiimid-Chemie, die zu den etablierten Methoden für die Kopplung von Molekülen mit Karboxylgruppe- bzw. primärer Aminogruppe gehört. Die Produktion der Mikroträger konnte nahezu vollständig mit Standard-Labormaterialien erfolgen. Lediglich die Vorrichtung zur Herstellung der Alginatkugeln erforderte einen Aufbau, mit dem reproduzierbar Alginatkugeln hergestellt werden können. Der zeitliche Aufwand war mit der hier beschriebenen Methode vertretbar und umfasste lediglich 48 h, sofern eine Anwendung im *kleinen Maßstab* erfolgte. Sowohl die Dimensionierung (Durchmesser) der Mikroträger als auch die Biofunktionalisierung waren individuell auf die zellbiologischen Anforderungen adaptierbar.



**Abbildung 52: BESCHICHTUNG DER ALGINAT-MIKROTRÄGER MIT KOLLAGEN I.**

**a** Native Alginat-Mikroträger (-EDC/NHS; -COL) ohne Kollagen I Nachweis. **b** Aktivierte Alginat-Mikroträger (+EDC/NHS; -COL) ohne Kollagen I Nachweis. Ein direkter Kollagen I Nachweis konnte mit **c** Kollagen I-Inkubation der Mikroträger ohne Aktivierung (-EDC/NHS; +COL) und **d** Kollagen I-Kopplung auf Alginat-Mikroträger (+EDC/NHS; +COL) anhand der Antikörperfärbung erbracht werden. Die Beladung in **c** fällt geringer aus, verglichen mit der in **d**. Bei der Kondition **d** ist bei dem Standard Protokoll eine deutliche Texturierung (Rauigkeit) erkennbar. Wird dahingegen das COP Protokoll angewendet, ist eine glatte homogene Schicht erkennbar. Maßstab: 500µm.

Ebenso ließ sich die beschriebene Modifikation von Alginatkugeln zu funktionalisierten Alginat-Mikroträgern mit Kollagen mit Standard-Laboraüstung durchführen. Bei der Funktionalisierung selbst konnte während den einzelnen Prozessschritten eine Änderung der Eigenschaften der Alginatkugeln be-

obachtet werden. Durch ihre physiko-chemischen Eigenschaften im nativen Zustand zeigten Alginatkugeln keine Interaktion sowohl mit anderen Alginatkugeln als auch mit der Wand von Zentrifugenröhrchen. Eine Änderung dieses Verhaltens konnte während der Aktivierung mittels EDC/NHS beobachtet werden. Die Alginatkugeln tendierten zur Agglomeration und interagierten mit der Gefäßwand aus Polypropylen (PP) in Form einer Adhäsion. Durch die Durchmischung während der Aktivierung und Modifikation auf einem Orbitalrotator wurde diesem Verhalten entgegengewirkt, um letztendlich eine gleichmäßige Modifikation zu erreichen. Die Zugabe der Proteinlösung nach dem Aktivierungsschritt verstärkte diesen Effekt und es kam am konisch zulaufenden Gefäßboden teilweise zu ausgeprägter Agglomeration der Mikroträger, die durch manuelles Schütteln des Gefäßes gelöst werden konnte. Nach den finalen Waschschrinen wurde dieses Verhalten nicht mehr beobachtet. Nach der Herstellung erfolgte eine Charakterisierung der Mikroträger bzgl. der physikalischen als auch der chemischen Eigenschaften, die in der Folge dargestellt werden.

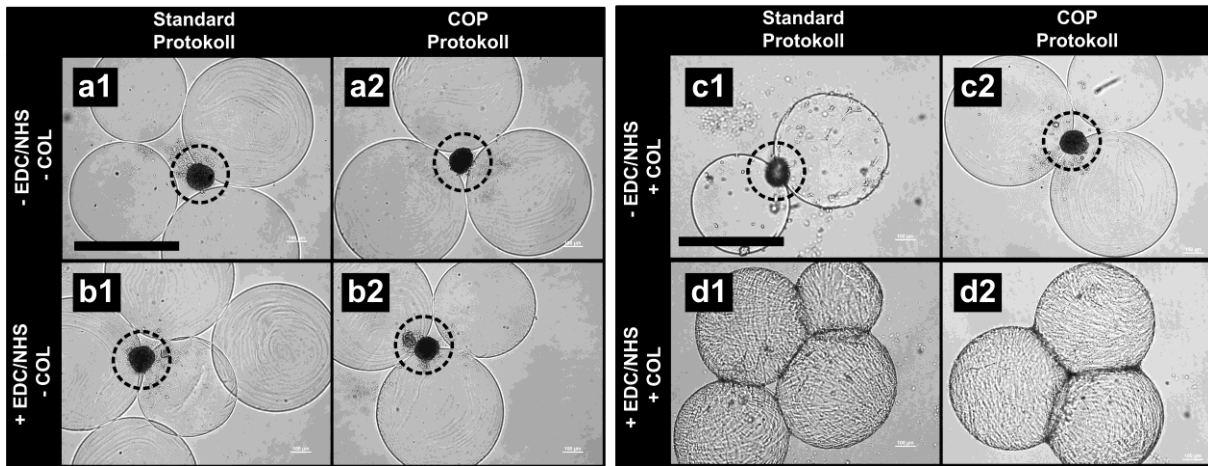
### **Charakterisierung der Alginat-Mikroträger - biochemische Eigenschaften**

Die mit Kollagen biofunktionalisierten Alginatkugeln (*Alginat-Mikroträger*) wurden mittels einer Antikörperfärbung gegen Kollagen bzgl. ihrer Beladung charakterisiert. Es wurden dabei zwei Modifikationsprotokolle miteinander verglichen, das Standard Protokoll, das bereits für die planaren Oberflächen verwendet wurde, sowie ein Protokoll, das einen möglichst konstanten osmotischen Druck realisieren soll. Die bei der Modifikation verwendeten Reagenzien wurden in ihren möglichen Kombinationen mit den Alginat-Mikroträgern gemäß dem Protokoll inkubiert und die Beladung von Kollagen analysiert. Es zeigte sich kein Signal bei den Kombinationen, die keine Inkubation mit Kollagen I beinhalteten (Abbildung 52 a und b). Erfolgte eine Inkubation mit Kollagen I ohne vorherige Aktivierung mit EDC/NHS, so war bei beiden untersuchten Modifikationsprotokollen Kollagen I nachweisbar (Abbildung 52 c). Ebenso konnte Kollagen I nach vorheriger Aktivierung mit anschließender Kollagen I-Inkubation nachgewiesen werden (Abbildung 52 d). Hier zeigten sich auch Unterschiede bei den verwendeten Modifikationsprotokollen. Bei dem Standard Protokoll war eine starke Strukturierung des Kollagens auf der Alginat-Oberfläche zu beobachten, wohingegen beim COP Protokoll eine sehr homogene Beladung mit Kollagen vorlag. Bei den beiden Kombinationen (Abbildung 52 c und d) war durch die Antikörperfärbung Kollagen nachweisbar, eine Aussage über die Stabilität konnte hierdurch jedoch nicht erfolgen. Für die weiteren Experimente wurde das Standard Protokoll verwendet, da die beobachtete Strukturierung (Rauigkeit) neben der Proteinbeschichtung eine weitere Eigenschaft ist, die die Adhäsion der Zellen positiv beeinflussen könnte.

### **Charakterisierung der Alginat-Mikroträger - biologische Interaktion**

Die biologische Interaktion war bei der Untersuchung der Alginat-Mikroträger von primärem Interesse, da diese letztendlich für die weiteren Anwendungen ausschlaggebend ist. Durch die Modifikation der Alginatkugeln mit EDC/NHS und Kollagen sowie den Waschschrinen selbst, mussten mehrere Kombinationen untersucht werden, um die Kopplungsreaktion selbst verifizieren zu können. Hierfür wurden hMSCs für 4 Tage im *hängenden Tropfen* in Anwesenheit von Alginat-Mikroträgern kultiviert. Die untersuchten Konditionen (Modifikationen des Alginats) waren native Alginatkugeln, also keine Aktivierung mit EDC/NHS und keine Kopplung mit Kollagen I (-EDC/NHS, -COL), aktivierte Alginatkugeln ohne Kollagen I (+EDC/NHS, -COL), keine Aktivierung, sondern nur Kollagen I-Inkubation (-EDC/NHS, +COL) und Aktivierung und Kopplung (+EDC/NHS, +COL). Zusätzlich wurden alle Konditionen mit den in Abschnitt 3.7.5 beschriebenen Protokollen hergestellt. Abbildung 53 zeigt die zelluläre Reaktion von hMSCs im hängenden Tropfen nach 4 Tagen auf die verschiedenen Kombinationen der chemischen Behandlung. Die Experimente belegten eindeutig, dass nur eine Kombination von Aktivierung und Kopplung zu einer positiven Zellreaktion in Form der Adhäsion führt. Die übrigen Konditionen zeigten keine signifikante Verbesserung der Zelladhäsion - die Zellen präferierten die Zell-Zell-Interaktion und formierten sich zu multizellulären Sphäroiden. Diese Beobachtung konnte für beide Protokolle verifiziert werden. Speziell

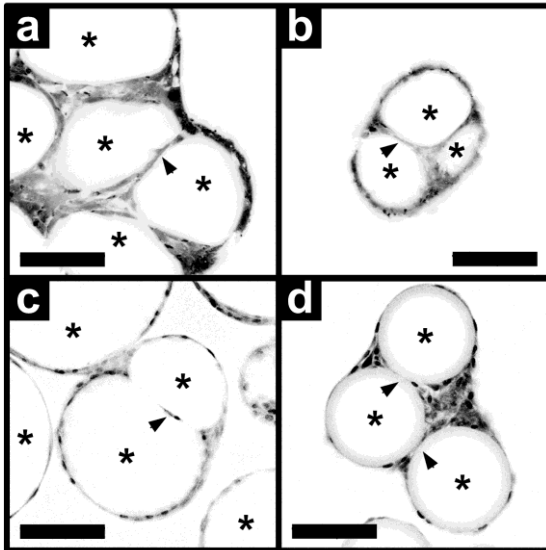
die Inkubation der Alginate-Mikroträger mit Kollagen ohne Kopplung war hier von Interesse, da durch den Waschschrift ein Übergang von einem niedrigem pH-Wert zu einem neutralen pH-Wert erfolgte, was unter bestimmten Bedingungen eine Ummantelung der Alginate-Mikroträger mit einem Kollagen-Netzwerk zur Folge haben kann.



**Abbildung 53: hMSCs auf ALGINAT-MIKROTRÄGERN IN STATISCHER „HÄNGENDEN TROPFEN“-KULTUR.**

Die zelluläre Interaktion hMSCs nach 4 Tagen mit unterschiedlich behandelten Alginatekugeln ist in den beiden entwickelten Protokollen jeweils vergleichbar. Die Art der Modifikation, in diesem Fall Kombinationen aus Aktivierung und Kopplung (**d1** und **d2**) bzw. reiner Inkubation mit Kollagen I (**c1** und **c2**) zeigt, dass die Alginatekugeln ihre inerten Eigenschaften beibehalten (**a1**, **a2**, **b1** und **b2**), außer wenn eine Aktivierung und Kopplung in Kombination durchgeführt wird (+EDC/NHS, +COL). Die eingekreisten Objekte markieren aggregierte hMSCs, die keine Interaktion mit den Alginate-Oberflächen ausüben. Maßstab (schwarz): 500 µm.

Die weitere Untersuchung der bewachsenen Alginate-Mikroträger mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zeigt mehrere interessante Aspekte des zellulären Verhaltens auf den Mikroträgern. Durch die konfokalen Schnitte war die Adhäsion der Zellen auf der konkaven Oberfläche erkennbar (Abbildung 54 a). In den Bereichen, in denen die Mikroträger kontaktieren und somit makroskopisch eine V-förmige Furche bildeten, war eine Akkumulation der Zellen zu erkennen (Abbildung 54 a). In diesem Bereich wuchsen die Zellen in mehreren Schichten und füllten die Furche aus. In den Bereichen, in denen die Mikroträger direkten flächigen Kontakt hatten, waren ebenso Zellen nachweisbar (Abbildung 54 b, c). Im Unterschied zu den Cytodex 3-Mikroträgern (Abbildung 54 d) wurde durch die Aufnahmen deutlich, dass die Zellen die Alginate-Mikroträger sehr stark deformierten und die ausgeübte Kraft der Zellen auf molekularer Ebene auf das Material der Mikroträger übertragen werden konnte. Dies ist eine interessante Eigenschaft, da hier davon ausgegangen werden kann, dass die Zellen, ähnlich wie im nativen Gewebe, ihre unmittelbare Umgebung modulieren können.



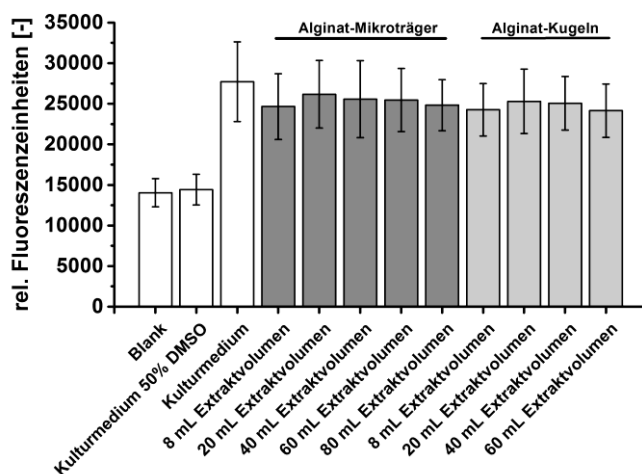
**Abbildung 54: ANALYSE DER MIKROTRÄGER MIT CLSM.** *a, b, c* Konfokaler Schnitt durch eine Ebene eines MSC-Mikroträger Agglomerats.

*Alginat-Mikroträger (schwarze Sterne) sind mit Zellen bedeckt. Eine Deformation der Mikroträger sowohl bei äußeren, als auch inneren Mikroträgern kann beobachtet werden. Adjazente Mikroträger werden durch adhärenente Zellen voneinander getrennt (schwarzer Pfeil)*

*d* Agglomerate von hMSCs mit Cytodex 3 weisen ebenso dünne Zellbrücken zwischen adjazenten Mikroträgern auf, eine Deformation der Mikroträger liegt nicht vor. Die Bilder wurden mit ImageJ (Fiji) erstellt. Die Originalbilder wurden zur besseren Kontrastierung invertiert Maßstabsbalken: 100 µm.

### Charakterisierung der Alginat-Mikroträger – zytotoxische Charakterisierung

Die verwendeten Chemikalien wurden hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht. Es erfolgte von den modifizierten Alginat-Mikroträgern die Herstellung eines Extrakts durch Inkubation in Kulturmedium, um die tatsächlichen Gegebenheiten nach der Mikroträgerherstellung bestmöglich abzubilden. Die Ergebnisse in Abbildung 55 zeigen, dass die Zellen mit 50% DMSO die geringste metabolische Aktivität aufwiesen, vergleichbar mit der Kontrolle ohne Zellen. Die Zellen in Standardkulturmedium wiesen die höchste metabolische Aktivität auf. Die Zellen, die mit den Extrakten kultiviert wurden, wiesen eine nur minimal reduzierte metabolische Aktivität auf (sowohl die Extrakte nach Aktivierung, als auch die Extrakte ohne Aktivierung) und waren insgesamt auf vergleichbarem Niveau mit dieser Kontrolle. Hieraus konnte geschlossen werden, dass das Protokoll zur Aktivierung der Mikroträger die Zellen nicht negativ beeinflusste und die Reaktanden, die die Zellen schädigen können, mit den Waschschrinen ausreichend entfernt wurden.



**Abbildung 55: ZYTOTOXIZITÄT DER EDC/NHS-AKTIVIERUNG.**

*Zytotoxizität des Extrakts bei hMSCs nach Aktivierung und Waschschrinen in verschiedenen Verdünnungen. (Mittelwert ± SD aus n=8 Replikaten).*

### Charakterisierung der Alginat-Mikroträger - physikalische Eigenschaften

Für die Kultivierung in Suspensions-Bioreaktoren, statisch oder durchmischt, ist die Dichte der Mikroträger ein wichtiger Parameter für z. B. die Sedimentation. Anhand der experimentell bestimmten Sedimentationsgeschwindigkeiten wurden die Dichten der verschiedenen Mikroträger bestimmt. Für die Alginat-

Mikroträger wurden Dichten in der Größenordnung 1,01 g/ml, für Cytodex 3 in der Größenordnung 1,07 g/ml und für Cytodex 1 in der Größenordnung 1,05 g/ml anhand der Stockes'schen Gleichung bestimmt.

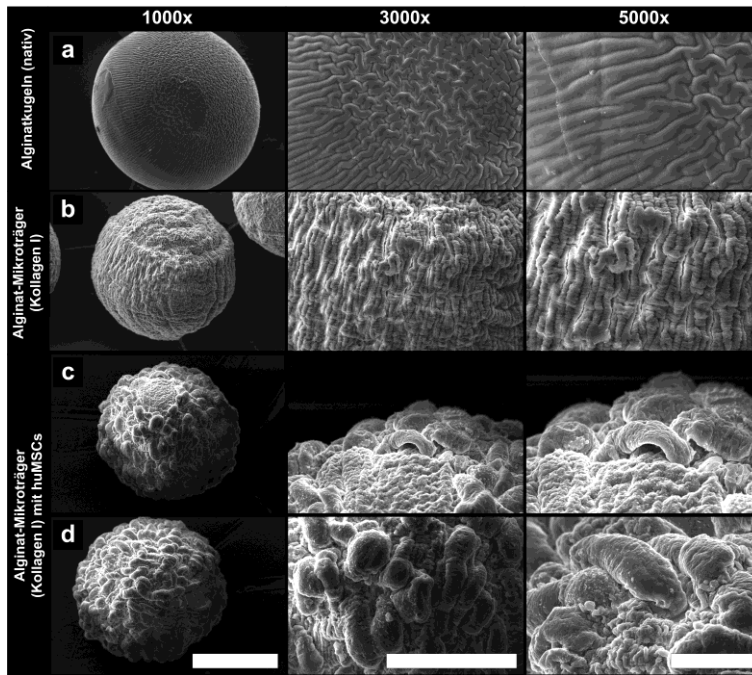
**Tabelle 9:** Physikalische Eigenschaften von Mikroträgern: Dichte von verschiedenen Mikroträgern, experimentell bestimmt. \*=*theoretisch berechnet aus Literaturwerten [318].*

Mikroträger (Ø)	Sedimentationsgeschwindigkeit [cm/min]	Durchschnittliche Dichte [g/ml]
Alginat-Mikroträger (740 µm)	13,44 (± 1,59)	1,0122 (± 0,0012)
Alginat-Mikroträger (620 µm)	11,85 (± 1,73)	1,0138 (± 0,0013)
Alginat-Mikroträger (500 µm)	7,25 (± 0,96)	1,0135 (± 0,0012)
Cytodex 1 (180 µm)	5,08 (± 0,83)	1,052 (± 0,079)
Cytodex 1*	NA	1,03
Cytodex 3 (160 µm)	4,80 (± 0,64)	1,070 (± 0,088)
Cytodex 3*	NA	1,04
Zelle (5 µm)*	0,66	1,085
Zelle (10 µm)*	2,64	1,085

Die Ergebnisse zeigten, dass aufgrund der unterschiedlichen Dichten und Durchmesser, Alginat-Mikroträger mit einem Durchmesser, der größer als 500 µm war, wesentlich schneller sedimentierten als Cytodex-Mikroträger (siehe Tabelle 9). Die Sedimentationsgeschwindigkeiten kleinerer Alginat-Mikroträger konnten experimentell nicht bestimmt werden, da die Transparenz und Größe eine visuelle Verfolgung nicht ermöglichte. Zog man die Dichte der Zellen in diesem Vergleich hinzu, so war deren Sedimentationsgeschwindigkeit, je nach Durchmesser, wiederum geringer als die der Mikroträger. Die Sedimentationsgeschwindigkeit der Alginat-Mikroträger nahm mit steigendem Durchmesser zu und war auch in der Stokes'schen Formel mit dem quadrierten Durchmesser berücksichtigt.

### Charakterisierung der Mikroträger – Oberflächeneigenschaften

Die Oberfläche der Alginat-Mikroträger wurde nach erfolgter Modifikation im Vergleich zur nativen Alginat-Oberfläche mittels der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Insbesondere die schon in Abbildung 53 gezeigte gesteigerte Interaktion der hMSCs müsste auf eine Änderung der Oberflächeneigenschaften zurückzuführen sein, die entweder biochemisch durch die Kopplung von Kollagen oder durch topographische Modifikationen, wie z. B. der Rauigkeit, hervorgerufen wird. Abbildung 56 a zeigt die REM-Aufnahme eines nativen, d. h. nicht modifizierten Alginat-Mikroträgers. Die verschiedenen Vergrößerungen zeigten interessante Charakteristika der Oberfläche. Die Oberfläche war nicht wie etwa durch die Phasenkontrastaufnahmen in Abbildung 53 glatt, sondern durch eine Mikrotopographie gekennzeichnet. Die Oberfläche war durch wulstartige Strukturen sehr markant, die Wülste selbst jedoch sehr glatt und nicht durch eine Mikrorauigkeit gekennzeichnet. Im Vergleich hierzu ist in Abbildung 56 b ein Alginat-Mikroträger mit Kollagen I, d. h. nach Modifikation, dargestellt. Die schon zuvor beschriebenen Wülste waren auch hier deutlich erkennbar und zogen sich über den gesamten Mikroträger. Im Gegensatz zur nativen Alginat-Oberfläche war bei den modifizierten Alginat-Mikroträgern auf den Wülsten eine deutliche Mikrorauigkeit erkennbar, die auch schon durch die Immunfluoreszenzanalyse (Abbildung 52 d) beobachtet wurde. Die Rauigkeit war somit eine weitere Eigenschaft, die neben der biochemischen Modifikation eingeführt wurde. Die direkte Interaktion der hMSCs auf den modifizierten Mikroträgern ist in Abbildung 56 c und d illustriert.



**Abbildung 56: ANALYSE DER OBERFLÄCHE DER ALGINAT-MIKROTRÄGER MITTELS RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE.**

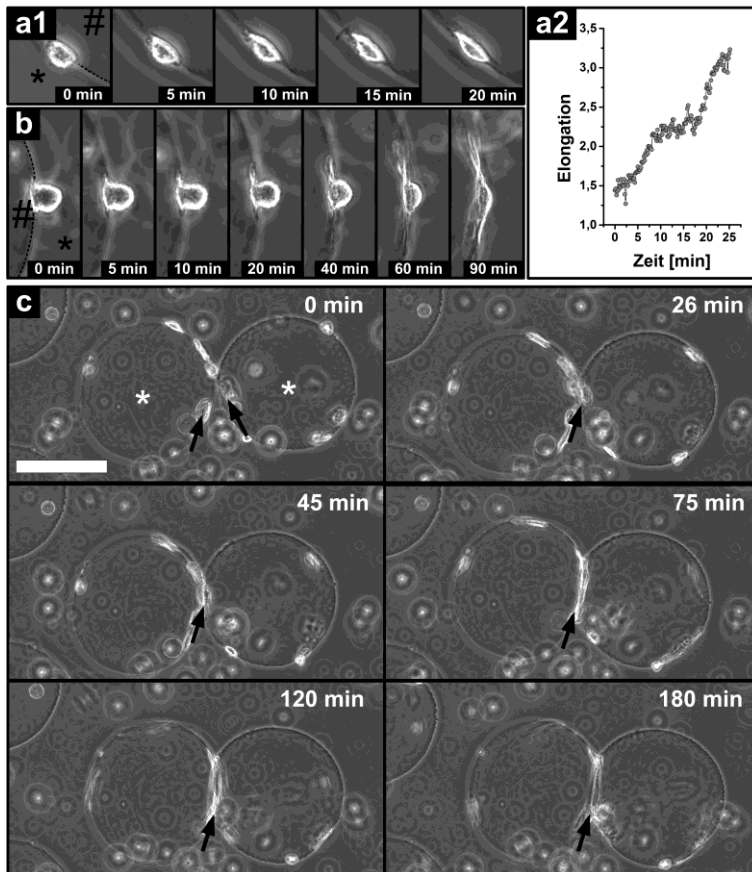
**a** Native Alginat-Oberfläche ohne Modifikation. **b** Modifizierte Alginat-Oberfläche mit Kollagen I. **c** und **d** Zell-Matrix-Interaktion von hMSCs auf modifizierten Alginat-Mikroträgern mit Kollagen I. Maßstab: 100µm bei 1000x, 50µm bei 3000x und 20µm bei 5000x

Die Interaktion der Zellen auf den Mikroträgern war deutlich zu erkennen, jedoch war die Morphologie der Zellen sehr ungewöhnlich, da diese nicht flach und ausgebreitet, sondern „wurmartig“ war. Hierbei muss man jedoch die Präparation der Proben berücksichtigen, bei der insbesondere die Trocknung der Alginat-Mikroträger auch die Zell-Matrix-Interaktion beeinflussen und durch Schrumpfen die Morphologie der Zellen beeinflusst werden kann. Die Analyse der Zell-Matrix-Interaktion war demnach nicht zufriedenstellend mittels REM analysierbar, im Gegensatz zur reinen Texturanalyse der Oberfläche.

### Zelluläre Ereignisse auf der Mikroträger – Oberfläche

Die Adhäsion wurde anhand der Lebendzell-Mikroskopie in statischer Kultur zeitlich hochaufgelöst untersucht. Die Form der Mikroträger ermöglichte es, die Adhäsion seitlich zu beobachten. Hierfür musste eine initiale Zell-Matrix-Interaktion bereits erfolgt sein, da die Zellen sonst nicht stabil in der Fokusebene verblieben. Abbildung 57 a und b zeigen Adhäsionssequenzen von hMSCs auf Kollagen I modifizierten Alginat-Mikroträgern. Nach erfolgter initialer Adhäsion konnte über einen längeren Zeitraum die morphologische Veränderung beobachtet werden, die mit flachen, ausgebreiteten Zellen endete. Durch die hohe zeitliche Auflösung waren vereinzelt Deformationen der Membran der Zellen in den Zeitrafferaufnahmen zu erkennen. Es folgte hierauf eine laterale Ausbreitung der Zellen. Da hMSCs generell sehr flach auf dem Substrat adhärten, war, auch durch die seitliche Betrachtung die Zellen, nach abgeschlossener Adhäsion die Ausbreitung nur unzureichend erkennbar. Eine Interaktion der Zellen mit der Matrix, die über die Zell-Matrix-Interaktion auf molekularer Ebene hinausging, konnte ebenso beobachtet werden (Abbildung 57 a). Während der Adhäsion waren leichte Verformungen der Oberfläche des Alginat-Mikroträgers erkennbar, die auf die Kräfte schließen ließen, die von den Zellen auf das Substrat ausgeübt wurden (Abbildung 57 c). Eine wichtige Erkenntnis dieser Daten war die sehr kurze Zeitspanne, die die Zellen nach Kontaktierung mit dem Mikroträger benötigten. Bereits nach 10 min war eine deutliche Adhäsion erkennbar, die letztendlich die Grundlage für die Nutzung der Mikroträger in z. B. durchmischten Bioreaktoren darstellte.





**Abbildung 57: ADHÄSION UND AUSBREITUNG VON hMSCs AUF KOLLAGEN I ALGINAT-MIKROTRÄGERN. EREIGNISSE VON ALGINAT-MIKROTRÄGERN IN STATISCHER KULTUR MIT MESENCHYMALEN STAMMZELLEN.**

*a1 und b* Detaillierte Aufnahme der Adhäsion von hMSCs auf Kollagen I modifizierten Alginat-Mikroträgern in seitlicher Ansicht.

*a2* Verlauf der Adhäsion der Zelle in *a1* quantifiziert anhand der Elongation.

*c* Adhärenz von Zellen auf benachbarten Alginat-Mikroträgern (weiße Sterne) migrieren entlang der Oberfläche und akkumulieren an der Kontaktstelle der Mikroträger (schwarze Pfeile). An der Kontaktstelle der Mikroträger bildet sich ein Bereich mit hoher Zelldichte, der die Mikroträger miteinander verbindet (schwarzer Pfeil). Die Agglomeration erfolgt somit über Matrix-Zell-Zell-Matrix oder Matrix-Zell-Matrix-Interaktionen. Die Zellen verteilen sich langsam über die Mikroträger ohne jedoch den Komplex wieder zu lösen. Die Zellen wurden 30 min zuvor mit den Mikroträgern inokuliert. Maßstabsbalken: 200  $\mu\text{m}$ . (Abbildung *b* nach [316], abgeändert).

### Untersuchung des Verhaltens von hMSCs auf bioaktiven Alginat-Mikroträgern in durchmischten Mini-Bioreaktoren

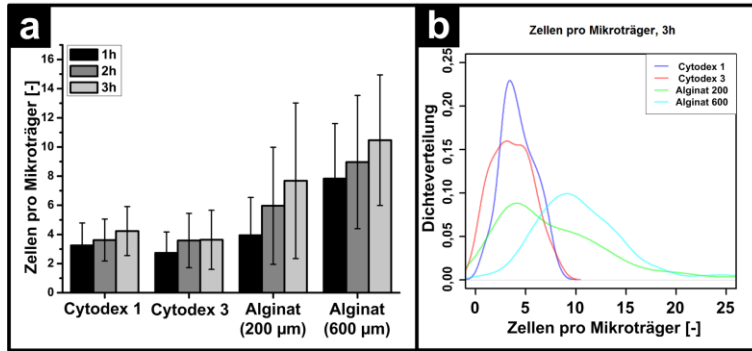
Die positive Zellreaktion auf die Alginat-Mikroträger in der statischen Kultivierung im *hängenden Tropfen* führte zu der Fragestellung, ob diese Mikroträger auch für durchmischte Suspensionskulturen geeignet sind. In diesem Abschnitt wird in einem durchmischten Bioreaktorsystem die zelluläre Reaktion auf die entwickelten Alginat-Mikroträger vergleichend untersucht.

### Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von hMSCs auf bioaktiven Alginat-Mikroträgern während der Inokulationsphase

Eine entscheidende Phase stellte bei einer Mikroträger-basierten Kultivierung die Inokulationsphase dar. Bei Durchmischung der Kultur, durch ein Rührwerk o.ä., ist die Kontaktzeit von Kulturoberfläche (Mikroträger) und den inokulierten Zellsystemen zeitlich begrenzt. Die Eigenschaften der Mikroträger (und die Einstellungen zur Durchmischung) mussten dahingehend eine optimale Zellinteraktion in Form einer Adhäsion garantieren, damit beispielsweise eine bestimmte Zellzahl pro Mikroträger während dieser Phase adhären kann. Die Kultivierung der hMSCs auf Cytodex 1, Cytodex 3 und den beiden Alginat-Mikroträgern ( $\sim 200 \mu\text{m}$  und  $\sim 600 \mu\text{m}$  Durchmesser) wurden während der Inokulationsphase im Biolevitator (vgl. Tabelle 4) bzgl. der Zelladhäsion untersucht.

Abbildung 58 a zeigt die durchschnittliche Zellzahl pro Mikroträger zu den untersuchten Zeitpunkten. Bei den untersuchten Zeitpunkten zeigte sich, dass bei den Mikroträgern Cytodex 1 und Cytodex 3 nach einer Stunde eine vergleichbare Anzahl an Zellen adhären (3,3  $\pm$  1,5 bzw. 2,7  $\pm$  1,4 Zellen pro Mikroträger). Nach 2 h bzw. 3 h hat sich dieser Wert kaum geändert - nach 2 h adhären 3,6  $\pm$  1,4 bzw. 3,6  $\pm$  1,9 Zellen und nach 3 h waren es 4,2  $\pm$  1,7 bzw. 3,6  $\pm$  2,0 Zellen pro Mikroträger.





**Abbildung 58: ADHÄSIONSVERHALTEN WÄHREND DER INOKULATIONS-PHASE.**

**a** Die Adhäsion der hMSCs auf den verschiedenen Mikroträgern wurde nach 1, 2, und 3 h lichtmikroskopisch bestimmt und ist als Zellen pro Mikroträger dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD. ( $n=3$ , je 20 analysierte Mikroträger).

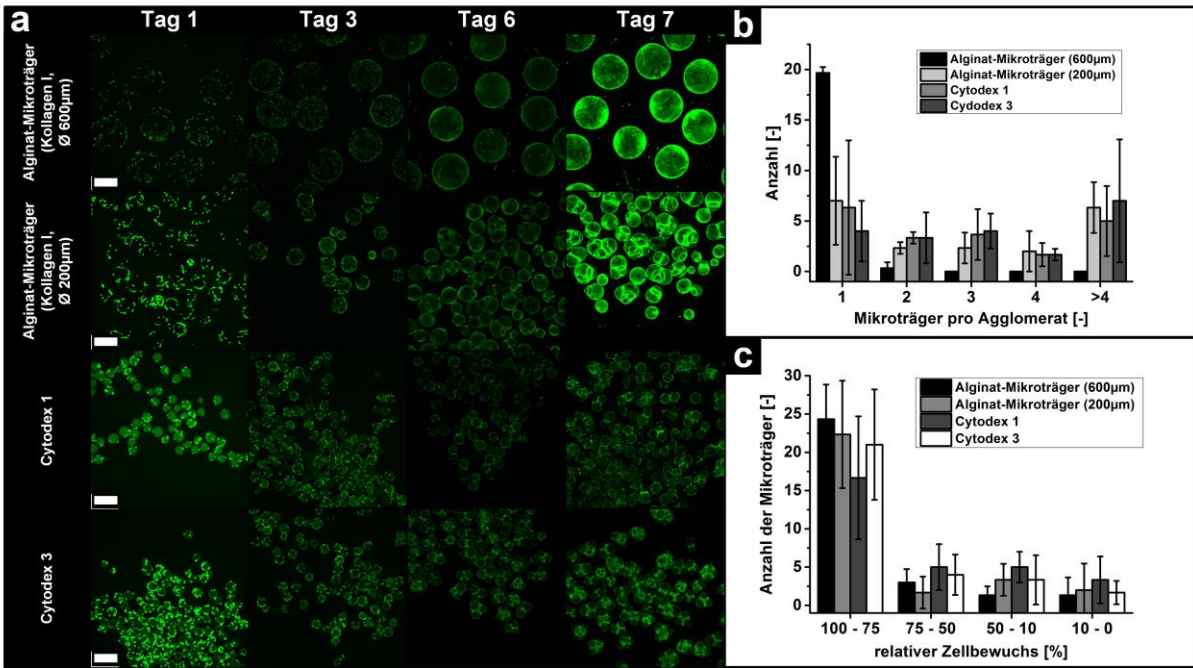
**b** Zellen pro Mikroträger nach 3 h Inokulation, dargestellt als Dichteverteilung ( $n=3$ , je 20 analysierte Mikroträger). (Abbildung a nach [316], abgeändert).

Im Gegensatz hierzu war bei den Alginat-Mikroträgern eine höhere Zellzahl pro Mikroträger zu verzeichnen. Nach 1 h lag die Zellzahl pro Mikroträger bei den kleineren Alginat-Mikroträgern bei  $4,0 \pm 2,6$  und bei den großen Alginat-Mikroträgern bei  $7,8 \pm 3,8$ . Eine steigende Zellzahl pro Mikroträger konnte nach 2 h ( $6,0 \pm 4,0$  bzw.  $9,0 \pm 4,6$ ) und ebenso nach 3 h ( $7,7 \pm 5,3$  bzw.  $10,5 \pm 4,5$ ) beobachtet werden. Die Adhäsion auf den Cytodex-Mikroträgern war mit Hinblick auf die Standardabweichung gleichmäßiger, wohingegen größere Unterschiede der Adhäsionsrate bei den Alginat-Mikroträgern zu verzeichnen waren. Die Dichteverteilung der Adhäsionsrate nach 3 Tagen ist in Abbildung 58 b dargestellt. Die schon beschriebene gleichmäßigere Adhäsionsrate der Zellen auf den Mikroträgern wurde hierdurch nochmals durch die enge Verteilung verdeutlicht. Im Gegensatz hierzu war die Verteilung der Adhäsionsrate auf den Alginat-Mikroträgern wesentlich breiter. Eine Überprüfung auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk zeigte, dass die Hypothese einer Normalverteilung bei der Adhäsionsrate bei von Cytodex 1, Cytodex 3 und den kleinen Alginat-Mikroträgern abgelehnt werden muss, wohingegen die Adhäsionsrate bei den großen Alginat-Mikroträgern normalverteilt war.

Die Ergebnisse belegten insgesamt, dass eine Kultivierung von hMSCs auf Alginat-basierten Mikroträgern auch in durchmischten Kultivierungssystemen durchgeführt werden kann, da die Zellen in sehr kurzer Zeit mit der funktionalisierten Alginat-Oberfläche interagieren können.

### Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von hMSCs auf bioaktiven Alginat-Mikroträgern während der Kultivierungsphase

Das Verhalten der Zellen wurde nach der Inokulationsphase an verschiedenen Tagen mittels Konfokal-Mikroskopie untersucht. Die Ergebnisse der Zelladhäsion während der Inokulationsphase zeigten, dass eine adäquate Zellzahl auf den Mikroträgern für eine Kultivierung vorhanden war. Es galt nun zu untersuchen, ob die Funktionalisierung der Oberfläche mit Kollagen I stabil genug war, um einer Kultivierung im gerührten Suspensionssystem standzuhalten. Diese betraf sowohl die Alginat-Oberfläche selbst, als auch die Integrin-vermittelte Interaktion der Zellen mit der funktionalisierten Oberfläche. Abbildung 59 a zeigt FDA-gefärbte hMSCs auf den verschiedenen Mikroträgern nach 1, 3, 6 und 7 Tagen. Insgesamt war bei allen Mikroträgern eine stetige Adhäsion, sowie Proliferation der Zellen zu beobachten. Auch bei einem konfluenten Bewuchs der Mikroträger, wie es z. B. bei den großen Alginat-Mikroträgern zu beobachten war, blieb der Zellrasen intakt. Ein Ablösen der hMSCs war bis zu diesem Zeitpunkt nicht zu beobachten, trotz der Durchmischung der Kultur und dem damit verbundenen mechanischen Stress. Auffällig war die Agglomeration der kleiner dimensionierten Mikroträger (Cytodex 1, Cytodex 3 und Alginat 200µm).



**Abbildung 59: VERLAUF DER MIKROTRÄGER-KULTUR. AUSBREITUNG DER hMSCS AUF VERSCHIEDENEN MIKROTRÄGER-SYSTEMEN (ALGINAT-KOLLAGEN I, 600 µM, ALGINAT-KOLLAGEN I, 200 µM, CYTODEX 1 UND CYTODEX 3).**  
**a** Nach 1, 3, 6 und 7 Tagen. Die hMSCs wurden zur besseren Dokumentation mit FDA gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Auf allen Mikroträgersystemen adhären die Zellen und wachsen bis zur Konfluenz. Skala: 500 µm. **b** Relativer Bewuchs der Mikroträger mit hMSCs nach 7 Tagen Kultivierung im durchmischten Bioreaktor durch 4 Klassen. Gezeigt sind Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n=3$  Versuchen zu je 30 bewerteten Mikroträgern. **c** Agglomerationsverhalten der Mikroträger mit hMSCs nach 7 Tagen Kultivierung im durchmischten Bioreaktor. Gezeigt sind die Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n=3$  Versuchen mit je 20 Objekten. Der Kontrast der Bilder in **a** wurde zur besseren Darstellung adaptiert. (Abbildung **b** nach [316], abgeändert).

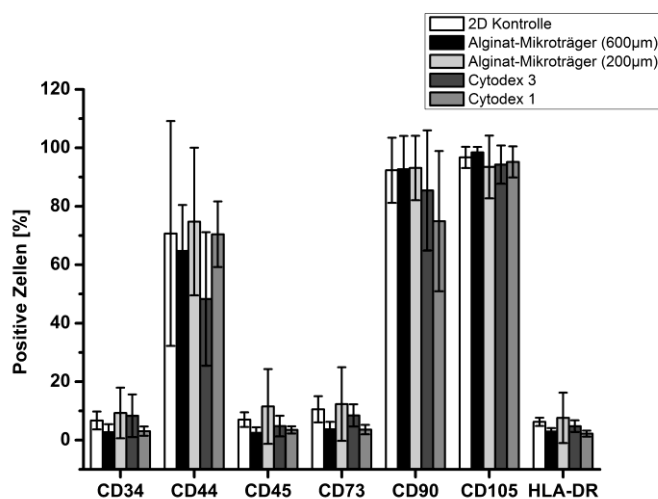
Abbildung 59 b zeigt die Agglomeration der verschiedenen Mikroträgersysteme nach 7 Tagen Kultivierung im Bioreaktor. Die Daten belegten die schon gemachten Beobachtungen der geringen Agglomeration der großen Alginat-Mikroträger. Diese lagen überwiegend als einzelne Mikroträger vor, wohingegen die übrigen Mikroträger (kleine Alginat-Mikroträger, Cytodex 1 und Cytodex 3) sowohl aus einzelnen Mikroträgern, als auch aus mehr als vier Mikroträgern ein Agglomerat bildeten (Abbildung 59 b). Aus den Daten konnte die Tendenz abgeleitet werden, dass kleinere Mikroträger, unabhängig vom Material stärker dazu tendierten Agglomerate zu bilden, als größere Mikroträger.

Neben der Agglomeration wurde des Weiteren der relative Bewuchs der Zellen auf den Mikroträgern untersucht. Anhand der Fluoreszenzbilder in Abbildung 59 a war bereits erkennbar, dass die Zellfläche auf den Mikroträgern unabhängig von dem Mikroträgersystem mit steigender Kultivierungszeit zunahm, die Zellen also folglich proliferierten und die Mikroträger immer mehr bedeckten. Die manuelle Bestimmung der bewachsenen Flächen zeigte (Abbildung 59 c), dass bei allen Mikroträgersystemen die bewachsene Fläche zwischen 75-100% lag und somit ein konfluentes Wachstum auf der Oberfläche möglich war. Geringer bewachsene Mikroträger waren vorhanden, die Verteilung unter den Mikroträgern jedoch vergleichbar und nicht höher als 20%.

Somit konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit entwickelten Alginat-Mikroträger für eine biotechnologische Anwendung in gerührten Bioreaktoren genutzt werden konnten. Ferner zeigte sich, dass die Art der Zellinteraktion der kleinen Alginat-Mikroträger mit kommerziell erhältlichen Mikroträgern vergleichbar war, aber auch, dass beispielsweise durch die Größe der Mikroträger die Agglomeration unterschiedlich ausfiel.

## Untersuchung des Phänotyps mittels Durchflusszytometrie

Der Phänotyp der hMSCs nach erfolgter Expansion im durchmischten Bioreaktor wurde anhand von sieben Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie (FACS) untersucht. Die Analyse erfolgte nach sieben Tagen Kultivierung mit den positiven Markern CD44, CD90 und CD105, sowie den negativen Markern CD34, CD45, CD 73 und HLA-DR (siehe Abbildung 60). Untersucht wurden insgesamt 5 Kultivierungssysteme (2D, Alginat-Mikroträger 600  $\mu\text{m}$ /200 $\mu\text{m}$ , Cytodex 1/3), bei denen die Expression der Marker für die Antigene vergleichbar ist. Die Häufigkeit der CD105 positiven Zellen zeigte dabei die geringsten Unterschiede zwischen den fünf Systemen. Auf gleichem Niveau war auch die Zahl der CD90-positiven Zellen, mit der Ausnahme, dass auf Cytodex 1 weniger positive Zellen gemessen wurden. Die höchste Variabilität wurde in den Versuchen bei den CD44-positiven Zellen gemessen, wobei hier eine deutlich geringere Zahl an positiven Zellen bei den Cytodex 3-Mikroträgern gemessen wurde. Generell lag die Anzahl mit weniger als 80% unter der von CD90 und CD105. Bei den negativen Markern zeigte sich eine vergleichbare Zellzahl von 10-20%, die diese Marker exprimierten. Im Mittel lag die Anzahl der positiven Zellen unterhalb von 10%, mit Ausnahme der 200  $\mu\text{m}$  Alginat-Mikroträger, bei denen die Anzahl der CD45- und CD73-positiven Zellen zwischen 10-20% lag. Bei den CD73-positiven Zellen lag die Anzahl der 2D-Kontrollen ebenso über 10% und war damit bei den negativ-Markern am höchsten. Insgesamt können mit den gewählten Markern die Eigenschaften der hMSCs sehr gut abgebildet werden. Die Eigenschaften waren sowohl für die 2D-Kultur, als auch für die adhärenzte Mikroträger-Kultur anwendbar. Bis auf die CD44-Marker zeigten die Ergebnisse sehr gute Reproduzierbarkeiten.

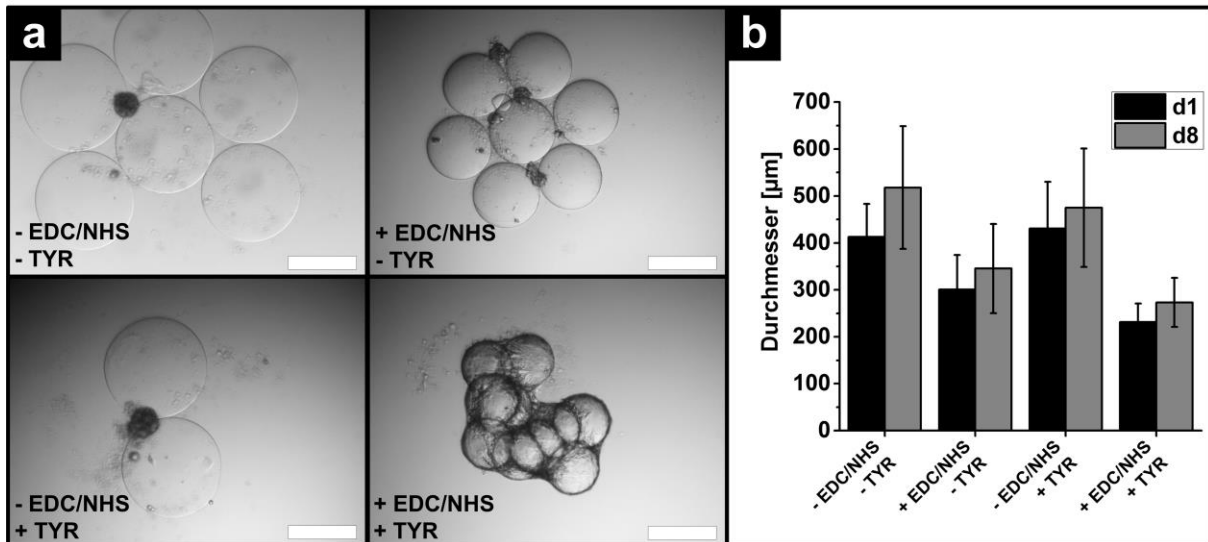


### Abbildung 60: UNTERSUCHUNG DES PHÄNOTYPS MITTELS FACS.

Der Phänotyp der hMSCs wurde nach der Kultivierung mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Expression der Oberflächenantigene CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 und HLA-DR wurde mittels monoklonaler Antikörper untersucht, die typischerweise für die Identität von hMSCs verwendet werden. Die untersuchten Antigene beinhalten 3 negative Marker und 4 positive Marker. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n=2-3$  Experimenten.

## Untersuchungen zur kovalenten Kopplung mit Tyramin

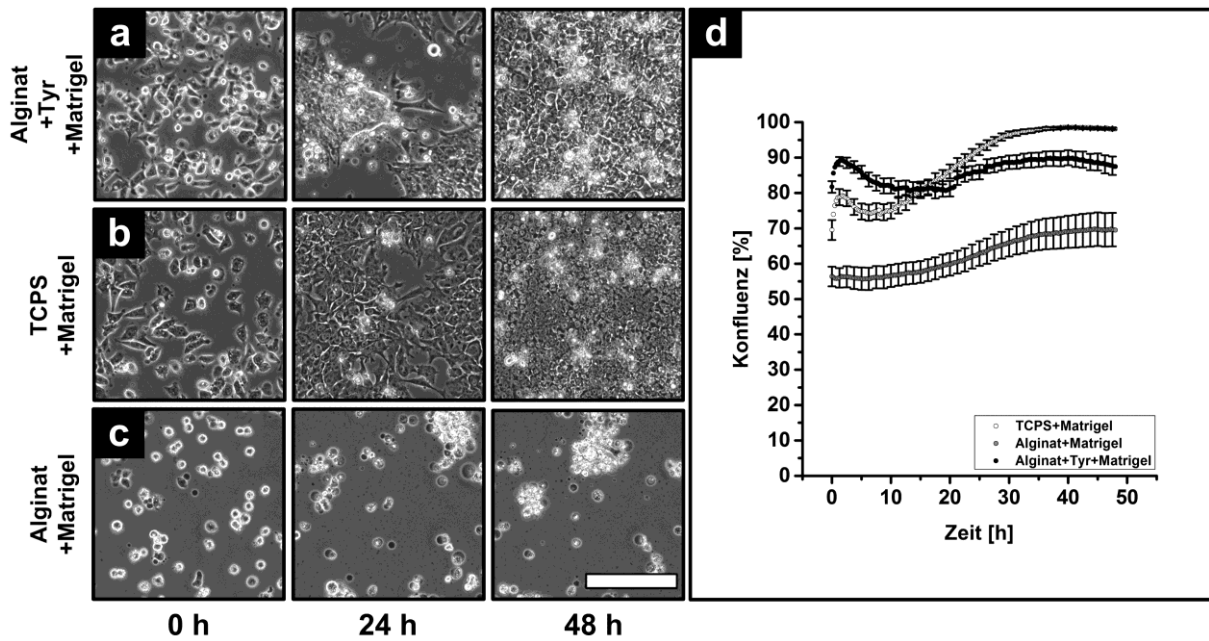
Die Kopplungsreaktion von Molekülen an die Alginatkugeln zur Herstellung von Alginat-Mikroträgern wurde durch die Kopplung von einem sehr kleinen Molekül evaluiert und bereits im Zusammenhang planarer Alginat GS untersucht (Abbildung 49). Dies diente zum Ausschluss von Artefakten, die durch die Inkubation mit Kollagen I entstehen können, wie z. B. der Ummantelung durch Kollagen I-Fasern durch einen pH-Anstieg bei den Waschstufen. An dieser Stelle soll weiter untersucht werden, ob diese Modifikation auch auf sphärische Alginat-Gerüststrukturen anwendbar ist. Durch eine Kopplung von Tyramin könnte eine universelle Beschichtung von Alginat-Mikroträgern möglich sein, die eine hohe Flexibilität bei experimentellen Untersuchungen mit sich bringen würde. Ähnlich wie bei der Kopplung von Kollagen I (Abbildung 53) wird auch hier die statische Kultur des *hängenden Tropfens* zur Untersuchung angewendet.



**Abbildung 61: ZELLULÄRE REAKTION VON hMSCs AUF MODIFIZIERTE ALGINATKUGELN MIT TYRAMIN.**

**a** Gezeigt sind die unterschiedlichen Kombinationen der verwendeten Lösungen zur Herstellung der Mikroträger: EDC/NHS: Lösung zur Aktivierung der Carboxylgruppen, TYR: Tyramin als zu koppelnde funktionale Gruppe, „-“, „+“: verwendet, „-“, „+“: nicht verwendet. Es ist zu beobachten, dass die Konditionen -EDC/NHS-TYR, +EDC/NHS-TYR und -EDC/NHS +TYR keine Adhäsion auf den Mikroträgern hervorrufen, wohingegen die Kondition +EDC/NHS +TYR ein Adhären der hMSCs auf den Alginat-Mikroträgern hervorruft. Die unterschiedlichen Durchmesser der Mikroträger resultieren aus den verwendeten Lösungen. Skala: 250 µm. **b** Quantifizierung des Durchmessers der Alginatkugeln nach Inkubation in verschiedenen Lösungen zur Herstellung der Mikroträger nach Tag 1 und Tag 8. Die Inkubation mit EDC/NHS bzw. EDC/NHS mit Tyramin führt zu einer Reduzierung der Kugelgröße, wohingegen der Durchmesser bei Inkubation nur in Tyramin vergleichbar mit dem der nativen Alginatkugeln ist. Die Unterschiede bleiben über die Zeit gesehen vergleichbar. Gezeigt ist der Durchmesser als Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n=3$  unabhängigen Experimenten.

Auch hier zeigten die Resultate, dass nur durch die kovalente Kopplung von Tyramin (+ EDC/NHS, +TYR) an das Alginat eine Zelladhäsion erfolgen konnte (Abbildung 61 a). Wie auch bei der Kopplung von Kollagen I zeigten die übrigen Behandlungen der Mikroträger keine Reaktion der Zellen in Form einer Adhäsion auf den Alginat-Oberflächen. Neben dem Adhäsionsverhalten der Zellen konnte bei den vier Konditionen auch eine unterschiedliche Dimensionierung der Mikroträger beobachtet werden (siehe Abbildung 61 b). Nach der Inkubation der Alginatkugeln mit Tyramin (ohne Aktivierung) war der Durchmesser vergleichbar (-EDC/NHS +TYR:  $430 \pm 99$  µm) mit dem der nativen Alginatkugeln (-EDC/NHS -TYR:  $412 \pm 70$  µm). Anders verhält es sich bei den Konditionen +EDC/NHS -TYR und +EDC/NHS +TYR. Hier war in beiden Fällen eine Reduzierung des Durchmessers zu beobachten, was letztendlich in kleineren Mikroträgern resultierte. Der Durchmesser bei +EDC/NHS -TYR betrug demnach noch  $301 \pm 74$  µm und  $231 \pm 40$  µm bei +EDC/NHS +TYR. Die Daten zeigten somit einen starken Einfluss der EDC/NHS Inkubation auf die Dimension der Alginatkugeln, der durch TYR verstärkt wurde. Für die Aktivität der Mikroträger spielte diese Beobachtung eine untergeordnete Rolle. Ursächlich für die Reduzierung der Mikroträger waren entweder der pH-Wert oder die Osmolarität während der Inkubation. Bei der Modifikation der Alginat-Mikroträger mit Kollagen I trat dieser Effekt nicht auf, da die EDC/NHS Aktivierungslösung nach 30 min entfernt wurde. In diesen Experimenten wurde das Tyramin zu dieser Lösung hinzugegeben, da aufgrund der vorhandenen funktionellen Gruppen keine Kopplung zwischen zwei Tyramin-Molekülen erfolgen konnte. Die unterschiedlichen Durchmesser blieben, im Verhältnis gesehen, über einen Inkubationszeitraum von 8 Tagen konstant. Es war lediglich eine leichte Zunahme des Durchmessers bei allen Konditionen zu beobachten (siehe Abbildung 61 b).



**Abbildung 62:** hiPSC AUF VERSCHIEDENEN OBERFLÄCHEN IM ZEITLICHEN VERLAUF.

**a** hiPSC auf modifiziertem Alginat (Alginat + Tyramin + Matrigel). **b** hiPSC auf der Standardkulturoberfläche (TCPS + Matrigel) und **c** hiPSC auf modifiziertem Alginat (Alginat + Matrigel). Es sind jeweils die Zeitpunkte 0 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h gezeigt. Eine Adhäsion erfolgt ausschließlich auf der Standardkulturoberfläche und dem modifizierten Alginat mit Tyramin, wohingegen auf dem modifizierten Alginat mit lediglich Matrigel keine Adhäsion festzustellen ist. **d** Quantifizierung der Konfluenz von hiPSC auf verschiedenen Oberflächen, gezeigt als Mittelwert  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils  $N > 9$  ausgewerteten FOVs. Zur besseren Übersicht, wird in dieser Abbildung der Standardfehler des Mittelwerts, statt der Standardabweichung angezeigt. Maßstab für alle Bilder: 200  $\mu$ m.

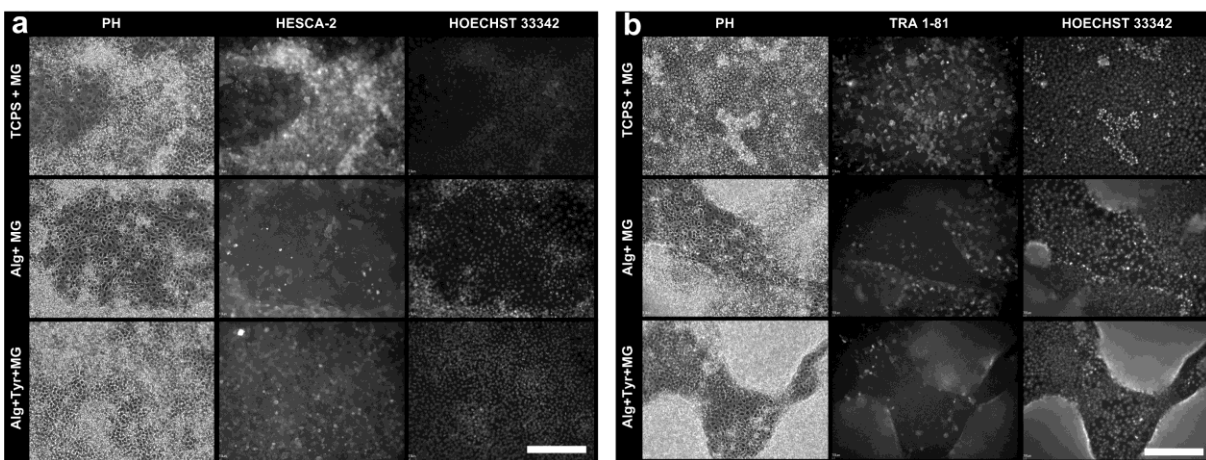
### Untersuchungen zur Adhäsivität von hiPSC auf Alginat-Hydrogelen

In Anlehnung an die Experimente aus Abschnitt 4.2.4 wurden hiPSC nach erfolgter Dissoziation (Vereinzelung) auf drei verschiedenen Oberflächen inokuliert und das Verhalten mittels Lebendzell-Mikroskopie über zwei Tage beobachtet. Auf den Alginat-Oberflächen, die auf herkömmlichem Weg mit Matrigel modifiziert wurden, erfolgte keine signifikante Zelladhäsion. Zwar konnten vereinzelt adhären Zellen beobachtet werden, der Großteil der Zellen verblieb im Verlauf des Experiments abgerundet. Im Gegensatz hierzu zeigte sich auf den Alginaten, an die zunächst das Molekül Tyramin gekoppelt wurde und anschließend eine Inkubation mit Matrigel zur Proteinadsorption auf der Oberfläche durchgeführt wurde, eine vergleichbare Adhäsion der Zellen im Vergleich zur Standardkulturoberfläche (TCPS mit Matrigel). Die Zellen adhärten in beiden Fällen auf der Kulturoberfläche, breiteten sich aus und bildeten innerhalb weniger Stunden Zellverbände (Abbildung 62 a und b). Über die Zeit kam es zum Zusammenschluss mehrerer dieser Zellverbände. Die zunächst entstandenen Zellverbände wanderten dabei nahezu geschlossen über die Kulturoberfläche bis sie auf einen weiteren Zellverbund stießen und sich mit diesem zusammenschlossen. Auf der Oberfläche, bei der Matrigel direkt mit dem Alginat gekoppelt wurde, waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Zum einen konnte eine Zelladhäsion beobachtet werden, bei weiteren Ansätzen jedoch nicht (Abbildung 62 c). Diese reduzierte Reproduzierbarkeit kann beispielsweise durch das Verhalten des Matrigels erklärt werden, seinerseits ein Gel zu bilden. Dieses Gel ist dadurch wiederum anfällig gegenüber Waschschritten und kann während der Präparation, auch aufgrund der Planarität der Oberfläche, abgetragen werden. Dies ließ den Schluss zu, dass eine Modifikation über Tyramin mit nachträglicher Matrigelbeschichtung zu wesentlich reproduzierbareren, d. h. stabileren Beschichtungen führte. Dies äußerte sich ebenso in der gemessenen Konfluenz der hiPSC über die Zeit (Abbildung 62 d). Während die Zellen auf TCPS mit Matrigel bzw. Alginat mit Tyramin und Matrigel eine hohe Konfluenz erreichten, stagnierten die Werte bei der Oberfläche Alginat mit Matrigel. Die wesentlich geringeren Werte zu Beginn

des Experiments ließen auch auf eine geringere Effizienz während der Adhäsion auf dieser Oberfläche schließen.

### Immunfluoreszenzanalyse

Die Zellidentität von der AXAi-hiPSC wurde nach 7 Tagen Kultivierung auf den Alginat-Gerüststrukturen im Vergleich zu Matrigel-beschichtetem TCPS analysiert. Bei allen Oberflächen konnten sowohl HESCA-2 (Abbildung 63 a), als auch Tra1-81 (Abbildung 63 b) positive Zellen detektiert werden. Aufgrund der hohen Zelldichte und der langen Kulturzeit lagen ebenfalls differenzierte Bereiche vor, die ein geringeres Fluoreszenzsignal aufwiesen. Diese korrelierten mit der Morphologie der Zellen. Insbesondere Zellverbände, die Kolonie-ähnliche Morphologien besaßen, zeigten große Bereiche an positiven Zellen. Die Resultate zeigten, dass bei den Parametern der Kultivierung, insbesondere der Zelldichte und Kultivierungsdauer, Optimierungsbedarf besteht, jedoch auf den modifizierten Alginat-Oberflächen nach 7 Tagen eine hohe Zahl an Tra1-81 und HESCA-2 positiven Zellen vorlagen.

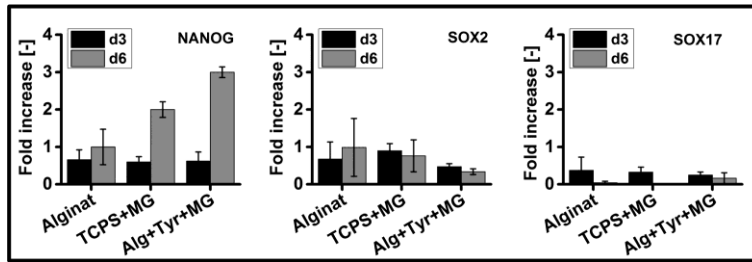


**Abbildung 63:** ANALYSE DER ZELLIDENTITÄT MITTELS PLURIPOTENZMARKER.

**a** HESCA-2-Färbung von hiPSC auf verschiedenen Alginat-Oberflächen. **b** TRA1-81-Färbung von hiPSC auf verschiedenen Oberflächen. Maßstabsbalken für alle Bilder: 200 µm. Abkürzungen: TCPS+MG: zellkulturbehandelte Polystyrenoberfläche mit Matrigelbeschichtung, Alg+MG: Alginat mit Matrigelkopplung, Alg+Tyr+MG: Alginat mit Tyraminkopplung und Matrigelbeschichtung.

### RT-qPCR Analyse

Weitere Analysen der Zellidentität wurden mit der RT-qPCR und Markern für NANOG, SOX2, und SOX17 durchgeführt (Abbildung 64). Die Expressionsprofile dieser Marker wurden für AXAi-hiPSCs erstellt, die über 6 Tage auf Matrigel-beschichtetem TCPS, nativem Alginat ohne Beschichtung und Alginat mit Tyramin-Kopplung und Matrigelbeschichtung kultiviert wurden. Die Profile wurden nach 3 bzw. 6 Tagen erstellt und auf das Expressionsprofil der Zellen zu Beginn des Experiments normiert. Bei SOX2 (Pluripotenzmarker) und SOX17 (Differenzierungsmarker) zeigten sich bei allen drei Oberflächen sowohl nach 3 Tagen, als auch nach 6 Tagen vergleichbare Werte zu den Ausgangszellen. Eine startende Differenzierung der Zellen kann aus diesen Werten nicht abgeleitet werden. Bei NANOG, einem weiteren Pluripotenzmarker, zeigten sich Unterschiede in der Expression. Nach 3 Tagen sind die Werte auf einem vergleichbaren Niveau, wohingegen sie nach 6 Tagen bei nativem Alginat auf gleichem Niveau blieben, bei Matrigel-beschichtetem TCPS und Alginat mit Tyramin und Matrigelbeschichtung höher waren.



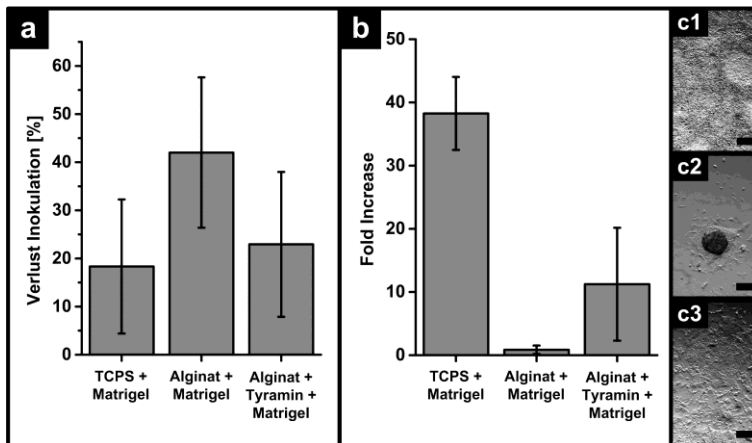
**Abbildung 64: ANALYSE DER EXPRESSION VON NANOG, SOX2 UND SOX17 VON hiPSCs AUF VERSCHIEDENEN KULTIVIERUNGS-OBERFLÄCHEN NACH 3 BZW. 6 TAGEN KULTIVIERUNG.**

Die Zellen wurden auf nativem Alginat („Alginat“), Matrigel-beschichtetem TCPS (TCPS+MG) und Alginat, modifiziert mit Tyramin und mit Matrigel beschichtet (Alg+Tyr+MG) kultiviert. Die Werte wurden auf das Expressionsprofil der Zellen vor Inokulation normiert. Als endogene Kontrolle wurde GAPDH verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert des Fold Increase  $\pm$  SD,  $n=3$ .

### Bestimmung der Proliferation auf modifizierten Alginaten

Da die Art der Oberfläche Einfluss auf Morphologie und Zellfläche haben kann und somit die Konfluenzwerte beeinflusst werden, wurde zusätzlich die Proliferation der Zellen über die Zellzahl bestimmt. Ebenso wurde die Anzahl der Zellen bestimmt, die nach 24 h nicht adhärten, um die Effizienz der Adhäsion auf den untersuchten Oberflächen zu quantifizieren. Auf der Oberfläche TCPS mit Matrigel waren nach 24 h 18,3% ( $\pm$  13,9), auf Alginat mit Tyramin und Matrigel 22,9% ( $\pm$  15,0) und auf Alginat mit Matrigel 42,0% ( $\pm$  15,6) der Zellen nicht adhärent (Abbildung 65 a). Hieraus konnte geschlossen werden, dass bei den ersten beiden Oberflächen eine vergleichbare Zellzahl zu Beginn der Experimente vorhanden war, wohingegen bei Alginat mit Matrigel eine wesentlich geringere Zahl adhärenter Zellen für die Proliferationsstudie vorlag. Ferner ließ sich hierdurch feststellen, dass bei TCPS mit Matrigel und Alginat mit Tyramin und Matrigel eine sehr hohe, vergleichbare Adhäsionseffizienz bestand. Nach einer Kultivierungszeit von 6 Tagen wurden die Zellen abgelöst und die Zellzahl bestimmt. Hierbei zeigte sich neben der geringen Proliferation auf Alginat mit Matrigel ( $0,9 \pm 0,7$ -fach) eine sehr hohe Proliferation bei der Oberfläche TCPS mit Matrigel ( $38,3 \pm 5,8$ -fach). Die Zellen auf dem Alginat mit Tyramin und Matrigel proliferierten, jedoch lag die Proliferationsrate wesentlich unter dem Wert der Proliferation auf TCPS mit Matrigel ( $11,2 \pm 8,9$ -fach). Die gemessenen Werte (Abbildung 65 b) stimmten auch mit der optischen Begutachtung der Zellen überein, bei der auf TCPS mit Matrigel ein dichter Zellrasen (Abbildung 65 c1), auf Alginat mit Matrigel nur vereinzelt adhärenente Zellen bzw. Aggregate (Abbildung 65 c2) und auf Alginat mit Tyramin und Matrigel adhärenente Zellen (kein dichter Zellrasen, Abbildung 65 c3) beobachtet wurde. Nach diesen Daten konnte geschlossen werden, dass die Modifikation mit Tyramin und anschließender Beschichtung mit Matrigel geeignet war, um eine Expansion von hiPSC zu erreichen, die Proliferationsrate jedoch wesentlich geringer war, verglichen mit der Oberfläche TCPS mit Matrigel. Die Gründe hierfür werden später eingehend diskutiert. An dieser Stelle soll aber erwähnt werden, dass die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der Oberfläche ein Grund hierfür sein können.

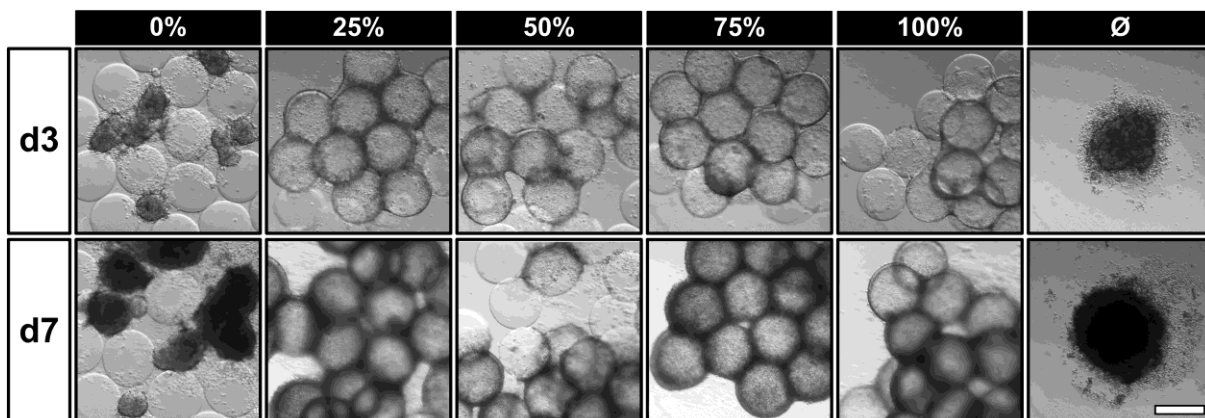




**Abbildung 65: INOKULATION UND PROLIFERATION VON hiPSCs AUF ALGINAT-OBERFLÄCHEN.**

**a** Zellverlust nach 24 h Inokulation auf den Oberflächen TCPs + Matrigel, Alginat+Matrigel und Alginat+Tyramin+Matrigel. **b** Proliferation der hiPSC auf den Oberflächen dargestellt als Fold increase in Bezug auf die Ausgangszellkonzentration. **c** Repräsentative Bilder der Kulturen nach 6 Tagen Kultivierung. Bild 1: TCPs+Matrigel, 2: Alginat+Matrigel, 3: Alginat+Tyramin+Matrigel. Hinweis: Zur besseren Darstellung wurde der Kontrast verändert. Maßstabsbalken in c: 200  $\mu$ m. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 Experimenten. (Abbildung nach [316], abgeändert).

Nachdem die Ergebnisse auf den planaren Oberflächen gezeigt haben, dass hiPSC auf Alginaten mit Tyramin und Matrigel adhären und proliferieren können, wurde weiter untersucht, ob dieses System auch auf sphärischen Alginat-Gerüststrukturen funktional ist. Hierfür wurden Alginat-Mikroträger mit Tyramin modifiziert und mit unterschiedlichen Matrigelkonzentrationen (0%, 25%, 50%, 75% und 100% ausgehend von der Standardbeschichtung von planaren Oberflächen) beschichtet. Dissoziierte hiPSC-Kolonien wurden mit diesen Gerüststrukturen inokuliert und über sieben Tage kultiviert. Abbildung 66 zeigt die Adhäsion der Zellen nach 3 bzw. 7 Tagen. Es wurde deutlich, dass die Modifikation auch eine Adhäsion der Zellen auf Alginat-Mikroträgern erlaubte und dass schon bei einer Konzentration von 25% Matrigel die Zellen auf den Mikroträgern adhären wachen konnten. Auf unbeschichteten Alginat-Mikroträgern (d. h. nur Tyramin-Funktionalisierung) erfolgte keine Zell-Matrix Interaktion, sondern eine Zell-Zell Interaktion, die sich in der Bildung von Zellaggregaten widerspiegelte. Ein ähnliches Verhalten wurde auch in den Proben beobachtet, in denen keine Mikroträger vorhanden waren ( $\emptyset$ ). Es wurde ferner deutlich, dass die Zellen bei vollständiger Besiedelung der Oberfläche der Mikroträger begonnen haben in mehreren Schichten zu wachsen.



**Abbildung 66: ADHÄSION VON hiPSC AUF MODIFIZIERTEN ALGINAT-MIKROTRÄGER NACH 3 BZW. 7 TAGEN KULTIVIERUNG IN "ULTRA LOW ATTACHMENT" MIKROTITERPLATTEN.**

Bei den Alginatkugeln wurde die Menge ausgehend von der Standardkonzentration (100%) verdünnt (0%, 25%, 50%, 75%), sowie einer Kontrolle ohne Alginatkugeln mitgeführt. Die Zelladhäsion kann auch bei der geringsten Matrigel-Konzentration beobachtet werden, lediglich auf den Alginatkugeln ohne Matrigel (0%, nur Tyramin-Funktionalisierung) findet keine Zellaadhäsion statt. Ähnlich wie bei den Proben ohne Alginatkugeln erfolgt eine Aggregatbildung der Zellen zwischen den Alginatkugeln. Repräsentative Bilder aus zwei unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken für alle Bilder: 400  $\mu$ m.

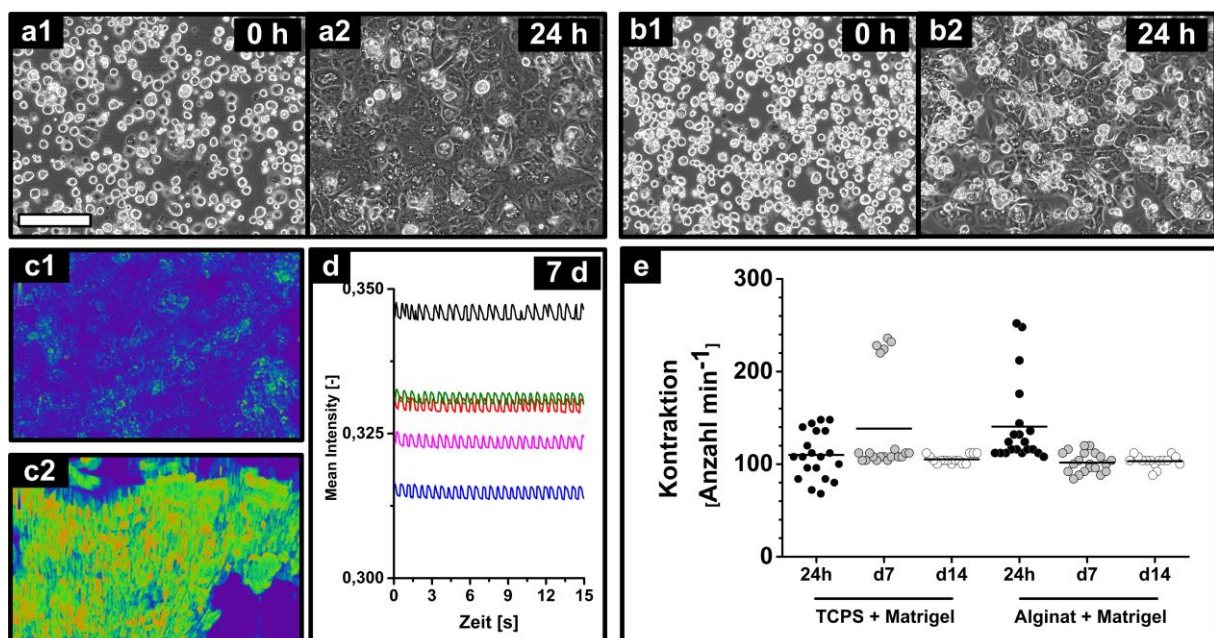


## Untersuchungen zur Funktionalität von hiPSC abgeleiteter Kardiomyozyten auf Alginate-Gerüststrukturen

Durch die vorangegangenen Versuche konnte gezeigt werden, dass durch die Modifikation der Alginat mit ECM eine Adhäsion der Zellen auf Alginate hervorgerufen werden kann. Ferner zeigte sich durch die Versuche mit hMSCs, dass diese elastische Kulturoberfläche einen Einfluss auf das zelluläre Verhalten hatte. Auf Alginate-Mikroträgern waren hMSCs in der Lage das Hydrogel zu komprimieren, so dass ausgeübte Kräfte durch die Adhäsion auf das Hydrogel übertragen werden konnten. Dieser Effekt ist bei Zellen, wie hMSCs oder hiPSC, bei der Kultivierung und Expansion zunächst von geringerem Interesse. Bei dynamischen Zellsystemen, wie beispielsweise (Herz-)Muskelzellen kann diese Elastizität sehr interessant sein, da die Zellen durch die Möglichkeit der Kontraktion nicht nur biochemisch, sondern auch mechanisch mit ihrem Substrat in Wechselwirkung treten könnten. In diesem Teil der Arbeit wird daher mit hiPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten die Interaktion auf modifizierten Alginate GS untersucht.

### hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten auf 2D-Alginaten

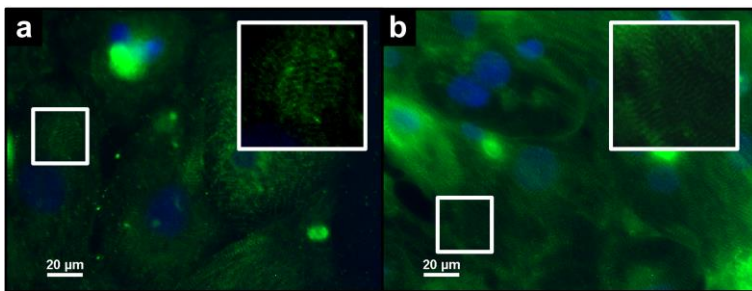
Die Zellen wurden nach erfolgreicher Modifikation der Alginatemembranen bzw. Beschichtung von TCPS-Oberflächen in die Petrischalen inokuliert und die Kontraktion in bestimmten Abständen (24 h, 7 Tage, 14 Tage) dokumentiert. Abbildung 67 zeigt adhärenz Kardiomyozyten auf TCPS direkt nach Inokulation (Abbildung 67 a1), nach 24 h (Abbildung 67 a2), sowie auf mit Matrigel funktionalisiertem Alginate (Abbildung 67 b1 bzw. Abbildung 67 b2). Anhand der Adhäsion konnten hierbei zunächst keine Unterschiede festgestellt werden. Bereits nach 24 h konnte beobachtet werden, dass die Kardiomyozyten auf beiden Oberflächen adhärenz und ausgebreitet vorlagen. Ebenso zeigte sich eine Kontraktion der Zellen in beiden Ansätzen, die sich jedoch qualitativ stark voneinander unterschieden. Auf den (harten) TCPS-Oberflächen kontrahierten die Zellen tendenziell lokal abgegrenzt und nicht als vollständiger Zellrasen, wohingegen bei dem (weichen) Alginate eine höhere Dynamik beobachtet werden konnte.



**Abbildung 67:** FUNKTIONALITÄT VON HIPSC ABGELEITETER KARDIOMYOZYTEN (COR.4U) AUF MODIFIZIERTER ALGINAT-OBERFLÄCHE.

Kardiomyozyten auf **a** TCPS mit Matrigel und **b** Alginate mit Matrigel nach 0h und 24h. **c1** Dynamische Bereiche der CM auf TCPS mit Matrigel. **c2** Dynamische Bereiche CM auf Alginate mit Matrigel. **d** „Kardiogramm“ aus nicht-invasiver Messung mittels Lebendzell-Mikroskopie. **e** Quantifizierung der Schlagfrequenz von CM nach 24h bzw. 7d auf den Oberflächen TCPS bzw. Alginate mit Matrigel.  $n \geq 3$  unabhängige Experimente mit jeweils 5 untersuchten FOV. **a, b** Skala: 200  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 67 c1 zeigt eine aus einer Bildsequenz abgeleitete Gewichtung dynamischer Bereiche auf TCPS im Vergleich zu dem funktionalisierten Alginat (Abbildung 67 c2). Die Farbintensität spiegelt dabei den Grad der Dynamik wider: Blaue Bereiche waren über den analysierten Zeitraum eher statisch, wohingegen gelbe Bereiche eine hohe Dynamik aufwiesen. Durch die Etablierung eines nicht-invasiven Verfahrens wurde ferner untersucht, ob sich die Schlagfrequenz auf diesen Substraten unterscheidet. Die aufgenommenen Bildsequenzen wurden hierfür mittels automatisierter Bildanalyse (Abbildung 67 d) prozessiert und die Schlagfrequenz anhand der mittleren Intensität des Gesamtbildes abgeleitet (Abbildung 67 e). Die Schlagfrequenz zeigte bei einigen Messungen zwar Ausreißer, jedoch waren die Schlagfrequenzen generell vergleichbar. Die Kontraktion selbst war bei diesen beiden Oberflächen sehr unterschiedlich. Bei den harten Plastikoberflächen war die Kontraktion eher „flach“, so dass die Zellen keine lateralen Positionsänderungen während der Kontraktion zeigten (Abbildung 67 c1). Im Gegensatz zeigten die hiPSC-CM auf dem Alginat GS eine „plastische“, sowie eine starke Positionsänderung während der Kontraktion (Abbildung 67 c2). Das beobachtete Verhalten ließ darauf schließen, dass die Zellen mit dem weichen (elastischen) Alginat in eine Interaktion treten, die über die Adhäsion hinausgeht. Durch die elastischen Eigenschaften erfolgte zusätzlich eine mechanische Interaktion der Zellen mit ihrer Umgebung. Bei einer näheren Betrachtung des Strukturproteins  $\alpha$ -Aktinin konnten auf beiden Oberflächen die typischen Banden verifiziert werden. Unterschiede waren hierbei nicht zu erkennen. In beiden Fällen lag eine isotrope Anordnung des  $\alpha$ -Aktinins vor (Abbildung 68).



**Abbildung 68: IMMUNZYTOCHEMISCHER NACHWEIS VON  $\alpha$ -AKTININ IN KARDIOMYOZYTEN.**

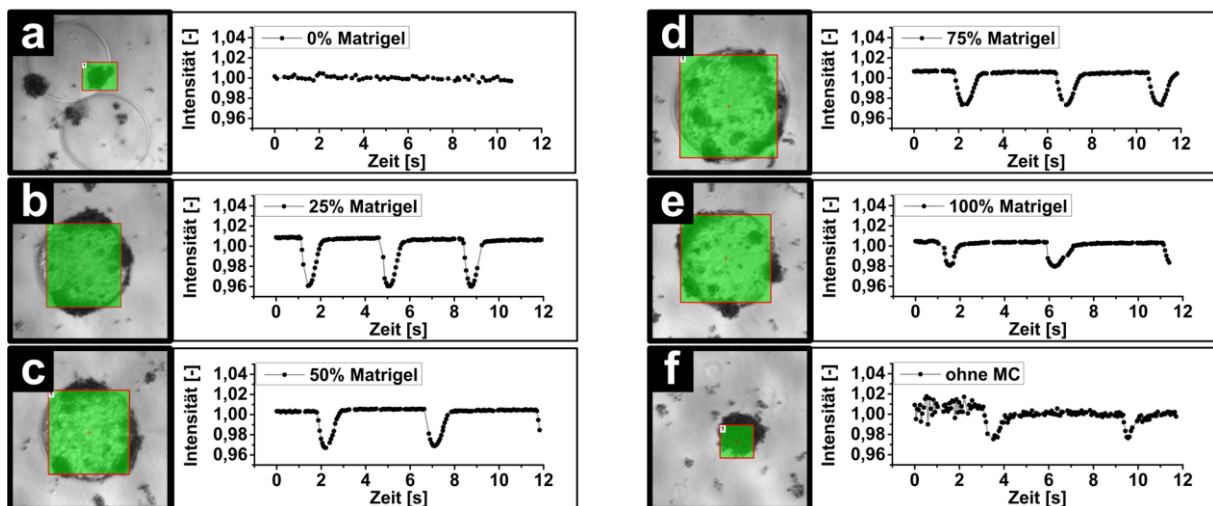
**a** Alginat mit Matrigel und **b** TCPS mit Matrigel. Die zusätzlichen Bildausschnitte im Hauptbild zeigen vergrößerte Detailaufnahmen. Überlagerung Fluoreszenzbilder aufgenommen mit Filter FITC (grün,  $\alpha$ -Aktinin) und DAPI (blau, Nukleus). Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. Hinweis: Der Kontrast der Bildausschnitte wurde zur besseren Darstellung erhöht.

### hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten auf sphärischen Alginat-Mikroträgern

Nachdem gezeigt werden konnte, dass hiPSC-CM auf modifizierten Alginaten kultiviert werden können und ferner eine erweiterte Interaktion der Zellen mit dieser elastischen Oberfläche vorlag, wurde untersucht, ob diese Zellen auch auf sphärischen Alginat-Mikroträgern kultiviert werden können. Für zukünftige zellbasierte Tests, wie z. B. Zytotoxizitätstests oder der Entwicklung neuer Wirkstoffe, könnte dieses Konstrukt ein interessantes Modellsystem darstellen, da es durch die Mikroträger elastische Eigenschaften des nativen Gewebes besser abbilden kann. Zusätzlich wird durch das Alginat eine Möglichkeit geschaffen, weitere Eigenschaften wie die mechanischen Eigenschaften von gesundem bzw. krankem Gewebe in das Modell einfließen zu lassen. In diesem Teil soll jedoch zunächst untersucht werden, ob die entwickelte Biofunktionalisierung des Alginats in Verbindung mit hiPSC-CM eine geeignete Adhäsionsoberfläche (als Gerüststruktur) für die Zellen abbilden kann. Um die Reproduzierbarkeit der Biofunktionalisierung weiter zu verbessern wurde hierbei zunächst die Modifikation durch Tyramin durchgeführt und diese Alginat-Mikroträger dann mit unterschiedlichen Konzentrationen (0, 25, 50, 75 und 100% ausgehend von der üblichen Beschichtungsmenge für 2D-Oberflächen an Matrigel) beschichtet.

In Mikrotiterplatten erfolgten die Inokulation, sowie die Kultivierung der Zellen, um ähnliche Bedingungen wie bei Screeningverfahren zu erhalten. Ferner wurde dabei darauf geachtet, möglichst wenige Mikroträger den Zellen zur Verfügung zu stellen, um einen größtmöglichen Zellbewuchs zu erreichen. Nach

einer Kultivierungsdauer von 8 Tagen wiesen die Zellen auf den Mikroträgern, die nicht mit Matrigel beschichtet wurden, d. h. bei denen die Oberfläche nur mit Tyramin funktionalisiert wurde, keine Adhäsion der Zellen vor. In der Konsequenz formierten sich hier kleinere Aggregate die schwach kontrahierten (Abbildung 69 a). Erfolgte eine Beschichtung mit Matrigel, zeigte sich bereits bei einer sehr geringen Beschichtung (25%) ein adhärentes Wachstum der Zellen. Auch die gewünschte Funktionalität in Form der Kontraktion war vorhanden (Abbildung 69 b). Ebenso konnte dies bei den Mikroträgern mit höheren Konzentrationen beobachtet werden (Abbildung 69 c, d, e). Bei den Proben, bei denen keine Mikroträger vorhanden waren wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet wie bei den Mikroträgern ohne Matrigel. Die Zellen aggregierten und kontrahierten nur sehr schwach (Abbildung 69 f). In den meisten Fällen waren mehrere bewachsene Mikroträger in den einzelnen Nöpfchen vorhanden, die eine unabhängige Kontraktion zeigten. Hier kann davon ausgegangen werden, dass die Mikroträger, obwohl sie in Kontakt mit den anderen Mikroträgern standen, keine Zell-Zell-Interaktion über benachbarte Mikroträger ausbildeten. Durch die Untersuchungen konnte ebenso gezeigt werden, dass auch für dieses Zell-Mikroträger System eine nicht invasive Analyse der Kontraktion mittels bildbasierter Methoden möglich ist. Gerade im Hinblick auf neue Screeningverfahren ist dies hervorzuheben, da hiermit auch eine zerstörungsfreie Analyse der Zellreaktion zu mehreren Zeitpunkten vorgenommen werden kann. Durch die Beschaffenheit der zugrundeliegenden Bilder war im Vergleich zu den übrigen Analysen der Kontraktion ein negativer Ausschlag zu beobachten – die daraus gewonnenen Informationen (ja-nein Entscheidung Kontraktion, Schlagfrequenz) wurden hierdurch jedoch nicht beeinflusst.



**Abbildung 69:** ADHÄSION (LINKS) UND KONTRAKTION (RECHTS) VON hiPSC-CM AUF FUNKTIONALISIERTEN ALGINAT-MIKROTRÄGERN (ALGINAT-TYRAMIN-MATRIGEL).

Die Adhäsion der Kardiomyozyten auf Mikroträgern nach 8 Tagen Kultivierung *a* ohne Matrigel-Beschichtung, *b* 25%, *c* 50%, *d* 75%, *e* 100% und *f* ohne Mikroträger. Bei allen Matrigel-beschichteten Mikroträgern ist eine Kontraktion messbar, bei den Aggregaten ohne Mikroträger ist die Kontraktion schwach, bei Mikroträgern ohne Matrigel-Beschichtung ist keine Kontraktion messbar. Die grüne Fläche zeigt den Bereich, in dem die Kontraktion gemessen wurde. Repräsentative Daten aus drei Experimenten. Normierte Intensität auf den Mittelwert.

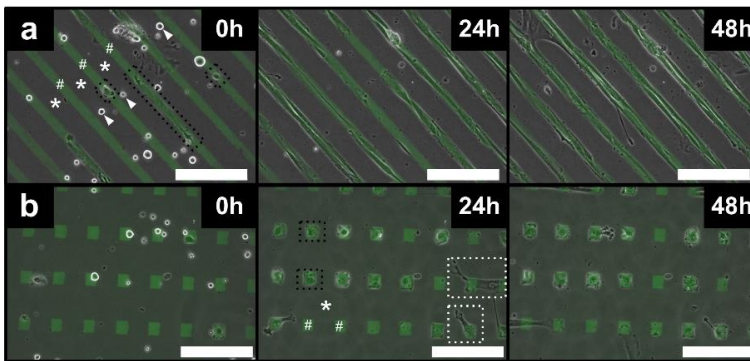
#### 4.3.6 Strukturierung und Funktionalisierung von Alginate-Oberflächen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die Biofunktionalisierung von Alginate-Hydrogelen, sowie die Kultivierung von humanen Stammzellen eingehend untersucht. Die biofunktionalisierten Alginate-Hydrogele waren hierbei entweder planar (Membran) oder sphärisch (Mikroträger). Um die Komplexität dieser Gerüststrukturen zu erhöhen, wäre es auch in Hinblick auf die biologische Funktion interessant, die Topographie der Oberflächen zu modifizieren. Die bereits untersuchten Oberflächen wie z. B. die fibrillären Alginate-Oberflächen (Abschnitt 4.3.1), die Nanopartikel-beladenen Alginate-Hydrogele (Abschnitt 4.3.2) oder auch die Alginate-ECM Mischungen (Abschnitt 4.3.4) werden hierbei nicht weiter behandelt, da



der Fokus auf eine Strukturierung gelegt werden soll, die beispielsweise für die Entwicklung von kardialen Zellmodellen interessant sind. Ebenso werden die Mikroträger hier nicht untersucht, da eine Strukturierung zwar interessant wäre, die Funktionalisierung zur Adhäsion für komplexere Zellsysteme, gemäß den Erfahrungen aus dieser Arbeit, nicht ausreichend ist. In Voruntersuchungen wurde das zelluläre Verhalten von hMSCs auf lokal funktionalisierten Oberflächen analysiert. Diese Untersuchungen sollten zunächst Aufschluss geben, inwieweit diese Zellen auf ihre Umgebung reagieren. Es wurden hierfür Strukturen aus Fluoreszenz-markierter Gelatine mittels  $\mu$ -Contact-Printing auf eine unbehandelte Polystyrenoberfläche gedruckt und das zelluläre Verhalten mittels Lebendzell-Mikroskopie verfolgt.

Die gewählten Muster waren zum einen parallele Linien (25  $\mu\text{m}$  Linienbreite, 58  $\mu\text{m}$  Zwischenraum) und zum anderen separierte Rechtecke (36 $\times$ 30  $\mu\text{m}$  Rechtecke, 60  $\mu\text{m}$  bzw. 95  $\mu\text{m}$  Zwischenraum). Das gewählte Protein hat den Vorteil, dass durch die Konjugation eines Fluorophors eine Korrelation von zellulärem Verhalten und Struktur mit der Lebendzell-Mikroskopie möglich ist.

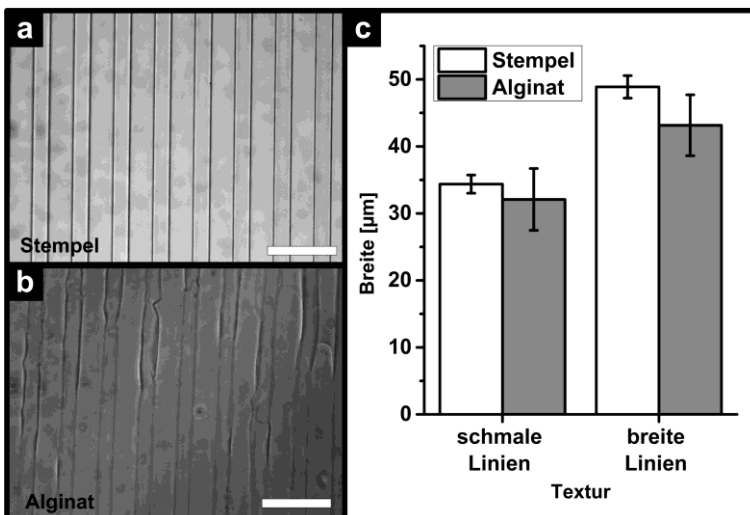


**Abbildung 70: hMSC AUF STRUKTURIERTEN BIOFUNKTIONALISIERTEN OBERFLÄCHEN.**

**a** MSC auf Linien aus fluoreszenzmarkierter Gelatine (25  $\mu\text{m}$  Linienbreite, 58  $\mu\text{m}$  Zwischenraum) zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h.

**b** MSC auf Rechtecken aus fluoreszenzmarkierter Gelatine (36 $\times$ 30  $\mu\text{m}$  Rechtecke, 60  $\mu\text{m}$  bzw. 95  $\mu\text{m}$  Zwischenraum) zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h. Maßstab: 200  $\mu\text{m}$ .

Die Experimente zeigten, dass hMSCs sowohl morphologisch, als auch bei der Migration auf die linienartigen Muster (Abbildung 70 a) reagierten. Zum einen erfolgte eine spindelförmige Ausrichtung der Zellen, die mit der Richtung der Struktur korrelierten. Ferner konnte beobachtet werden, dass die Zellen tendenziell auf den Linien entlang migrierten. Bei den quadratischen Proteinmustern (Abbildung 70 b) konnte ebenso eine morphologische Adaptation der adhären Zellen festgestellt werden. Größere hMSCs, die in der Literatur auch mit Seneszenz in Verbindung gebracht werden [218], waren ferner in der Lage größere Distanzen ohne Proteinmuster zu überwinden, was sich in einer Migration quer zum Linienmuster oder in einer Adhäsion über benachbarte Quadrate äußerte. Dieses Verhalten ließ gleichzeitig die Schlussfolgerung zu, dass die Modifikation einer Oberfläche, wie z. B. von nativen Alginaten, vollständig sein muss, um derartiges Zellverhalten zu unterbinden. Nach diesen Experimenten stellte sich vielmehr die Frage, wie eine derartige Strukturierung auf nativen Alginaten realisiert werden kann.



**Abbildung 71: ÜBERTRAGUNG VON STRUKTUREN MITTELS  $\mu$ -CONTACT PRINTING.**

**a** Mikroskopische Aufnahme der Struktur des Stempels, mit der die Strukturierung des Alginats vorgenommen wurde.

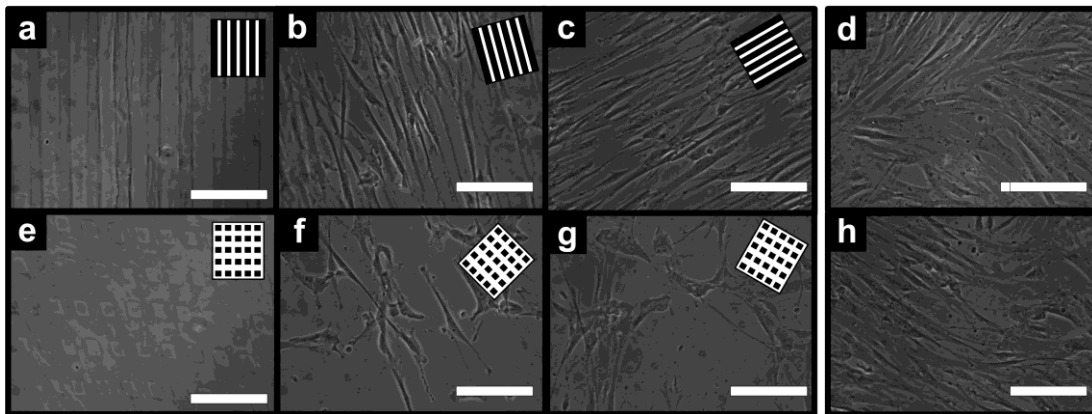
**b** Resultierende Alginat-Oberfläche nach Strukturierung mit dem in a gezeigten Stempel.

**c** Quantifizierung der Übertragungsgüte anhand der vorhandenen Texturmerkmale. Es wurde die Dimension der beiden vorhandenen Linientypen (schmal bzw. breit) ausgemessen. Im Vergleich zum Stempel sind die Dimensionen der Texturmerkmale auf dem Alginat um etwa 10% kleiner. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD vier Alginatstrukturen mit  $n=38$  bzw. 40 (Stempel) und  $n=89$  (Alginat). Maßstabsbalken in a und b: 200  $\mu\text{m}$ .

## Übertragung von Strukturen auf Alginat-Hydrogele

Der Transfer auf Alginat GS erfolgte mit dem sog.  $\mu$ -Contact Printing, bei dem eine Variante der Nano-Imprint-Lithographie adaptiert wurde (siehe auch [93, 320]).

Nach erfolgter Strukturierung der Alginat-Hydrogele und anschließender Vernetzung, wurde untersucht, inwieweit die Struktur übertragen wurde. Hierfür wurden die zugrundeliegende Matrize (Stempel, Abbildung 71 a), sowie die jeweiligen topographischen Merkmale auf dem Hydrogel (Abbildung 71 b) vermessen. Die Messergebnisse zeigten, dass die Topographie generell sehr gut übertragen wurde. Abbildung 71 c illustriert die Qualität der Strukturierung anhand der lateralen Breite der Linienmuster. Die Breite der schmalen Linien lagen bei dem Stempel im Bereich von  $34,3 (\pm 1,4) \mu\text{m}$  und die breiten Linien in einem Bereich von  $48,9 (\pm 1,7) \mu\text{m}$ . Bei den strukturierten Alginaten lag die Breite der schmalen Linien bei  $32,1 (\pm 4,6) \mu\text{m}$  und die der breiteren Linien bei  $43,2 (\pm 4,6) \mu\text{m}$ . Dies zeigte, dass nach der Strukturierung die Dimensionen der topographischen Merkmale im Vergleich zur genutzten Matrize minimal kleiner sind (7% bei den schmalen Linien, 13% bei den breiten Linien). Die schmalen Linien waren topographisch gesehen tieferliegend als die breiten Linien, sodass auf der Oberfläche des Alginat-Hydrogels kanal-artige Strukturen mit einer Tiefe von etwa  $10 \mu\text{m}$  und einer Breite von etwa  $30 \mu\text{m}$  vorhanden waren. Breite und Höhe waren so ausgelegt, dass die Strukturen einen Effekt auf die Zellen ausüben konnten.

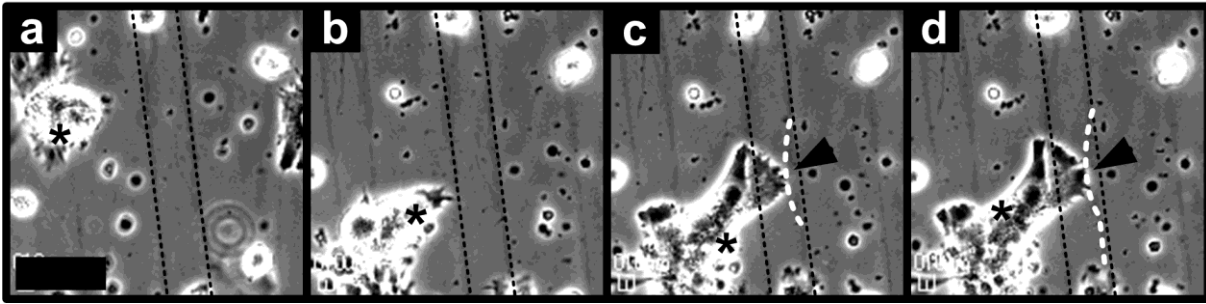


**Abbildung 72:** hMSC AUF STRUKTURIERTEM, BIOFUNKTIONALISIERTEM ALGINAT.

*a* Alginat mit Kanal-artiger Struktur, *b* hMSC nach 24 h, *c* hMSC nach 72 h, *d* hMSC nach 24 h auf glatter Alginat-Oberfläche. *e* Alginat mit Quadraten, *f* hMSC nach 24 h, *g* hMSC nach 72 h. *h* hMSC nach 72 h auf glatter Alginat-Oberfläche. Maßstabsbalken:  $200 \mu\text{m}$ , Piktogramme: Orientierung der Struktur im jeweiligen Bild.

## Kultivierung von hMSCs auf strukturierten Alginat-Hydrogelen

Die hergestellten strukturierten Gerüststrukturen wurden zunächst bzgl. des zellulären Verhaltens von hMSCs untersucht. Als Gerüststrukturen wurden Alginat-Hydrogele verwendet, die entweder glatt (Abbildung 72 d, h), mit Kanälen (Abbildung 72 a-c) oder mit eingelassenen Quadraten (Abbildung 72 e-g) strukturiert waren. Nach Inokulation der Zellen konnte mittels der Lebendzell-Mikroskopie beobachtet werden, dass während des Beobachtungszeitraums von 5 h die Zellen auf den Alginaten mit Quadraten keine spezifische Reaktion bzgl. der Struktur zeigten. Die Ausrichtung der Zellen war hier unregelmäßig und ungerichtet. Ebenso war diese morphologische Reaktion bei den glatten Alginat-Oberflächen zu beobachten. Erfolgte die Kultivierung auf den Alginaten mit Kanal-artigen Strukturen, so konnte man in der Adhäsionsphase eine Korrelation von Morphologie und Struktur beobachten. Zellen, die in den Kanälen positioniert waren, nahmen teilweise eine rechteckige Morphologie an, da sie beidseitig von dem Alginat eingegrenzt wurden. Im weiteren Verlauf konnte eine Ausrichtung an der Kanalstruktur beobachtet werden, ebenso eine Migration entlang der Kanten. Es gilt zu erwähnen, dass es den Zellen auch möglich war, quer über die Strukturen sowohl zu adhären, als auch zu migrieren. Teilweise lösten sich die Zellen auf den Kanal-artigen Strukturen ab und aggregierten, was möglicherweise durch die extreme Streckung verursacht wurde.



**Abbildung 73: INTERAKTION VON hMSC MIT STRUKTURIERTEN BIOFUNKTIONALISIERTEN ALGINAT-OBERFLÄCHEN.**

*a* Zeigt die Ausgangssituation von Struktur und Zellen zu Beginn der Bildsequenz. Die schwarze gestrichelte Linie markiert den Bereich eines Kanals im Ursprungszustand. *b* Die Zelle (\*) migriert über die erhabene Kanalwand und kontaktiert in *c* erstmals die benachbarte Kanalwand mit ihrer Zellmembran. (schwarze Pfeilspitze). Im weiteren Verlauf erkennt man, dass die Wand eindeutig von der Zelle herangezogen wird (weiße gestrichelte Linie, schwarze Pfeilspitze) und *d* das Hydrogel sich entsprechend verformt (weiße gestrichelte Linie, schwarze Pfeilspitze). Maßstabsbalken für alle Bilder: 50  $\mu\text{m}$

Ein interessanter Effekt konnte durch die Aufnahmen beobachtet werden: die Zellen, die mit den Kanalwänden durch Zell-Matrix-Kontakte interagierten, waren in die Lage, die Alginat-Oberfläche zu verformen, sei es durch Kompression aber auch durch Heranziehen (Abbildung 73 a-d).

Nach der Lebendzell-Mikroskopie wurden die Proben im Brutschrank weiter kultiviert und in bestimmten Abständen dokumentiert. Die Morphologie war nach 24 h und 72 h vergleichbar zu den Beobachtungen während der Lebendzell-Mikroskopie. Auf den glatten und mit Quadraten strukturierten Alginaten war die Morphologie nicht orientiert, wohingegen die proliferierenden Zellen auf den Kanal-artigen Strukturen weiterhin die Richtung der Strukturierung einnahmen. Hierbei sei erwähnt, dass mit steigender Zelldichte generell eine spindelförmige Ausrichtung beobachtet werden konnte und die Analyse erschwerte. Richtungsänderungen dieser Anordnung waren in den unstrukturierten Hydrogelen zu erkennen, wohingegen bei den strukturierten Hydrogelen diese nicht zu beobachten waren.

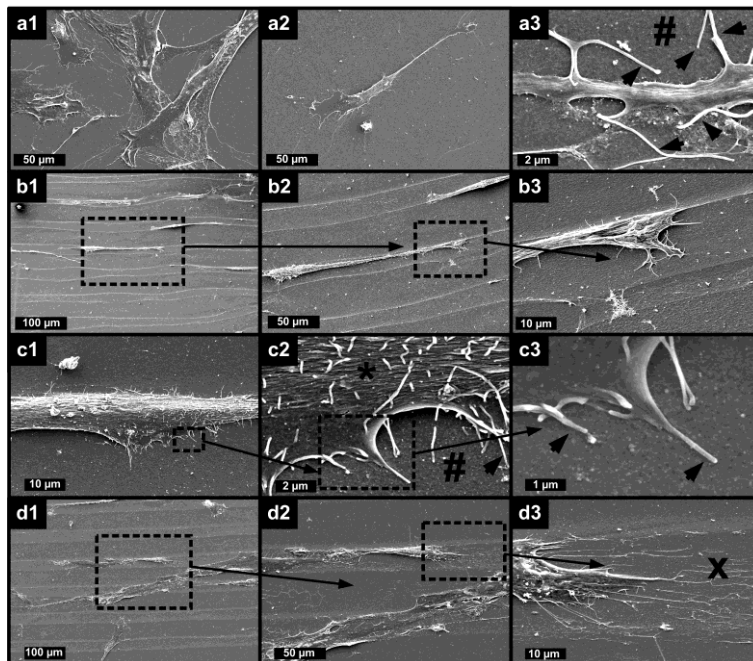
Die durchgeführten Experimente zeigten eine Reaktion von hMSCs auf Alginat-Strukturen, die in ihrer Dimension größer waren, als die Zellen selbst. Auf die kleiner dimensionierten Quadrate erfolgte keine Zellreaktion, wohingegen die Kanäle eine Manipulation der Zelladhäsion in Form der Ausrichtung im strukturierten Bereich erlaubten. Bei den glatten und mit Quadraten strukturierten Oberflächen war die Zellausrichtung eher isotrop, wohingegen bei den mit Kanälen strukturierten Oberflächen die Ausrichtung anisotrop war.

Diese Beobachtung konnte durch die Immunzytochemische Färbung des Zytoskelett (F-Aktin) weiter untermauert werden. Auf der glatten Alginat-Oberfläche, als auch auf der Alginat-Oberfläche mit Quadraten lag eine isotrope Anordnung des F-Aktins vor, wohingegen bei der Alginat-Oberfläche mit Kanälen eine anisotrope Ausrichtung dieses Strukturproteins zu beobachten war. Analysen der Zelladhäsion mittels REM lieferten, neben den schon durch die lichtmikroskopischen Aufnahmen beobachteten Zellverhalten, weitere Details über die Zell-Matrix-Interaktion (Abbildung 74). Die hMSCs interagierten sowohl auf der glatten, als auch auf der strukturierten Alginat-Oberfläche über Filopodien direkt mit der funktionalisierten Alginat-Oberfläche (Abbildung 74 a und c). Eine Ausrichtung der Zellen entlang der Kanalstruktur erfolgte insbesondere an den Kanten, wobei diese durch die Präparation für die REM-Aufnahmen nur noch sehr flach vorhanden waren (Abbildung 74 b und d). Ebenso lagen Zellspuren, d. h. nano-skalige Membranreste, auf der Oberfläche vor (Abbildung 74 d3).

Die Untersuchungen mit den hMSCs haben letztendlich gezeigt, dass eine Strukturierung, sowie Funktionalisierung von Alginat-Hydrogelen mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden möglich war und eine zelluläre Reaktion auf die Strukturen erfolgte. Für eine Anwendung dieser Gerüststruktur im Kontext des *Tissue Engineering* sollte, aufbauend auf diesen Ergebnissen, das Verhalten eines komplexeren Zellsystems untersucht werden, das durch eine derartige Gerüststruktur weitere funktionale Eigenschaften des *in-vivo*-Gewebes erhalten soll.

### hiPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten auf strukturierten Gerüststrukturen aus Alginat

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kultivierung von hiPSC-abgeleiteter Kardiomyozyten (hiPSC-CM) auf biofunktionalisierten Gerüststrukturen aus Alginat möglich war und eine plastischere Kontraktion hervorgerufen hat. Die Adhäsion und Anordnung der Kardiomyozyten war hierbei nicht gerichtet. Die in-vivo-Situation zeigt, dass die Zellen im Gewebeverbund linear orientiert angeordnet sind, um die biologische Funktion zu erfüllen. Hiervon ausgehend, wurde die schon bei den hMSCs beschriebene Kanal-artige Struktur auf Alginate übertragen, um diese Eigenschaften abzubilden. Die hiPSC-CM adhärirten nach Inokulation auf den Alginat-Oberflächen und zeigten nach 24 h Kontraktionen. In den Experimenten wurden strukturierte (Kanäle, Abbildung 75 b) und unstrukturierte Alginat-Oberflächen (Abbildung 75 a), die mit Matrigel funktionalisiert wurden, miteinander verglichen. Bzgl. Ausrichtung der hiPSC-CM konnte beobachtet werden, dass Zellen sowohl spindelförmig, als auch ausgebreitet entlang der Kanalstruktur adhärirten (Abbildung 75 b, ab 72h).



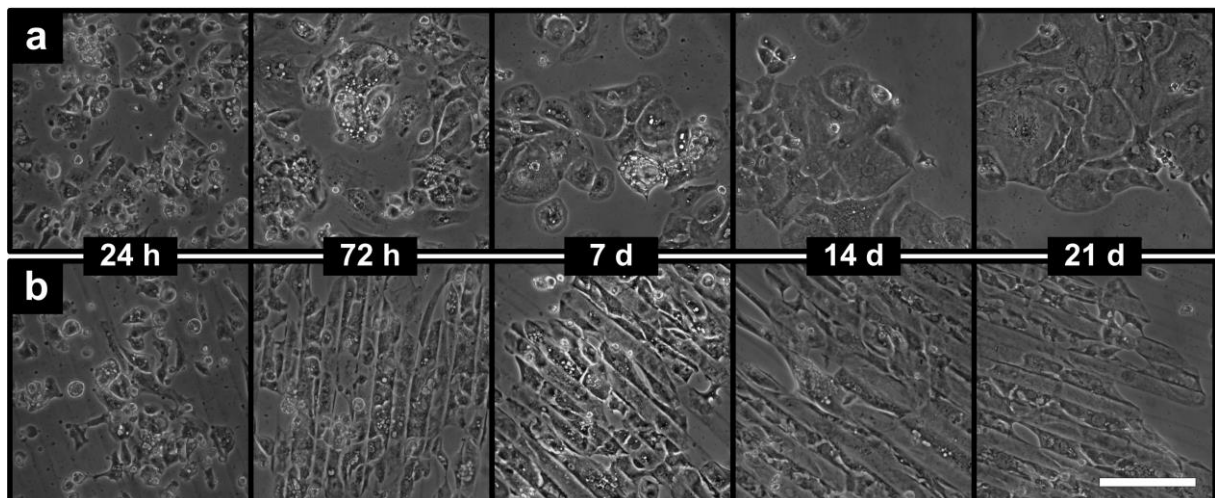
**Abbildung 74:** hMSCs AUF ALGINAT-GERÜSTSTRUKTUREN, MODIFIZIERT MIT TYRAMIN UND MATRIGEL NACH 24 H AUFGENOMMEN MIT REM.

*a* hMSCs auf glatten Alginat-Oberflächen.

*b* hMSCs auf strukturierten Alginat-Oberflächen.

*c* Detailaufnahmen der Zell-Matrix Interaktion auf strukturierten Alginat-Oberflächen.

*d* Detail Aufnahme Zellspuren von hMSCs auf Alginat-Oberflächen. Annotationen: Pfeilspitzen: Zell-Matrix Interaktion über Filopodien, #: Alginat-Matrix, \*: Zelle, x: Zellspuren, gestrichelte Quadrate markieren vergrößerte Ausschnitte im jeweils folgenden Bild. Maßstabsbalken: jeweils in den Bildern annotiert.



**Abbildung 75:** hiPSC-ABGELEITETE KARDIOMYOZYTEN AUF STRUKTURIERTEN, BIOFUNKTIONALISIERTEN ALGINAT-GERÜSTSTRUKTUREN.

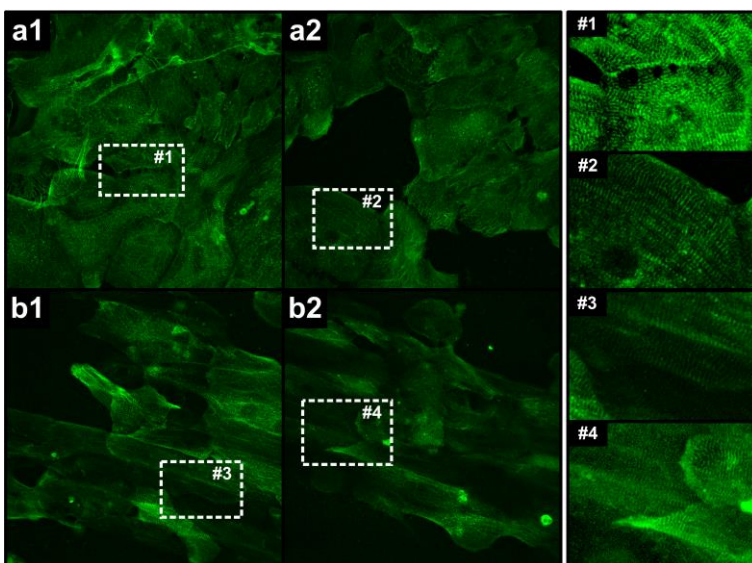
*a* Glatte Alginat-Oberfläche mit hiPSC-CM zu unterschiedlichen Zeitpunkten. *b* Glatte Alginat-Oberfläche mit hiPSC-CM zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Maßstabsbalken: 200 µm.

Die Zellen waren insbesondere an den Kanten positioniert. Adhärerte eine Zelle über mehrere Strukturelemente, so war deutlich die Kante im Bereich der Zellmembran erkennbar. Ferner war auch bei höherer Zelldichte keine perfekte Ausrichtung einzelner Zellen in Bezug auf die Struktur zu beobachten. Dennoch war eine Strukturierung der Zellfläche als Gesamtheit deutlich zu beobachten (Abbildung 75 b, ab 72h). Eine vollkommen isotrope Ausrichtung der Zellen wurde auf den glatten Alginat-Oberflächen beobachtet (Abbildung 75 a).

Die Kontraktion der Zellen schien primär von der Struktur nicht beeinflusst zu werden. Zwar existierten Zellen auf der Oberfläche, die in einem Kanal mit dem Strukturverlauf kontrahierten, ein genereller Trend konnte aufgrund der erhobenen Daten nach einer Kultivierungsdauer von 72 h jedoch nicht abgeleitet werden. Nach 72 h wurde eine Schlagfrequenz von  $32 \pm 12 \text{ min}^{-1}$  der hiPSC-CM auf den glatten Alginat-Oberflächen, sowie eine Schlagfrequenz von  $24 \pm 10 \text{ min}^{-1}$  gemessen. Somit war die Schlagfrequenz von beiden Ansätzen vergleichbar.

Nach sieben Tagen Kultivierung auf den Oberflächen konnten keine wesentlichen Veränderungen festgestellt werden. Die Kontraktion zeigte an einigen Stellen eine Korrelation mit der Orientierung der Struktur, war jedoch für eine Verallgemeinerung nicht eindeutig genug. Die Kontraktion lag weiterhin in einem Bereich, vergleichbar mit der Messung nach 72 h (Glattes Hydrogel:  $34 \pm 12 \text{ min}^{-1}$ , strukturiertes Hydrogel:  $27 \pm 13 \text{ min}^{-1}$ ). Im Laufe der Kultivierungsdauer blieben diese Frequenzen in einem vergleichbaren Bereich, wenn auch eine leichte Erhöhung der Schlagfrequenz gemessen wurde. Nach 21 Tagen wurden die Experimente beendet und es konnte dabei eine Schlagfrequenz von  $37 \pm 15 \text{ min}^{-1}$  auf den glatten Alginat-Oberflächen und von  $33 \pm 16 \text{ min}^{-1}$  gemessen werden. Die Strukturierung war bis zu diesem Zeitpunkt stabil, trotz der mechanischen Beanspruchung, die durch die Kontraktion auf die GS wirkten.

Der Immunfluoreszenz-Nachweis von  $\alpha$ -Aktinin in den Kardiomyozyten konnte nach 21 Tagen erbracht werden. Es konnte dadurch die Arbeitshypothese bestätigt werden, dass sich die Art der Topographie neben der Kontraktion, auch auf die Strukturproteine der Zellen auswirkt. Bei den glatten Alginat-Oberflächen lag  $\alpha$ -Aktinin isotrop vor (Abbildung 76 a), während auf den strukturierten Alginaten mit Kanälen die Anordnung tendenziell anisotrop war (Abbildung 76 b). Die Anisotropie äußerte sich in einem orthogonal zu den Kanälen angeordneten Bandenmuster. Somit rief eine Strukturierung von Alginat-Hydrogelen mit Kanälen eine Modifikation der Zelladhäsion hervor, die sich auf die Kontraktion auswirkte und letztendlich zu einer anisotropen Anordnung von intrazellulären Strukturproteinen führte. Isotrope Bereiche des  $\alpha$ -Aktinins wurden insbesondere dann beobachtet, wenn die Kardiomyozyten orthogonal zur Kanalstruktur adhärerten.



**Abbildung 76: IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON KARDIOMYOZYTEN (CM) AUF ALGINAT-GERÜSTSTRUKTUREN.**  
*a* CM auf glatter Alginat-Oberfläche nach 21 Tagen Kultivierung.  
*b* CM auf strukturierte Alginat-Oberfläche mit Kanälen nach 21 Tagen Kultivierung. #1 bis #4: Detailaufnahme der in *a* und *b* markierten Bereiche mit nachträglicher Kontrastierung zur Hervorhebung der Details.



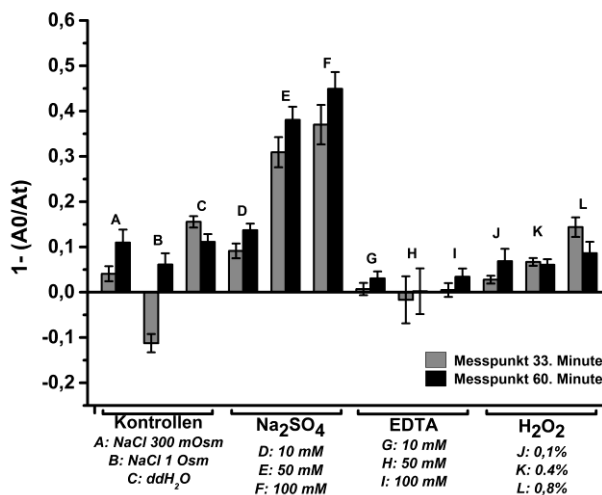
#### 4.4 Untersuchungen zu Reversibilität und Abbau von Gerüststrukturen

*Hinweis: Teile dieses Kapitels sind Bestandteil eines Manuskript in der Einreichungsphase [325].*

In diesem Abschnitt werden Destruktionsmechanismen von Alginat-basierten Gerüststrukturen untersucht. Für die Degradierung sollten zwei Ansätze untersucht werden, die destruktiv mit dem Alginat wechselwirken: ein chemischer Ansatz, der die multivalenten Kationen wieder aus dem Alginat entfernt, sowie ein enzymatischer Ansatz, bei dem eine Alginat-spezifische Lyase die Polymere spezifisch schneidet. Bei der AlgL muss geklärt werden, ob die Polymere des vorliegenden Alginats als Substrat für die Katalyse der Reaktion geeignet sind, da sich Enzyme durch ihre hohe Substratspezifität auszeichnen. Ferner soll geklärt werden, ob die Aktivität auf das flüssige Alginat begrenzt ist, oder auch vernetzte Hydrogele damit degradiert werden können.

##### 4.4.1 Chemische und enzymatische Destruktion von sphärischen Gerüststrukturen aus UHV-Alginaten

Die Destruktion von Alginat-basierten Gerüststrukturen wurde zunächst mit Stoffen untersucht, die chemisch auf vernetzte Alginat einwirken können. Alginatkugeln wurden zusammen mit Lösungen von Natriumchlorid unterschiedlicher Osmolarität (300 mOsm und 1 Osm), deionisiertem Wasser, unterschiedlichen Konzentrationen an Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) inkubiert und das Degradierungsverhalten mikroskopisch dokumentiert. Bei den gewählten Lösungen zeigte sich dies insbesondere durch ein Anschwellen bzw. Schrumpfen der Alginatkugeln. Bei der isotonen NaCl-Lösung (300 mOsm) war nur ein geringfügiges Anschwellen der Alginatkugeln zu beobachten (etwa 5%), wohingegen bei der hypertonen NaCl-Lösung (1 Osm) ein Schrumpfen um etwa 10% erfolgte. Bei der Inkubation der Kugeln in einer hypotonen Lösung (deionisiertes Wasser) schwollen die Kugeln um etwa 15% an. Diese Werte bestätigten die Annahme, dass die Alginatkugeln osmotisch aktiv sind und von einer semipermeablen Membran ausgegangen werden kann.

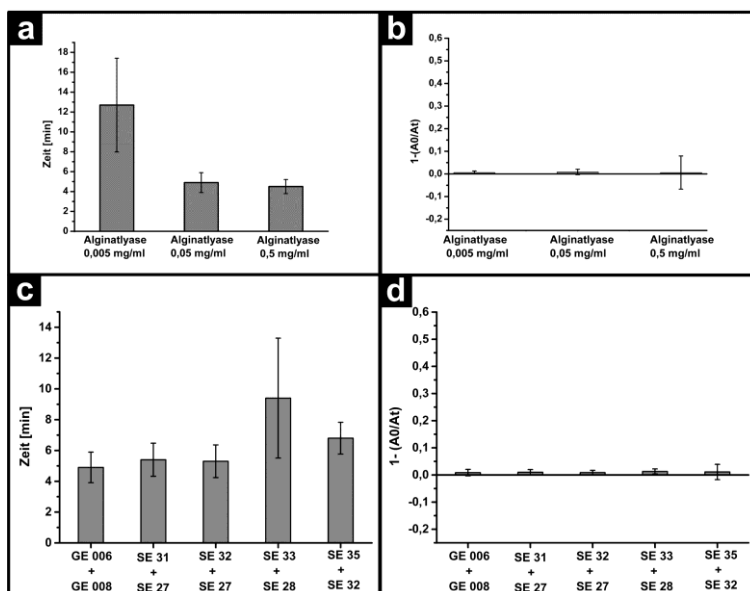


**Abbildung 77: VERGLEICH DES EINFLUSSES VERSCHIEDENER CHEMISCHER SUBSTANZEN AUF ALGINATKUGELN BZGL. DES SCHWELLVERHALTENS.**  
Gezeigt sind auf die Anfangsgröße normierte Flächenwerte als Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=10$  Kugeln nach 33 min (vor Zugabe 300 mOsmol NaCl) und nach 60 min.

Um die Stabilität der Alginatkugeln weiter zu untersuchen, wurden die Kugeln mit Substanzen inkubiert, die mit dem Hydrogel destruktiv interagieren können. Bei den Alginatkugeln, die mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , und  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert wurden, konnte über die Beobachtungsdauer von 33 bzw. 60 min eine Veränderung der Kugelgröße beobachtet werden. Die Vermessung der (zweidimensionalen) Größe der Fläche abstrahierte hierbei die (dreidimensionalen) Größe des Volumens und implizierte dadurch ein Anschwellen der Alginatkugeln durch die zugegebenen Lösungen. In EDTA schwollen die Kugeln minimal an. Die Kugeln verändern dabei unabhängig von der applizierten EDTA-Konzentration ihre Fläche um weniger als 10%. Ein mäßiges Anschwellen konnte bei der Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beobachtet werden. Die Fläche der Kugeln vergrößerte

sich bei dieser Substanz in Abhängigkeit der Konzentration um bis zu 10% bevor die NaCl Lösung hinzugegeben wurde. Die höchste Änderung des Volumens konnte bei der Zugabe von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  beobachtet werden. Die Fläche der Kugeln vergrößerte sich um etwa 40% vor NaCl-Zugabe. Bei den untersuchten Kontroll-Lösungen war ein Anschwellen der Kugeln in  $\text{ddH}_2\text{O}$  (etwa 15%) und bei NaCl (etwa 5%) zu beobachten. Bei einer NaCl-Lösung von 1 Osm schrumpften die Kugeln um etwa 10%. Bei allen untersuchten Lösungen waren die Kugeln nach der Inkubation intakt und makroskopisch nicht degradiert. Ebenso zeigte der Vergleich der beiden Chelatbildner  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und EDTA, dass eine größere Wirkung von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  auf vernetzte Alginat-Hydrogele ausging. Abbildung 77 zeigt das Schwellverhalten der Alginatkugeln nach 33 min bzw. 60 min nach Inkubation mit den genannten Substanzen, jeweils normiert auf die Fläche zu Beginn des Experiments. Der Messpunkt bei 33 min zeigt dabei den Einfluss der Substanz vor der Zugabe und der Messpunkt 60 min nach der Zugabe einer isotone NaCl-Lösung. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Degradierung der Alginatkugeln mit diesen Substanzen bei den untersuchten Konditionen nicht möglich war, da die Kugeln nach dem Schwellen weiterhin intakt waren.

Aus diesem Grund wurden die Kugeln zusätzlich mit einem Alginat-spezifischen Enzym inkubiert, das die Spaltung von Alginatpolysacchariden katalysiert, der Alginatlyase (AlgL). Abbildung 78 zeigt den Einfluss einer kommerziell erhältlichen AlgL, die in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Alginatkugeln gegeben wurde. Im Gegensatz zu den im vorherigen Abschnitt beschriebenen Substanzen, war bei der AlgL eine Beobachtung der Alginatkugeln nicht über den angestrebten Zeitraum von einer Stunde möglich, da die Degradierung auch bei geringer Enzymkonzentration weniger als 20 min benötigte (Abbildung 78 a). Aufgrund dieser Tatsache wurde bei der AlgL in Abhängigkeit der Konzentration der letzte Zeitpunkt quantifiziert, bei dem eine intakte Alginatkugel vorlag. Bei einer Konzentration der AlgL von 0,005 mg/ml liegt dieser bei 12,7 min ( $\pm 4,7$  min), bei 0,05 mg/ml bei 4,9 min ( $\pm 1,0$  min) und bei 0,5 mg/ml bei 4,5 min ( $\pm 0,7$ ). Die Degradierung von Alginat-Hydrogelen konnte gemäß diesen Ergebnissen zeitlich durch die Enzymkonzentration gesteuert werden, wobei das Limit bei etwa 5 min lag. Betrachtete man ferner die Fläche der Alginatkugeln zu diesem Zeitpunkt, so gilt festzuhalten, dass ein Schwellen bzw. Schrumpfen nicht zu verzeichnen war, und die Gerüststruktur somit sehr schnell und ohne osmotische Effekte degradiert werden konnte (Abbildung 78 b).



**Abbildung 78: DEGRADIERUNG VON ALGINATKUGELN MIT ALGINATLYASE.**  
**a** Maximale Zeitpunkte, an denen die Alginatkugeln noch vollständig intakt sind.

**b** Normierte Flächenwerte der Kugelflächen zum letzten Zeitpunkt vor vollständiger Degradierung in Bezug zur Anfangsgröße.

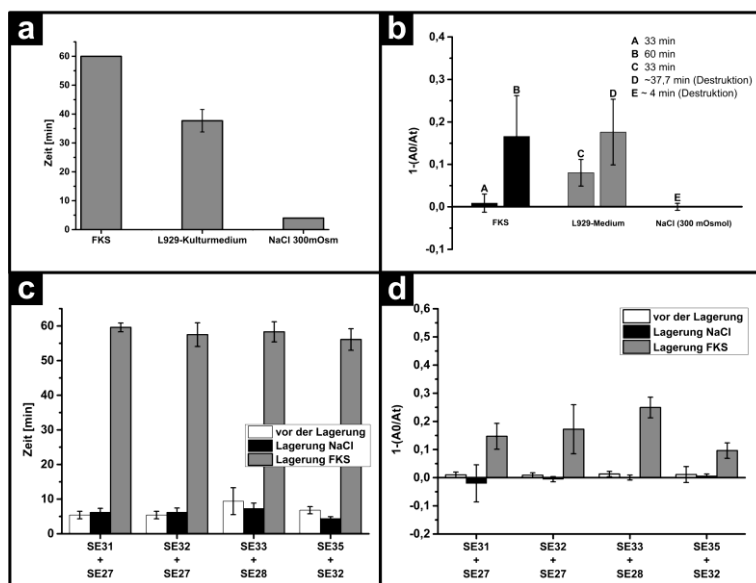
**c** Maximale Zeitspanne intakter Kugeln verschiedener Alginatchargen bei Inkubation mit 0,05 mg/ml Alginatlyase.

**d** Normierte Flächenwerte der Kugelflächen zum letzten Zeitpunkt vor vollständiger Degradierung in Bezug zur Anfangsgröße von den in **a** aufgeführten Zeitpunkten Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=10$  Kugeln.

Bei detaillierter Analyse unterschiedlicher Alginatchargen zeigten sich Differenzen in der Widerstandsfähigkeit. Abbildung 78 c zeigt die Widerstandsfähigkeit mehrerer Alginatmischungen nach Behandlung mit 0,05 mg/ml AlgL. Die Dauer bis zur Degradierung der Alginat aus den Mischungen betrug bei GE006 + GE 008 4,9 ( $\pm 1,0$ ) min, bei SE31 + SE27 5,4 ( $\pm 1,1$ ) min und SE32 + SE27 5,3 ( $\pm 1,1$ ) min). Im Gegensatz hierzu zeigten Kugeln aus den Chargen SE33+SE28 (9,4  $\pm$  3,9 min) und SE35 + SE32

( $6,8 \pm 1,0$  min) eine höhere Widerstandsfähigkeit gegenüber der AlgL, was sich in einer verlängerten Zeitspanne bis zur Destruktion widerspiegelte (Abbildung 78 c). Bei allen Mischungen konnte kein osmotisches Anschwellen bzw. Schrumpfen kurz vor der Destruktion beobachtet werden (Abbildung 78 d). Die Destruktion der Alginatkugeln lief somit unabhängig von der verwendeten Alginatcharge ähnlich ab, lediglich die zeitliche Verzögerung bis zur Destruktion fiel je nach Chargenmischung unterschiedlich aus.

Da bei zellbiologischen Experimenten in der Regel komplexe Medien mit gewissem Proteinanteil genutzt werden, wurde die Widerstandsfähigkeit ebenso in solchen Medien gemessen. Die Kugeln wurden hierfür in den entsprechenden Medien über mehrere Wochen inkubiert. Abbildung 79 a zeigt die Widerstandsfähigkeit von Alginatkugeln in einem Medium, bestehend aus 100% fetalem Kälberserum (FKS), DMEM mit 10% FKS (L929-Kulturmedium) und isotoner Kochsalzlösung. Bei Kugeln, die in 100% FKS inkubiert wurden, dauerte die Zeit bis zu Destruktion 60,0 min ( $\pm 0,0$  min), in L929-Kulturmedium 37,7 min ( $\pm 3,9$  min) und 4,0 min ( $\pm 0,0$  min), wenn die Kugeln in isotoner NaCl-Lösung inkubiert wurden. Aufgrund der zeitlichen Auflösung ergaben sich bei den Kugeln in 100% FKS und isotoner NaCl-Lösung Standardabweichungen von  $\pm 0,0$  min. Das Schwellverhalten der inkubierten Kugeln während der Behandlung mit AlgL war bei der Vorinkubation in FKS ( $0,01 \pm 0,02$ ), L929-Kulturmedium ( $0,08 \pm 0,03$ ) und NaCl ( $0,00 \pm 0,01$ ) zu vernachlässigen. Erst nach Austausch der AlgL-Lösung durch isotoner Kochsalzlösung konnte ein geringes Anschwellen von 20% der Ausgangsgröße beobachtet werden. Demnach schwollen die in 100% FKS vorinkubierten Kugeln um einen Faktor von  $0,17 (\pm 0,010)$  und die in 10% FKS inkubierten Kugeln um den Faktor  $0,18 (\pm 0,08)$  an. Generell ließ sich hieraus schließen, dass eine Vorinkubation in proteinhaltigem Medium Einfluss entweder auf die Aktivität der AlgL, oder das Schwellverhalten hatte. Abbildung 79 b illustriert das Schwellverhalten der Kugeln nach 33 min bzw. 60 min, sofern noch intakte Kugeln zur Vermessung vorhanden waren.



**Abbildung 79: STABILITÄT VORINKUBIERTER ALGINATKUGELN UNTER DEM EINFLUSS VON 0,05 MG/ML ALGINATLYASE.**

**a** Mittelwerte der Zeitpunkte bis zu denen die Kugeln vollständig intakt waren. Sowohl bei FKS, als auch bei 300 mOsmol NaCl konnte zum gleichen Zeitpunkt die beginnende Degeneration gemessen werden, wodurch die SD bei Null liegt. **b** Flächenveränderung der Kugeln bei Inkubation mit Alginatlyase. Bei Destruktion ist dies der Zeitpunkt, bei dem die Kugel noch intakt war. Zudem wurde, wenn möglich, die Flächenzunahme in der 33 Minute aufgeführt. **c** Zeitpunkt der Degradierung von Kugeln mit unterschiedlichen Alginatchargen nach Lagerung in NaCl bzw. FKS. **d** Normierte Flächenwerte zum Zeitpunkt der Degradierung mit und ohne Lagerung. Die Kugeln in c und d wurden über 4 Wochen in den Lösungen inkubiert. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von  $n=10$  Kugeln.

Die Inkubation der Kugeln mit 100% FKS zeigte bei den vorangegangenen Experimenten den größten Einfluss. Die Inkubation wurde daher über vier Wochen mit Kugeln aus mehreren Alginatmischungen durchgeführt und die Widerstandsfähigkeit ebenso getestet. Abbildung 79 c illustriert die Widerstandsfähigkeit der Kugeln nach einer Inkubation über diesen Zeitraum, im Vergleich zu Alginatkugeln, die lediglich in (proteinfreier) isotoner NaCl-Lösung gelagert wurden, jeweils vor und nach der Lagerung. Die zuvor gemachten Beobachtungen konnten sich durch diese Experimente bestätigen und zeigten die Unabhängigkeit von der jeweils genutzten Alginatkomposition. Die Degradierung der Alginatkugeln, die in isotoner Kochsalzlösung inkubiert wurden, erfolgte sehr schnell und war mit der Zeit ohne Lagerung ver-

gleichbar. Die Widerstandsfähigkeit stieg, wenn die Kugeln in proteinhaltiger Lösung inkubiert wurden. Die gemessenen Zeitpunkte (Abbildung 79 c) der beginnenden Destruktion der Alginatkugeln, als auch die Veränderung der Fläche bis zum Zeitpunkt der Destruktion (Abbildung 79 d) ließen den Schluss zu, dass die Destruktion der Alginatkugeln von der Alginatcharge unabhängig war und durch Verlängerung der Inkubationszeit in AlgL auch nach der Inkubation in FKS erfolgen konnte.

Durch die AlgL war der strukturbildende Prozess der Hydrogelbildung reversibel, erfolgte jedoch ohne FKS-Inkubation so schnell, dass eine Untersuchung mittels der Phasenkontrastmikroskopie zwar möglich, dies jedoch die Nutzung von z. B. Hochgeschwindigkeitskameras erfordern würde und mit einer zeitintensiven Bildauswertung verbunden war. Durch Effekte wie z. B. Kontrastverlust während der Destruktion erscheint eine rein Bild-basierte Analyse schwierig. Weitere Analysen sollen daher mittels der UV/vis Spektroskopie durchgeführt werden, die mit einer höheren Rate Messwerte aufnehmen kann.

#### 4.4.2 Enzymatische Destruktion von UHV Na-Alginaten

Mittels der UV/vis Spektroskopie wurde die Aktivität der AlgL weiter untersucht. Es wurde hierbei die Produktbildungsrate (PBR) unter der Verwendung von Alginaten aus *Lessonia trabeculata* und *Lessonia nigrescens* quantifiziert. Die enzymatische Reaktion führt durch die sog.  $\beta$ -Elimination eine Doppelbindung bei einem Alginatfragment ein, dass bei einer Wellenlänge von 235 nm detektiert werden kann. Die PBR wird in diesen Experimenten als Zunahme der Absorbanz (bei 235 nm) über die Zeit definiert.

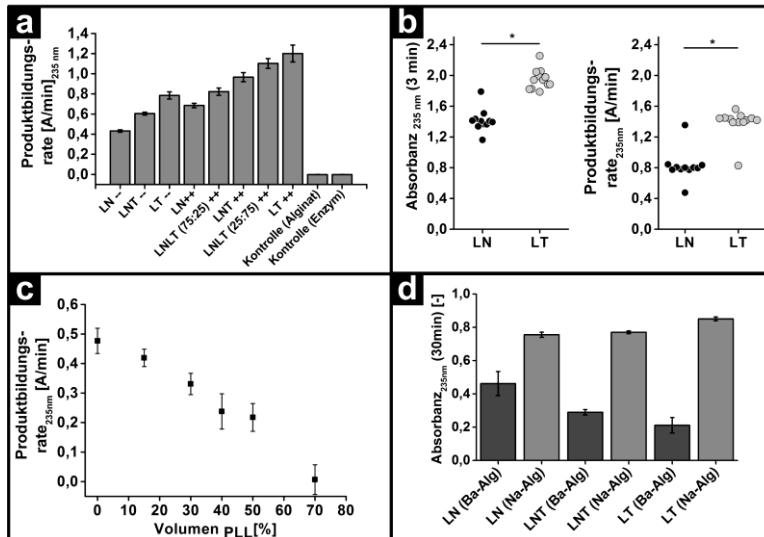
##### Alginatmischungen von Na-Alginaten

Die Na-Alginat wurden zunächst in verschiedenen Mischungen vorbereitet und die PBR in An- und Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  untersucht. Die Arbeitshypothese bestand darin, dass eine unterschiedliche chemische Zusammensetzung der Na-Alginatlösung durch die Enzymspezifität abgebildet werden kann. Abbildung 80 a zeigt die PBR von Na-Alginaten aus LN 100, LT/LN 50/50, 25/75, 75/25 und LT 100 (Angaben jeweils Volumenprozent) in Anwesenheit  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ .

Zusätzlich wurden für die Mischungen LN, LNT (50%:50%) und LT die PBR ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  bestimmt. Die PBR von LT war hierbei am größten ( $0,78 \text{ A/min} \pm 0,03$ ) und bei LN am niedrigsten ( $0,43 \text{ A/min} \pm 0,01$ ). Die PBR von LNT (1:1 Mischung) lag mit  $0,6 \text{ A/min} \pm 0,01$  zwischen diesen Werten.

Vergleichbare PBRs konnten bei den untersuchten Alginatmischungen in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  gemessen werden. Die PBR sank bei Erhöhung des volumenmäßigen LN-Anteils der Alginatmischung:  $LT\ 100 > LT/LN\ 75/25 > LT/LN\ 50/50 > LT/LN\ 25/75 > LN\ 100$ . Die Werte stiegen in Abhängigkeit mit der LT-Konzentration linear an ( $R^2 = 0,9976$ ,  $y = 0,67 + 0,00545 \cdot x$ ). Im Vergleich zu den Ansätzen ohne  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  war eine Zunahme der PBR von 58% (LN), 53% (LT) und 60% (LNT) zu verzeichnen.

Hieraus konnte gefolgert werden, dass die genutzte Lyase Alginat aus LT schneller degradiert als Alginat aus LN. Ebenso konnte die Degradierung durch Zugabe von  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  beschleunigt werden. Abbildung 80 b zeigt sowohl die PBR, als auch die absolute Absorbanz nach 3 min der Reaktion bei 235 nm bei unterschiedlichen Na-Alginatchargen. Na-Alginat aus LN wurden demnach weniger bzw. langsamer degradiert als Na-Alginat aus LT. Die mittlere PBR lag bei  $0,8 \pm 0,2 \text{ A/min}$  und bei LT bei  $1,38 \pm 0,18 \text{ A/min}$ . Vergleichbare Unterschiede konnten auch bei der absoluten Absorbanz nach 3 min festgestellt werden. Demnach konnten die zwei unterschiedlichen Alginat Spezies-spezifisch in zwei Klassen bzgl. der Degradierbarkeit eingeteilt werden.



#### Abbildung 80: ALGINATLYASE – QUANTIFIZIERUNG.

**a** Produktbildungsrate (PBR) in Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Höhere PBR können bei allen Proben festgestellt werden, wenn  $\text{Ca}^{2+}$  im Reaktionsansatz vorhanden ist. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n=3$  Reaktionen. **b** PBR Alginat Lyase LN und LT. Die PBR bei den Na-Alginaten LN und LT zeigt eine höhere PBR bei LT im Vergleich zu LN sowohl in der Betrachtung der Rate [A/min] als auch bei der absoluten Absorbanz nach 3 min. **c** PBR bei Anwesenheit der interagierenden Substanz poly-L-Lysin (pLL). Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n=3$  Reaktionen. **d** Vergleich Degradierung Na-Alginat und Ba-Alginat anhand der absoluten Absorbanz bei 235 nm nach 3 min Reaktionsdauer. Alginatmischungen (vol%) LN (100%), LNT (50%/50%), und LT (100%). Abkürzungen: Na-Alg: unvernetztes Alginat, Ba-Alg: vernetztes Alginat. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SD,  $n=3$ . Abbildung aus [325], abgeändert.

#### Abhängigkeit von der Temperatur

Ein weiteres Kriterium für die Destruktion von Alginat-Gerüststrukturen war die Durchführung bei zellverträglichen Temperaturen. Diese liegen im optimalen Fall bei 37°C. Die Aktivität nahm mit steigender Temperatur zu, wobei ein Zusammenhang gemäß der Arrhenius-Gleichung (Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von der Temperatur) nicht bestätigt werden konnte. Ein Aktivitätsmaximum war bei 40°C zu beobachten, was jedoch für zellbiologische Anwendungen im Allgemeinen eine zu hohe Temperatur darstellt. Bei höheren Temperaturen nahm die Aktivität wieder ab, was wahrscheinlich mit der Denaturierung des Enzyms zusammenhängt. Bei 37°C war die Enzymaktivität dennoch in ausreichendem Maß vorhanden und somit für zellbiologische Anwendungen unter physiologischen Bedingungen nutzbar.

#### Einfluss interagierender Substanzen

Die Änderung der AlgL-Aktivität in Anwesenheit interagierender Substanzen ist in Abbildung 80 c dargestellt. Die zu dem Reaktionsansatz hinzugefügte Substanz war poly-L-Lysin, von dem bekannt ist, dass es elektrostatisch mit Alginaten interagieren kann. Die Daten zeigten, dass mit steigender pLL-Konzentration die Enzymaktivität sank. Bei einem Reaktionsansatz ohne Zugabe von pLL konnte eine PBR von  $0,47 \pm 0,04$  A/min gemessen werden, wohingegen bei einem Anteil von 40% pLL die PBR auf  $0,23 \pm 0,06$  A/min sank. Bei einem Anteil von 70% pLL ist noch eine PBR von  $0,007 \pm 0,05$  A/min feststellbar. Diese Ergebnisse gingen mit Beobachtungen einher, die bei Alginatkugeln gemacht wurden, die entweder mit pLL auf der Kulturschale fixiert, bzw. die mit Alzian-Blau, einem polykationischen Farbstoff für Polysaccharide, angefärbt wurden. Unter diesen Bedingungen blieb nach Inkubation eine dünne Hülle der äußeren Alginatkugel bestehen, die letztendlich nur durch mechanische Behandlung vollständig zerstört werden konnte. Aufgrund der elektrostatischen Interaktion war hier anzunehmen, dass das pLL eine zusätzliche Polymerschicht um das Alginat bildete und in der Folge das Enzym an diesen Stellen keine Wechselwirkung mit dem Substrat eingehen konnte.

#### 4.4.3 Enzymatische Destruktion von UHV Ba-Alginaten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Degradierbarkeit von UHV Na-Alginaten durch die AlgL möglich ist, soll mittels der UV/vis Spektroskopie auch die Degradierbarkeit durch die Bestimmung der PBR bei vernetzten Alginaten untersucht werden.

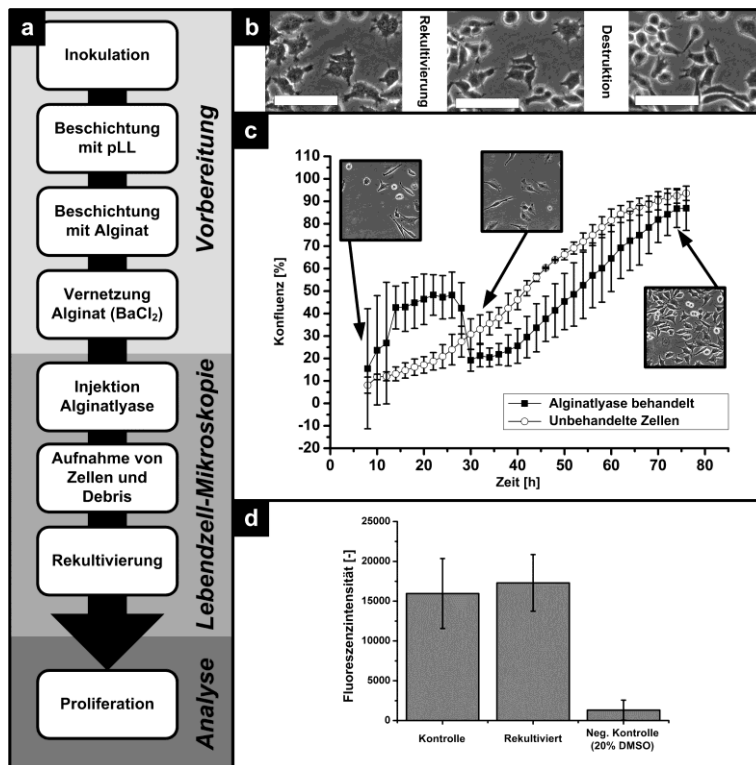
##### Vergleichende Untersuchung der Degradierung von Na-Alginat und Ba-Alginat

In einer vergleichenden Untersuchung wurden Na-Alginat, sowie die entsprechenden Ba-Alginat mit der AlgL behandelt und die PBR nach 30 min per UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Die Ergebnisse der zuvor dargestellten Experimente wurden bei Na-Alginat bestätigt. Na-LT zeigte nach 30 min die höchste Absorbanz, gefolgt von Na-LNT und schließlich Na-LN. Die vergleichsweise geringen Unterschiede bei der Absorbanz waren durch die Länge der Reaktionsdauer zu erklären. Nach etwas weniger als 3 min befand sich die Absorbanz und somit die Menge an gebildetem Produkt in einer stationären Phase. Vergleicht man Ba-Alginat und Na-Alginat bzgl. der Aktivität der AlgL, so stellte man fest, dass diese zum einen wesentlich geringer war und zum anderen bei Alginaten gleichen Typs inverse Aktivitäten besaßen (siehe Abbildung 80 d). Bei Ba-LN war die Absorbanz  $0,46 \pm 0,07$  A, bei Ba-LNT  $0,29 \pm 0,01$  A und  $0,21 \pm 0,04$  A bei Ba-LT. Im Gegensatz hierzu zeigten die Na-Alginat Absorbanzen von  $0,75 \pm 0,015$  A (Na-LN),  $0,77 \pm 0,008$  A (Na-LNT) und  $0,85 \pm 0,01$  A (Na-LT). Leitete man aus der Absorbanz die Enzymaktivität auf die Alginat ab, so galt für unvernetztes Na-Alginat: Na-LT > Na-LNT > Na-LN und für vernetztes Alginat die umgekehrte Reihenfolge Ba-LN > Ba-LNT > Ba-LT. Generell konnte aus den Daten gefolgert werden, dass die verwendete AlgL bei den Alginatspezies eine geeignete Aktivität sowohl im vernetzten als auch im unvernetzten Zustand aufwies.

##### Destruktion von Gerüststrukturen mit immobilisierten Fibroblasten

Anhand von adhärenz immobilisierten Fibroblasten wurde die Anwendbarkeit in der Zellkultur der erzielten Resultate des vorangegangenen Abschnitts untersucht. Die Fibroblasten wurden zunächst bis zur Adhärenz auf eine TCPS-Kulturschalen kultiviert und dann mit pLL beschichtet und mit Alginat immobilisiert. Während der Dauer des Experiments (vgl. auch Abbildung 81 a) wurden die Zellen mittels automatisierter Lebendzell-Mikroskopie beobachtet. Kulturmedium mit 2 mg/ml AlgL genutzt. Kurz nach der Zugabe der AlgL änderte sich die Morphologie der Fibroblasten und die Migration der Zellen auf der TCPS-Oberfläche setzte wieder ein. Dieses Verhalten, sowohl die Änderung der Morphologie, als auch die Migration (Abbildung 81 b) deuteten eindeutig auf die Destruktion der Gerüststruktur hin. Zur weiteren Überprüfung wurden die Zellen in ein neues Kulturgefäß überführt und die Adhäsion bzw. Proliferation weiter beobachtet. In den Proben, die zuvor mit AlgL behandelt wurden, zeigten sich zunächst noch Fragmente des Alginat-Hydrogels, die nicht vollständig von dem Enzym degradiert wurden. Nach 24 h Rekultivierung wurde daher ein Medienwechsel durchgeführt, um die Kultur weiter zu reinigen. Die Zellen wurden von diesem Waschschrift nicht beeinflusst, da sie nach der Rekultivierung wieder adhärenz auf der Kulturschale wachsen konnten. Vergleicht man den Verlauf der Konfluenz über die Zeit (Abbildung 81 c) so war der Verlauf bis auf einen Versatz der Werte nahezu identisch. Die sprunghafte Verringerung der Konfluenz bei den Proben nach Immobilisierung und Rückgewinnung kamen durch die Alginatfragmente bzw. deren Entfernung durch den Mediumwechsel zustande, da diese durch die Bildanalyse als biologischer Vordergrund erkannt wurden. Dies zeigt demnach, dass die Adhäsion der Zellen durch die Behandlung mit dem Enzym nicht beeinflusst wurde und eine Zurückgewinnung der Zellen aus dem immobilisierten Zustand durch diese Vorgehensweise für eine weitere biotechnologische Nutzung möglich war. Die Analyse der Proliferation der Zellen nach der Rekultivierung aus dem immobilisierten Zustand wurde anhand der metabolischen Aktivität untersucht. Die Analyse mittels des Alamar-Blue Tests zeigte dabei vergleichbare Werte (Abbildung 81 d) von nicht immobilisierten und immobilisierten Zellen, so dass auch auf ein ver-

gleichbares Proliferationsverhalten der Zellen mit diesem Ansatz der Rückgewinnung aus dem immobilisierten Zustand geschlossen werden konnte.



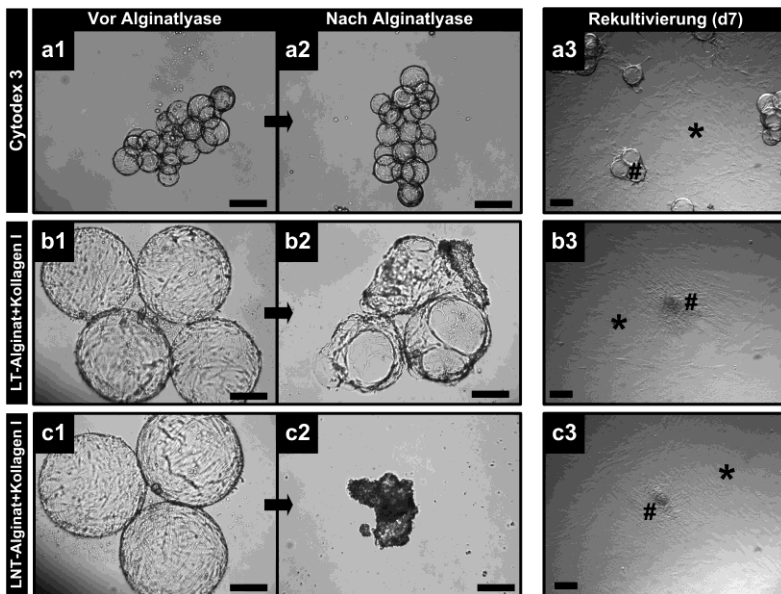
**Abbildung 81: Destraktion von Gerüststrukturen mit adhärennten Fibroblasten.**

**a** Ablauf des Experiments.  
**b** Zelluläres Verhalten im unmittelbaren zeitlichen Bereich der Deimmobilisierung und 5 h nach Degradierung der Alginatematrix.  
**c** Reaktivierung der Fibroblasten nach erfolgter Deimmobilisierung im Vergleich zu nicht immobilisierten Zellen. Analysiert wurde das Konfluenzverhalten mittels automatisierter Lebendzell-Mikroskopie.  
**d** Vergleichende Analyse der metabolischen Aktivität von Fibroblasten nach bzw. ohne Immobilisierung und Deimmobilisierung. Maßstabsbalken in **b**: 100 µm.

### Destraktion von Alginate-Mikroträgern mit adhärennten Zellen

Die enzymatische Degradierung von sphärischen Alginate-Gerüststrukturen, die mit hMSCs bewachsen waren, wurde nach den erfolgreichen Versuchen mit den Fibroblasten untersucht. Die Zellen wurden zunächst auf Mikroträgern Cytodex 3, Alginate (LT), sowie Alginate (LNT) kultiviert (Abbildung 82). Eine Herstellung von Alginate-Mikroträgern, die nur aus LN-Alginate bestehen, war nicht möglich, da diese sich während der Modifikation auflösten. Nachdem die Mikroträger (im hängenden Tropfen) mit der AlgL behandelt wurden, wurden die Proben mikroskopisch betrachtet. Die Cytodex 3-Mikroträger lagen nach der Behandlung unverändert intakt vor, da kein Substrat für das Enzym in den Mikroträgern verfügbar war (Abbildung 82 a). Bei den Alginate-Mikroträgern wurden zwei unterschiedliche Reaktionen beobachtet. Bei den LT-Alginate-basierten Mikroträgern entstanden nach der Inkubation zunächst partiell degradierte Mikroträger, von denen sich die Zellen ebenso partiell vom Mikroträger gelöst hatten (Abbildung 82 b). Bei den LNT-basierten Mikroträgern war nach der Inkubation mit AlgL eine vollständige Degradierung der Gerüststruktur zu erkennen, bei der sich die Zellen in einem zentralen Zellaggregat anordneten (Abbildung 82 c). Das Fehlen von Einzelzellen sprach für eine definierte Degradierung der Gerüststruktur, bei der Zell-Zell-Kontakte nicht beeinflusst wurden. Eine Aussaat der verschiedenen Mikroträger nach der Behandlung auf eine TCPS-Oberfläche zeigte eine steigende Zellzahl auf der Oberfläche, sowohl bei den intakten Cytodex 3, als auch bei den degradierten Alginate-Mikroträgern. Die Alginate-Mikroträger, bestehend aus LT, lösten sich im Laufe der Kultivierungsdauer weiter auf, so dass daraus geschlussfolgert werden konnte, dass die enzymatische Degradierung aufgrund des Substrats und damit einhergehend der stärkeren Vernetzung, zeitverzögert stattfand. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so kommt man zu dem Schluss, dass die enzymatische Degradierung des Alginats auch bei den chemisch modifizierten Mikroträgersystemen möglich war und die Gerüststrukturen auch *on-demand* abgeschaltet werden konnten. Die verzögerte Degradierung in Bezug auf die Alginatekomposition bestätigte ferner die Ergebnisse, die mittels der UV/vis Photospektroskopie erzielt wurden. Die vollständige Degradierung des Alginats konnte anhand

der Datengrundlage nicht bestätigt werden. Die Besiedelung einer planaren Oberfläche nach Degradierung war möglich, jedoch zeigten die Zellen auf den nicht degradierten Cytodex 3-Mikroträgern ein vergleichbares Verhalten, was somit zu der Schlussfolgerung führte, dass eine Degradierung nicht zwingend für die Reaktivierung notwendig war, aber z. B. für das gezielte Abschalten von Oberflächen biotechnologisch genutzt werden kann. Beispielsweise könnten mit dieser Methode Zellen zunächst adhären auf den Mikroträgern kultiviert werden und bei Bedarf diese degradiert werden um die Zellen als dreidimensionale Aggregate ohne Wachstumsfläche zu kultivieren.



**Abbildung 82: ANWENDUNG DER ALGINATLYASE IM „HÄNGENDEN TROPFEN MIT hMSCs AUF MIKROTRÄGERN.**

**a** Cytodex 3-Mikroträger vor (1) und nach Alginatlyase Behandlung im HD (2), sowie nach 7 Tagen Reaktivierung (3).

**b** Alginat-Mikroträger aus LT-Alginat mit Kollagen I vor (1) und nach Alginatlyase Behandlung im HD (2), sowie nach 7 Tagen Reaktivierung (3).

**c** Alginat-Mikroträger aus LNT-Alginat mit Kollagen I vor (1) und nach Alginatlyase Behandlung im HD (2), sowie nach 7 Tagen Reaktivierung (3). In Bild 3 sind die abgewanderten Zellen mit \* und die Mikroträger bzw. deren Reste mit # annotiert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen von zwei unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweils 8 Replikaten. Maßstab: 200µm

## 4.5 Untersuchungen zur Voraussetzung einer automatisierten Entwicklung von Gerüststrukturen

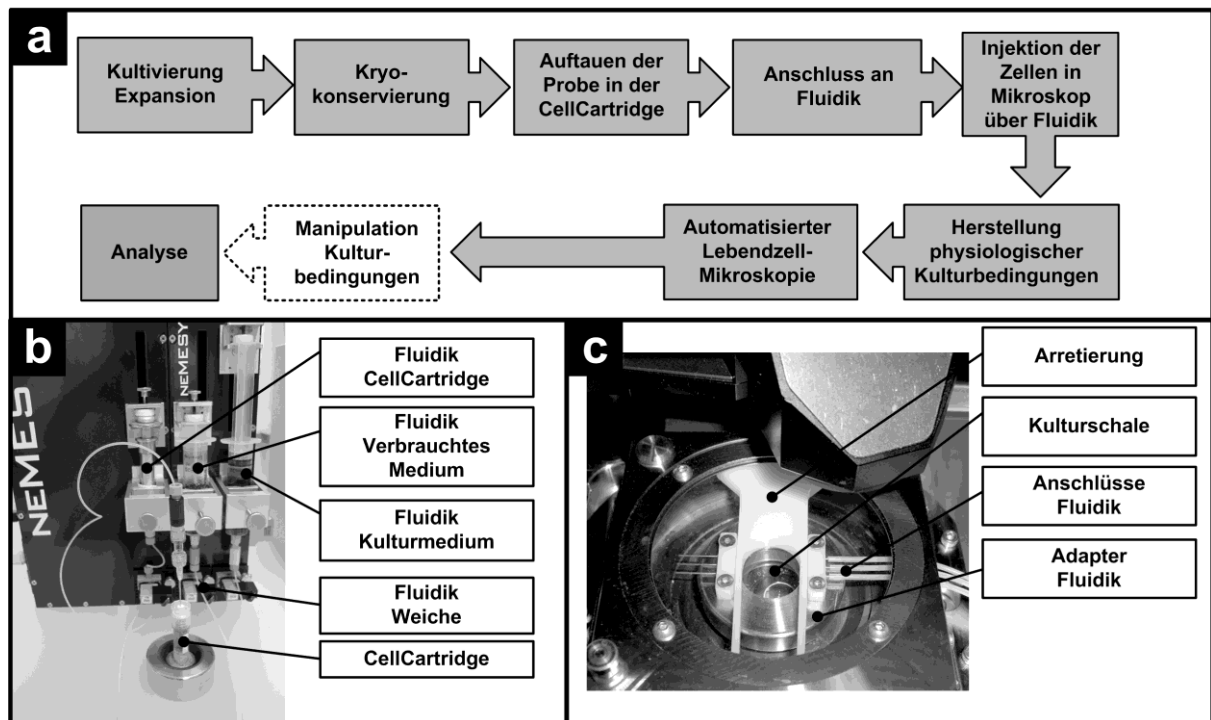
Der Abschnitt beinhaltet die Entwicklung von Prototypen für die Lebendzell-Mikroskopie, die zukünftig die Basis für eine automatisierte Entwicklung von Gerüststrukturen bilden könnte. Im ersten Teil wird ein neuartiger experimenteller Aufbau untersucht, der es erlaubt, kryokonservierte biologische Proben der automatisierten Lebendzell-Mikroskopie zugänglich zu machen. Im zweiten Teil werden ein neues Konzept und ein Prototyp vorgestellt, der in laufenden Lebendzell-Experimenten dem Nutzer Informationen über den Status der biologischen Probe übermitteln kann. Im dritten Teil wird die Entwicklung eines Beutelsystems untersucht, das für eine zukünftige (alternative), automatisierte Herstellung von Zellaggregaten, aber auch zur Untersuchung von Gerüststrukturen genutzt werden soll.

### 4.5.1 Entwicklung und Evaluation der Zellpatrone (CellCartridge) im Kontext der automatisierten Lebendzell-Mikroskopie

Die Idee hinter der sog. Zellpatrone (CellCartridge) beruht auf der Integration eines Substrates mit der Kryokonservierung und Anschluss an eine mikrofluidische Anlage. Basierend auf einem am IBMT entwickelten Kryosubstrat [327] wurden durch eine Modifikation des Schraubverschlusses die Anforderungen an eine mikrofluidische Weiterprozessierung kryokonservierter Proben nach dem Auftauen realisiert. Dabei wurde der Schraubverschluss des Kryogefäßes derart modifiziert, dass eine Art Septum für den Anschluss an eine Fluidik, beispielsweise durch eine Kanüle, zur Verfügung stand. Der abzubildende Workflow umfasste Kultivierung, Kryokonservierung, Auftauen, fluidischer Transfer, Kultivierung und Beobachtung



mittels Lebendzell-Mikroskopie (Abbildung 83 a). Die Umsetzung eines solchen Systems und der damit verbundenen Nutzung in Einrichtungen, die nur über eine limitierte zellbiologische Infrastruktur verfügen soll in diesem Teil untersucht werden.



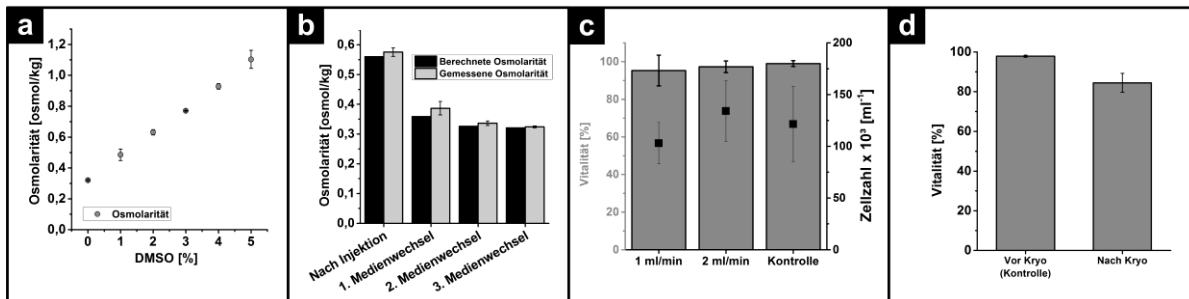
**Abbildung 83: ARBEITSABLAUF UND HARDWARE FÜR DIE AUTOMATISIERTE UNTERSUCHUNG VON ZELLSYSTEMEN.**  
*a* Workflow. Nach Expansion der Zellen erfolgt die Kryokonservierung bis zur Nutzung in der CellCartridge. Anordnung der Spritzenpumpe für Transport der Zellen und Medienwechsel. *b* Positionierung der CellCartridge in unmittelbarer Nähe der automatisierten Mikroskope. *c* Verbindung der Fluidik mit der Kulturschale in den automatisierten Mikroskopen.

Die biologischen Proben sollen nach Kryokonservierung und Auftauen über eine Fluidik in ein automatisiertes Mikroskop geleitet werden, um das zelluläre Verhalten analysieren zu können. Für die Umsetzung mussten zunächst grundlegende Untersuchungen durchgeführt werden, die insbesondere den fluidischen Transport bzw. den Austausch von Kryomedium durch Standardkulturmedium betrafen. Für die Realisierung des Transports von Medien und Zellen wurden steuerbare Spritzenpumpen (Abbildung 83 b) mit einem Adapter mit Verbindungsmöglichkeiten (Abbildung 83 c) implementiert. Der fluidische Adapter konnte auf eine Kulturschale mit einem Durchmesser von 35 mm gesetzt und in die Inkubationskammer (Abbildung 83 c) der automatisierten Mikroskope (Abbildung 8) eingesetzt werden. An den fluidischen Kreislauf wurde das entwickelte Kryosubstrat angeschlossen, mit dem die Zellen in das System eingebracht werden sollten.

**Charakterisierung des Systems**

Die Kryokonservierung von Zellen impliziert die Nutzung von Kryoprotektiva, die bei längerer Kontaktierung der Zellen toxische Effekte hervorrufen können. Die Untersuchungen von Fibroblasten zu Beginn dieser Arbeit (Absatz 4.2.1) zeigten beispielsweise, dass bereits eine Konzentration von 3% DMSO im Kulturmedium die Adhäsion, Migration und Proliferation beeinflusste (siehe Abschnitt 4.2.1, Abbildung 16). Die Bestimmung der DMSO-Konzentration wurde zunächst anhand der Osmolarität bestimmt und ein linearer Zusammenhang festgestellt (Abbildung 84 a). Je höher die DMSO-Konzentration, desto höher war die Osmolarität des Kulturmediums. Die Osmolarität des Kulturmediums lag demnach bei etwa 0,3 osmol/kg, welcher nach dem Auswaschen des Kryoprotektivs wieder erreicht werden musste. Die Simulation der geplanten fluidischen Prozessschritte ohne Zellen zeigte, dass durch das implementierte Pro-

gramm zum einen die theoretisch berechneten Osmolaritäten mit den realen Osmolaritäten korrelierten und zum anderen, dass nach der Injektion der Zellen zwei bis drei weitere Medienwechsel notwendig waren, um die gewünschte Osmolarität einzustellen (Abbildung 84 b). An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Medienwechsel jeweils nur zu 50% erfolgten, um die Gefahr der Aufsaugung der Zellen aus der Kulturschale zu minimieren. Ferner wurde bei der Injektion aus der CellCartridge die Zellsuspension direkt mit dem gleichen Volumen an Standardkulturmedium gemischt.



**Abbildung 84:** CHARAKTERISIERUNG DES CELLCARTRIDGE-SYSTEMS.

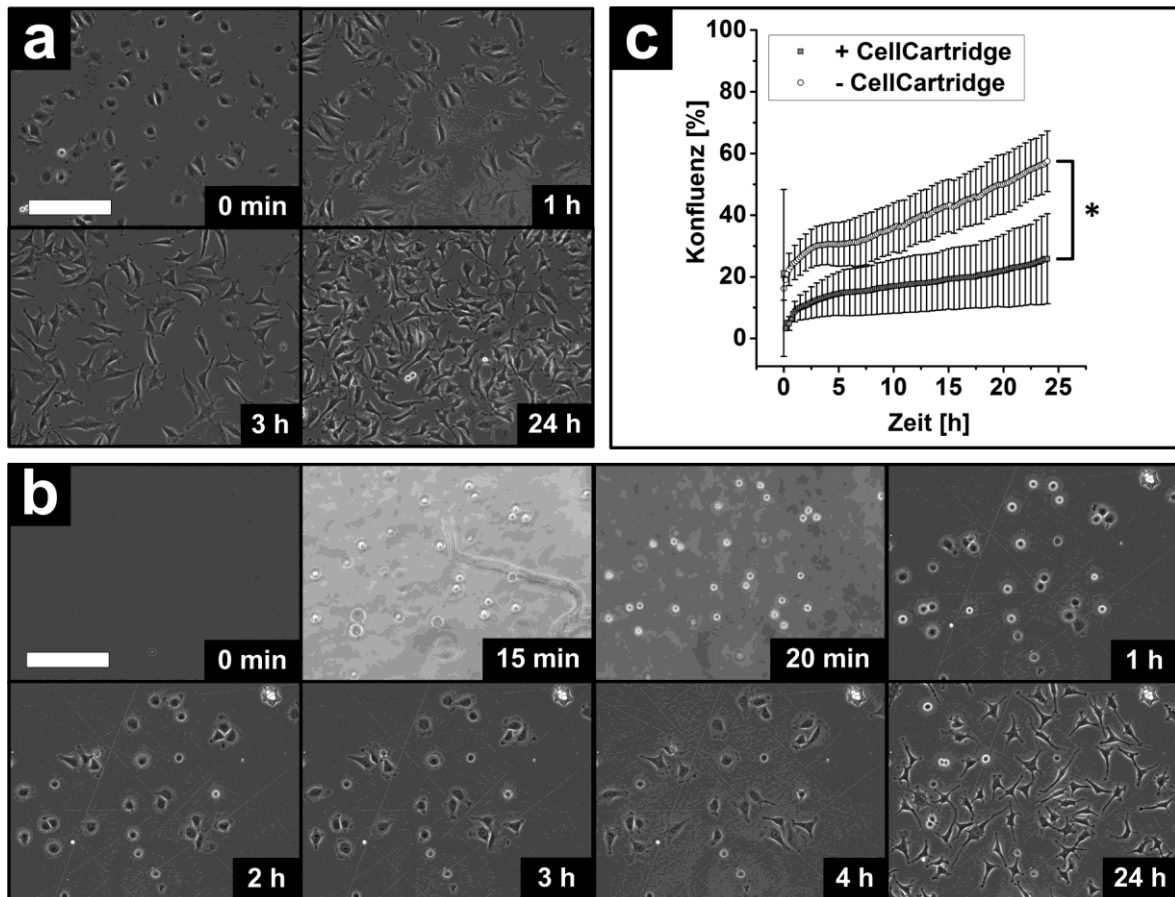
**a** Verdünnungsreihe von DMSO in Standardkulturmedium für L929 Fibroblasten. **b** Osmolarität des Kulturmediums nach mehreren Waschschritten durch mikrofluidische Prozessierung. **c** Vitalität und Zellzahl der Fibroblasten, die mit unterschiedlichen Flussraten mit der Fluidik prozessiert wurden. **d** Vitalität der Fibroblasten vor und nach Kryokonservierung in der CellCartridge. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n=3$  Experimenten.

### Kryokonservierung und Vitalität

Da durch die mikrofluidische Prozessierung der Zellen Scherstress auf die Zellen ausgeübt wird, wurde die Vitalität als Funktion der Membranintegrität von Fibroblasten untersucht. Die Ergebnisse zeigten dabei, dass sowohl bei einer eingestellten Flussrate von 1 ml/min, als auch 2 ml/min eine hohe Vitalität der Zellen vorlag, die vergleichbar mit den nicht mikrofluidischen Kontrollzellen war (Abbildung 84 c). Die Kryokonservierung der Zellen in der CellCartridge selbst führte nur zu einer minimalen Reduzierung der Vitalität von etwa 10% im Vergleich zur Kontrolle vor der Kryokonservierung (Abbildung 84 d).

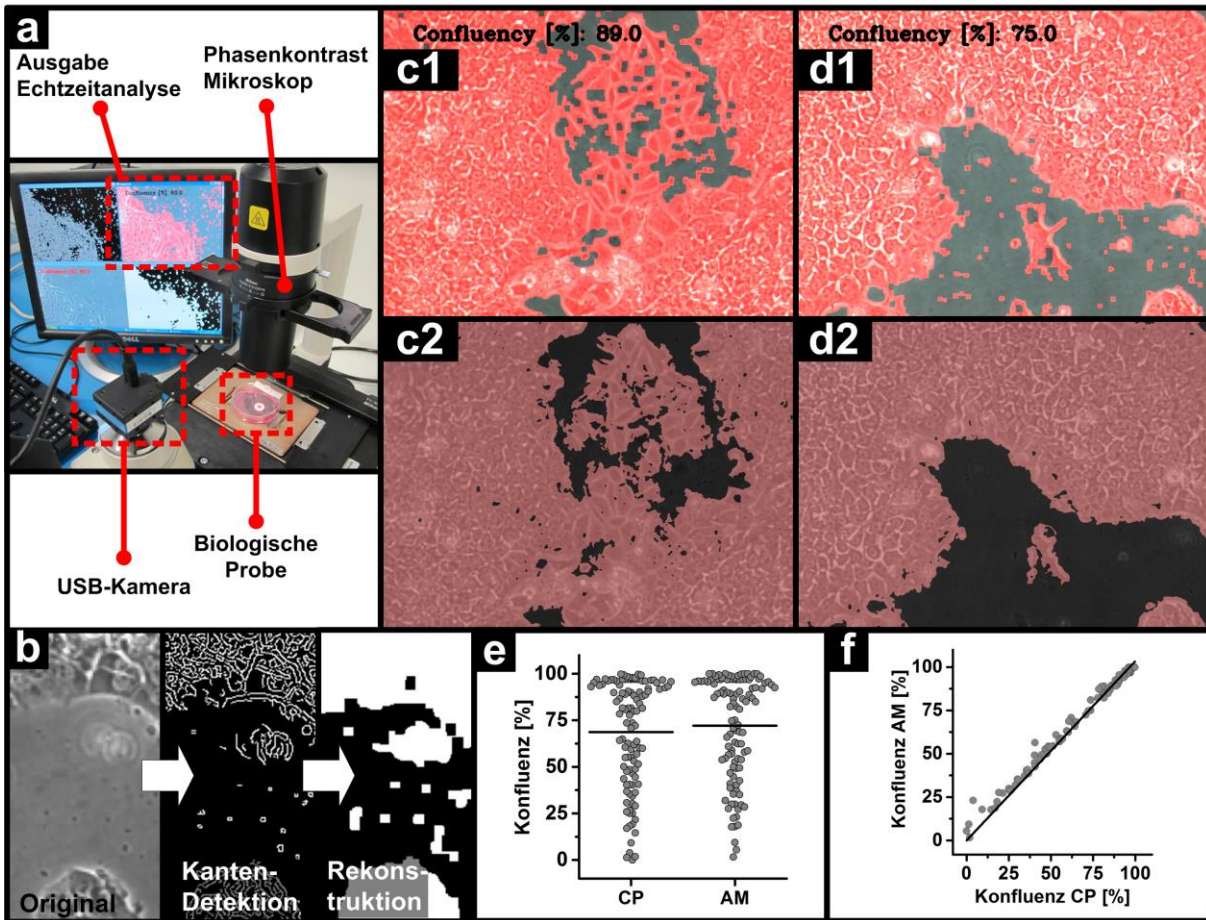
### Evaluation des Systems

Nachdem die Grundvoraussetzungen für das System der CellCartridge untersucht wurden und insgesamt gezeigt werden konnte, dass alle Voraussetzungen für eine mikrofluidische Verbindung und Prozessierung von kryokonservierten Proben in ein automatisiertes Mikroskop erfüllt sind, wurde der vollständige Workflow evaluiert. Fibroblasten wurden zunächst kryokonserviert, dann in einem Wasserbad aufgetaut, an die Fluidik angeschlossen und letztendlich in die Kulturschale im automatisierten Mikroskop transportiert. Dort erfolgten der Medienwechsel und eine anschließende Kultivierung der Zellen über 24 h. Parallel wurden die Zellen vor Kryokonservierung und Prozessierung in der CellCartridge mit der Lebendzell-Mikroskopie beobachtet (Abbildung 85 a). Die Zeitrafferaufnahmen der Zellen, die über die CellCartridge in das Mikroskop transportiert wurden, sind in Abbildung 85 b illustriert. Deutlich zu erkennen sind die Injektion der Zellen sowie die Medienwechsel, die mit einer kurzfristigen Kondensation an der Kulturschale einhergehen.



**Abbildung 85: ZEITRAFFERAUFNAHMEN VON L929-FIBROBLASTEN MIT DIREKTER INJEKTION AUS DER CELLCARTRIDGE.** **a** Adhäsions- und Proliferationsverhalten von Fibroblasten, die nicht kryokonserviert und manuell in die automatisierten Mikroskope gegeben wurden. **b** Zeitrafferaufnahmen von L929-Fibroblasten, die mikrofluidisch direkt aus der (aufgetauten) CellCartridge in die automatisierten Mikroskope transportiert wurden und bei denen während der ersten Minuten der Kultivierung ein Medienwechsel mikrofluidisch durchgeführt wurde. Maßstab: 200 µm für alle Bilder. **c** Verlauf der Zellaadhäsion mit CellCartridge (+ CellCartridge) und ohne CellCartridge (- CellCartridge) quantifiziert durch die konfluente Zellfläche. Zur Übersichtlichkeit wurde in den beiden Graphen jeweils nur jede zweite Standardabweichung aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus  $n = 3 \times 12$  Bildausschnitte. \*: Die konfluenten Zellflächen der beiden Konditionen zum Zeitpunkt 24 h unterscheiden sich signifikant (Mann-Whitney Test,  $p < 0,05$ ).

Das Verhalten der Zellen war bei beiden Bedingungen vergleichbar, eine Adhäsion der Zellen erfolgte nach weniger als einer Stunde nach Inokulation, wobei die Proben aus der CellCartridge eine verzögerte Adhäsion zeigten. Bei beiden Bedingungen waren morphologisch vergleichbare Zellen vorhanden. Eine extreme Ausbildung von spindelförmigen Membranfortsätzen, wie sie in den Experimenten in Abschnitt 4.2.1 beobachtet wurden, war hier nicht festzustellen und die Entfernung des Kryoprotektivs implizierte. Die Zahl der Zellen aus der CellCartridge, die die Petrischale erreichten, waren geringer im Vergleich zu den manuell inokulierten Zellen in der Kontrolle, was sich letztendlich auch in dem Verlauf der Konfluenz widerspiegelte (Abbildung 85 c). Der Verlauf der Kurven ist zwar vergleichbar, unterschied sich jedoch durch einen Offset, der aus der unterschiedlichen Zellzahl der beobachteten Zellen resultierte. Dies wurde ebenso durch die Steigung des Konfluenzverlaufs im linear ansteigenden Bereich deutlich, bei dem die Steigung bei den Kontrollen 1,39 und bei der CellCartridge 0,48 betrug.



**Abbildung 86: IMPLEMENTIERUNG UND EVALUATION EINES PROTOTYPZUR AUGMENTIERTEN MIKROSKOPIE.**

**a** Aufbau für die augmentierte Mikroskopie. An ein Standard-Mikroskop ist eine USB-Kamera angeschlossen, die mit der Skriptsprache Python angesprochen werden kann. Die Informationen der biologischen Probe werden über die Kamera an einen PC weitergeleitet, dort verarbeitet und auf dem Bildschirm die augmentierten Mikroskopbilder ausgegeben. **b** Prinzip der Bildanalyse. Von dem Originalbild werden die Kanten detektiert, die eine Erhöhung des Kontrasts von biologischen Vorder- und Hintergrund erlauben. Diese Information wird zur Rekonstruktion des Biologischen Vordergrunds genutzt, aus dem die Konfluenz berechnet werden kann. **c** und **d** Beispielaufnahmen von hiPSC-Kolonien mit Augmentierung. Bild 1: Echtzeitanalyse mit dem Prototypen, Bild 2: Vergleich der Offline-Analyse mit CellProfiler. **e** Konfluenzwerte der untersuchten Bilder von Augmented Microscope und CellProfiler Analyse. Die horizontale Linie markiert den Mittelwert ( $n=111$ ). Die Werte der beiden Analysemethoden unterscheiden sich nicht signifikant (Mann-Whitney-Test,  $p < 0,05$ ). **f** Korrelation der Konfluenz berechnet mit dem Augmented Microscope (AM) und CellProfiler (CP). Die Konfluenzwerte wurden gegeneinander aufgetragen. Je näher die Datenpunkte an der Trendlinie ( $R^2=0,997$ ) liegen, desto geringer ist die Differenz der Werte aus den beiden Methoden ( $n=111$ ).

#### 4.5.2 Entwicklung eines Prototyps für die erweiterte Mikroskopie

Die Charakterisierung von biologischen Proben anhand von Mikroskopiebildern erfolgt in der Regel manuell und im Anschluss an das Experiment. Damit verbunden ist ein hoher Zeitaufwand, Expertenwissen und auch die Tatsache, dass man nicht mehr in das Experiment manipulativ eingreifen kann. In diesem Abschnitt wird ein Ansatz evaluiert, der eine Analyse der biologischen Probe in-situ, d. h. während des laufenden Experiments, erlaubt. Durch die implementierten Regeln, die aus den vorherigen Experimenten abgeleitet werden konnten, werden dem Anwender nahezu in Echtzeit Informationen in dem analysierten Bild angezeigt, auf die er reagieren kann bzw. Expertenrat einholen kann.

Dieser Prototyp eines *augmented microscope* (abgeleitet von *augmented reality*, erweiterter Realität) könnte beispielsweise in interdisziplinären Forschungsprojekten seinen Einsatz finden, wo Ingenieure bildbasierte Systeme für zellbiologische Anwendungen entwickeln. Ferner könnte in einer zukünftigen weiteren Entwicklungsstufe Automatisierungshardware in das System integriert werden, dass mit Hilfe

einer Art künstlicher Intelligenz auf die Ergebnisse der Analyse Aktionen, wie z. B. Medienwechsel, Injektion von Faktoren oder auch Aufforderungen zu einem Passagieren der Kultur einleitet bzw. empfiehlt.

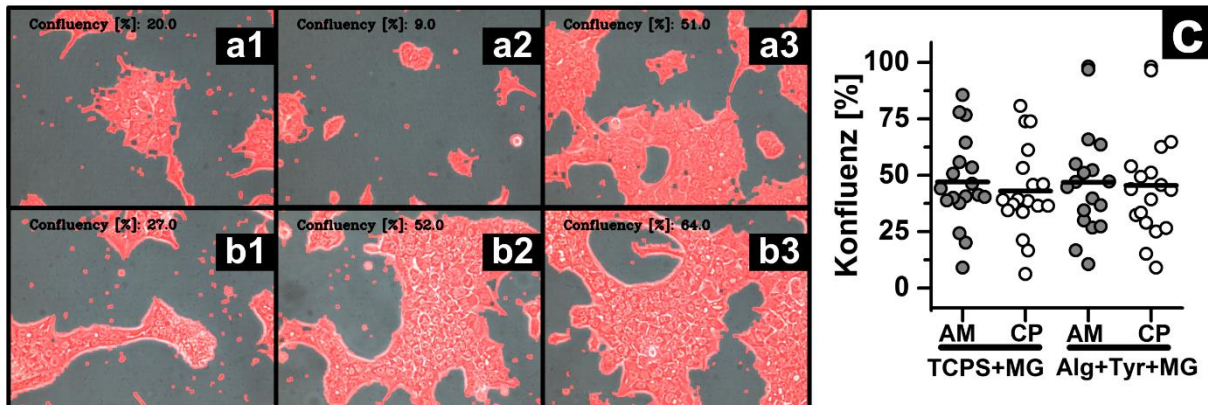
### Prototyp 1 – Echtzeit-Analyse hiPSCs

Bei der Kultivierung von hiPSCs hat sich im Laufe der Zeit die Beurteilung der Konfluenz als adäquater Parameter zur Passage bzw. Differenzierung dieser Zellen etabliert (siehe z. B. [328]). Die Konfluenz selbst ist dabei die prozentual mit Zellen bewachsene Fläche. Die Beurteilung der Konfluenz erfolgt jeweils vom Experten über ein Mikroskopiebild und ist somit ein subjektiver Parameter. Die Konfluenz wurde in dieser Arbeit bereits zur Analyse des zellulären Verhaltens auf z. B. modifizierten Alginaten herangezogen, dabei jedoch immer eine retrospektive Analyse mit CellProfiler durchgeführt. Die Routinen in der Zellbiologie erfordern jedoch oftmals eine direkte Analyse, die also in Echtzeit erfolgen sollte. Dem Experten soll dabei die Konfluenzwerte direkt angezeigt werden, damit diese zur Dokumentation (und Qualitätskontrolle) genutzt werden können. Eine Implementierung dieses Prototyps mittels CellProfiler ist zwar möglich, jedoch hat sich gezeigt, dass ein derartiges Konzept Wartezeiten erforderte, die den Dokumentationsprozess stören würden. Aus diesem Grund wurde die Implementierung mittels der Skriptsprache Python und der Library *openCV* realisiert. Der Pseudocode der Applikation ist im Anhang zu finden (ab Seite 196). Die Implementierung des Prototyps erfolgte auf Basis eines Standard-Mikroskops mit Phasenkontrast (Nikon TS-100, Nikon Instruments GmbH, Düsseldorf, Deutschland), sowie einer USB-Kamera, die mit der Skriptsprache angesteuert werden konnte (The Imaging Source, DFK 72AUC02).

Abbildung 86 a zeigt den Aufbau des Mikroskops mit biologischer Probe und Benutzerausgabe am Monitor. Die Programmierung erfolgte unter der Verwendung der Bibliotheken *OpenCV*, *Python Image Library (PIL)*, *numpy*, *scipy* und *VideoCapture*. Die Bestimmung der konfluenten Flächen ist in Abbildung 86 b dargestellt. Vom Originalbild wurden zunächst die Kanten mittels der *Canny-Edge-Detection* herausgearbeitet. Anhand des dadurch entstandenen binären Bildes wurde mittels morphologischer Operationen (*dilate* und *erode*) der biologische Vordergrund rekonstruiert. Im folgenden Schritt wurde der biologische Vordergrund ins Verhältnis zum Gesamtbild gesetzt und dadurch der prozentuale Bewuchs (Konfluenz) berechnet. Abbildung 86 c1 und d1 zeigen jeweils die Ausgabe eines Ausschnitts der biologischen Probe, die mit Hilfe des Prototyps in Echtzeit annotiert wurde. Der Benutzer bekam direkt für den jeweiligen Bildausschnitt die Konfluenz (in %) angezeigt und konnte (optional) durch Drücken der „s“-Taste die Daten als Bilder zur Dokumentation abspeichern. Die berechneten binären Bilder (Rekonstruktion, Abbildung 86 b) wurden zusätzlich mittel der offline-Analyse mit CellProfiler quantifiziert. Abbildung 86 c2 und d2 zeigen Resultate der entsprechenden Bilder aus Abbildung 86 c1 und d1. Die Unterschiede fielen hier gering aus, lediglich kleinere detektierte Flächen wurden in der CellProfiler-Analyse nicht detektiert. Der Vergleich des gesamten Datensatzes ist in Abbildung 86 e dargestellt. Die Ergebnisse der beiden Methoden zeigten keinen signifikanten Unterschied ( $n=111$ , Mann-Whitney-Test,  $p<0,05$ ). Die hohe Korrelation wird durch den Graphen Abbildung 86 f deutlich. Die berechneten Werte beider Methoden wurden gegeneinander aufgetragen. Die Lage der Datenpunkte in Bezug zur schwarzen Trendlinie verdeutlicht die hohe Korrelation der beiden Analyse-Methoden: je näher die Datenpunkte auf der Trendlinie liegen, desto höher ist die Korrelation. Es waren nur wenige Ausreißer vorhanden und insgesamt konnten sehr vergleichbare Werte berechnet werden.

Abbildung 87 zeigt die Ergebnisse einer Studie von hiPSCs auf TCPS-Oberfläche (Abbildung 87 a) und Alginat-basierten Gerüststrukturen (Abbildung 87 b) jeweils mit Matrigelbeschichtung. Mithilfe des Prototyps konnte die Konfluenz-Fläche der adhärenen Zellen auf beiden Oberflächen bestimmt werden, was das hohe Potenzial für eine automatisierte Entwicklung von Gerüststrukturen belegte. Die schon in Abbildung 87 a und b gezeigte hohe Korrelation von biologischem Vordergrund und detektierter Fläche spiegelte sich auch in der zum Vergleich durchgeführten Analyse mit CellProfiler wider. Die Konfluenzwerte, die von dem Prototyp bestimmt wurden, sowie die Werte aus der Berechnung von CellProfiler unterschieden





**Abbildung 87:** ANWENDUNG DES PROTOTYPS FÜR DIE AUGMENTIERTE MIKROSKOPIE BEI DER UNTERSUCHUNG DER ZELL-MATRIX-INTERAKTION.

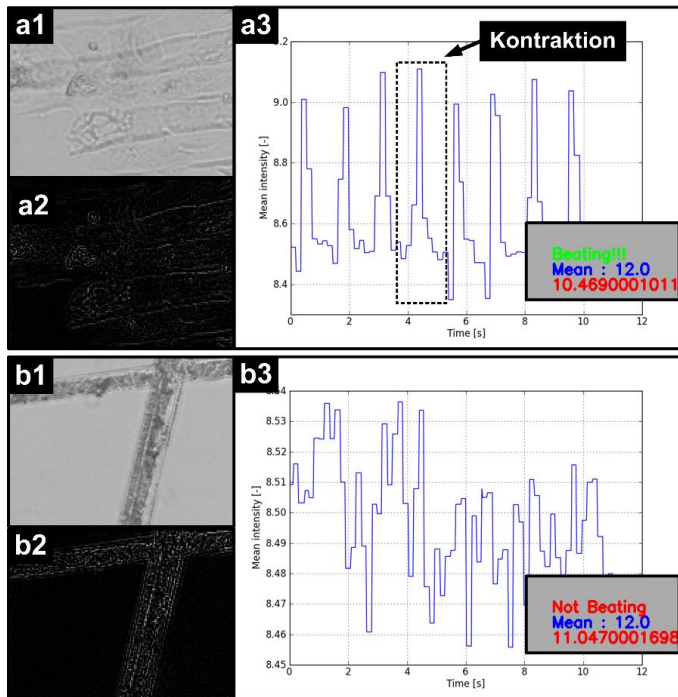
**a** hiPSCs auf TCPS mit Matrigelbeschichtung. **b** hiPSC auf Alginat/Tyramin mit Matrigelbeschichtung. Die Bilder 1-3 zeigen unterschiedliche FOVs. **c** Konfluenzwerte der untersuchten Bilder von Augmented Microscope und Cellprofiler Analyse. Die horizontale Linie markiert den Mittelwert ( $n=18$ ). Die Werte der beiden Analysemethoden unterscheiden sich nicht signifikant ( $t$ -test,  $p < 0,05$ ). AM=Augmented Microscope, CP = Cellprofiler, MG = Matrigel.

sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 87 c). Ebenso wurde deutlich, dass das System über den gesamten Wertebereich stabile und reproduzierbare Konfluenzwerte berechnet.

Anhand der durchgeführten Experimente konnte geschlussfolgert werden, dass der vorliegende Prototyp für die augmentierte Mikroskopie möglicherweise ein nützliches Werkzeug für die Qualitätskontrolle bei der Expansion von hiPSCs ist. Die Konfluenz konnte in Echtzeit ermittelt werden und dem Anwender direkt den Status der Konfluenz objektiv im Mikroskopbild übermitteln. In zukünftigen Versionen könnten dem Anwender auch Empfehlungen angezeigt werden, wie mit der Kultur weiterverfahren werden soll. Erreicht die Konfluenz beispielsweise einen Wert von über 80%, könnte der Hinweis bzw. die Aufforderung einer Passage angezeigt werden, da sonst mit einer Differenzierung und somit einer Verschlechterung der Qualität der hiPSC-Kultur zu rechnen ist. Ferner ist durch eine weitere Adaptation eine Charakterisierung von hiPSC-Kolonien möglich. Kolonien können durch die Implementierung weiterer Funktionen morphologisch charakterisiert werden und beispielsweise die Beschaffenheit des Randes klassifiziert werden. Parameter wie der *formfactor* oder *shapefactor* können dazu genutzt werden, den Zustand einzelner Kolonien vorherzusagen. Bei einem niedrigen *shapefactor* ist der Rand der Kolonie eher unregelmäßig (sternförmig), was auf eine (beginnende) Differenzierung der Kolonie schließen lässt.

## Prototyp 2 – Echtzeit-Analyse hiPSC-CM

Bei den vorangegangenen Untersuchungen von hiPSC-CM auf verschiedenen Oberflächen (vgl. Abbildung 67) konnte bereits gezeigt werden, dass die Kontraktion anhand der mittleren Intensität des Gesamtbildes abgeleitet werden konnte. Es konnten *bildbasierte EKGs* erstellt werden, aus denen dann die Schlagfrequenz bestimmt wurde. Dieser Ansatz ist auch für eine Echtzeit-Analyse interessant, da sie unter sehr geringem Rechenaufwand, und somit sehr schnell, erfolgen kann. Diese wurde als Hypothese für die Echtzeitanalyse übernommen und ein Prototyp für diese Untersuchungen implementiert. An den automatisierten Mikroskopen (Nikon Biostation IM) wurden einige Modifikationen (z. B. Austausch der Kamera) durchgeführt, um einen Zugriff auf die Kamerabilder über eine Skriptsprache zu realisieren. Ebenso wurde ein Objektiv für Kulturschalen mit Plastikboden statt des Objektivs für Glasböden verwendet, da hierdurch ein größeres Feld abgebildet werden kann.



**Abbildung 88: PROTOTYP FÜR DIE AUGMENTED MICROSCOPY VON hiPSC-CM.**  
*a* kontrahierende hiPSC-CM, *b* statische Kontrollprobe. Bilder: 1. Originalbild im Phasenkontrast. 2. Modifiziertes Originalbild nach Kantendetektion zur Verstärkung des Kontrastes. 3. Echtzeitanalyse der Kontraktion von hiPSC-CM über einen Zeitraum von 10 s. Ein Peak entspricht einer Kontraktion, ermittelt durch die Änderung der mittleren Intensität des modifizierten Originalbilds aus 2. über die Zeit. Graue Infobox in 3.: Information für den Benutzer nach Ausführung der Echtzeitanalyse. Erste Zeile: Klartext, über den Status der Kontraktion. Zweite Zeile: mittlere Intensität des Originalbilds. Dritte Zeile: benötigte Aufnahmezeit.

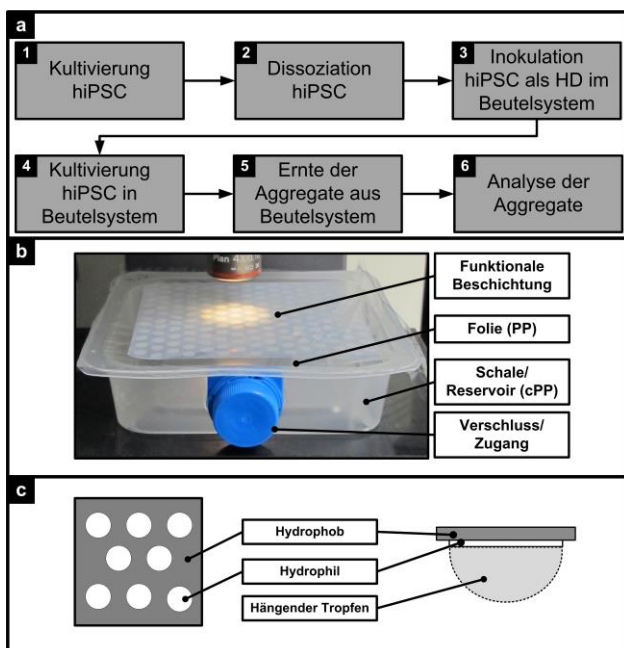
Die installierte Kamera (The Imaging Source, DFK 72AUC02) kann mit der Skriptsprache Python und deren entsprechenden Libraries angesprochen und die Bilder gleichzeitig weiterverarbeitet werden. Für die Implementierung wurden die Libraries *OpenCV*, *Python Image Library (PIL)*, *scipy*, *numpy*, *Videocapture*, *os*, *time*, *pyplot*, *ImageFilter* und *math* verwendet. Nach dem Start des Python-Skripts wird das Originalbild (Abbildung 88 a), das Originalbild nach Detektion der Kanten, sowie ein Informationsfenster angezeigt. In dem Prototyp muss die Detektion der Kontraktion durch die Betätigung der Leerzeichen-Taste initiiert werden. Nach diesem Nutzereingriff wird im Hintergrund die mittlere Bildintensität über 400 Bilder gespeichert und die dafür benötigte Zeit berechnet. Um die Kontraktion zu verifizieren, wird von diesen Werten Minimum und Maximum, sowie deren Differenz berechnet. Anhand von Voruntersuchungen wurde herausgefunden, dass eine Kontraktion bei einer bestimmten Differenz vorliegt. Bei einer Differenz zwischen 0 und 0,1 liegt keine Kontraktion vor, eine Differenz größer 0,11 wird als Kontraktion klassifiziert. Anhand von kontrahierenden hiPSCs wurde diese Klassifizierung evaluiert bei der keine falsch-negativen Klassifizierungen ausgegeben wurden. Die Überprüfung von statischen Proben erfolgte mit Kulturschalen ohne Zellen, um das Grundrauschen des Systems einzugrenzen (Abbildung 88 b). Peaks waren zwar auch hier vorhanden, jedoch unterschieden diese sich sehr stark in der Amplitude. Bei dieser Evaluation wurden keine falsch-positiven Klassifizierungen ausgegeben. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Klassifizierung einer hiPSC-CM-Kultur bzgl. der Kontraktion mittels der implementierten Echtzeitanalyse erfolgen kann, ohne die Probe zu zerstören. Die Bildanalyse erfolgte gleichzeitig *unsupervised* und erhält dadurch einen hohen Grad der Objektivität. Neben der Klassifizierung wurde dem Benutzer direkt ein Bild-basiertes EKG angezeigt, das aber in dieser Version des Prototyps noch nicht über eine Detektion einzelner Kontraktionen aus dem EKG verfügte und dadurch keine automatische Ausgabe der Schlagfrequenz erfolgte, sondern manuell vom Nutzer vorgenommen werden musste. Entsprechende Libraries sind hierfür verfügbar, es muss jedoch zunächst evaluiert werden, ob die Funktionen zur Detektion der Peaks auf die generierten Daten angewendet werden können.

Dieser Prototyp kann für eine schnelle Dokumentation von Kardiomyozyten-Kulturen verwendet werden, ist aber auch in der Automatisierung von Workflows einsetzbar. Vorstellbar wäre hier z. B. die Überwachung von Kardiomyozyten über die Kontraktion. Eine Änderung der Schlagfrequenz bis hin zum vollständigen Aussetzen der Kontraktion kann beispielsweise mit einem solchen Analysesystem überwacht, und durch festgelegte Regeln entsprechende Aktionen eingeleitet werden. Denkbar z. B. bei einem Abfallen der Schlagfrequenz die Aufforderung bzw. automatische Durchführung eines Medienwechsels.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit einer Echtzeit-Analyse dynamische Zellsysteme charakterisiert werden können und dem Benutzer während des Mikroskopierens und Betrachtens der Probe diese Informationen zur Verfügung zu stellen. Die bisher erzielten Routinen zur Analyse der Schlagfrequenz konnten übertragen werden und bei hiPSCs-CM auf Alginate-Gerüststrukturen erfolgreich angewendet werden.

#### 4.5.3 Untersuchungen und Evaluation eines Prototyps für die Herstellung von Zellaggregaten im „hängenden Tropfen“ ohne Automatisierungshardware

Die durchgeführten Experimente in den vorherigen Abschnitten haben gezeigt, dass eine Untersuchung von zellulären System und deren Interaktion mit Alginate-basierten Mikroträgern sowohl in speziellen Zellkultursubstraten (vgl. Abbildung 41), in Multiwellsystemen mit spezieller Oberflächencharakteristik (vgl. Abbildung 69), als auch in Standard Petrischalen (vgl. Abbildung 53) untersucht werden kann. Gerade die Kultivierung im sog. „hängenden Tropfen“ und die damit verbundene Formierung von dreidimensionalen Zellaggregaten ist von hohem Interesse, da diese in Wissenschaftsbereichen wie die Entdeckung neuer Wirkstoffe, Modellierung von Krankheitsbildern auf zellulärer Ebene oder Zytotoxizitätstest vielseitige Anwendung finden. Die Kultivierungstechnik des „hängenden Tropfen“ hat jedoch zwei große Nachteile: sie ist entweder sehr zeitintensiv, wenn man eine Vielzahl von Tropfen manuell setzen muss, oder sie ist sehr kostenintensiv, da ein Automatisierungssystem (z. B. Pipettierroboter) mit hohen Investitionskosten verbunden ist. Zur Lösung dieses Problems wurde das Konzept des sog. *Labors im Beutel* entwickelt, welches die Kultivierung, Aggregatbildung und Kryokonservierung von humanen pluripotenten Stammzellen abbilden soll. Das Konzept des *Labors im Beutel* wurde 2014 als internes Fraunhofer-Projekt gestartet, an dem mehrere Institute beteiligt sind (Fraunhofer IST, IVV, IVV-DD und IBMT). Die Formation der *hängenden Tropfen* soll dabei durch eine chemische Strukturierung erfolgen, die aus einer flächigen superhydrophoben Schicht besteht, auf die in bestimmten Abständen hydrophile Spots mit einem Durchmesser von etwa 5 mm gesetzt wurden (Abbildung 89 c). Das Folienmaterial, sowie die Schale für den Prototyp (Abbildung 89 b) wurde vom Fraunhofer IST, Freising, vorbereitet. Die Modifikation der Folien und Aufbringen auf die Schale mittels Heißsiegeln erfolgte am Fraunhofer IST, Braunschweig. Ein vorhandener Verschluss zur Inokulation und Ernte der Zellen erfolgte durch das Fraunhofer IVV, Dresden.



**Abbildung 89: WORKFLOW UND PRINZIP DER BEUTELSYSTEME.**

**a** Abgebildeter Workflow für Kultivierung von hiPSC in Beutelsystemen. Die hiPSCs werden nach Standardkultivierung in 2D zunächst einzeln und dann in dem Beutelsystem inokuliert. Die Kultivierung erfolgt über 72 h, in der sich in den gebildeten Tropfen Aggregate bilden sollen. Nach dieser Zeit erfolgen die Ernte der Aggregate und die Analyse anhand ausgewählter Parameter.

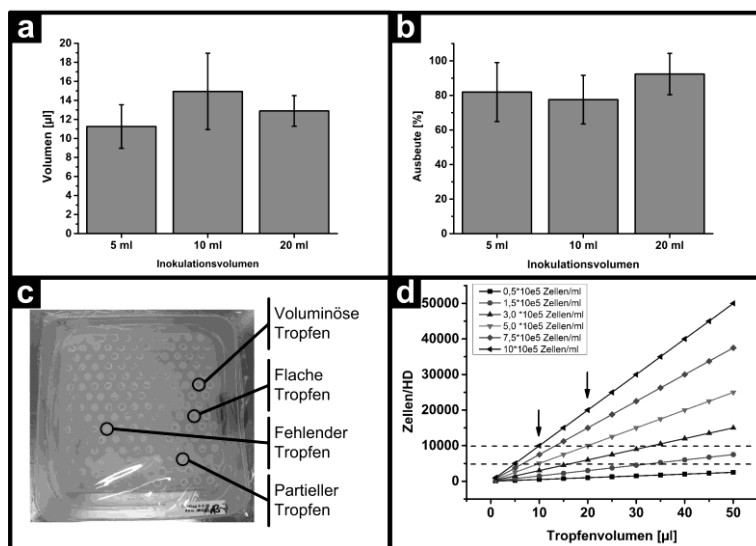
**b** Aufbau und Eigenschaften der Beutelsysteme (Prototyp).

**c** Eigenschaften der Funktionalisierung zur Erzeugung von „hängenden Tropfen“ für die Aggregatbildung.



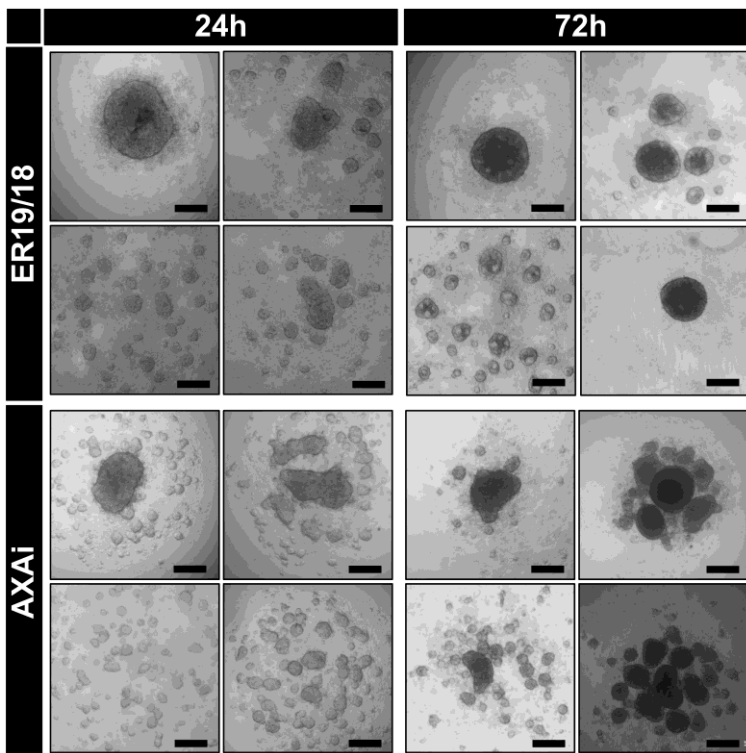
### Beutelsysteme zur Aggregatbildung durch „hängende Tropfen“

In den Vorarbeiten wurde zunächst ein Material evaluiert, das zum einen die Durchführung der Arbeitsschritte biologischer Workflows erlaubt (optische Güte/Mikroskopierbarkeit, chemische Beständigkeit, Kryokompatibilität), und zum anderen auch die Modifikation der Oberfläche mittels chemischer Strukturierung, sowie die Anforderungen an eine Konstruktion eines Beutelsystems (Siegelbarkeit, Einbau von Verschlüssen). Für die Evaluation des konstruierten Prototyps (Abbildung 89 b) wurde der in Abbildung 89 a dargestellte Workflow auf die Beutelsysteme mit human induziert pluripotenten Stammzellen übertragen. Die Zellen wurden hierfür vereinzelt und im Beutelsystem mit  $5 \times 10^5$  Zellen/ml inokuliert. Als Inokulationsvolumen wurden 10 ml Zellsuspension verwendet, da dieses in Voruntersuchungen die größten Tropfenvolumina erzielte (Abbildung 90 a) und eine Tropfenausbeute von etwa 80% (Abbildung 90 b) lieferte. Die Tropfen selbst konnten in flache und voluminöse Tropfen klassifiziert werden. Ebenso konnten partielle Tropfen beobachtet werden, die bei der Quantifizierung als voluminös eingeordnet wurden (Abbildung 90 c). Die hierdurch gewonnen Werte wurden für die Zelldichte der Evaluation herangezogen. Um eine ausreichende Zellzahl pro Tropfen zu erhalten, die in diesem Fall auf 5000 Zellen festgelegt wurde, musste eine Zellkonzentration von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt werden (vgl. Abbildung 90 d). Es folgte die Kultivierung von zwei hiPSC-Linien in den Beuteln, die durch Schwenken der Zellsuspension über die hydrophilen Spots und Herumdrehen des Beutels in die Kultivierungsform des „hängenden Tropfens“ gebracht wurden. Die Beutel wurden 72 h kultiviert und die Aggregatbildung nach 24 h und 72 h dokumentiert.



**Abbildung 90: CHARAKTERISIERUNG DER BEUTELSYSTEME.**  
**a** Durchschnittliches Volumen pro Tropfen nach Applikation verschiedener Volumen an Kulturmedium (ohne Zellen). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD, (n=5).  
**b** Durchschnittliche Ausbeute an benetzten Spots mit Kulturmedium (ohne Zellen) nach Applikation verschiedener Volumina. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SD, (n=5).  
**c** Exemplarische Darstellung der Benetzung des Beutelsystems. Mehrere Tropfentypen konnten auf den Spots beobachtet werden: voluminöse Tropfen, flache Tropfen, fehlende Tropfen und partielle Tropfen.  
**d** Theoretische Berechnung der benötigten Inokulationsdichte ausgehend von einem Tropfenvolumen von 10-20  $\mu$ l. Bei einer Zellzahl von 5000 Zellen pro Tropfen muss eine Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen pro ml eingesetzt werden.

Abbildung 91 zeigt repräsentativ die Aggregatbildung der beiden Zelllinien nach 24 h bzw. 72 h. Es zeigte sich eine heterogene Aggregatbildung in den Beutelsystemen, wohingegen in den 3D-Kontrollen eine Aggregatbildung stattfand. Bei beiden Zellsystemen war zu beobachten, dass sich tendenziell zunächst mehrere kleine Aggregate bildeten, die über die Zeit miteinander fusionierten. Die Zelllinie ER19/18 bildete dabei generell besser Aggregate, als die Zelllinie AXAi.



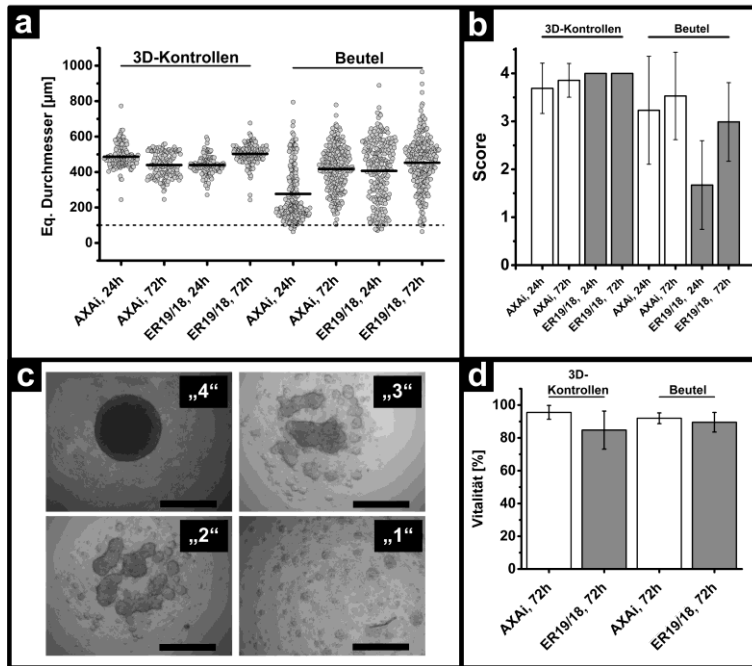
**Abbildung 91: AGGREGATBILDUNG VON hiPSC-LINIEN IN BEUTELSYSTEMEN.**

*Gebildete Aggregate im Beutelsystem nach 24 h bzw. 72 h von AXAi bzw. ER19/18 hiPSC. Die Aufnahmen spiegeln die heterogene Größenverteilung der entstandenen Aggregate wider, dokumentieren aber auch gleichzeitig, dass die Bildung von Aggregaten in diesem Beutelsystem möglich ist. Tendenziell entstehen in den Tropfen zunächst mehrere kleine Aggregate, die dann über die Kultivierungsdauer zu größeren Aggregaten fusionieren. Maßstabsbalken: 250  $\mu\text{m}$ .*

Die Aggregatgröße ist in Abbildung 92 a dargestellt. Deutlich erkennbar war eine homogene Größenverteilung der Aggregate bei den 3D-Kontrollen im Bereich von etwa 500  $\mu\text{m}$  im Durchmesser bei beiden Zelllinien. Im Gegensatz hierzu war die Größenverteilung der Aggregate in den Beutelsystemen bei beiden Zelllinien heterogener, insbesondere waren mehr kleinere Aggregate vorhanden. Die Größenverteilung verschob sich im Zeitraum von 24 h auf 72 h hin zu größeren Aggregaten, was wiederum durch eine Fusionierung von Aggregaten zu erklären war. Durch die Vielzahl von kleinen Aggregaten in einem einzelnen Tropfen wurde lediglich ein Aggregat pro Tropfen ausgewertet. Um den Grad der Aggregatbildung zu quantifizieren wurde ein „Score“ eingeführt (1 – 4, siehe Abbildung 92 b). Die höchste Bewertung (4) erhielten die Tropfen, in denen ein Aggregat vorhanden war. Die schlechteste Bewertung erhielten die Tropfen, in denen sehr viele kleine Aggregate und keine größeren (größer 100  $\mu\text{m}$ ) vorhanden waren. Charakteristische Tropfen mit Aggregaten und ihr jeweiliger Score sind in Abbildung 92 c dargestellt.

Der mittlere Score aller Experimente zeigte die höchsten Werte bei den 3D-Kontrollen bei AXAi (24 h:  $3,7 \pm 0,5$  und 72 h:  $3,9 \pm 0,4$ ) sowie ER19/18 (24 h:  $4,0 \pm 0$  und 72 h:  $4,0 \pm 0$ ). Der mittlere Score aller Experimente bei den Beutelsystemen lag bei AXAi (24 h:  $1,7 \pm 0,9$  und 72 h:  $3,0 \pm 0,8$ ), sowie bei ER19/18 (24 h:  $3,2 \pm 1,1$  und 72 h:  $3,5 \pm 0,9$ ) unter denen der Kontrollen. Insgesamt belegte auch diese Quantifizierung die bessere Aggregatbildung bei ER19/18.

Zusätzlich wurde nach 72 h auch die Vitalität bestimmt (Abbildung 92 d). Die Vitalität der 3D-Kontrollen lag bei beiden Zelllinien bei über 80% (AXAi:  $95,6 \pm 4,2$  und ER19/18:  $84,8 \pm 11,6$ ). Die Vitalitätswerte der Aggregate aus den Beutelsystemen waren dabei vergleichbar (AXAi:  $92,0 \pm 3,3$  und ER19/18:  $89,6 \pm 4,2$ ). Die Beutelsysteme konnten demnach für eine Herstellung von vitalen Zellaggregaten genutzt werden, die zwar eine heterogene Größenverteilung aufwiesen, jedoch in der Regel einen Durchmesser von mehr als 100  $\mu\text{m}$  hatten.



**Abbildung 92: CHARAKTERISIERUNG DER AGGREGATBILDUNG IN BEUTELSYSTEMEN.**

**a** Größe der Aggregate von AXAi bzw. ER19/18 nach 24 h und 72 h Kultur im "hängenden Tropfen" in Standard-Petrischalen ("3D-Kontrollen") und den Beutelsystemen ("Beutel"). Gezeigt sind die Daten aus 3 unabhängigen Experimenten.

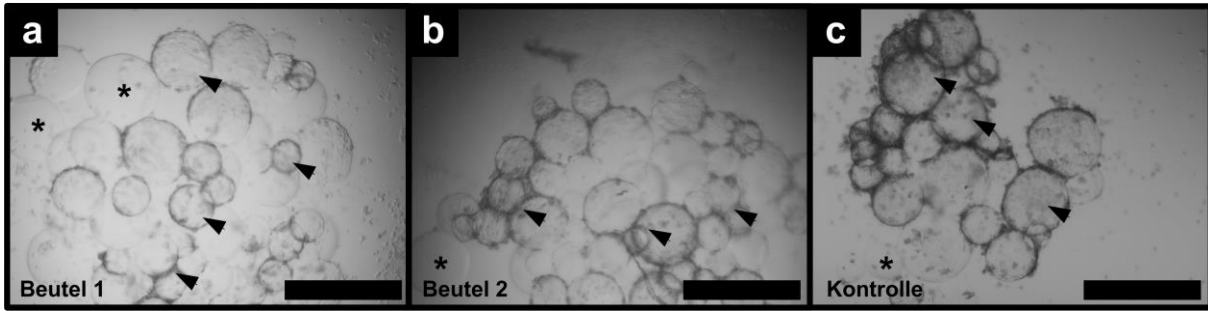
**b** Klassifizierung der Aggregatbildung in den Tropfen dargestellt als "Score" von AXAi bzw. ER19/18 nach 24 h. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 unabhängigen Experimenten.

**c** Charakteristische Aggregate nach Kultivierung im Beutelsystem zur Klassifizierung mit dem jeweilige "Score". Der Maßstabsbalken entspricht 500 µm.

**d** Vitalität der Aggregate bestimmt durch die Membranintegrität mittels Ethidiumbromid/Fluoreszein diacetat Färbung. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD aus 3 unabhängigen Experimenten. Maßstabsbalken in c: 500 µm.

### Beutelsysteme zur adhärennten Suspensionskultur auf Mikroträgern

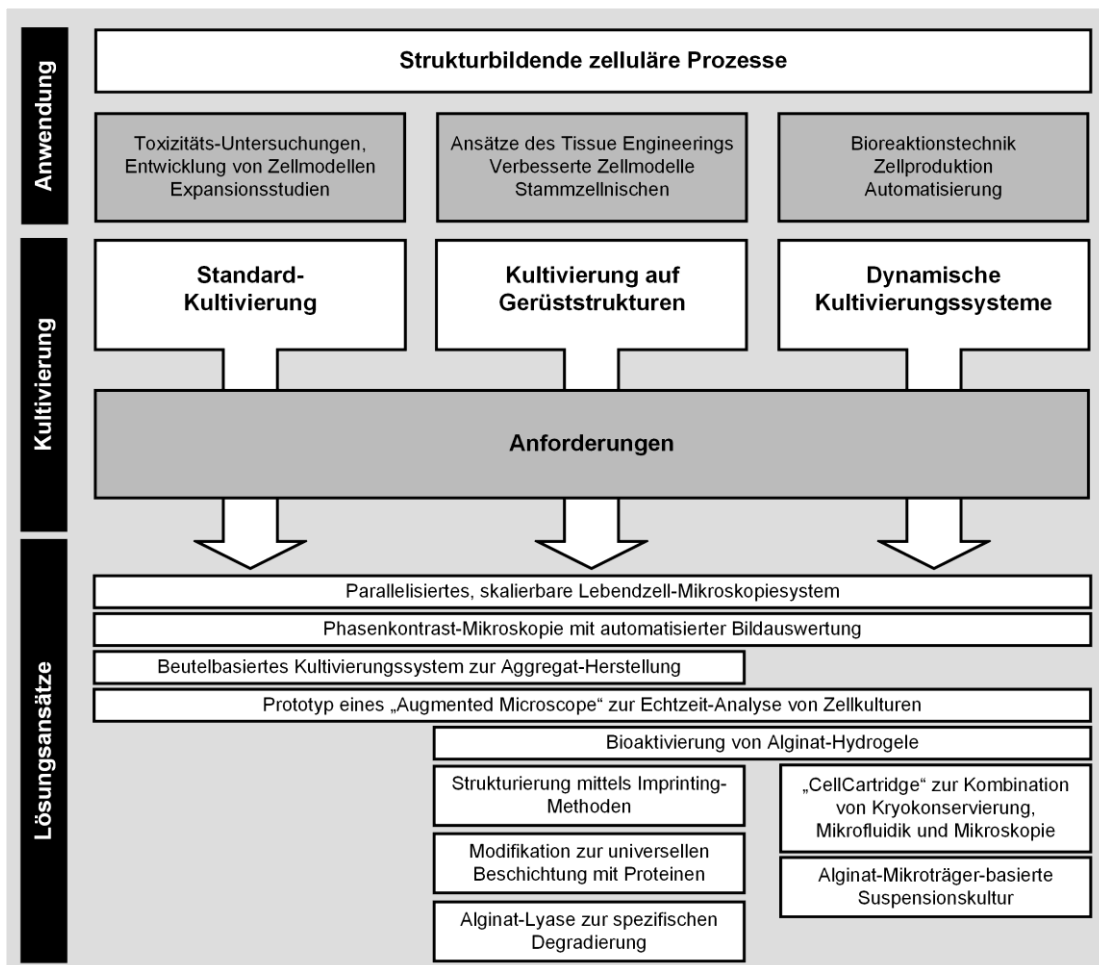
Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine Inokulation, Kultivierung und Aggregatbildung in einem geschlossenen Beutelsystem möglich ist, stellte sich die Frage, ob dies auch mit komplexeren Kultivierungsformen, wie z. B. der adhärennten Suspensionskultur auf Mikroträgern, möglich ist. Neben den Zellen, die in diesem Fall nicht als Einzelzellen, sondern als multizelluläre Aggregate vorbereitet wurden, befanden sich auch Alginat-Mikroträger (Matrigel-modifiziert) in der Suspension. Durch die Inokulationsmethode, die bereits bei den Zellsuspensionen im vorherigen Abschnitt angewendet wurde, konnte diese Mikroträger/Aggregat-Suspension auf die hydrophilen Spots transferiert werden. Ferner zeigte sich nach einer Kultivierungsdauer von 48 h eine Adhäsion der hiPSC auf den Mikroträgern (Abbildung 93 a, b). Diese fiel im Vergleich zu den manuell gesetzten Kontrollen, qualitativ gesehen, geringer aus (Abbildung 93 c). Durch die Aggregate sank die Wahrscheinlichkeit, eine homogene Verteilung von Zellen in den Tropfen nach der Inokulation zu erhalten. Ausgehend von diesen Experimenten konnte geschlossen werden, dass neben der reinen Kultivierung von Zellsuspensionen auch die Kombination von Mikroträgern und Zellen/Zellaggregaten in den Beutelsystemen möglich ist und insgesamt somit ein hochflexibles Kultivierungssystem für die Herstellung von Modell- bzw. Testsystemen für Wirkstoffentwicklung und Zytotoxizitätstests entwickelt werden konnte.



**Abbildung 93: ADHÄRENTE SUSPENSIONSKULTUR IM „HÄNGENDEN TROPFEN“ IN BEUTELSYSTEMEN.**  
*a und b* Repräsentative Aufnahme eines „hängenden Tropfen“ mit Mikroträgern (rund) und hiPSC (Kontrastierung) der Randbereiche der Mikroträger nach 48 h in zwei unterschiedlichen Beutelsystemen. *c* Kontrollenaufnahme eines manuell gesetzten hängenden Tropfen nach 48 h. Die Pfeilspitzen markieren Bereiche, in denen Zellen adhären auf den Mikroträgern wachsen, die Sterne Mikroträger, auf denen keine adhären Zellen vorliegen. Maßstabsbalken: 500 µm

**Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse**

Zusammenfassend sollen die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit in dem Kontext von Abbildung 13 eingeordnet werden. In dieser Arbeit konnten Lösungsansätze für die unterschiedlichen Kultivierungsformen (Standard, mit Gerüststrukturen und dynamisch) entwickelt werden, die heutzutage die fundamentalen biotechnologischen Prozesse darstellen (siehe Abbildung 94).



**Abbildung 94: ANWENDUNGEN, ANFORDERUNGEN UND LÖSUNGEN IM KONTEXT STRUKTURBILDENDER ZELLULÄRER PROZESSE.** Die zu Beginn dieser Arbeit definierten Anforderungen wurden untersucht und entsprechende Lösungsansätze für die jeweiligen Kultivierungsformen entwickelt. Insbesondere Ansätze der Standard-Kultivierung konnten auf die komplexeren Kultivierungsbedingungen erfolgreich übertragen werden.

Es wurde ein nicht-invasiver Lebendzell-Mikroskopieansatz implementiert (Abschnitt 4.1) und strukturbildende zelluläre Prozesse anhand der Standard-Kultivierung (2D-Kulturen), auch von therapeutisch relevanten Zellen, untersucht (Abschnitt 4.2). Das System erlaubt auch die Untersuchung dynamischer Prozesse in Form von z.B. der Anbindung fluidischer Komponenten, was mit der CellCartidge gezeigt werden konnte (Abschnitt 4.5.1). Die zusätzliche Entwicklung von Routinen zur automatisierten Bildanalyse erlaubten ferner die Untersuchung großer Bilddatensätze, die in der Konsequenz mit einer hohen Stichprobenzahl (Zellzahl) einhergingen (Abschnitt 4.2.1 - 4.2.4). Dieses System konnte in der Folge für die Entwicklung von Alginat-basierten Gerüststrukturen genutzt werden, um strukturbildende zelluläre Prozesse zu untersuchen. Es wurden hier mehrere Modifikationen in Form der Aufbringung von Fibrillen (Abschnitt 4.3.1), der Abscheidung von CaP-Nanopartikeln (Abschnitt 4.3.2), der Metallisierung der Alginat-Oberfläche (Abschnitt 4.3.3), der nicht-kovalenten Modifikation mit ECM-Proteinen (Abschnitt 4.3.4), sowie der kovalenten Modifikation mit ECM-Proteinen (Abschnitt 4.3.5) untersucht. Die kovalente Modifikation des Alginats zur Bereitstellung von Proteinen der ECM erlaubte sowohl bei planaren, als auch bei sphärischen Alginat-GS eine adhärenz Kultivierung von anspruchsvollen Zellsystemen.

Durch die stabile Ankopplung von z. B. Kollagen I konnten hMSCs sowohl auf planaren Alginat-Oberflächen (Abbildung 49), als auch in dynamischer adhärenz Suspensionkultur auf Alginat-Mikroträgern über eine Woche erfolgreich kultiviert und expandiert werden (Abbildung 59). Ebenso konnte in diesem Zusammenhang ein Vermittler (Tyramin) identifiziert werden, der nach Kopplung an das Alginat eine Adsorption von Proteinen auf der Alginat-Oberfläche ermöglichte (vgl. Abbildung 61) und dadurch reproduzierbar die Beschichtung von Proteinmischungen erlaubte (Abbildung 62). Insgesamt konnte für die aktuell vielversprechendsten therapeutisch relevanten Zellen (hMSCs, hiPSCs und hiPSC-CMs) eine Steigerung der Adhäsion durch die in dieser Arbeit entwickelten Methoden festgestellt werden.

Die Alginat-GS konnten darüber hinaus mit einem Ansatz des  $\mu$ -Contact Printings topographisch strukturiert werden, um mit hiPSC-CMs ein artifizielles Gewebe herzustellen, das sich sowohl durch die mechanischen Eigenschaften der Gerüststruktur, als auch durch die Kanal-artige Strukturierung, weitere Eigenschaften der nativen Umgebung von Kardiomyozyten abbildet (Abschnitt 4.3.6). Untersuchungen bzgl. der Degradierbarkeit von Alginat-GS zeigten, dass sich die hergestellten Hydrogele enzymatisch degradieren lassen und hierdurch z. B. für die Rückgewinnung von Zellsystemen in biotechnologischen Prozessen genutzt werden können. Unterschiede zwischen den genutzten Alginat-Spezies konnten dabei festgestellt werden (Abschnitt 4.4). Auf Basis einiger Ergebnisse dieser Arbeit konnte Entwicklung des „Augmented Microscope“ realisiert werden. Somit war und ist nicht nur eine retrospektive Analyse, sondern auch eine Analyse in Echtzeit möglich (Abschnitt 4.5.2). Ein Beutel-basiertes Kultivierungssystem konnte erfolgreich entwickelt werden, welches eine effiziente Herstellung von Aggregaten im „Hängenden Tropfen“ durch ein chemisch modifiziertes Spot-Layout erlaubt. Auch eine adhärenz Kultivierung von hiPSCs mit modifizierten Alginat-Mikroträgern war dabei möglich (Abschnitt 4.5.3). Für alle drei Kultivierungsformen konnten in dieser Arbeit Fortschritte in den Bereichen der Analyse, Herstellung und Qualität von strukturbildenden zellulären Prozessen erzielt werden.



# 5. Diskussion

---

**Inwieweit lassen sich zelluläre strukturbildende Prozesse mit der Lebendzell-Mikroskopie aufklären?**

## *System zur parallelisierten Lebendzell-Mikroskopie*

In dieser Arbeit konnte ein parallelisiertes automatisiertes Mikroskopiesystem implementiert werden. Das System zeichnet sich insbesondere durch seine Modularität aus. Jede Probe wird in einem separaten Modul (Mikroskop) prozessiert. Experimente können durch diese Eigenschaften individuell aufgesetzt werden. Ebenso ist damit eine erhöhte Ausfallsicherheit verbunden, da die Geräte unabhängig voneinander sind. Ein vollständiges Versagen des Experiments ist nur durch einen Stromausfall bzw. Unterbrechung der CO<sub>2</sub>-Versorgung möglich. Defekte an einem Mikroskop oder Steuerungs-PC führten dahingegen nur zum Verlust der Kondition in diesem einen Modul, die übrigen Module werden dadurch nicht beeinflusst. Viele kommerzielle Lebendzell-Mikroskopiesysteme besitzen eine zentrale Optik für die Prozessierung von z. B. Mikrotiterplatten [272, 329]. Dies ermöglicht einerseits die simultane Untersuchung von sehr vielen Proben, führt aber andererseits bei Hardwareproblemen zu einem vollständigen Verlust des Experiments. Erfahrungsgemäß ist die Aufnahmezeit der Bilder bei diesem Aufbau begrenzt, da die verschiedenen Konditionen durch eine Mechanik angefahren werden müssen. Sehr schnelle Aufnahmezeiten sind dadurch oftmals nicht möglich. Für 48 Positionen werden insgesamt etwa 20 min benötigt, wohingegen ein Modul des in dieser Arbeit entwickelten Mikroskopiesystems für diese Anzahl lediglich 3,5 min benötigt.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit haben ferner gezeigt, dass eine Integration von fluidischer Hardware an die einzelnen Module erfolgen kann, um automatisiert Proben zu prozessieren bzw. eine Änderung der Kultivierungsbedingungen vorzunehmen (vgl. Abschnitt 4.5.1). Kryokonservierte Proben konnten dadurch direkt nach dem Auftauen in die Kulturschale injiziert und mit dem System untersucht werden. Dies stellt insofern einen neuen Ansatz dar, da eine zellbiologische Infrastruktur nicht notwendig ist. Der Prototyp ist ein geschlossenes System, bei dem nach dem Auftauen der Probe keine Sterilbank oder Zentrifuge zur Prozessierung der Proben vorhanden sein müssen. Ein solcher Ansatz kann daher interessant für kleinere Unternehmen sein, die zellbasierte Assays, beispielsweise Zytotoxizitätsassays, durchführen wollen, aber über keine zellbiologische Infrastruktur verfügen.

### Offline-Analyse

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden strukturbildende zelluläre Prozesse mittels der Lebendzell-Mikroskopie untersucht. Die erzeugten Bilddaten wurden mittels automatisierter Bildanalyse quantifiziert und zellspezifisches Verhalten daraus abgeleitet. Durch die Verwendung der *open source* Softwarewerkzeuge *ilastik*, *CellProfiler* und *R* konnte ein vollständiger Workflow von der Bildsequenz bis zum quantifizierten zellulären Verhalten abgebildet werden. Durch die Parallelisierung der Versuche ist eine effiziente, objektive Analyse möglich. Hervorzuheben ist, dass hiermit ein Arbeitsablauf vorliegt, bei dem keine Färbung der Zellen durch Fluoreszenzfarbstoffe durchgeführt werden muss. Es hat sich gezeigt, dass auch gerade im Zusammenhang mit der Optimierung von Gerüststrukturen das Konfluenzverhalten ein sehr guter Parameter zur Ableitung des zellulären Verhaltens darstellt. Erstmals vor etwa 10 Jahren in der Literatur von Curl *et al.* erwähnt [303, 304], hat sich die quantitative Phasenkontrast-Mikroskopie stetig weiterentwickelt. In den vorhandenen Publikationen zeigt sich jedoch, dass eine Vielzahl der Arbeiten auf die Entwicklung der Algorithmen fokussierte [291, 305, 306, 330-335] und nicht die eigentliche Anwendung in zellbiologischen Studien. Eine kürzlich veröffentlichte Studie, die sich mit der neuronalen Differenzierung befasst [336], nutzt das Konfluenzverhalten über die Zeit, um eine Aussage über den Zustand der Kultur treffen zu können. Eine Problematik ist, dass die Entwicklung der Algorithmen in vielen Fällen auf spezielle Szenarien bzw. Zellkulturen ausgelegt ist, die einen Transfer schwierig gestaltet. Ferner ist die Nutzung dieser Softwarewerkzeuge für Anwender ohne Programmierkenntnisse oftmals sehr schwierig. Mittlerweile gibt es daher auch kommerzielle Anbieter, die vordefinierte Bildanalysen anbieten, hierfür die Daten jedoch auf deren Server geladen werden müssen [299]. Die Entwicklung der Arbeitsabläufe für die Bildanalyse in dieser Arbeit stellt daher einen entscheidenden Vorteil dar, auch ohne die Entwicklung von neuen Algorithmen. Bei den Untersuchungen in dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die automatisierte Analyse der Zellmorphologie auf Einzelzellebene nur unter bestimmten Bedingungen möglich ist. Die größte Herausforderung ist dabei nicht die Detektion der Zellfläche, sondern die Separation adjazenter Zellen. Typische Algorithmen zur Separation (z. B. Watershed) sind hier nicht zielführend, da diese für die Separation runder Objekte ausgelegt sind und nicht auf Fibroblasten-ähnliche Zellen anwendbar sind. In den zuvor aufgelisteten Studien wird dieser Schritt oftmals auch nicht behandelt und lediglich die Algorithmen für die Segmentierung beschrieben, nicht aber die Separation der Objekte [330].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mittels der Konfluenz das zelluläre Verhalten von Fibroblasten in unterschiedlichen Kultivierungsmedien (Standard-Kulturmedium, toxisches Kulturmedium und Mangel-Medium) sehr gut abgebildet werden kann (siehe Abschnitt 4.2.1). Ferner zeigte sich, dass diese Methode zur Abbildung des Verhaltens von humanen multipotenten Stammzellen hMSCs (Abschnitt 4.2.2), sowie von multizellulären und dissoziierten hiPSC-Kolonien (Abschnitt 4.2.3 und 4.2.4) eingesetzt werden kann. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass neben der Segmentierung des biologischen Vordergrunds, auch der Texturparameter Entropie des Gesamtbilds zur Quantifizierung genutzt werden kann. Der Vorteil hierbei ist die Möglichkeit einer schnellen Analyse ohne Klassifikatoren. Die Bestimmung des Zustands der Kultur, z. B. adhärent oder nicht adhärent war mit diesem Parameter jedoch nicht möglich. Shamir *et al.* konnten im Gegensatz hierzu mit der Entropie das Alter eines biologischen Systems bestimmen [311]. Die Übertragung auf adhärente Zellkulturen ist wahrscheinlich nicht möglich, da die Ausgangslage immer wieder variiert (z. B. Zelldichte) und daher auch bei adhärenenten Kulturen immer unterschiedliche Entropiewerte vorliegen. Eine Nutzung des Parameters ist damit nur in Verbindung mit der zeitlichen Information sinnvoll bzw. es wird mindestens ein Referenzwert des identischen Bildausschnitts benötigt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Adhäsion und Ausbreitung der Zellen mit einer signifikanten Änderung der Entropie über die Zeit einhergeht, wohingegen nicht adhärente Kolonien über die Zeit nur eine geringfügige Änderung der Entropie aufzeigten.

Die Bestimmung des Adhäsionsstatus der Kolonien wurde ferner mit der Klassifikation durch *ilastik* untersucht. Die Idee war hier, durch gezieltes Training adhärente und nicht adhärente Kolonien zu bestim-



men. Obwohl in diesem Ansatz hohes Potential steckt, konnte bei den durchgeführten Experimenten keine zufriedenstellende Vorhersage erreicht werden (siehe Abbildung 28). Hier sind möglicherweise Verfeinerungen der Algorithmen im Bereich der Textur-Klassifizierung notwendig. Da der Quellcode der genutzten Software frei verfügbar ist (*open source*) ist dies auch umsetzbar. Nur wenige Studien zeigen, dass eine detaillierte Klassifikation der Kolonie-Bereiche möglich ist (z. B. [334, 335]), mit denen sogar differenzierte Bereiche der Kolonien annotiert werden können.

### **Echtzeit-Analyse**

In dieser Arbeit wurden Prototypen entwickelt, die eine bildbasierte, nicht-invasive Analyse von biologischen Proben bzgl. der Konfluenz und der Kontraktion in Echtzeit ermöglichen. In der Literatur konnte, nach derzeitigem Wissensstand, kein vergleichbares System gefunden werden, das eine solche Quantifizierung zellbiologischer Proben ermöglicht. Mehrere Systeme erlauben eine Online-Analyse der Proben, d. h. die Analyse nach erfolgter Bildaufnahme durch z. B. Makros, jedoch keine Echtzeit-Analyse, die dem Nutzer die Annotation bzw. Quantifizierung im Live-Bild des Mikroskops ausgibt (z. B. [272, 292]). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein solches System in die Arbeitsabläufe der Kultivierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen exzellent integriert werden kann. Der erste Prototyp (siehe Abbildung 86 und Abbildung 87) quantifiziert die konfluente Zellfläche von adhärennten hiPSC Kolonien bzw. –Rasen und zeigt sowohl die detektierte Zellfläche, als auch den Konfluenzwert an. Die Bestimmung der Konfluenz ist Teil der Kultivierungsroutinen bei hiPSCs und kann Teil eines Qualitätsmanagements sein. Die bisherige Bestimmung der Konfluenz erfolgt in der Regel manuell durch den Wissenschaftler am Mikroskop und ist dadurch subjektiv. Durch den implementierten Prototyp kann somit über die objektive Bestimmung durch einen Algorithmus ein Fortschritt in diesem Bereich erfolgen und von hohem Nutzen sein. Basis des Algorithmus ist die Kantendetektion und die Rekonstruktion des biologischen Vordergrunds. Eine texturbasierte Klassifizierung, wie sie in großen Teilen dieser Arbeit durchgeführt wurde, wäre hier zur weiteren Steigerung der Robustheit wünschenswert. Vorarbeiten zu diesem Prototyp haben gezeigt, dass die Integration möglich ist, dies jedoch zur Verlangsamung der Analyse und letztendlich nur zu einer Online-Analyse führt. Mit dem Prototyp in der aktuellen Version ist es momentan nicht möglich, den Adhäsions-Zustand der Zellen zu bestimmen. Durch die durchgeführten Untersuchungen in dieser Arbeit (vgl. Abbildung 25) wurde jedoch die hierfür die Grundlage gelegt, um dies in Weiterentwicklungen des Prototyps zu implementieren.

Neben der Analyse von hiPSC-Kolonien auf TCPS-Oberfläche konnte in dieser Arbeit ebenso gezeigt werden, dass dieser Prototyp es ermöglicht, eine Analyse der Zellen auf Gerüststrukturen durchzuführen (siehe Abbildung 87). Die Analyse wird somit nicht durch die Gerüststruktur beeinflusst und kann dadurch für eine automatisierte Entwicklung bzw. Optimierung von Gerüststrukturen genutzt werden. Durch die geringen Investitionskosten und Anforderungen an die Hardware, kann der Prototyp an bestehende Phasenkontrast-Mikroskope installiert werden. Grundvoraussetzung ist eine angeschlossene Kamera, die mit der open source Bibliothek *openCV* ausgelesen werden kann.

Zur Untersuchung von Kardiomyozyten wurde ein Prototyp entwickelt, um eine nicht-invasive Echtzeit-Analyse vornehmen zu können. Basierend auf der Quantifizierung der Änderung des Intensitätssignals konnte die Kontraktion zum einen detektiert werden und zum anderen ein Kardiogramm zu Dokumentationszwecken automatisiert gespeichert werden (siehe Abbildung 88). In dieser Arbeit wurden erstmalig diese Zellsysteme in Echtzeit adhärennt auf Alginat-GS untersucht, womit ein Fortschritt zu dem System von Maddah et al. erreicht wurde [337]. Durch das plattformübergreifende Design und den minimalen Anforderungen an die Hardware könnte es auch schnell in die Automatisierung der Zellkultur integriert werden und z. B. bei der Differenzierung von hiPSCs zu hiPSC-CMs die Detektion von positiven Konditionen erlauben.

Im Gegensatz zum ersten Prototyp wurde dieser in ein automatisiertes Lebendzell-Mikroskop integriert, um die Zellen bei physiologischen Bedingungen zu kultivieren. Basis der Analyse ist die Änderung der Intensität über die Zeit, die während der Kontraktion stattfindet. Bereits bei der Offline-Analyse von Kardiomyozyten auf Alginat-Gerüststrukturen konnte gezeigt werden, dass diese Methodik für eine automatisierte Generierung von „Kardiogrammen“ geeignet ist. Zur Verbesserung des Kontrasts wurde in diesem Prototyp zusätzlich eine Kantendetektion durchgeführt und dann die Intensität bestimmt. Die Analyse muss durch eine Interaktion (Tastendruck) des Experimentators eingeleitet werden und läuft dann im Hintergrund ab. Es wird dann das Ergebnis der Analyse (ja-nein Aussage, ob eine Kontraktion vorliegt), sowie die Kontraktion in einem Diagramm dargestellt. Durch die Speicherung von „Kardiogramm“, Mikroskopbild und Analyseergebnis steht hierdurch ein Dokumentations- und Analysesystem zur Verfügung, das beispielsweise bei der kardialen Differenzierung von hiPSCs genutzt werden kann. Der Prototyp besitzt hierdurch auch das Potenzial in Screeningverfahren integriert zu werden, um beispielsweise neue Differenzierungsprotokolle kombinatorisch zu evaluieren. Die Anwendbarkeit des Prototyps bei Zellen auf Gerüststrukturen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden und stellt damit die Flexibilität des Systems heraus. Aufgrund des Austauschs der Original-Kamera mit der USB-Kamera, liegt nur eine geringe Bildqualität vor. Eine Adaptation der Optik ist für eine Verbesserung notwendig, was jedoch zunächst nicht vorgesehen ist. Eine Integration einer Funktion zur Peak-Detektion kann ferner zu einer direkten Angabe der Frequenz genutzt werden und dadurch die Automatisierung weiter zu perfektionieren. Die Detektion des biologischen Vordergrunds durch Kantendetektion (offline) wird in einer aktuellen Veröffentlichung von Choudhry [338] u. a. für Stammzell-Kolonien angewendet und zeigt die Signifikanz der in dieser Arbeit entwickelten Prototypen.

### **Inwieweit lassen sich Alginat-Hydrogele für biotechnologische Anwendungen im Kontext des Tissue Engineerings modifizieren?**

#### ***Topographische Modifikation von Alginat-Gerüststrukturen***

Die topographische Strukturierung mittels eines bis dahin noch nicht für UHV-Alginat veröffentlichten Protokolls wurde in Abschnitt 4.3.1 beschrieben. Das Verfahren selbst wurde von Hsu *et al.* für Polypropylen beschrieben [312]. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich durch eine Adaptation der Prozessschritte hiermit auch die topographischen Eigenschaften von Gerüststrukturen aus UHV-Alginaten in Form von auf der Oberfläche befindlichen Alginat-Fasern ändern lassen. Der große Vorteil dieser Methode ist eine schnelle Übertragung in experimentelle Untersuchungen, da im Wesentlichen Standard-Labormaterialien verwendet werden können und keine Notwendigkeit von speziellen Geräten (Automatisierungshardware) besteht. Es können durch die Auswahl von Filtermembranen ebenso Variationen der Strukturierung vorgenommen werden und die strukturierten Alginat individuell auf die Anforderungen angepasst werden. Für die Untersuchungen wurden Fasern auf Alginatmembranen übertragen, die sich aufgrund der gewählten porösen Filtermembranen im Durchmesser, aber auch in der resultierenden Faserdichte auf der Oberfläche unterschieden. Bei einem Durchmesser von 2  $\mu\text{m}$  besitzen die Fasern eine durchschnittliche Länge von 9  $\mu\text{m}$  und sind somit bzgl. des Aspektverhältnisses (Länge : Durchmesser) in einem Bereich, der durch lithographische Verfahren erreicht werden kann [339].

Für die Untersuchung der strukturierten Oberflächen wurden murine Fibroblasten verwendet, da sie zum einen keine Adhäsion auf nativen Alginat-Hydrogelen zeigen, jedoch auf topographische Änderungen auf Alginat-Oberflächen reagieren können [82]. Die erzielten Resultate zeigten, dass durch die Strukturierung mit Fasern durch Membranen mit einem Porendurchmesser von 0,6  $\mu\text{m}$ , 1,0  $\mu\text{m}$  und 2,0  $\mu\text{m}$  die inerte Alginat-Oberfläche bzgl. des Adhäsionsverhaltens modifiziert werden kann. Beispielsweise konnten Adhäsionsraten von etwa 50% auf den Alginatstrukturen mit 0,6  $\mu\text{m}$  Faserdurchmesser gemessen werden. Mit steigendem Faserdurchmesser nahm dahingegen die Adhäsionsrate ab. Hieraus lässt sich schließen, dass

die Adhäsionsrate und -fähigkeit der Fibroblasten von der Dimension, aber auch von der Dichte der topographischen Merkmale abhängt. Betrachtet man die Dichte der Poren auf der Membran, so nimmt diese mit steigendem Porendurchmesser ab [324]. Bei günstiger Verteilung und Anordnung der Fasern können die Zellen mit den Fasern interagieren. Liegen die Fasern jedoch zu weit auseinander, befindet sich die Zelle, lokal betrachtet, auf einer nativen unstrukturierten Alginat-Oberfläche, die keine Adhäsion hervorruft. Im Bereich der Fasern liegt makroskopisch betrachtet eine Erhöhung der Rauigkeit vor, was die Adhäsion von Fibroblasten positiv beeinflussen kann, wie bereits von Schulte *et al.* gezeigt wurde [340]. Die Autoren beobachteten in ihrer Studie ein ähnliches Verhalten dieser Zellen auf PEG-Oberflächen, die mit Säulen strukturiert wurden. Sie verwendeten bei ihren Untersuchungen, bedingt durch die Strukturierungsmethode, sehr regelmäßig angeordnete und größere Strukturen. Sie beobachteten eine Agglomeration der Zellen auf glatten PEG-Oberflächen und eine verbesserte Adhäsion auf strukturierten PEG-Oberflächen, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit deckt. Für die Alginatfasern könnte dieses Prinzip ebenso zutreffen. Im Bereich der Fasern könnte die Adsorption von Adhäsionsproteinen, die im Kulturmedium durch das FKS vorliegen, bevorzugt stattfinden, was in diesem Bereich Signale zur Integrin-vermittelten Adhäsion bereitstellen würde. Die Kaskade der Zelladhäsion (siehe hierzu auch Abschnitt 2.2.3) könnte hierdurch ausgelöst werden und zu einer Ausbreitung der Zellen führen. Gerüststrukturen basierend auf Alginatfasern sind durch das sog. Elektro-Spinnen hinlänglich bekannt [341, 342]. In den Studien von Nie *et al.* und Jeong *et al.* wird jedoch berichtet, dass sich reine Na-Alginat nicht dafür eignen, da die produzierten Fasern uneinheitlich in ihrer Dicke sind [342, 343]. Für eine Verbesserung der Faserbildung werden in beiden Studien Substanzen wie Glycerin [342] oder Polyethylenoxid [343] hinzugesetzt. Nach dem Spinnen und Vernetzen der Komponenten, müssen einige Komponenten jedoch ausgewaschen werden, um zytotoxische Effekte zu vermeiden [343]. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Protokoll zur Strukturierung von Alginaten mit Fasern, benötigt keine weiteren chemischen Zusätze und kann mit nativen Na-Alginat erfolgen. Die Faserlängen sind durch die Dicke der Membranen auf etwa 10 µm festgelegt und bilden in der Konsequenz auch kein Netzwerk, was sie von den Fasern durch Elektro-Spinnen wesentlich unterscheidet (siehe z. B. [341]). Es konnte jedoch bereits in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine Adaptation des Verfahrens durch eine Änderung der Membran (Silizium-Chip), die Herstellung eines komplexen Fasergeflechts aus Alginat erlaubt (siehe hierzu Abbildung 37), was mit dem Elektro-Spinnen vergleichbar ist. Durch die Immobilisierung der Fasern auf einer Alginatmembran eignen sich diese Gerüststrukturen nach derzeitiger Einschätzung exzellent für die Entwicklung zellbasierter Modelle. Die Herstellung dieser Netzwerke über einen Silizium-Chip hat signifikante Vorteile gegenüber dem Elektro-Spinnen, insbesondere bei Alginat. In der Arbeit von Jeong *et al.* wird ein solches Netzwerk mittels Elektro-Spinnen hergestellt [343]. Bei der Herstellung der Fasern wird hier ein elektrisches Feld mit einer Stärke von 11 kV angelegt. Der Einfluss auf empfindliche Zellen, wie hiPSCs, muss hier ebenso kritisch betrachtet werden wie das hinzugefügte Polyethylenoxid (PEO). Der Chip-basierte Prozess, der in dieser Arbeit entwickelt wurde, findet unter physiologischen Bedingungen statt und wurde in dieser Art und Weise erstmals zur Herstellung von Alginat-Netzwerken angewendet.

### **Metallisierung von Alginat-Gerüststrukturen**

In Abschnitt 4.3.3 wurde erstmalig die Modifikation von Alginaten durch eine dünne Metallschicht etabliert und deren Einfluss auf verschiedene Zellsysteme untersucht. Angewendet auf planare Alginat-Oberflächen konnte gezeigt werden, dass eine Metallschicht aus abgeschiedenem Titan als Biofunktionalisierung verwendet werden kann. In einer vergleichenden Untersuchung wurden die Oberflächen mehrerer Materialien nach der Funktionalisierung im zellbiologischen Experiment mit hMSCs untersucht. Eine Zelladhäsion auf den Oberflächen mit nativem Ba-Alginat war nicht zu beobachten, ebenso auf nativem Na-Alginat, das mit dem Metall funktionalisiert wurde. Bei der ersten Oberfläche kann dies auf die schon beschriebenen Eigenschaften des Alginats zurückgeführt werden, wohingegen bei der zweiten Oberfläche aufgrund der nicht durchgeführten Vernetzung eine Desintegration des Alginats erfolgte. Bei der TCPS-

Oberfläche war eine hohe Zelladhäsion zu beobachten. Sie stellte gleichzeitig die Referenz für die Experimente dar, da hMSCs als Charakteristik die Plastik-Adhärenz besitzen. Durch das Aufbringen der Metallschicht auf TCPS und der beobachteten Zelladhäsion auf dieser Kulturfläche konnte ferner geschlossen werden, dass hMSCs generell auf den Metallschichten adhären können. Dieses Phänomen wird auch in der Literatur beschrieben, jedoch nicht im Zusammenhang mit Alginaten [313, 344, 345], sondern bei Implantaten um beispielsweise ein Zahnimplantat in das vorhandene Knochengewebe zu integrieren (Osseointegration) [346]. Bei der Beschichtung des Ba-Alginats, die im Fokus der Untersuchungen stand, konnte durch die Zellversuche ebenso gezeigt werden, dass diese Modifikation zum einen möglich ist, zum anderen die Oberfläche derart modifiziert, dass hMSCs adhären können. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine Metallisierung von Alginat durch Titan eine adhäsive Oberfläche für adhärente Zellen generiert. Bei den Oberflächen TCPS, TCPS-Ti, sowie G-Alg-Ti konnten vergleichbare Adhäsionsraten von etwa 80% gemessen werden, wohingegen die Adhäsionsrate auf G-Alg lediglich bei 5% lag. Nimmt man die Oberflächen TCPS und TCPS-Ti als Referenz und vergleicht diese mit G-Alg-Ti, so können die Unterschiede der in den Versuchen gemessenen Zellfläche mehrere Ursachen haben. Zum einen liegt bei der TCPS-basierten Oberfläche eine geringere Elastizität vor, wohingegen bei G-Alg-Ti eine höhere Elastizität vorliegt. Es ist mittlerweile bekannt, dass durch die mechanischen Eigenschaften des Kultivierungssubstrats unterschiedliche Morphologien [347] und auch Genexpressionen [173] auftreten können. Insbesondere Engler *et al.* konnten zeigen, dass sich die Zellfläche mit sinkender Elastizität des Substrats vergrößert [347]. Die direkte Interaktion der Zellen erfolgt zwar auf der funktionalisierten Oberfläche, jedoch liegen Studien vor, die belegen, dass Zellen die physiko-chemischen Eigenschaften des Substrats über mehrere Mikrometer erfassen können [170, 348] und dadurch auch die tieferliegende Polystyren- bzw. Alginschicht einen Einfluss auf die Zellen hat. Dieser Mechanismus ist als „*Mechanosensing*“ bzw. „*Mechanotransduktion*“ bekannt. Bei hMSCs auf titanisierter Alginat-Oberfläche könnte dies auch über eine Modulation der eigenen ECM erfolgen, die Li *et al.* in einem anderen Zusammenhang für hMSCs beschrieben haben [226]. Fibrilläres Fibronectin fungiert demnach als indirekter Sensor, da es je nach E-Modul der Oberfläche gestreckt oder kondensiert vorliegt. Bei gestreckter Konformation, die bei hohem E-Modul vorliegt, sind Abschnitte des Proteins erreichbar, die mit einem bestimmten Transmembranprotein (in diesem Fall eine bestimmte Klasse an Integrinen) der Zellen interagieren können. Dies hätte zur Folge, dass weniger Adhäsionsstellen zur Verfügung stehen und dadurch die Aktinfilamente keine langen Stressfasern ausbilden. In diesem Zusammenhang kann man das gemessene Migrationsverhalten der hMSCs auf den Oberflächen diskutieren. Die langsamsten Migrationsgeschwindigkeiten konnten bei den TCPS-basierten Oberflächen gemessen werden, gefolgt von G-Alg-Ti, auf denen sich die Zellen minimal schneller bewegten. Auf den G-Alg war die Migrationsgeschwindigkeit am größten, wobei hier die Migration als *Schwimmen* bezeichnet werden kann, da die Zellen aufgrund der ausbleibenden Zell-Matrix-Interaktion frei über die Oberfläche schwimmen. Bei G-Alg-Ti ist unter Umständen auch die negative Ladung des Alginats und dadurch eine elektrostatische Wechselwirkung (Abstoßung) für die unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeiten verantwortlich. Eine negativ geladene Oberfläche eines hydratisierten Materials kann eine schnellere Migrationsgeschwindigkeit der Zellen zur Folge haben, wie bereits Han *et al.* in einer Studie zeigen konnten [349].

Der generelle Mechanismus der Adhäsion auf Alginat muss über die Eigenschaften der Titan-Funktionalisierung diskutiert werden. Die Funktionalisierung selbst bietet keine Moleküle, die direkt mit den Zellen in Interaktion treten und die Integrin-vermittelte Adhäsion auslösen können. Wie bereits erläutert, beruht die Zelladhäsion auf einer Kaskade von Ereignissen im Zusammenhang mit der Interaktion und Adsorption von Proteinen auf Oberflächen. Proteine aus dem Serum adsorbieren und liefern die Signale für die Integrin-vermittelte Interaktion [145]. Durch REM-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Metallschicht mit einer Erhöhung der Rauigkeit einhergeht (vgl. Abbildung 43). Diese Beobachtung basiert auf Messungen von sphärischen Alginat-Gerüststrukturen, es kann jedoch angenommen werden, dass dies ebenso für planare Oberflächen gültig ist. Für die Adhäsion der Zellen auf Alginat-

Gerüststrukturen wird daher analog zur Aussage in [145] die Hypothese aufgestellt, dass zunächst Proteine aus dem Medium auf der Metallschicht adsorbieren können. Proteine des Serums, wie Fibronectin oder Vitronectin, sind dadurch auf der Oberfläche vorhanden und können die Adhäsion über Integrine vermitteln [145]. Diese Hypothese wird durch eine Studie von Yang *et al.* untermauert, in der von einer hohen Adsorption von Fibronectin auf Titanoberflächen berichtet wird und in der Konsequenz eine Adhäsion von Osteoblasten ermöglicht [350].

Neben der Kultivierung von hMSCs auf planaren Oberflächen wurde diese Funktionalisierung auf sphärische Alginate-Gerüststrukturen übertragen. Die Herausforderung ist hierbei die Präparation der Alginatekugeln für die Funktionalisierung, da diese im Vakuum stattfindet und die Proben daher im getrockneten Zustand prozessiert werden müssen. Durch den hohen Wasseranteil der Alginate-Hydrogele verlieren die Kugeln durch das Trocknen sehr viel an Volumen und besitzen eine entsprechend geringe Oberfläche im Vergleich zum rehydratisierten Zustand. Hier liegt auch die Hauptproblematik, da das Titan auf die geschrumpften, trockenen Alginatekugeln aufgebracht wird und diese danach für die Versuche wieder rehydratisiert werden müssen. Die Fläche, die letztendlich beschichtet wird, ist durch die Dimensionen der getrockneten Alginatekugeln festgelegt. Messungen haben ergeben, dass je nach Trocknungsmethode der Durchmesser um bis zu 65% verkleinert wird. Anhand von Adhäsionsversuchen von hMSCs und murinen Fibroblasten wurde diese Biofunktionalisierung weiter untersucht. Bei den Alginatekugeln, die entweder luftgetrocknet oder per CPD getrocknet wurden, ist nur ein kleiner Teil der Funktionalisierung für die Zellen verfügbar, aufgrund der Diskrepanz zwischen Größe vor und nach dem Trocknen und der folgenden Funktionalisierung. Proteine können auf der Titanschicht weiterhin adsorbieren, jedoch sind entweder die Abstände dieser funktionalen Stellen soweit voneinander entfernt, dass eine Adhäsion nicht möglich ist oder die durch das Schwellen entstandenen Alginateflächen beeinflussen durch die Hydrophilie die Proteinadsorption negativ. Aus einer Studie von Lehnert *et al.* resultiert ein Abstand benachbarter Protein-Spots, der kleiner als 20 µm sein muss, um eine Zelladhäsion zu gewährleisten [351]. Die Titan-Spots auf den Alginatekugeln lagen nach Rehydratisierung etwa 10 µm voneinander entfernt. Für murine Fibroblasten scheinen diese Eigenschaften für eine Adhäsion ausreichend, wohingegen für hMSCs die Oberfläche hierdurch für eine Adhäsion unzureichend ist. Durch das Aufquellen der Alginate-Gerüststruktur während der Rehydratisierung entstehen nicht beschichtete Bereiche, die das Adhäsionsverhalten durch z. B. die negativen Ladungen des Alginats beeinflussen können. Dennoch bleibt die Hauptproblematik die Trocknung und Beschichtung, die für planare oder sphärische Gerüststrukturen praktikabel sind, jedoch für diffizilere Strukturen (wie z. B. die Faserstrukturen aus Abschnitt 4.3.1) an ihre Grenzen stoßen. Diese Funktionalisierung ist für Alginate interessant, da zwei Materialien miteinander kombiniert werden, die bereits in der regenerativen Medizin und dem *Tissue Engineering* eingesetzt werden. Die Modifikation erfolgt darüber hinaus mit einer physikalischen Methode, die u.a. für weitere Medizinprodukte (z. B. Gazen oder Stents) eingesetzt wird [352] und aufgrund der Methodik keine chemischen Zusätze benötigt, die zytotoxisch wirken könnten.

#### ***Nicht-kovalente Modifikation von Alginate-Gerüststrukturen mit ECM-Proteinen***

Die Mischung von Alginate-Hydrogelen mit Proteinen der extrazellulären Matrix stellt einen weiteren Ansatz dar, um spezifische Signale mit dem Alginate zu kombinieren, die von den Zellen zur Adhäsion erkannt werden sollen. Damit die Proteine nicht durch das Alginate selbst umhüllt werden, war eine Aufkonzentrierung an der Oberfläche notwendig, was durch Erhitzen erfolgte. Erst nach diesem Schritt wurde das Alginate vernetzt. Bei diesem Schritt konnte man ein verändertes Benetzungsverhalten beobachten: die Flüssigkeit verteilte sich nicht direkt auf der Oberfläche, sondern bildete zunächst erkennbare Tropfen. Dieses Verhalten kann dadurch erklärt werden, dass ein geringerer Anteil an hydrophilem Alginate an der Oberfläche vorhanden ist, und durch hydrophobe Proteine, die in der ECM-Mischung enthalten sind, an der Oberfläche aufkonzentriert wurden. Generell gilt jedoch, dass sich Proteine an der Wasser-Luft-Grenzfläche anlagern und dabei Konformationsänderungen (z. B. Auffaltung globulärer Proteine [353]) auftreten können

[354]. Es kann hierbei angenommen werden, dass die Aufkonzentrierung durch Erhitzen diesen Prozess beschleunigt und zusätzlich Effekte, wie z. B. eine Phasentrennung, zwischen den negativ geladenen Polymeren des Alginats und den Proteinen hervorruft. Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass eine solche Modifikation des Alginats für eine Steigerung der Adhäsivität ausreicht, um hiPSCs über mehrere Tage adhären zu kultivieren. Damit konnte im Gegensatz zu der Studie von [177] gezeigt werden, dass zum einen komplexe Proteinmischungen eingesetzt werden können, und zum anderen auch pluripotente Stammzellen auf diesem Substrat kultiviert werden können. Der Einfluss der Oberfläche konnte anhand der Morphologie (Fläche und Zirkularität) bestimmt werden (Abbildung 45). Die geringere Fläche und höhere Zirkularität lassen auf tendenziell kompakte hiPSCs schließen. Insbesondere die höhere Zirkularität ist ein Indiz für eine Tendenz zur Bildung (dreidimensionaler) Aggregate. Eine mögliche Erklärung kann hierfür eine unregelmäßige Verteilung der ECM-Proteine auf der Kulturoberfläche sein. In der Folge könnten hiPSC-Kolonien nur partiell anhaften und dann in einer Aggregat-ähnlichen Konformation vorliegen. Ebenso kann die schon im vorherigen Abschnitt beschriebene Mechanotransduktion für diese Morphologie verantwortlich sein. Es konnte bei hiPSCs nachgewiesen werden, dass weiche Substrate die Phosphorylierung von Smad 1/5/8 inhibieren und gleichzeitig ein Abbau der Aktin-Filamente erfolgt [355, 356]. Durch die nicht vorhandenen Stressfasern ist einerseits die Morphologie erklärbar, andererseits könnten in bestimmten Bereichen der Kolonie Suspensions-ähnlichen Zustände vorliegen, die die Gesamtmorphologie der Kolonie erklären.

Mit dieser modifizierten Alginat-Oberfläche konnte darüber hinaus eine Destruktion durch eine Alginatlyase erreicht werden (Abbildung 46), was von biotechnologischem Nutzen sein kann. In dieser Arbeit konnten zum ersten Mal pluripotente Stammzellen mittels einer Alginatlyase von einer Gerüststruktur abgelöst und wieder ausgesät werden. Die zusätzliche Schicht eines Hydrogels könnte darüber hinaus von Interesse für ein mechanisches Ablösen und Transferieren der Zellen sein. Mit Werkzeugen könnte ein Bereich um die Kolonie ausgestanzt werden und die Gerüststruktur unterhalb der Kolonie mechanisch gelöst werden. Die mechanische Belastung für die Zellen wäre hier sehr gering, da nur eine Bearbeitung der Gerüststruktur erfolgt.

Es wird angenommen, dass eine Übertragung auf sphärische Alginat-Mikroträger durch die Aufkonzentrierung des Proteins durch hohe Temperaturen nicht trivial ist, da sie im flüssigen Zustand vorgenommen werden müsste. Es müsste ein zusätzliches Modul an die Verkapselungsanlage integriert werden, das den Alginat/Protein-Tropfen während des Eintropfvorgangs aufheizt. Durch das geringe Volumen des Tropfens ist dies durchaus realistisch und kann Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.

### ***Chemische Modifikation durch ECM-Proteine von Alginat-Gerüststrukturen***

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass die kovalente Kopplung von Proteinen an Gerüststrukturen aus Alginat die vielversprechendste Methode zur Biofunktionalisierung ist. Nach Etablierung eines Protokolls zur Kopplung von Kollagen I an UHV-Alginate konnte gezeigt werden, dass hiermit sowohl planare Gerüststrukturen, als auch sphärische Gerüststrukturen derart modifiziert werden können, dass eine Kultivierung von humanen (mesenchymalen) Stammzellen darauf möglich ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Gerüststrukturen sowohl in statischer Kultur (Standard 2D, sowie im *hängenden Tropfen*), als auch in durchmischten Bioreaktoren einsetzbar sind, und eine Kultivierung und Expansion adhärenter Zellen erlaubt. Die optischen Eigenschaften des Alginats bleiben während der Funktionalisierung erhalten, so dass Phasenkontrast- als auch Fluoreszenzmikroskopie an diesen Proben möglich ist.

### ***Adhäsion von hMSCs auf Alginat-Gerüststrukturen***

Das Adhäsionsverhalten von hMSCs wurde dabei auf planaren Oberflächen untersucht und eine exzellente Adhäsionsrate auch bei geringer gekoppelter Proteinkonzentration gemessen (siehe Abbildung 48 und

Abbildung 49). Bei einer sehr geringen Proteinkonzentration wurde dabei eine verringerte Reproduzierbarkeit festgestellt, was mit der Vorgehensweise der Kopplungsreaktion (keine Bewegung der Proben) zusammenhängt. Hierdurch sind besonders geringe Proteinkonzentrationen kritisch anzusehen. Die Adhäsionsrate war bei den übrigen Konzentrationen vergleichbar hoch (>80%), so dass mit einer Konzentration von z. B. 37,5 bzw. 75 µg/ml pro 10 cm<sup>2</sup> eine Biofunktionalisierung erfolgen kann, die für die Adhäsion der Zellen ausreicht. Die Herstellerangaben der verwendeten Kollagen I -Lösung empfehlen eine Beschichtung von 5 µg/cm<sup>2</sup> (über Adsorption), die mit der Konzentration der Funktionalisierung vergleichbar ist. Es konnte somit bereits in den ersten Versuchen gezeigt werden, dass eine Adhäsion durch eine kovalente Kopplung von Kollagen I auf UHV-Alginaten erreicht werden kann. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Adhäsionsrate vergleichbar mit der von Standard TCPS-Oberflächen ist (Abbildung 48). Durch die Modifikation über das verwendete nasschemische Verfahren, war es möglich, einen direkten Transfer des Protokolls auf sphärische Alginat-Gerüststrukturen durchzuführen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass tatsächlich nur die Kombination von der Aktivierungslösung (EDC/NHS) und dem Protein (Kollagen I) zu einer Zelladhäsion auf Alginat-Mikroträgern führen kann (vgl. Abbildung 53). Auf den vollständig funktionalisierten Alginat-Mikroträgern konnte nach 4 Tagen eine vollständige Konfluenz beobachtet werden, die neben der Adhäsion auch auf eine Proliferation der Zellen schließen lässt. Die experimentellen Ergebnisse lassen somit den Schluss zu, dass durch die Verwendung eines Carbodiimids (EDC), Proteine über eine Amidbindung stabil an ultra-hoch viskose Ba-Alginat gekoppelt werden können, die aus dem bioinerten Alginat eine attraktive Adhäsionsoberfläche generieren.

Eine direkte kovalente Kopplung von Kollagen I an ein vernetztes Alginathydrogel mit einer resultierenden Adhäsivität für adulte humane Stammzellen wurde, nach bestem Wissen, zum ersten Mal in dieser Arbeit gezeigt. Darüber hinaus konnte bisher noch keine Studie die Langzeit-Stabilität eines derartig modifizierten Alginats in durchmischten Bioreaktoren für eine adhärenente Suspensionskultur von humanen adulten Stammzellen nachweisen. In weiteren Studien erfolgte eine Kopplung lediglich an Alginat mit geringerer Viskosität und es wurden dabei nur Peptide verwendet [125, 357]. Eine Kopplung von Kollagen-Hydrolysat, also Fragmente des Proteins, erfolgte in [129], jedoch wurde hier lediglich die Zytotoxizität des Alginat-Derivats gemessen und die Zellen nicht direkt auf dem modifizierten Alginat kultiviert. Eine Kombination von UHV-Alginaten mit Kollagen erfolgte ohne kovalente Kopplung in [358], wobei hier sehr hohe Proteinkonzentrationen verwendet wurden und angenommen werden kann, dass die Modifikation durch eine Selbstassemblierung des Kollagens um den Alginat-Mikroträger erfolgt, wie sie auch in [359] beschrieben wird. Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Verfahren zur Herstellung von Alginat-Mikroträgern nutzt eine sehr geringe Konzentration von Kollagen I für die Kopplung, so dass eine Selbstassemblierung zwar prinzipiell möglich ist, diese jedoch nicht ausreicht, um eine Zell-Matrix-Interaktion hervorzurufen (siehe hierzu Abbildung 52 und Abbildung 53). Die Autoren der beiden zitierten Studien verwendeten Konzentrationen, die mit 0,1 mg/ml [359] bzw. 0,5 mg/ml [358] um ein Vielfaches höher ist und die Selbstassemblierung während des pH-Anstiegs hervorruft. Aussagen über die Stabilität des Mikroträgers wurden nicht gemacht, da hier eine statische Kultur erfolgte [358]. Alginat-Mikroträger mit Gelatine wurden in [360] untersucht. Hierbei erfolgte die Modifikation nicht auf den Alginat-Mikroträgern, sondern man nutzte die Kopplungsreaktion, um das Alginat über das Protein zu vernetzen.

In einer Studie von Yamamoto *et al.* wird Fibronectin kovalent an Alginat gekoppelt [361]. Sie benutzten aber kein UHV-Alginat und keine sphärischen Gerüststrukturen, sondern wabenförmige Gerüststrukturen und konnten die Biofunktionalität auch nur bei Endothelzellen und bei humanen Stammzellen (hMSCs) nachweisen. In Bioreaktoren wird die Kultivierung und Expansion von hMSCs auf Mikroträgern zwar intensiv untersucht, jedoch verwenden viele Studien kommerziell erhältliche Mikroträger, die zumeist auf Dextran (Cytodex-Mikroträger) basieren [362-370].

Die Zytotoxizität des in dieser Arbeit für sphärische Alginat-Gerüststrukturen entwickelten Protokolls zeigt bei den hergestellten Extrakten keine Auffälligkeiten über den alamarBlue Tests. Die metabolische

Aktivität der Proben, die mit den Extrakten inkubiert wurden war auf einem vergleichbaren Level wie die Kontrollzellen, die in Standardkulturmedium inkubiert wurden. Moleküle, die möglicherweise in der porösen Struktur des Alginats während der Modifikation akkumulierten sind somit ausreichend durch die anschließenden Waschschriffe entfernt worden. Zytotoxische Effekte auf die Zellen wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurden [371], z. B. die Poration der Zellmembran [372], sind damit ausschließbar. Von NHS ist generell keine krebserregende oder toxische Wirkung bekannt [373].

Die Analyse der Mikroträger-Oberfläche mittels REM (siehe Abbildung 56) zeigte bei den nativen Alginat-Mikroträgern ohne Modifikation eine Wulst-artige Topographie, deren Oberfläche wiederum glatt ist (siehe Abbildung 56 a). Die Alginat-Mikroträger haben dabei längsgerichtete Wülste, sowie an einer Stelle isotrope Wülste. Hier ist es denkbar, dass diese Struktur durch das Eintropfen in das Fällbad entsteht. Die längsgerichteten Wülste entstehen wahrscheinlich während der Eintauchphase des Alginattropfens. Die isotropen Wülste entstehen demnach entweder durch den ersten Kontakt des Fällbads mit dem Alginattropfen oder durch das finale Umschließen der durch das Eintauchen entstandenen Kavität. Ein Artefakt durch die Trocknung kann nicht ausgeschlossen werden. Weitere REM-Aufnahmen in anderen Studien zeigen eine ähnliche Struktur [374-377], wobei Pasparakis *et al.* in ihrer Studie derartige Strukturen mit dem Kollabieren des Polymernetzwerks während der Trocknung erklären [378]. An dieser Stelle kann darüber spekuliert werden, ob die längsgerichteten Wülste und die isotropen Wülste zwar durch die Kollabierung des Netzwerks entstehen, aber deren Ausrichtung dennoch durch den Eintropfvorgang definiert wird. Bei den modifizierten Alginat-Mikroträgern sind diese Wulst-artigen Strukturen ebenso vorhanden, mit dem Unterschied, dass deren Oberfläche nicht mehr glatt ist, sondern über eine Rauigkeit verfügt (siehe Abbildung 56 b). Diese Rauigkeit ist ein indirekter Nachweis für das Vorhandensein von Kollagen I auf der Alginat-Oberfläche und bestätigt ebenso die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalyse (siehe Abbildung 52).

Nach den ersten erfolgreichen Experimenten bzgl. der Adhäsivität der entwickelten Gerüststrukturen, wurde die Proliferation der Zellen auf diesen Substraten untersucht. Es zeigte sich bei hMSCs, dass im Vergleich zur Standard-Kulturoberfläche (TCPS mit und ohne Kollagen-Beschichtung) Alginat-Gerüststrukturen mit Kollagen I-Modifikation eine deutlich geringere Proliferationsrate besaßen (22-fach bei TCPS mit Kollagen, 18-fach bei TCPS ohne Kollagen und 10-fach bei Alginat mit Kollagen). Eine Erklärung für dieses Verhalten kann durch die unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften der Oberflächen hergeleitet werden. Bei der Alginat-Gerüststruktur sind zwei Schichten zu betrachten: zum einen die Kollagenschicht, aber auch die darunterliegende Alginatschicht. Deren Eigenschaften (Ladung, Hydrophilität, Hydratisierung) kann, durch die dünne Proteinschicht, von den Zellen erfasst werden und sich auf das Proliferationsverhalten auswirken [170]. Ebenso befinden sich die Zellen auf Substraten unterschiedlicher Elastizität bzw. Festigkeit (*stiffness*). Über Integrine, die mit der ECM interagieren, können extrazelluläre mechanische Signale ins Innere der Zelle übertragen werden. Je nach Ausbildung der Fokalkontakte wird die Kontraktilität des Aktomyosin-Komplexes beeinflusst. Die Analysen des Zytoskeletts auf Oberflächen mit hohem Elastizitäts-Modul (TCPS), als auch niedrigerem E-Modul (Alginat mit Kollagen I bzw. Alginat mit Tyramin) untermauern diese Hypothese, da eine unterschiedliche Ausprägung des Zytoskeletts in Form des F-Aktins beobachtet werden kann (vgl. Abbildung 50). Auf TCPS sind die F-Aktinfilamente deutlich markanter ausgeprägt, verglichen mit den modifizierten Alginatstrukturen, auf denen die Zellen zwar F-Aktin positiv sind, die F-Aktinfilamente jedoch nicht markant ausgeprägt sind. Das Zytoskelett selbst ist über die sog. Nesprine mit der Kernmembran verbunden [379]. Der Einfluss der Nesprine auf das zelluläre Verhalten wie Migration oder Zellmorphologie [380], aber auch Proliferation [380] ist bekannt. Es ist daher höchstwahrscheinlich, dass die Beeinflussung der Proliferation von hMSCs und hiPSCs auf Alginat-basierten Gerüststrukturen in ähnlicher Weise reguliert wird. Bei den Oberflächen TCPS und TCPS mit Kollagen ist dieser Unterschied durch die geringe Beladung mit Kollagen eher gering und resultiert demnach auch in nicht signifikanten Unterschieden bzgl. der Proliferation. Dahingegen liegt bei dem Alginat ein sehr weiches Substrat vor, was von den Zellen ebenfalls detektiert (Mechanotransduktion) werden kann [381]. Bei mesenchymalen Stammzellen erfolgt dies insbesondere über die Zell-Matrix-



Kontakte, wohingegen bei Epithelzellen neben diesen auch Zell-Zell-Kontakte involviert sind [382]. In einer Studie von Mih *et al.* wird ein Screeningverfahren für die Untersuchung von Substraten mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften [383] beschrieben. Auch aus ihren Daten geht hervor, dass die Proliferationsrate bei hMSCs mit Elastizitätsmodul wächst. Umgekehrt zeigten L929-Fibroblasten vergleichbare Proliferationsraten unabhängig von den mechanischen Eigenschaften des Substrats [383].

### **Inwieweit ist die Biofunktionalisierung auf weitere biotechnologische Anwendungen übertragbar?**

Nach den Untersuchungen von Adhäsivität und Proliferation von hMSCs auf den mit Kollagen I biofunktionalisierten Oberflächen konnte geschlussfolgert werden, dass diese Funktionalisierung die bestmögliche zelluläre Antwort, auch im Vergleich mit den zuvor durchgeführten Untersuchungen, liefert. Nach der statischen Kultur wurde daher die Kultivierung in ein durchmisches Mini-Bioreaktorsystem übertragen. Das verwendete System (Hamilton Biolevitator) ist speziell für diese Anwendung ausgelegt und erlaubt Ansätze im kleinen Maßstab (bis zu 40 ml). Die Ergebnisse der Kultivierung von hMSCs auf modifizierten Alginat-Mikroträgern in zwei verschiedenen Größen zeigten, dass die Modifikation nicht nur für eine statische Kultur im *hängenden Tropfen*, sondern auch im durchmischten Bioreaktor exzellent geeignet ist.

Dies ist insbesondere bemerkenswert, da die Art der Kultivierung nur eine kurze Kontaktzeit von Mikroträger und Zelle erlaubt. Die Modifikation in Form der Kollagenbeschichtung ermöglicht den Zellen demnach bei Kontakt eine direkte Interaktion, die ausreicht um auch bei erneuter Durchmischung haften zu bleiben und letztendlich zu adhären. Es kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur spezifische Adhäsionssignale auf der Oberfläche vorhanden sind, sondern auch die (negative) Ladung des Alginats so geändert wurde, dass keine elektrostatische Repulsion erfolgt. Die zeitliche Abfolge der Zell-Mikroträger-Interaktion (Abbildung 57 a und b), zeigt die Geschwindigkeit der Adhäsion auf. Die Mikroträger wurden nur kurz durch eine Zellsuspension bewegt und dann per Lebendzell-Mikroskopie die Adhäsion beobachtet. Bereits 5 min nach Kontakt zeigt sich ein sukzessives Ausbreiten der Zellen auf der Oberfläche. In dem verwendeten Kultivierungsprogramm für diese Versuche erfolgt über einen Zeitraum von 4 h die Inokulation, bei der 2 min die Kultur durchmischt wird und danach eine statische Phase von 10 min folgt (Tabelle 4). Dieses Ergebnis deckt sich damit auch mit den Beobachtungen, die im Zusammenhang mit der zweidimensionalen Alginat-Oberfläche gemacht wurden (Abbildung 48 und Abbildung 49), die ebenso auf eine schnelle Adhäsion und Ausbreitung der Zellen schließen lassen. Diese Beobachtung wird ferner durch die gemessenen Adhäsionsraten auf den Mikroträgern während der Inokulationsphase bestätigt (Abbildung 52). Auf den kommerziell erhältlichen Cytodex-Mikroträgern werden, verglichen mit den Alginat-Mikroträgern, insgesamt geringere Zellzahlen gemessen. Die höchsten Zellzahlen waren bei den Alginat-Mikroträgern mit einem Durchmesser von 600 µm vorhanden. Dieses Ergebnis lässt sich durch die unterschiedlichen Oberflächen der Mikroträger erklären. Während der Inokulation werden Zellen und Mikroträger zyklisch durchmischt und kommen während dieser Phase, aber auch während der Ruhephase zwischen den Zyklen in Kontakt. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle einen Mikroträger kontaktiert, ist natürlich bei größeren Mikroträgern höher. Folglich adhären mehr Zellen auf den großen Alginat-Mikroträgern. Ferner kann die Sedimentationsgeschwindigkeit der Mikroträger bei diesem Vorgang eine Rolle spielen, insbesondere während der Ruhephase der Inokulation. Die Sedimentationsgeschwindigkeit steigt in folgender Reihenfolge: Zellen < Dextran-Mikroträger < Alginat-Mikroträger. Folglich befinden sich zu einem bestimmten Zeitpunkt mehr Alginat-Mikroträger auf dem Reaktorboden verglichen mit den Dextran-Mikroträgern, bevor die Zellen auf diesen sedimentieren.

Mit den Experimenten im Bioreaktor konnte gezeigt werden, dass je nach Material und Größe die Zellzahl pro Mikroträger variiert werden kann. Ferner ist die initiale Zellzahl pro Mikroträger entscheidend für die Effizienz der Kultivierung, da diese über den Zeitpunkt der vollständigen Konfluenz eines Mikroträgers entscheidet [384] und insgesamt die Lag-Phasen und Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen beeinflusst [385]. Für FS-4 Fibroblasten wurde diese z. B. auf 6 Zellen pro Mikroträger bestimmt [384]. Bei diesen

Mikroträgern handelte es sich um Sephadex G50-80 mit einem Durchmesser von 170-185  $\mu\text{m}$ . Diese Dextran-basierten Mikroträger liegen damit in der Größenordnung der kleineren Alginat-Mikroträger, die in dieser Arbeit genutzt wurden. Die Zellzahl, die nach 3 h auf den Alginat-Mikroträgern anhaftete lag im Mittel bei 7 – 8 Zellen pro Mikroträger (vgl. Abbildung 58) und damit im Bereich der postulierten optimalen Zellzahl.

In den durchgeführten Experimenten wurde diese Optimierung noch nicht durchgeführt, da hauptsächlich die Entwicklung des Mikroträgers im Vordergrund stand. Die Konfluenz der Zellen betrug nach 7 Tagen beim Großteil der Mikroträger zwischen 75 – 100% (Abbildung 59), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die gewählten Kultivierungsbedingungen mit den hMSCs kompatibel sind. Die Mikroträger zeigen nach der Kultivierung eine hohe Vitalität und auch die Zellidentität ist bei allen Mikroträgersystemen mit der 2D-Kultur vergleichbar.

Ein in dieser Arbeit nicht gelöstes Problem stellt die Zellernte dar. Nach Kultivierung gelang es nicht, die Zellen von den Mikroträgern enzymatisch abzulösen. Die Ursache hierfür könnte an der starken Zell-Matrix-Interaktion liegen oder generell an Effekten, die durch die Suspensionskultur ausgelöst werden. Die Beobachtung wird untermauert durch eine Studie von Weber *et al.*, die die Ernte von hMSCs von Mikroträgern mit verschiedenen Enzymen untersuchten [386]. Sie zeigten, dass Trypsin oder Accutase diese Zellen innerhalb kurzer Inkubationszeit ablösen konnte, jedoch angewendet auf Mikroträger war dies nicht mehr bei allen möglich. Insbesondere Zellen auf Cytodex-Mikroträgern konnten nicht durch die Enzyme abgelöst werden. Erst die Kombination von Accutase und Trypsin brachte den gewünschten Erfolg bei einigen Mikroträgern, jedoch nicht bei Cytodex [386]. Analoge Untersuchungen müssen demzufolge in Zukunft auch für die Alginat-Mikroträger durchgeführt werden, um die Zellernte in den Workflow zu integrieren, damit die Zellen nach der Expansion auf den Mikroträgern biotechnologisch weiter genutzt werden können.

Eine Möglichkeit diesen Vorgang zu optimieren, könnte in der Nutzung einer AlgL bestehen. Das Enzym katalysiert nicht die Degradierung der Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktion, ermöglicht jedoch die spezifische Degradierung der Alginat-Gerüststrukturen. Die AlgL (Degradierung Gerüststruktur) besitzen gemäß deren Klassifizierung entweder eine Substratspezifität zu den Polysaccharidoligomeren Mannuronsäure (Enzyme Commission Nr. 4.2.2.3) oder Guluronsäure (Enzyme Commission Nr. 4.2.2.11). Proteasen (Degradierung Zellkontakte), wie z. B. Trypsin (Enzyme Commission Nr. 3.4.21.4) katalysieren die Spaltung zwischen den Aminosäuren Arginin und Lysin. Durch die unterschiedlichen Angriffspunkte würde die Degradierung der Alginat-Gerüststruktur durch die AlgL ein Ablösen der Zellen bewirken bei dem, höchstwahrscheinlich, die Zell-Zell-Kontakte weiterhin aufrechterhalten bleiben. Durch die kovalente Kopplung von Proteinen an diese Alginat-Oberfläche ist es möglich, dass diese Grenzfläche besonders stabil ist und als dünne Membran erhalten bleibt (vgl. hierzu auch die Stabilisierung der Alginatgrenzfläche durch interagierende Substanzen in Abbildung 102 und Abbildung 80 c).

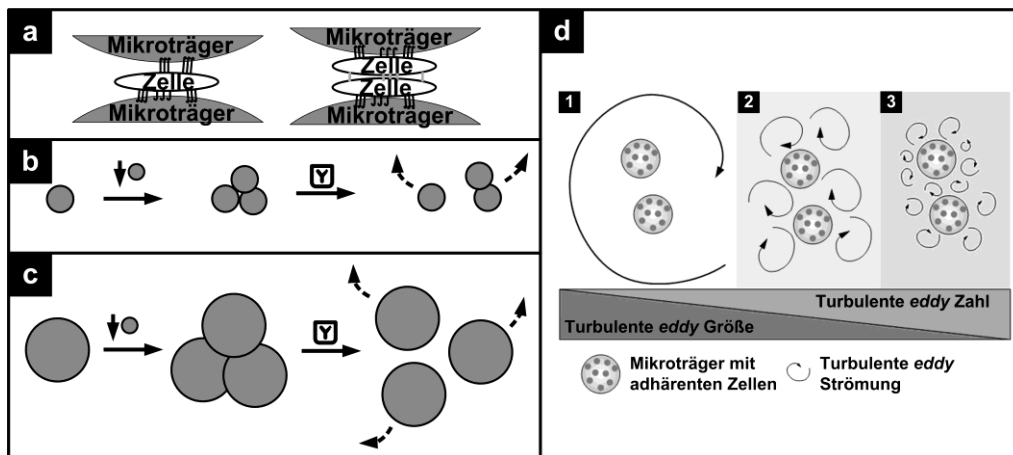
Erste Experimente haben gezeigt, dass Mikroträger, auf denen hMSCs kultiviert wurden, durch die AlgL degradiert werden können und dass die Zellen nach erneuter Kultivierung auf zweidimensionaler TCPS-Oberfläche wieder einen Zellrasen bilden (siehe Abbildung 82). Eine vollständige Degradierung der Mikroträger konnte dabei jedoch nicht erreicht werden. Die Zellen verbleiben auf den hüllartigen Resten der Mikroträger, die höchstwahrscheinlich durch die kovalente Kopplung von Kollagen nicht durch das Enzym degradiert werden können. Ferner ergaben sich Unterschiede in der Degradierung, wenn die Mikroträger aus reinem LT-Alginat bestanden oder aus einer Mischung aus LT und LN (Abbildung 82). Alginat aus LT war nach der Behandlung nur partial degradiert und löste sich erst im Laufe der Re-Kultivierung auf. Dahingegen waren Mikroträger aus der LT und LN-Mischung vollständig degradiert. Diese Beobachtung geht einher mit den Ergebnissen aus Abschnitt 4.4.3, die an späterer Stelle diskutiert werden.

Weitere Messungen zeigten, dass die Mikroträger Unterschiede bzgl. der Aggregation aufzeigten. Generell wurde eine starke Aggregation bei den kleinen Mikroträgern beobachtet, wohingegen die großen Alginat-

Mikroträger kaum Agglomerate bildeten (vgl. Abbildung 59). Da der Energie-Eintrag durch die Rotation der Bioreaktoren bei allen Mikroträgersystemen identisch war, liegt die Ursache hierfür bei den Eigenschaften der Mikroträger selbst und dem zunehmenden Zellbewuchs. Generell gilt bei der Mikroträgerkultur, dass eine Aggregation vermieden werden soll und dies z. B. durch einen größeren Energieeintrag bei der Durchmischung oder Verkürzung der Zeiten der statischen Phase erfolgt [387]. Zeitrasterstudien von Mikroträgern mit hMSCs zeigten, dass eine Aggregation beispielsweise durch Zellen auf adjazenten Mikroträgern erfolgen kann (Abbildung 57). Die Aggregation erfolgt dann sehr wahrscheinlich über Zell-Zell-Kontakte oder über Zell-Matrix-Kontakte über beide Mikroträger (siehe Abbildung 95 a). Durch das erneute Durchmischen der Suspension per Rotation, wirken wiederum Kräfte, die zum einen die Mikroträger aufwirbeln und, vereinfacht dargestellt, eine Kreisbewegung durchführen lassen. Bei dieser Bewegung wirken auf die Mikroträger unterschiedliche mechanische Kräfte, wie z. B. die Zentrifugalkraft. Bei kleineren Agglomeraten ist die Masse eines einzelnen Mikroträgers geringer als bei großen Mikroträgern. Berechnet man für die Alginat-Mikroträger (vgl. Tabelle 9) mit einem Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$  und 600  $\mu\text{m}$  die Masse ( $m = \rho \cdot V$ , wobei  $m = \text{Masse}$ ,  $V = \text{Volumen}$  und  $\rho = \text{Dichte}$ ), so ergibt sich eine Masse von 4,2 mg für einen Mikroträger mit dem Durchmesser 200  $\mu\text{m}$  und eine Masse von 218 mg für einen Mikroträger mit dem Durchmesser von 600  $\mu\text{m}$ . Somit liegt ein Unterschied um das 50-fache vor. Für die Zentrifugalkraft ( $F_{Zen} = m \cdot \frac{v^2}{r}$ ) würde dieses Verhältnis auch für die Kraft gelten, unter der Voraussetzung, dass Term  $\frac{v^2}{r}$  mit  $v = \text{Geschwindigkeit}$  und  $r = \text{Radius}$  konstant ist. Die auf die Mikroträger (Durchmesser von 200  $\mu\text{m}$ ) wirkenden Kräfte könnten dabei ausreichen, um die Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Kontakte weiter bestehen zu lassen bzw. die Interaktion überhaupt erst zuzulassen (siehe Abbildung 95 b). Bei Mikroträgern mit größerer Masse ist die Kraft jedoch so groß, dass die Kontakte zwischen Zellen und/oder Mikroträgern auseinandergerissen werden und das Agglomerat dadurch wieder getrennt wird (siehe Abbildung 95 c). Durch das Funktionsprinzip des genutzten Bioreaktors in Kombination mit den integrierten Strombrechern kann diese Hypothese jedoch hinterfragt werden, da die Mikroträger keine Kreisbewegung durchführen, sondern durch die Durchmischung im Bioreaktor eher aufgewirbelt werden. In den Arbeiten von Cherry *et al.* [388] und Jossen *et al.* [389] wird ein weiterer Effekt beschrieben, der auf die Mikroträgersysteme in Bioreaktoren wirken kann. Turbulente Strömungen (sog. *Eddies*) interagieren je nach Größe mit den Mikroträgern und den darauf befindlichen Zellen (Abbildung 95 d), wobei das Größenverhältnis zwischen *Eddies* und Mikroträgern von entscheidender Bedeutung ist [388]. Sind die *Eddies* größer als die Mikroträger, so wirkt sich dies nur in Form einer Beschleunigung der Mikroträger aus. Gleichgroße *Eddies* interagieren mit Teilen der Mikroträgeroberfläche und führen zu einer Rotation. *Eddies*, die kleiner als die Mikroträger sind, interagieren stark mit der Oberfläche und somit mit den darauf befindlichen Zellen. Der ausgeübte Scherstress kann zum Ablösen bzw. zur Schädigung der Zellen führen. [388]. Da Zellschädigungen, wie bereits erwähnt, nicht festgestellt wurden, und die Eddy-Größe durch die identischen Kultivierungseinstellungen ebenso identisch waren, könnte die Eddy-Größe im Bereich der großen Mikroträger liegen. Eine Beschleunigung der kleinen Mikroträger und eine Rotation der großen Mikroträger wäre die Folge, die auch leicht aggregierte größere Mikroträger wieder trennen könnte. Die hydrodynamischen Effekte in den genutzten Bioreaktoren müssen für weiterführende Experimente untersucht werden, da hierdurch die Parameter verfeinert werden können um beispielsweise humane pluripotente Stammzellen optimal kultivieren zu können, die wesentlich empfindlicher gegenüber Scherstress sind als hMSCs. Negative hydrodynamische Effekte durch die Eddy-Größe könnte demnach auch durch die Auswahl einer kompatiblen Mikroträgergröße für das System ausgeglichen werden und nicht nur durch die Reduzierung des Energieeintrags.

Die Analyse der Zellidentität mittels Durchflusszytometrie wurde anhand von mehreren Oberflächenantigenen durchgeführt. Sowohl negative als auch positive Marker wurden in die Untersuchung einbezogen, um den Empfehlungen der *International Society for Cellular Therapy* nachzukommen [213]. Als positive Marker wurden Antikörper für die Antigene CD44, CD90 und CD105, sowie als negative Marker Antikörper

per für die Antigene CD34, CD45, CD73 und HLA-DR verwendet. Die in Abbildung 60 dargestellten Resultate spiegeln bei allen untersuchten Mikroträgersystemen vergleichbare große Subpopulationen wider, die die einzelnen Antigene exprimieren. Bei den Negativ-Markern zeigte sich ein vergleichbares Expressionsprofil bei allen fünf Kultivierungsformen. Vereinzelt waren Schwankungen gemessen worden, die insbesondere CD90 und CD44 betrafen. Bei CD44 waren innerhalb der Versuchswiederholungen größere Schwankungen zu beobachten, die sehr wahrscheinlich durch eine bereits vorhandene Heterogenität der Zellen verursacht wird. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine beginnende Alterung der Zellen *in vitro*, die eine Herunterregulierung der Expression von einigen dieser Antigene zur Folge haben kann [390]. Die weiterhin hohe Expression von CD105 spricht jedoch gegen diese Hypothese, so dass die genaue Ursache an dieser Stelle nicht exakt geklärt werden kann. Bei CD90 ist insbesondere auf Cytodex 1 eine verringerte Expression zu erkennen, bei der jedoch die hohen Schwankungen bei den Versuchswiederholungen berücksichtigt werden müssen. Generell ist anhand der Charakterisierung über die Antigene keine eindeutige Tendenz bzgl. des Verlustes der multipotenten Eigenschaften erkennbar. Zukünftige Experimente müssen zeigen, dass die Mikroträger und dabei insbesondere die Alginate-Mikroträger nach erfolgter Expansion die multipotenten Eigenschaften der Zellen derart konservieren, dass eine Differenzierung in die drei Keimblätter weiterhin möglich ist, um das Kultivierungssystem für Anwendungen in der regenerativen Medizin und dem *Tissue Engineering* nutzen zu können. Insgesamt konnte anhand der Ergebnisse gezeigt werden, dass die modifizierten Alginate-Mikroträger nicht nur für statische Kultivierungstechniken, wie dem *hängenden Tropfen*, sondern auch für adhärenzte Mikroträger-Kultivierung im durchmischten Bioreaktor geeignet sind. Die Eigenschaften der Alginate-Mikroträger sind in jeder Hinsicht vergleichbar mit kommerziell verfügbaren Mikroträgersystemen, bieten jedoch den Vorteil, dass sie bzgl. ihrer Größe variiert werden können und dadurch beispielsweise eine Agglomeration verzögert bzw. unterbunden werden kann.



**Abbildung 95: HYPOTHESE ZUR AGGREGATION VON ALGINAT-MIKROTRÄGERN.**

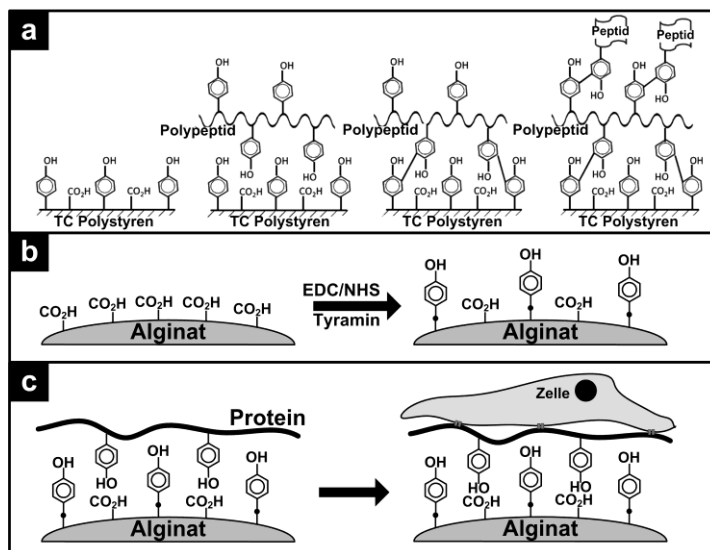
**a** Zell-Matrix-Interaktion und kombinierte Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktion, die zu einer Aggregation von adjazenten Mikroträgern führen können. **b** Verhalten von agglomerierten kleinen Mikroträgern während der statischen Phase der Kultivierung. Nach erfolgter Aggregation durch die in **a** beschriebenen Mechanismen kann eine Trennung der Aggregate durch die Energie der Durchmischung nicht mehr erfolgen. **c** Verhalten von agglomerierten großen Mikroträgern während der statischen Phase der Kultivierung. Nach erfolgter Aggregation durch die in **a** beschriebenen Mechanismen kann während der Durchmischung durch die höhere Masse der Mikroträger eine Trennung der Aggregate stattfinden. **d** Interaktion von turbulenten eddy-Strömungen auf Mikroträgersysteme durch das Größenverhältnis.

**1:** Eddies > Mikroträger, **2:** Eddies = Mikroträger, **3:** Eddies < Mikroträger. Je nach Größe der Eddies erfolgt eine Übertragung der Energie auf kleine bzw. große Bereiche des Mikroträgersystems die, neben der Beanspruchung der Zellen, auch zu einer Verhinderung der Aggregation der Mikroträger führen kann. Abbildung in **d** aus [389], abgeändert.

## Welchen Einfluss hat die Modifikation von nicht Peptid-basierten Molekülen auf Alginat in Bezug auf das Adhäsionsverhalten?

Die Kopplung von kleinen Molekülen an Alginat wurde exemplarisch mit Tyramin durchgeführt. Die Hypothese, dass mit Tyramin die Eigenschaften von Alginat zur Steigerung der Adhäsivität von Zellen geändert werden können, wurde durch die durchgeführten Experimente bestätigt. Ebenso konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass das entwickelte Protokoll eine kovalente Kopplung realisiert, da Tyramin durch seine molekulare Beschaffenheit nicht in anderer Art und Weise mit dem Alginat interagieren kann. Abbildung 96 a zeigt die schematische Durchführung von Vashi *et al.* [317], die eine TCPS-Kulturschale mit Hilfe der Phenolgruppen mit Peptiden beladen. Die TCPS-Oberfläche wurde mithilfe der Kopplung von Tyramin an Alginatkugeln imitiert und anhand der positiven Adhäsion von hMSCs verifiziert. Da die Oberfläche keine molekularen Erkennungssequenzen wie z. B. das RGD-Peptid besitzt, beeinflusst die Oberfläche wahrscheinlich die Adsorption von Serumproteinen des Kulturmediums positiv. Proteine, die die Zelladhäsion fördern, wie z. B. Fibronectin oder Vitronectin sind im fetalen Kälberserum enthalten [391] und können, ähnlich wie in Abbildung 96 a gezeigt, mit der modifizierten Alginat-Oberfläche interagieren. Eine Datenbankabfrage von Fibronectin (P07589) und Vitronectin (Q3ZBS7) ergab mit dem Werkzeug ProtParam [392], dass beide Proteine einen Tyrosin-Anteil von etwas mehr als 4% besitzen und hierüber eine direkte Interaktion mit dem Tyramin (am Alginat) möglich ist.

Die Kaskade zur zellulären Adhäsion von hMSCs könnte demnach wie folgt ablaufen: nach Kontaktierung der modifizierten Alginat-Mikroträger adsorbieren zunächst Proteine aus dem Serum auf der Alginat-Oberfläche. Durch die Anbindung der Phenolgruppen in Form des Tyramin ist die negative Ladung reduziert und es können auch andere Wechselwirkungen, wie z. B. mit Tyrosin stattfinden (siehe Abbildung 96 b). Proteine, wie z. B. Fibronectin oder Vitronectin aus dem Medium, bilden dann eine Schicht auf dem Alginat-Hydrogel und stellen wiederum in ihrer Aminosäuresequenz Motive zur Verfügung, die von den Zellen erkannt werden und eine Integrin-vermittelte Adhäsion zur Folge haben (siehe Abbildung 96 c).



### Abbildung 96: KOVALENTE KOPPLUNG VON TYRAMIN AN ALGINAT-HYDROGELE ZUR BIOFUNKTIONALISIERUNG.

**a** Methode von Vashi *et al.* zur Modifikation von TCPS mit bioaktiven Peptiden (Abbildung abgeändert nach [317]).

**b** Modifikation des Alginats zur Imitierung der chemischen Eigenschaften von TCPS mit Tyramin. Nach Modifikation sind vergleichbare chemische Gruppen auf TCPS und den Alginat-Mikroträgern vorhanden.

**c** Die Alginat-Mikroträger können demnach als eine Art "weiche" TCPS-Kulturfäche betrachtet werden, die mit Proteinen analog zu Standard-Kulturschalen beschichtet werden können, damit eine Zelladhäsion erfolgen kann.

Die Quantifizierung der Durchmesser der Mikroträger, die mit dieser Methode hergestellt wurden, zeigte ebenso eine signifikante Reduzierung auf. Die Mikroträger zeigten einen um etwa 40% reduzierten Durchmesser im Vergleich zum Durchmesser der Alginatkugeln auf, die nicht modifiziert wurden (vgl. Abbildung 61). In der Folge der Kultivierung war keine Reduzierung des Durchmessers zu beobachten, vielmehr vergrößerte sich der Durchmesser minimal. Dies lässt den Schluss zu, dass während der Modifikation eine Degradierung der Alginatkugeln erfolgt, die jedoch nicht zu einer Instabilität und möglichen Desintegration der Mikroträger führt. Eine mögliche Erklärung ist der pH-Wert der Aktivierungslösung. Dieser liegt in einem sehr niedrigen pH-Bereich, der auch zu einer aziden Degradierung der Alginatkugeln führen kann. Für Salzsäure wurden ähnliche Beobachtungen von Bajpai *et al.* gemacht, wobei sie eine

vollständige Degradierung der Alginatkugeln bei den von ihnen verwendeten Konditionen beobachteten [393]. Die Mikroträger, die nur 30 min mit EDC/NHS inkubiert wurden, zeigten in weiteren Experimenten keine Reduzierung des Durchmessers der Alginatkugeln (vgl. Abbildung 53). Dies lässt den Schluss zu, dass eine längere Inkubation (mehrere Stunden) der Alginatkugeln mit EDC/NHS zu einer Reduzierung des Durchmessers führen kann. Dies kann u. a. ein interessantes Werkzeug für die reproduzierbare Herstellung von Alginat-basierten Mikroträgern unterschiedlicher Größe sein. Mit der in Abbildung 7 gezeigten Apparatur ist es möglich, reproduzierbar Alginatkugeln mit einem Durchmesser von 500  $\mu\text{m}$  herzustellen. Kleinere Alginatkugeln können nur durch einen erhöhten Luftstrom erzeugt werden, was mit einer Satellitenbildung (sehr kleine Alginatkugeln) einhergeht. Die Verteilung der Alginatkugeln wird dadurch mehr gestreut, was kontraproduktiv für einen effizienten Einsatz der Mikroträger in Bioprozessen ist (siehe [387]). Durch eine zeitgesteuerte Abnahme des Durchmessers mit der Inkubation in EDC/NHS könnten somit, wie in den Versuchen mit Tyramin gezeigt wurde, Größenordnungen erreicht werden, die denen der kommerziell erhältlichen Mikroträger entsprechen. Nach den Untersuchungen von Alginat-Gerüststrukturen und der Etablierung der Kultivierung von humanen Stammzellen auf UHV-Alginat-basierten Mikroträgern zeigt Tabelle 10 zusammenfassend die wichtigsten Vor- und Nachteile dieses Mikroträgersystems.

**Tabelle 10:** Vor- und Nachteile von UHV-Alginat-basierten Mikroträgern.

<i>Vorteile</i>	<i>Nachteile</i>
⊕ Herstellung der Mikroträger mit Standardmaterialien	∅ Teilweise Präparation unter nicht physiologischen Bedingungen
⊕ Herstellung der Mikroträger mit wenig Investition	∅ Adsorption der Alginat-Mikroträger an Reaktionsgefäßen
⊕ Herstellung der Mikroträger "on-demand"	∅ Einstellen der Mikroträger-Suspension schwieriger, da als Suspension vorliegend
⊕ Flexible Größengestaltung der Mikroträger	
⊕ Flexible Wahl der Proteine zur Bioaktivierung	
⊕ geringe Rauigkeit	
⊕ Eigenschaften des Alginats: Porosität	
⊕ keine Makroporosität	
⊕ Eigenschaften des Alginats: einstellbares Elastizitätsmodul	
⊕ Eigenschaften des Alginats: keine Eigenfluoreszenz	
⊕ Eigenschaften des Alginats: transparent	
⊕ Immobilisierung von funktionalen Molekülen im Alginat	
⊕ Möglichkeit der Degradierung des Alginats	

### **Kann eine Kultivierung von humanen pluripotenten Stammzellen auf UHV-Alginat-basierten Gerüststrukturen erfolgen?**

Aufbauend auf den erzielten Resultaten und Beobachtungen wurde die Kultivierung von humanen induziert pluripotenten Stammzellen auf kovalent modifizierten Gerüststrukturen untersucht. Hierzu war es notwendig, statt dem zuvor genutzten Kollagen I, die Modifikation mit Matrigel vorzunehmen. Der zellbiologische Hintergrund wurde bereits in Abschnitt 3.1.3 dargestellt. Da es sich hierbei um ein komplexes Proteingemisch handelt, sind Parameter der Kopplung, wie z. B. der pH-Wert, problematisch, da Matrigel nach Protokoll in DMEM/F12 (bei +4°C) angesetzt werden muss. Neben der direkten Kopplung wurde daher auch die Kombination mit Tyramin in die Untersuchung einbezogen. Die Untersuchungen mittels der Lebendzell-Mikroskopie auf zweidimensionalen Alginat-Gerüststrukturen zeigten, dass die Adhäsion von hiPSCs auf dem mit Tyramin modifizierten Alginat mit anschließender Matrigelbeschichtung exzellent initiiert werden kann. Bei den Gerüststrukturen, auf denen Matrigel direkt gekoppelt wurde, ist dies

zwar möglich, jedoch traten hier Probleme bei der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf (Abbildung 65 c). Mögliche Gründe hierfür sind wahrscheinlich die wechselnden pH-Bedingungen bei der Kopplung. Die Aktivierung der –COOH-Gruppen mittels EDC/NHS erfolgt unter aziden Bedingungen. Da die Matrigel-Lösung in neutralem Puffer gelöst ist, können durch die Kontaktierung dieser Lösung mit dem aktivierten Alginat Effekte auftreten, die eine kovalente Kopplung unterbinden, oder es zu einer Phasentrennung von Alginat und Matrigel an der Grenzfläche kommt. Durch die intensiven Waschschrte nach der Modifikation, um beispielsweise die überschüssigen Reaktanden zu entfernen, ist es denkbar, dass sich Teile des Matrigels wieder ablösen und somit eine Zelladhäsion nicht oder nur schlecht erfolgen kann. Bei der Tyramin-basierten Methode ist der pH-Wert unkritisch, da sowohl die Aktivierung, als auch die Tyramin-Kopplung unter aziden Bedingungen erfolgt. Erst nach intensivem Waschen wird das Matrigel auf die Alginat-Oberfläche gebracht und kann dann, wie bei der Beschichtung von TCPS-Kulturschalen, auf der Alginat-Oberfläche adsorbieren. Die Ergebnisse zeigen, dass hierdurch eine stabile Modifikation des Alginsats erfolgen und eine adhäsive Oberfläche für hiPSCs hergestellt werden kann (Abbildung 65 a). Dissoziierte hiPSCs-Kolonien (Einzelzellen) adhäreren und formen multizelluläre Zellkolonien, vergleichbar mit der Standard-Kulturoberfläche (TCPS mit Matrigel). In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Oberflächen über mindestens 6 Tage stabil sind und die Zellen sich dementsprechend darauf kultivieren lassen.

Die Expansionsrate war bei der TCPS-Matrigel-Oberfläche im Vergleich zur Alginat-Tyramin-Matrigel-Oberfläche etwa viermal so hoch. Da eine Adhäsion bei beiden Substraten gegeben war, kann dies nicht als Hauptursache herangezogen werden. Durch die Nutzung von Einzelzellen ist zwar ein Verlust von etwa 20% nach 24 h zu beobachten, dieser ist jedoch bei beiden Oberflächen vergleichbar, im Gegensatz zur Alginat-Matrigel Oberfläche, bei der fast 50% der Zellen nicht anwachsen. Im Experiment wurden die hiPSCs von einer (harten) TCPS-Oberfläche auf eine (weiche) Alginat-Oberfläche überführt. Dies ist auf zellulärer Ebene gesehen eine signifikante Änderung der unmittelbaren Zellumgebung, bei der möglicherweise zunächst eine Adaptationsphase der Zellen erfolgen muss. In [394] wurde beschrieben, dass pluripotente Stammzellen von der PMEF-Kultur auf eine (PMEF-freie) Matrigel-Kultur zur Adaptation mehrere Passagen benötigten oder auch für eine PMEF- und Matrix-freie Kultivierung [395]. Ebenso wird von einer notwendigen Adaptation der Zellen bei einer generellen Änderung der Kultivierungsmethode (Suspensionskultur) berichtet [396]. Ein weiterer Grund für diese Unterschiede kann aber auch bei den mechanischen Eigenschaften der Oberflächen liegen. Keung *et al.* untersuchten in diesem Kontext hESC und hiPSC bzgl. Morphologie, Proliferation und Differenzierungspotenzial [250]. Ihre Ergebnisse zeigten, dass es zwar Unterschiede in der Koloniegröße bei unterschiedlichen Elastizitätsmodulen gab (je niedriger das E-Modul, desto kleiner die Kolonien), dies jedoch keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen hatte, also morphologisch bedingt war [250]. Insbesondere die Größenunterschiede der Kolonien in Abhängigkeit der mechanischen Eigenschaften des Substrats liefern somit auch eine Erklärung für die in Abschnitt 4.3.4 gefundenen Größenunterschiede bei hiPSC auf nicht-kovalent modifizierten Alginat-ECM Gerüststrukturen. Die Übertragung auf die in der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate bei kovalent modifizierten Alginat-Gerüststrukturen ist jedoch schwierig, da Keung *et al.* lediglich Unterschiede in der Proliferation bei Substraten zwischen 100-75000 Pa festgestellt haben, dies jedoch nur den Bereich des Elastizitätsmoduls von Alginat (nach [163]) abdeckt. Eine Proliferationsrate auf Polystyren ( $10^9$  Pa, [163]) wurde von den Autoren nicht untersucht, zusätzlich betrug die Kultivierungsdauer bis zur Bestimmung der Proliferation lediglich 3 Tage. Mushah *et al.* kommen in ihrer Studie über den Einfluss der mechanischen Eigenschaften des Substrats zu dem Schluss, dass feste Oberflächen die Selbsterneuerung von pluripotenten Stammzellen eher hervorrufen, als elastische Substrate [397].

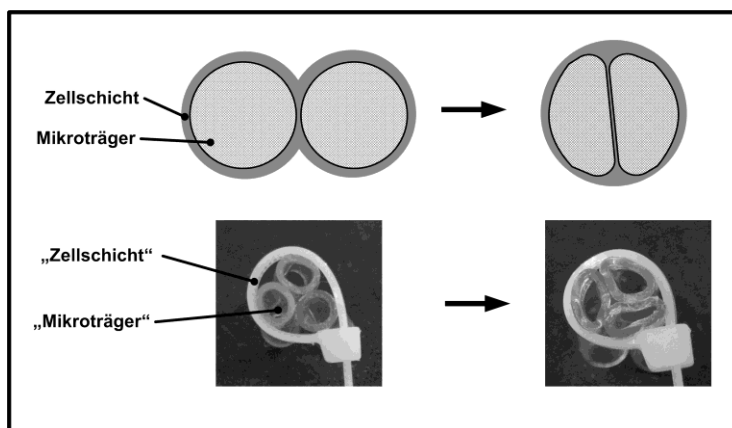
Es konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Modifikation mit Tyramin eine Art universale Beschichtung von Proteinen vergleichbar mit der auf Petrischalen ermöglicht. Mit dieser Modifikation konnte eine reproduzierbare Beschichtung mit dem komplexen Proteingemisch Matrigel erfolgen. Durch die adhärenente Kultivierung auf planaren, als auch auf sphärischen Alginat-GS von hiPSCs als auch

von hiPSC-CMs konnte erstmals eine Biofunktionalisierung dieser Art im Kontext des *Tissue Engineering* und pluripotenten Stammzellen gezeigt werden.

Die Modifikation von Alginaten mit Tyramin wurde zwar 2007 von Sarkai *et al.* [95, 96] beschrieben. Dabei fokussierten sie auf die Möglichkeit, Alginate nicht nur ionisch, sondern auch enzymatisch über die eingeführten Phenolgruppen zu vernetzen [96]. Die erste zelluläre Anwendung in einer weiteren Studie erfolgte durch die Einschlussimmobilisierung von CRFK-Zellen [95]. Die Kultivierung von Zellen auf Tyramin-modifizierten Alginaten wurde zeitgleich bei der Erstellung dieser Arbeit von Hou *et al.* publiziert [398]. Es gilt hierbei jedoch hervorzuheben, dass diese einen anderen Ansatz zur Hydrogelbildung verfolgten und lediglich die Adhäsion von Fibroblasten zeigen konnten, die wesentlich niedrigere Ansprüche an die ECM stellen. Bei den durchgeführten Experimenten in der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus die Kultivierung von hiPSC und hiPSC-CM durch eine zusätzliche Proteinbeschichtung gezeigt, was damit den Ansatz von Hou *et al.* weiter verbessert, da sie lediglich eine schwache Interaktion der Zellen auf Tyramin-modifiziertem Alginat feststellten und bessere Ergebnisse bzgl. der Zelladhäsion mit Dopamin-funktionalisierten Alginat erhielten [398]. Eine mögliche Erklärung ist die enzymatische Vernetzung des Alginats mit der Meerrettichperoxidase, die in der vorliegenden Arbeit nicht angewendet wurde. Das mit Tyramin modifizierte Alginat wurde von Arai *et al.* für die Anwendung des Bioprintings verwendet. Auch hier wurden lediglich Fibroblasten verwendet [399]. Die Funktionalisierung von UHV-Alginaten mit Tyramin und anschließender Beschichtung mit Matrigel zur Kultivierung von pluripotenten Stammzellen bzw. deren abgeleitete differenzierte Zellen in dieser Arbeit stellt somit eine Verbesserung zu den zitierten Studien dar.

### Welchen Einfluss haben die mechanischen Eigenschaften von Alginat-Gerüststrukturen auf das zelluläre Verhalten?

Die Etablierung von biofunktionalisierten Gerüststrukturen, basierend auf UHV-Alginaten, führt neben den biochemischen Signalmolekülen durch das Elastizitätsmodul eine weitere Eigenschaft ein, die einen Einfluss auf die Zellen hat. Die Zellen befinden sich, sowohl auf den Mikroträgern als auch auf den planaren Gerüststrukturen auf einer Oberfläche, die vereinfacht gesagt, elastischer ist, als die Standard-Plastikoberfläche aus Polystyren. Es stellt sich nun die Frage, ob die Zellen diese Eigenschaft detektieren können und folglich, wie sich dies auf das Verhalten auswirkt.



**Abbildung 97: MODELLIERUNG ELASTIZITÄT ANHAND DES „KABELBINDER-MODELLS“.**

*Modell der Verformung von Alginat-Mikroträgern bei umspannendem Zellbewuchs. Durch die Interaktion der Zellen mit der Oberfläche, Reorganisation des Zytoskeletts und Zell-Zell-Kontakten werden die Mikroträger deformiert (Schema). Die Fotografien rechts zeigen eine Simulation mittels elastischer Schläuche und Kabelbindern. Im relaxierten Zustand ist die Form der Schläuche (entsprechend den elastischen Alginat-Mikroträgern) nahezu perfekt rund. Komprimiert man diese Anordnung mittels eines Kabelbinders (entspricht der Zugkraft der Zellen) verformen sich die Schläuche und nehmen eine Form an, wie sie in den Experimenten beobachtet werden konnte.*

Bei der Kultivierung von hMSCs auf Mikroträgern erfolgten CLSM-Analysen nach der Kultivierung. Durch die konfokalen Schnitte durch die Konstrukte zeigte sich ein interessanter Effekt bzgl. der Verformung der Mikroträger. Die Cytodex-Mikroträger waren perfekt rund, wohingegen die Alginat-Mikroträger



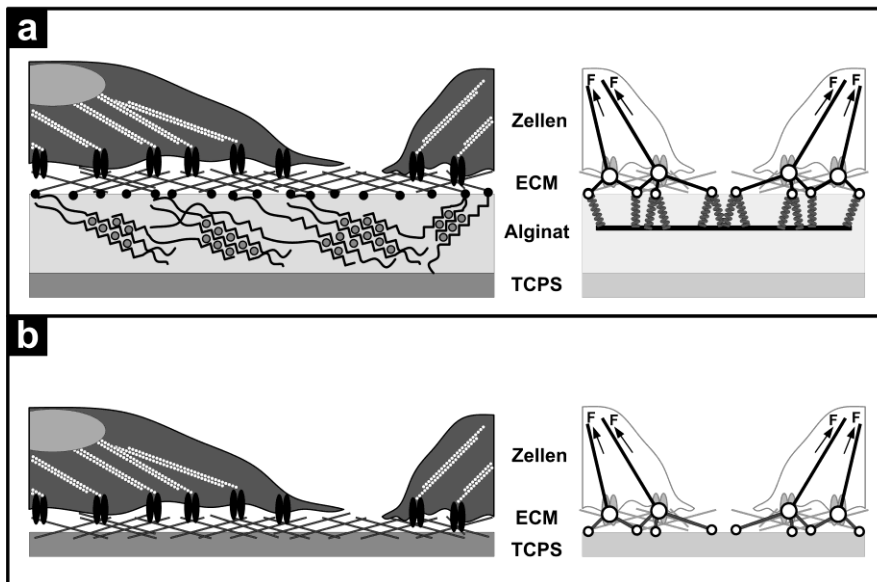
starke Verformungen unter dem Einfluss der Zellen aufwiesen (siehe Abbildung 54). Diese Verformung lässt darauf schließen, dass die Zellen auf den Mikroträgern durch ihre Adhäsion eine hohe Kraft ausüben können und somit die unmittelbare Umgebung modellieren. In einer Studie von Bidan *et al.* erfolgt eine ähnliche Beobachtung. Sie untersuchten konvexe und konkave Oberflächen in Bezug auf die Zelladhäsion und konnten schlussfolgern, dass die Adhäsion auf konvexen Oberflächen (also die Krümmung, die auch auf Mikroträgern vorliegt) in einer Druckausübung auf das Substrat resultiert [400]. Konkave Oberflächen, die z. B. auch durch die Aggregation mehrerer Mikroträger entstehen, führen hingegen nicht zu dieser Druckausübung [400]. Mittels eines einfachen Modells konnte dieser Vorgang nachgestellt werden. Abbildung 97 zeigt kontaktierte Schläuche aus einem elastischen Material, die mit einem Kabelbinder zusammengebunden sind. Zieht man den Kabelbinder zusammen, so verlieren die Schläuche ihre runde Form und zeigen in diesem komprimierten Zustand ähnliche Deformierungen wie die Mikroträger nach Zellbewuchs.

Man kann die Hypothese aufstellen, dass bei den Cytodex-Mikroträgern eine hohe Zugspannung des Zytoskeletts vorliegt, bei den Alginate-Mikroträgern diese jedoch durch die vorhandene Interaktion mit dem elastischen Mikroträger geringer ist. Andere Studien zeigen, dass Zellen, die auf nano-skalierten Säulen adhären, eine derartige Kraft ausüben, so dass die Säulen gebogen werden [401-404]. Ähnliche Kräfte sind auch bei der Adhäsion auf den Mikroträgern vorhanden, jedoch bleibt zukünftig zu klären, welche Folgen die unterschiedlichen Elastizitätsmodule der Mikroträger intrazellulär auslösen. Die Bewertung des Einflusses dieses Phänomens ist an dieser Stelle schwierig, in Studien von Bhadriaraju *et al.* konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Rückkopplung zwischen der Zugspannung des Zytoskeletts und intrazellulären Signalkaskaden wie z. B. der ROCK-Kinase Aktivität besteht [405]. Weitere Einflüsse sind insbesondere bei der Proliferation zu beobachten, die bereits eingehend für hiPSCs und hMSCs diskutiert wurden.

Die Ergebnisse in Bezug auf die mechanischen Eigenschaften der Alginate-Gerüststrukturen lassen sich in einem Modell zusammenfassen. Es wurden sowohl makroskopische Einflüsse in Form einer Dynamik des Substrats, das durch die Kontraktion von Kardiomyozyten ausgelöst wird, als auch Einflüsse auf das Proliferationsverhalten und die Morphologie von hMSCs und hiPSCs beobachtet. Abbildung 98 a (links) zeigt schematisch die Interaktion von adhären Zellen mit ECM Proteinen auf Alginate-Gerüststrukturen. An der Oberfläche des Alginats sind die Proteine angelagert, die entweder über eine kovalente Kopplung (siehe Kollagen I, Matrigel) oder über Adsorption an Tyramin-modifiziertem Alginate mit dem Polymer Netzwerk des Alginats verbunden sind. Mit den Proteinen auf der Alginate-Oberfläche interagieren wiederum Zellen (z. B. hMSCs, hiPSCs oder CMs), diese sind dabei über Membranproteine (Integrine) mit der ECM verknüpft und können über diese Verbindung mechanische Signale in die Zelle weiterleiten [406]. Die Integrine wiederum sind mit intrazellulären Strukturproteinen verbunden, die intrazelluläre Signalkaskaden bis ins Innere des Zellkerns weiterleiten können und hierdurch Proliferation, Differenzierung, Migration, Morphologie und Apoptose beeinflusst werden können. Auf mechanischer Ebene (Abbildung 98 a rechts) liegt eine ähnliche Kaskade vor. Das Alginate ist über Polymere als dynamisches Netzwerk abstrahiert (Federn), das mit der ECM verbunden ist. Die ECM wird hier durch multiple Anknüpfungspunkte vereinfacht dargestellt. Die Anknüpfungspunkte sind ihrerseits direkt mit den Strukturproteinen der Zellen verbunden, die eine bestimmte Kraft ausüben können (Kontraktion, Ausbreitung, Migration). Bei Standard-Kulturflächen ohne Alginate ist lediglich eine Proteinschicht auf der Oberfläche adsorbiert, die über die Verknüpfungspunkte mit dem Zellinnern verbunden ist (Abbildung 98 b). Ein ähnliches Modell wurde von Sheehy *et al.* vorgestellt, jedoch ist dies auf molekulare Wechselwirkungen begrenzt und berücksichtigt nicht Substrate mit variierendem Elastizitätsmodul [407].

Über das Modell lassen sich damit auch die Ergebnisse aus den Videosequenzen der Kardiomyozyten erklären (siehe Abbildung 67). Es wurde beobachtet, dass hiPSC-CM auf Alginate im Vergleich zu hiPSCs auf TCPS plastischer kontrahieren. Ferner zeigte sich, dass nicht verbundene Zellen bzw. Zellverbände durch ihre Kontraktion benachbarte Zellen heranziehen können. Das in Abbildung 98 a dargestellte Modell

erklärt dies durch die Übertragung der Kontraktion über die Zellmembran auf das Alginat-Netzwerk. Durch die Verbindung der Alginat-Polymerketten über die Ba-Alginat-Interaktion (*egg-box model*) werden diese Kräfte über größere Distanzen übertragen. Dies hat zur Folge, dass die CM nicht nur durch den mechanischen Reiz durch das Elastizitätsmodul, sondern auch in gewisser Weise durch das Strecken der Alginat-Gerüststruktur stimuliert werden können. In diesem Kontext untersuchten Gwak *et al.* murine ESC-abgeleitete Kardiomyozyten, die zyklischen Strecken ausgesetzt waren. Ihre Ergebnisse zeigten, dass unter dieser Stimulation die Zellen eine höhere Genexpression von kardialen Markern (z. B.  $\alpha$ -MHC oder GATA-4) aufwiesen, verglichen zur statischen Kultur [408].



**Abbildung 98: MODELLIERUNG DER MOLEKULAREN UND MECHANISCHEN INTERAKTION VON GERÜSTSTRUKTUR, ECM UND ZELLEN.**

**a** Interaktion auf Alginat-Gerüststrukturen. **b** Interaktion auf TCPS-Oberflächen. Links: Schematische Darstellung der molekularen Interaktionen von Matrix und Zellen, rechts: schematische Darstellung der Kraftübertragung von Matrix und Zellen. Die mechanischen Eigenschaften der Kulturoberfläche werden auf die Zellen übertragen, bzw. es erfolgt eine Kraftübertragung vom Zytoskelett auf/in die Kulturoberfläche.

### Ist es möglich, Strukturierungsverfahren und Modifikationsverfahren für Alginat-Gerüststrukturen zu kombinieren?

Zur Herstellung eines komplexeren Zellmodells wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Kombination von Biofunktionalisierung und Strukturierung implementiert werden kann. Bei der Strukturierung von UHV-Alginaten ist die Vernetzung der zentrale Punkt des Prozesses. Eine Struktur kann mit dem noch (flüssigen) Na-Alginat temporär hergestellt werden.

Diese muss jedoch zu einem geeigneten Zeitpunkt mit der Vernetzerlösung kontaktiert werden, um die erzeugte Struktur zu konservieren. Letztendlich wurde in dieser Arbeit die Methode von Franzesi *et al.* verwendet [93], da sie eine hohe Kompatibilität mit UHV-Alginaten und der genutzten Strukturierungsmethode, dem  $\mu$ -Contact Printing darstellt. Es erfolgte eine Adaptation der beschriebenen Verfahren des  $\mu$ -Transfermoldings und dem *Replika Molding*, um planare Alginat-Hydrogele mit einer definierten Topographie zu strukturieren. Zur Strukturierung wurde das Alginat auf den Agaroseblock gegeben und der Stempel mit dem Alginat kontaktiert. Die strukturellen Elemente werden durch dieses Verfahren sehr gut auf das Alginat übertragen (siehe Abbildung 71). Die tendenziell geringere Dimensionierung der Strukturen auf dem Alginat ist durch die sog. Synerese zu erklären, bei der mit steigender Vernetzung des Alginats heterogene MG-Blöcke [72] mehr verknäulen, und die Alginat-Hydrogele unter Ausschleusung von Wasser schrumpfen. Eine Verbesserung der Übertragung könnte damit durch die Nutzung von Alginaten mit geringem MG-Anteil erfolgen.

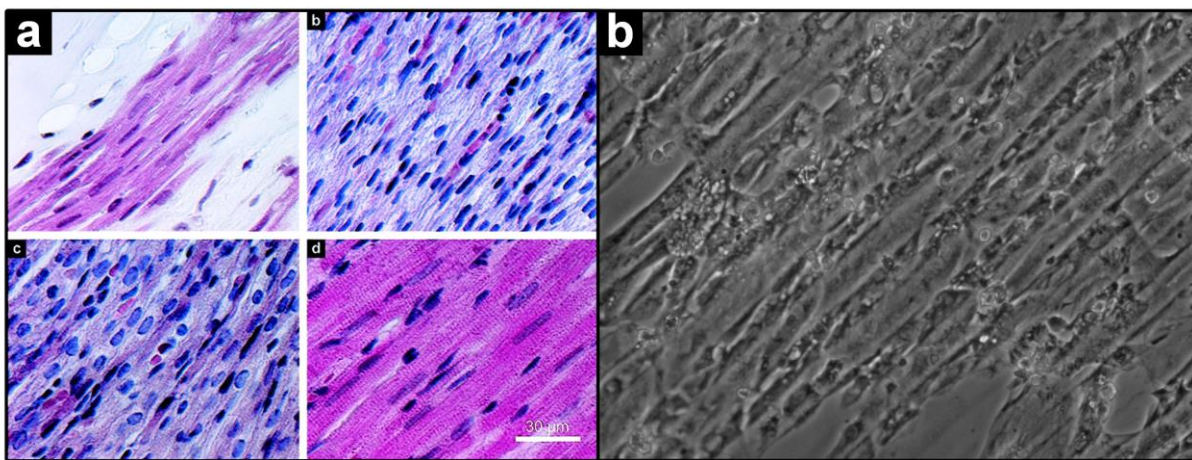
Vorversuche, in denen eine Lösung mit Bariumionen auf eine Alginatmembran pipettiert wurde und danach schnell die Kontaktierung vorgenommen wurde, führten zu keiner Strukturierung des Alginats, was für eine schnelle Vernetzung durch die Bariumionen spricht. Nach der Strukturierung mussten die Alginat-Gerüststrukturen in das finale Kulturgefäß manuell überführt werden. Dieser Schritt ist durchaus diffizil,

da das Alginat beispielsweise zusammenklappen kann, oder sich seitlich aufrollt, was ein manuelles Auf-falten per Pinzette erfordert und die Struktur lateral deformieren kann. Dennoch konnten auf diese Weise die Alginatstrukturen in ein Kulturgefäß übertragen werden. In der Folge konnte die in dieser Arbeit unter-suchte Modifikation des Alginats mit Tyramin mit anschließender Matrigel-Beschichtung erfolgreich durchgeführt werden, was anhand der Zelladhäsion von hMSCs und hiPSC-abgeleiteter CM gezeigt werden konnte. Diese Beschichtungsmethode wurde letztendlich gewählt, da sie sich in Verbindung mit Mat-rigel reproduzierbar aufbringen lässt und sich auch in weiteren potenziellen Anwendungen, wie z. B. der direkten Differenzierung von hiPSCs auf strukturierten Alginaten anbietet.

Die Versuche mit hMSCs (Abschnitt 4.3.6 und Abbildung 72) zeigten, dass sich die Zellen unmittelbar nach der Adhäsionsphase an den Kanälen ausrichten, jedoch keine Reaktion auf die quadratischen Löcher zeigten. Dies liegt wahrscheinlich an der Dimension der Textureigenschaften. Die Quadrate sind in etwa so groß wie eine nicht adhären-te Zelle, nach Ausbreitung können die Zellen über die Quadrate migrieren, ohne mit ihnen in Interaktion treten zu müssen. Die kanalartigen Strukturen sind in ihrer Dimension wes-entlich größer, so dass die Zellen hier in eine Interaktion treten. Ferner wird in der Literatur beschrieben, dass Zellen vorzugsweise an Kanten/Furchen adhären, was mit der hier untersuchten Topographie ver-gleichbar ist [159]. Zu Beginn der Kultivierung ist dieser Effekt, auch im Vergleich zur glatten Alginat-Oberfläche, stark ausgeprägt und gut unterscheidbar. Im Laufe der Kultivierung zeigten jedoch auch die Zellen auf der glatten Alginat-Oberfläche die Tendenz, sich parallel und spindelförmig auszurichten. Die-ser Effekt konnte auch bei der Standard-Kultivierung beobachtet werden, sobald sich eine sehr hohe Zell-dichte auf der Oberfläche einstellte. Bestimmte Oberflächen, wie z. B. Chitosan können ebenfalls zu dieser Selbstassemblierung führen [409, 410]. Ebenso konnte in einzelnen Versuchen ein Ablösen der Zellen nach 5 Tagen, sowie eine verstärkte Aggregatbildung beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine unzureichende Proteinadsorption auf der Alginat-Oberfläche, die jedoch formal ausgeschlossen werden kann, da die Zellen zu Beginn adhären und sowohl die unstrukturierten Bereiche in der glei-chen Probe, als auch die Zellen auf der glatten Alginat-Oberfläche weiterhin adhären waren. Daher kann man davon ausgehen, dass die Strukturierung die Zellen eine extrem spindelförmige Morphologie ausbil-den lässt, die ab einem gewissen Grad soviel Zugspannung erzeugt, dass die Zell-Matrix-Kontakte diese nicht mehr auf dem Substrat fixieren können. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Strukturierung, Modifikation und Kultivierung von Zellen auf Alginat-Hydrogelen in Kombination mög-lich ist. Für hMSCs muss der Prozess weiter optimiert werden, um die aufgetretene Selbst-Assemblierung weiter zu verstehen.

In der Folge konnte der Prozess auch auf hiPSC-CM erfolgreich übertragen werden und erstmalig gezeigt werden, dass diese Zellen über mehrere Wochen auf diesen Strukturen kultiviert werden können. Gerade bei diesem Zelltyp hat die Kombination von elastischer Oberfläche in Verbindung mit kanal-artigen Struk-turen einen biologischen Hintergrund, da hiermit eine weitere Annäherung an die in-vivo-Situation ge-schaffen werden kann. Die erzielten Resultate in diesem Bereich sind sehr vielversprechend, da die Zellen in einer Langzeitkultur von drei Wochen funktional auf dem strukturierten Hydrogel vorlagen. Ebenso wurde die Struktur von den Zellen adaptiert, was sich an der Morphologie von einzelnen Zellen, aber auch bei Zell-Clustern ausmachen lässt. Vergleicht man das in dieser Arbeit entwickelte „Myokard“-Modell (Abbildung 99) mit histologischen Schnitten aus der Ratte [411], so kann man insbesondere bzgl. der An-ordnung der Zellen große Ähnlichkeiten feststellen. Bei der Kontraktion konnte man nach drei Wochen den Trend verfolgen, dass diese sich an der Topographie orientiert. Nach derzeitigem Wissensstand konnte zum ersten Mal eine Langzeit-Kultivierung von hiPSC-CM auf strukturiertem, modifiziertem UHV-Alginat gezeigt werden. Lediglich Agarwal *et al.* veröffentlichten einen vergleichbaren Ansatz, in dem sie jedoch keine hiPSC-abgeleiteten Kardiomyozyten verwendeten, diese nur über 3 Tage kultivierten und niedermolekulares Alginat verwendeten [320]. Eine Studie von McCain *et al.* [42] konnte zeigen, dass eine Langzeitkultivierung dieser Zellen auf strukturierter Gelatine möglich ist, diese unterscheidet sich aber im Herstellungsprozess der Gerüststruktur und auch in der Tiefe der Topographie. McCain *et al.* er-

zeugten Strukturen mit einer Tiefe von 2  $\mu\text{m}$ , in der vorliegenden Arbeit wurden mit dem  $\mu$ -Contact Printing (bzw. Alginat Imprint Lithographie) Strukturen mit einer Tiefe von etwa 10  $\mu\text{m}$  verwendet. Eine weitere Annäherung an die in-vivo-Situation kann in zukünftigen Weiterentwicklungen des Modells durch die Struktur selbst, aber auch durch die Biofunktionalisierung erfolgen. Durch die Beschaffenheit der Struktur adhärirt ein Teil der Zellen im Kanal, der andere auf der Kanalwand. Dies ist in Bezug auf die Mehrschichtigkeit mit dem nativen Gewebe vergleichbar, erlaubt den Zellen aber auch orthogonal zur Kanalrichtung zu adhäririeren, was dem nativen Gewebe widerspricht. Aufgrund des Strukturierungs- und Funktionalisierungsverfahrens ist eine definierte Funktionalisierung der Kanalinnenseite nicht möglich. Denkbar wäre eine Bearbeitung des strukturierten Alginats analog zu einer Methode, die von Dusseiller *et al.* [412] vorgestellt wurde. Hier wurde auf eine ähnliche Struktur aus Polystyren mittels  $\mu$ -Contact-Printing eine Passivierungsschicht nachträglich aufgedruckt, so dass letztendlich bei der Funktionalisierung nur das Kanalinnere mit dem Protein modifiziert wurde [412]. Durch Veränderung der Dimensionen der Strukturen könnte auch dieses Problem gelöst werden. Generiert man lineare Strukturen, die wesentlich kleiner im Querschnitt sind als die Zellen, könnte ebenso eine Ausrichtung der Zellen gemäß der Strukturierung erfolgen, hätte aber den Vorteil, dass die Zellen in einer pseudo-planaren Oberfläche gerichtet adhäririeren können. Wang *et al.* konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass eine Kanal-artige Strukturierung mit einer Tiefe von 350 nm und einer Kanalbreite von 450 nm eine Orientierung von Kardiomyozyten erfolgen kann [413]. Im Vergleich zu den Strukturen in der vorliegenden Arbeit sind diese Größenordnungen jedoch wesentlich kleiner. Neben der Ausrichtung bzw. Strukturierung der Zelladhäsion konnte ein verändertes Kontraktionsverhalten auf den strukturierten Alginat-Gerüststrukturen beobachtet werden. Erfolgte die Kontraktion auf den planaren Alginat-Gerüststrukturen konzentrisch, so war auf den Kanal-artigen Gerüststrukturen eine Kontraktion zu beobachten die sich an der Richtung der Struktur orientierte.



**Abbildung 99: VERGLEICH IN-VIVO- UND IN-VITRO-„MYOKARD“.**

**a** Histologische Schnitte des Myokards der Ratte (aus [411]). **b** Myokard auf strukturiertem, biofunktionalisiertem Alginat mit hiPSC-CM.

Dieses Verhalten kann einerseits mit der Struktur selbst erklärt werden, da die Zellen zu einer länglichen Orientierung bei der Adhäsion tendieren. Andererseits liegen die Zellen, objektiv betrachtet, als topographisch strukturierter Zellrasen vor, so dass der direkte Einfluss der Orientierung der Zellen auch in Frage gestellt werden kann. Vergegenwärtigt man sich die Gerüststruktur in Verbindung mit einem Zellrasen, so kann die gerichtete Kontraktion auch durch lokale Unterschiede der mechanischen Eigenschaften erklärt werden. Generell erfolgt eine Mechanotransduktion über die Eigenschaften der Oberfläche (siehe z. B. [414, 415]). Auf den untersuchten Substraten sind lokale Unterschiede der mechanischen Eigenschaften durch die Kanalstrukturen denkbar: die erhabenen Strukturen könnten durch ihre Höhe ein niedrigeres E-Modul im Vergleich zu den tiefliegenden Furchen besitzen, die wiederum die Kontraktion beeinflussen

können. Ebenso ist denkbar, dass die erhabenen Strukturen die Oberfläche stabilisieren und eine Kontraktion der Zellen in Kanalrichtung bevorzugen.

Die hier durchgeführten experimentellen Arbeiten sind ferner nicht nur auf kardiale Zellen limitiert, vielmehr gibt es noch weitere Anwendungen bzw. Zellsysteme, für die eine derartige Gerüststruktur von Vorteil ist. Levis *et al.* untersuchten beispielsweise Ansätze des *Tissue Engineerings* im Kontext der Cornea und nutzten ebenso Kanal-artige Strukturen [416].

### **Inwieweit sind Gerüststrukturen aus UHV-Alginaten reversibel bzw. degradierbar?**

#### ***Na- und Ba-Alginat***

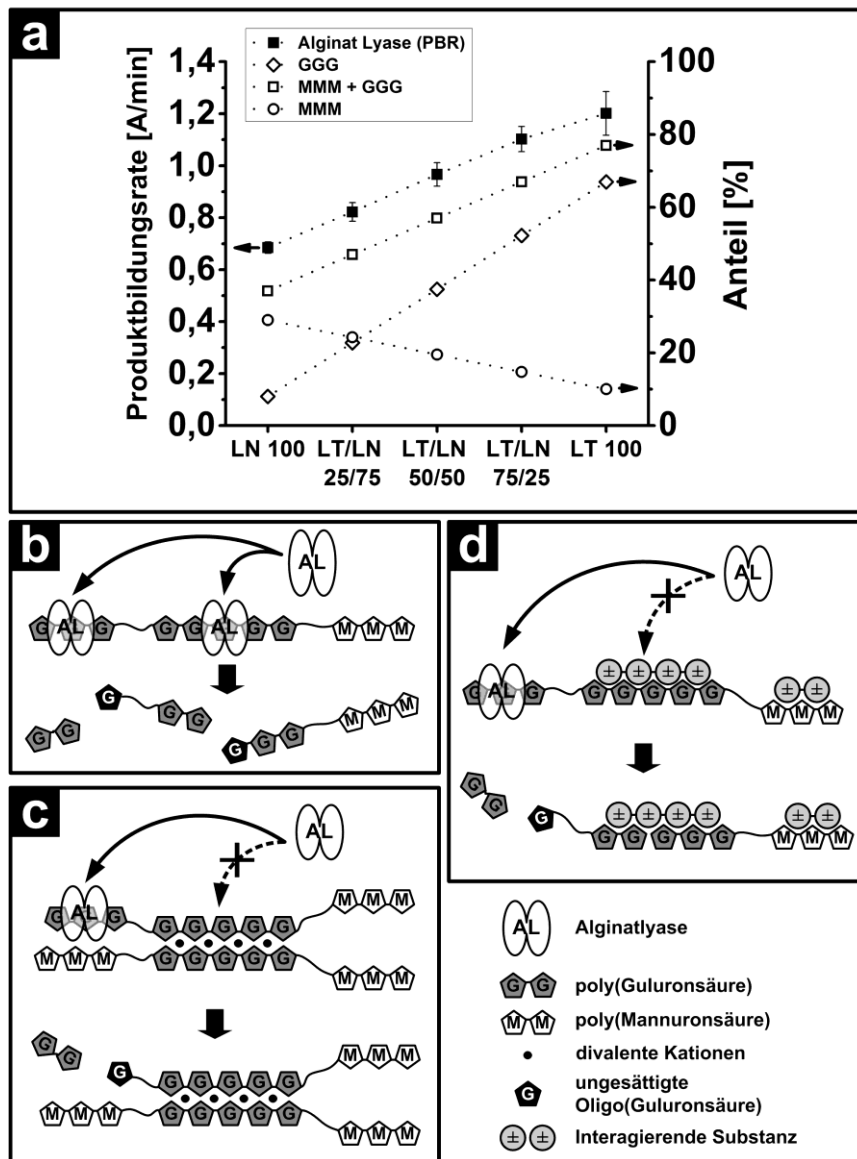
In den Experimenten wurden sowohl Na-Alginat als auch Ba-Alginat untersucht. Bei den Na-Alginaten wurden verschiedene Mischungen mit der AlgL behandelt und die enzymatische Degradierbarkeit nachgewiesen. Ein interessanter Aspekt ist hierbei die Nutzung von zwei Algenspezies, was letztendlich auch mit Alginaten unterschiedlicher chemischer Komposition einhergeht. Beide Na-Alginat (LN und LT) sind enzymatisch degradierbar, wobei eine höhere PBR bei Alginaten aus LT festgestellt wurde. Um diese Ergebnisse zu interpretieren, muss man die chemische Komposition der Alginat betrachten (Abbildung 100 a). Alginat aus LN besitzen einen hohen Mannuronsäuregehalt, wohingegen Alginat aus LT einen hohen Guluronsäuregehalt besitzen. Die Algen sind unterschiedlichen Wachstumsbedingungen ausgesetzt, was sich auf die chemische Komposition des Alginats auswirkt. LN wächst im Tidebereich der Chilenischen Küste und ist einer hohen Brandung ausgesetzt. Die dafür notwendige hohe Elastizität der Algen spiegelt sich in einem hohen Mannuronsäuregehalt wider (etwa 60%) [106]. LT wächst dahingegen im subtidalen Bereich der Küste, mehrere Meter unter der Wasseroberfläche, und ist weniger Strömungen ausgesetzt. Die Alge besitzt dadurch sehr harte Stängel was sich in einem hohen Guluronsäureanteil des Alginats widerspiegelt (~90%) [106]. Der Hersteller der genutzten AlgL gibt als Spezifikation des Enzyms die E.C. Nummer (Enzyme Commission Number) 4.2.2.3 an, was mit einer Enzymspezifität zu Mannuronsäureblöcke einhergeht [417]. Aufgrund der steigenden PBR mit steigendem Guluronsäureanteil (Abbildung 80 a), muss die Zuordnung zur Klasse 4.2.2.3 hinterfragt werden, da ein offensichtlicher Zusammenhang zwischen PBR und Mannuronsäureanteil besteht. Die darauf aufbauenden Experimente (siehe Abbildung 80 b) bestätigen die bevorzugte Degradierung von Alginaten aus LT. Berücksichtigt man die o. g. chemische Zusammensetzung des Alginats und nimmt die detaillierten Analyse der Alginatkomposition von Storz *et al.* [75] hinzu (Abbildung 100 a), so ist diese Unterscheidung auch bei den homogenen Monomerblöcken möglich. Die gemessene geringere PBR bei LN und gleichzeitig hohe PBR bei LT ist unter diesem Gesichtspunkt nicht nachvollziehbar, da die AlgL offensichtlich eine höhere Spezifität zu Guluronsäureblöcken besitzt.

#### **Hypothesen zur enzymatischen und chemischen Destruktion von Gerüststrukturen aus Alginat**

Unter der Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse und Einbeziehung vorhandener Literatur, lässt sich die Wirkweise der verwendeten AlgL an Alginaten aus *Lessonia nigrescens* und *Lessonia trabeculata* modellieren. Die gemessenen PBR an Na-Alginat und Ba-Alginat und die Korrelation mit der Alginatzusammensetzung aus Storz *et al.* [75] lassen den Schluss zu, dass es sich um eine Guluronsäure spezifische Lyase handelt. Die hohen PBR bei LT (100%) und gleichzeitig niedrigen PBR bei LN belegen diese Hypothese.

Durch die gemessenen PBR bei vernetztem Ba-Alginat, wird dies weiter untermauert. Durch die Vernetzung werden hauptsächlich homogene Guluronsäureblöcke miteinander verknüpft und unterbinden dadurch die Enzym-Substrat-Interaktion. Dadurch stehen nur noch homogene Mannuronsäure-, nicht gebundene Guluronsäure- sowie heterogene Uronsäureblöcke für die Degradierung durch die Lyase zur Verfügung. In der Folge sinkt die PBR relativ zum Anteil der Guluronsäureblöcke. In einer Studie von

Formo *et al.* wird ebenso von einer Guluronsäure-spezifischen AlgL gesprochen [119]. Die Verringerung der PBR konnte in ähnlicher Weise durch interagierende Substanzen, wie z. B. poly-L-Lysin, beobachtet werden. In Abhängigkeit der pLL-Konzentration komplexieren hier unspezifisch Uronsäureblöcke



**Abbildung 100: MODELLIERUNG DER DESTRUKTION VON UHV-ALGINATEN.**

**ZUSAMMENHANG VON ALGINATKOMPOSITION UND PRODUKTBILDUNGSRATE (PBR) DER ALGINATLYASE.**

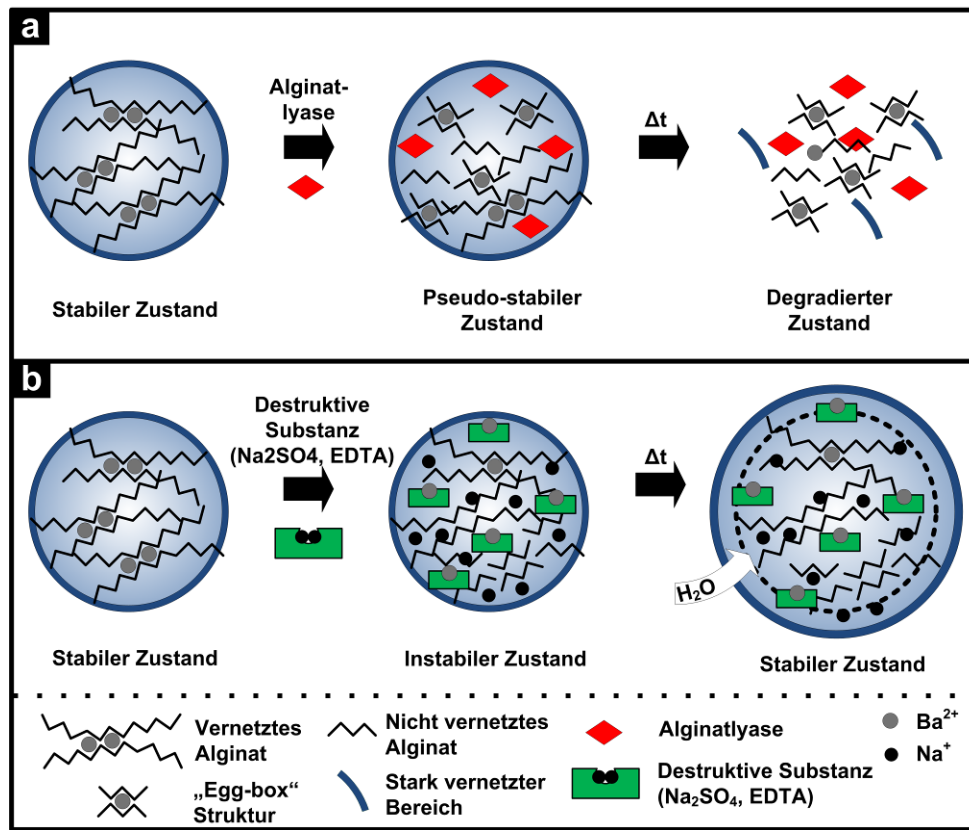
**a** Ermittelte PBR der Alginatlyase bei Na-Alginaten (■) zusammen mit den verschiedenen Monomeranteilen des Alginats (Literaturwerte aus [75]), GGG (◇), MMM (○), MMM+GGG (◻). **b** Destruktion von Na-Alginaten. **c** Destruktion von Ba-Alginaten. **d** Destruktion von Na-Alginaten in Anwesenheit interagierender Substanzen.

elektrostatisch miteinander und können dadurch nicht mehr durch die AlgL enzymatisch degradiert werden. Abbildung 100 zeigt die Modellierung der Wirkmechanismen der AlgL auf Na-Alginat (Abbildung 100 b), Ba-Alginat (Abbildung 100 c), sowie komplexiertem Na-Alginat mit pLL (Abbildung 100 d). Das Modell beruht auf einer Substratspezifität zu Guluronsäureblöcken.

Führt man die Ergebnisse weiter zusammen (kinetische und optische Messungen), lässt sich ebenso das Schwellverhalten erklären, das bei einer chemischen Degradierung mit z. B.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  auftritt (Abbildung 101 a und b). Durch die Ergebnisse mit sowohl flüssigem, als auch vernetztem Alginat wurde deutlich, dass die genutzte AlgL auch vernetztes Ba-Alginat degradieren kann. Offen bleibt, ob die AlgL nur spezi-



fisch poly-G-Blöcke degradiert, oder auch eine Spezifität zu poly-M-Blöcken besitzt. Diese Frage konnte in dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden und bedarf weiterer Experimente.

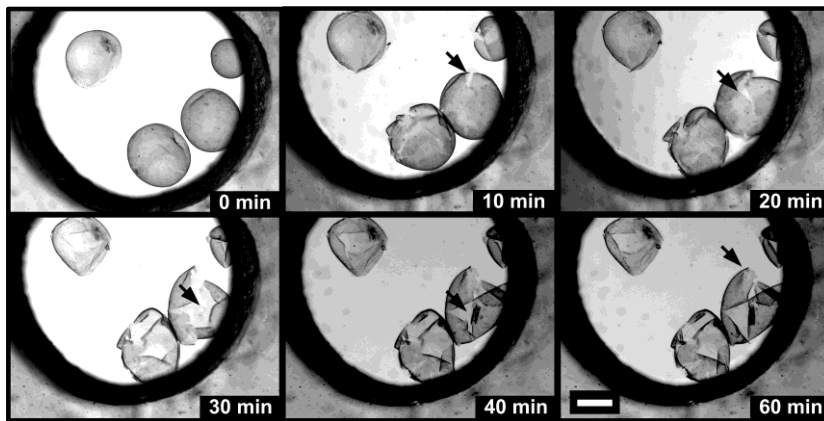


**Abbildung 101:** MODELLIERUNG DER DEGRADIERUNG VON GERÜSTSTRUKTUREN AUS ALGINAT MIT SPEZIFISCHEN ENZYMEN UND DESTRUKTIVEN SUBSTANZEN.

**a** Mechanismus der enzymatischen Degradierung mit Alginatlyase. **b** Mechanismus der chemischen Degradierung mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und unter der Annahme, dass die mit Barium komplexierten poly-G-Blöcke nicht enzymatisch degradiert werden können, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die enzymatische Degradierung von Alginatkugeln so schnell abläuft, dass keine bzw. nur minimale osmotische Effekte beobachtet werden können. Die Ursache hierfür kann darin bestehen, dass die AlgL zwar durch die Lyase die Zahl der freien Moleküle im Innern der Kugel erhöht, gleichzeitig aber auch die Kugel so degradiert, dass die semipermeablen Eigenschaften der Alginatkugeln nicht mehr vorhanden sind. Ebenso konnten Kugeln beobachtet werden, die nach Applikation der AlgL an einer Stelle aufplatzen und der Inhalt der Alginatkugel austritt. Hierfür kann man die für die Erhöhung des Kontrasts genutzte Alzian-Färbung heranziehen, die die äußeren Bereiche der Kugel zusätzlich stabilisiert. Abbildung 102 zeigt die Degradierung von Alginatkugeln mit AlgL und belegt das Vorhandensein einer zusätzlich stabilisierenden Hülle, hervorgerufen durch die Alzian-Blau Färbung. Der Einfluss von interagierenden Substanzen wurde am Beispiel von poly-L-Lysin in dieser Arbeit (vgl. Abbildung 80 d) untersucht, und stützt diese Hypothese.

Durch die fortschreitende Degradierung der Alginat-Gerüststruktur, und durch eine nicht ausschließbare Erhöhung des osmotischen Drucks, platzt die Kugel an der schwächsten Stelle auf. Die Degradierung der Alginatkugeln mit Chelatbildnern wie Natriumsulfat führt dahingegen nur zu einer geringfügigen Degradierung, die lediglich über das Anschwellen der Kugeln abzuleiten ist (Abbildung 101 b). Die Wirkweise von Natriumsulfat beruht in der Komplexbildung der Bariumionen, die im Alginat in Form der sog. „egg-box“-Struktur gebunden sind. Durch die Zugabe des Natriumsulfats werden die multivalenten Kationen mit dem Sulfat chelatisiert und infolge dieser Reaktion Natriumionen freigesetzt.



**Abbildung 102: ZEITLICHER VERLAUF DER DESTRUKTION VON ALGINATKUGELN MIT ALGINATLYASE ÜBER 60 MIN.**

Nach Applikation der Alginatlyase sind zunächst Risse in den Kugeln erkennbar, die im weiteren Verlauf immer weiter aufbrechen (schwarze Pfeile). Nach 40 min Inkubationszeit liegen nur noch vollkommen degradierte Alginatkugeln in Form einer schalenartigen Struktur vor. Maßstabsbalken für alle Bilder: 200  $\mu\text{m}$ .

Geht man von einer Komplexierung im Innern der Kugel aus, und zieht ferner die zunehmende Instabilität der Alginat-Gerüststruktur in Betracht, so lässt sich das Anschwellen der Kugel durch die Erhöhung des osmotischen Drucks im Innern der Kugel erklären, durch den Wasser bis zum Ausgleich des Konzentrationsunterschieds in die Kugel einströmt. Für die Alginatkugeln lässt sich somit die vereinfachte chemische Reaktion  $\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{Ba}^{2+}\text{-[Alginat]} \rightarrow 2 \text{Na}^+ + \text{BaSO}_4 + \text{[Alginat]}$  aufstellen. Dies bedeutet, dass bei der Komplexierung eines Bariumions zwei Natriumionen freigesetzt werden, die dann den osmotischen Druck in der Kugel beeinflussen. Durch die erhöhte Dichte der Bariumionen im Innern der Alginatkugeln wird an dieser Stelle davon ausgegangen, dass die Wahrscheinlichkeit auch höher ist, dass die o. g. Reaktion hauptsächlich im Innern der Alginatkugel abläuft. Das verstärkte Anschwellen der Kugeln nach Zugabe von  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  im Vergleich zu EDTA kann dabei auf der unterschiedlichen Affinität/Wirkweise der beiden Substanzen bzgl. Barium beruhen.

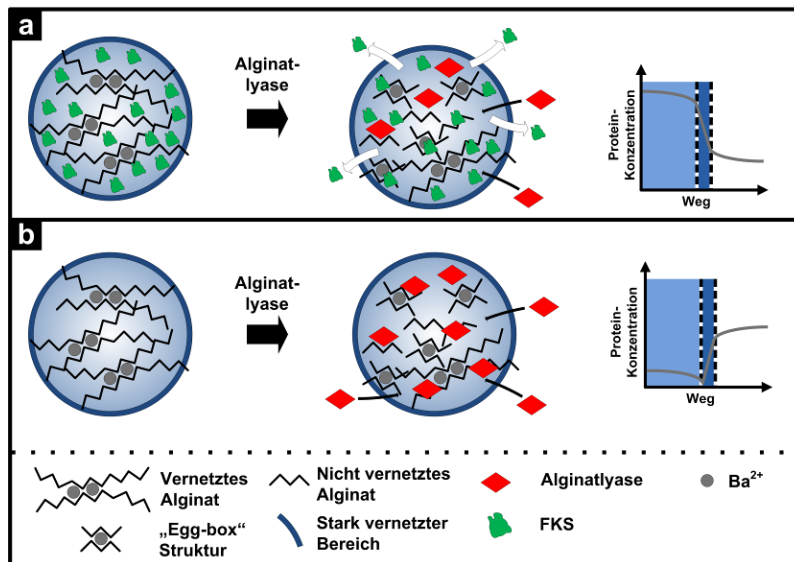
Eine weitere Erklärung für das Schwellverhalten der Alginatkugeln beruht auf dem Austausch von Ionen zwischen Alginat und Inkubationsmedium. Bajpai *et al.* beschreiben in ihrer Studie [393] das Schwellverhalten von Alginatkugeln unter verschiedenen Bedingungen. Sie stellten dabei fest, dass insbesondere  $\text{Na}^+$ -Ionen im Inkubationsmedium zu einem Schwellen der Kugeln und schließlich zu einer Degradierung führen können, wohingegen eine Inkubation in destilliertem Wasser nicht zu diesem Effekt führt. Aufgrund dieser Beobachtung schlussfolgerten sie, dass das  $\text{Na}^+$  in die Kugel diffundiert,  $\text{Ca}^{2+}$  ersetzt und es dadurch zunächst zu einer Instabilität führt, die mit einer Desintegration der Alginatkugeln [393] verbunden ist. Phosphat-Ionen, die z. B. in PBS vorhanden sind, reagieren mit den herausgelösten  $\text{Ca}^{2+}$  zu Kalziumphosphat, was die Wasseraufnahme und Degradierung der Alginatkugeln hervorruft.

Die Destruktion der Alginatkugeln nach FKS-Inkubation erfolgte, wenn überhaupt, erst nach 60 min. Die Beobachtung war gerade hinsichtlich der Nutzung von FKS in vielen Kulturmedien interessant, da dies die Destruktion stark beeinflussen kann. Als Ursache dieser Beobachtung können zwei Erklärungen dienen (Abbildung 103 a und b). Die naheliegende Erklärung ist ein Konzentrationsgradient der AlgL, der sich durch die Resorption von Proteinen des FKS im Innern der Alginatkugeln einstellt. Dies ist durchaus denkbar, da FKS eine sehr heterogene Proteinlösung ist und dadurch auch Proteine enthalten sein können, die durch die Poren des Alginat-Hydrogels diffundieren können. Zur Zugabezeit der AlgL kann eine hohe Konzentration von Protein im Innern vorliegen, die gemäß der Herstellerangaben von Seren bei bis zu 35-40 mg/ml (100% FKS) liegen kann. Hierdurch kann die Destruktion des Alginats durch die AlgL verlangsamt werden, da das Enzym zunächst den Konzentrationsgradienten überwinden muss, um an sein Substrat zu gelangen. Durch Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Serum und der damit verbundenen zeitlichen Verzögerung wird diese Hypothese untermauert.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Interaktion von Bestandteilen des FKS mit den Alginatmolekülen. Da FKS eine sehr heterogene Proteinlösung ist [418], ist auch eine Adsorption einiger Proteine an das Alginat denkbar, wie sie von Zheng *et al.* bereits für andere Partikel nachgewiesen werden konnte [419]. Die Beeinflussung der katalytischen Reaktion der AlgL durch eine solche Interaktion wurde in dieser Ar-



beit durch die Destruktionsversuche mit pLL bereits gezeigt. Ob die Beeinflussung durch die geänderten Ladungsverhältnisse, durch sterische Inhibierung oder einer Kombination aus beidem verursacht wird, konnte dabei nicht geklärt werden. In diesem Zusammenhang ist es ferner denkbar, dass durch Proteine, wie HSA oder FKS, mehr Wasser gebunden werden kann und die Alginatkugel dadurch stabilisiert wird [420]. Die Ergebnisse von Schneider *et al.* [420] werden somit weiter untermauert und machen deutlich, dass die Proteine auch einen definierten enzymatischen Abbau des Alginats (zumindest) verzögern können. Unter diesem Gesichtspunkt könnte die AlgL in Verbindung mit UHV-Alginaten auch genutzt werden, um z. B. die Langzeit-Stabilität durch Zugabe von bestimmten Reagenzien zu untersuchen.



**Abbildung 103: MECHANISMUS DER ENZYMATISCHEN DEGRADIERUNG IN ANWESENHEIT VON PROTEINEN.**

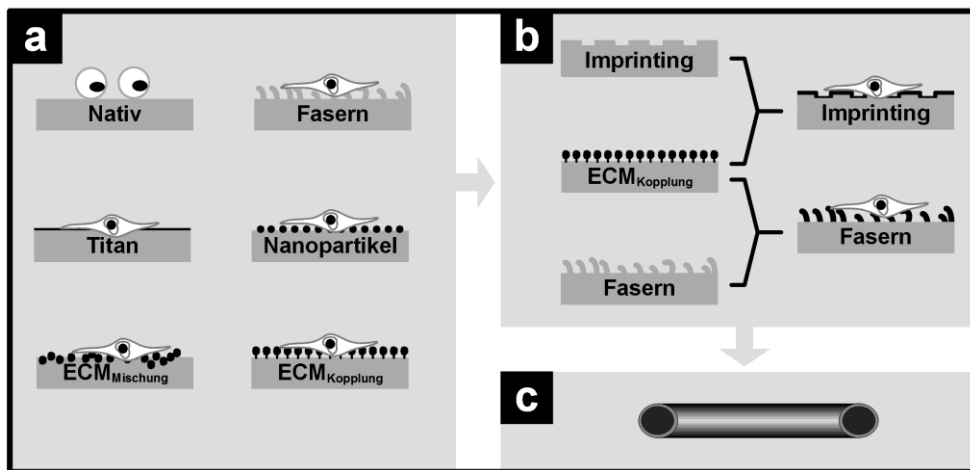
**a** Bei der enzymatischen Degradierung von Alginatkugeln mit vorangegangener Inkubation in proteinhaltiger Lösung muss ein Stoffaustausch von Protein in der Kugel und Alginatlyase außerhalb der Kugel erfolgen. Dieser Austausch ist für die verzögerte Degradierung verantwortlich.  
**b** Bei einer vorangegangenen Inkubation in proteinfreier Lösung kann das Enzym ungehindert in die Kugel diffundieren und die Reaktion katalysieren.

Die in dieser Arbeit genutzte Methodik zur Analyse der Destruktion sphärischer Alginat-Hydrogele basiert auf der mikroskopischen Analyse von zweidimensionalen Bildern, von denen dann auf das 3D-Modell geschlossen wird. Detailliertere Aufnahmen sind durch CLSM-Aufnahmen prinzipiell möglich, aber in der zeitlichen Auflösung limitiert. In diesen Experimenten wurde zusätzlich zur Kontrastierung der Alginatkugeln ein Farbstoff, Alzian-Blau, verwendet. Dieser ist ebenso notwendig, da durch z. B. das Anschwellen der Kugel der Kontrast stark abnimmt und die Kugel dadurch nicht mehr sichtbar ist. Durch die Färbung der Alginat-Oberfläche mit dem Farbstoff kann eine Beeinflussung der Katalyse nicht ausgeschlossen werden, muss aber zur besseren Analyse hingenommen werden. Eine Erhöhung der zeitlichen Auflösung auf z. B. 10 s Intervalle ist empfehlenswert und möglich und sollte für eine Detektion schneller Kinetiken genutzt werden. Die Kombination von mehreren spezifischen Lyasen, die die Degradierung von Polymeren katalysieren, kann in auf den Ergebnissen aufbauenden Ansätzen zu einer Herstellung von neuartigen Zell-Biomaterial Systemen führen.

### Einschätzung für zukünftige Alginat-basierte Gerüststrukturen

In dieser Arbeit wurden mehrere Ansätze untersucht, um aus dem nativen bioinerten Alginat Kultivierungsoberflächen zu entwickeln (siehe Abbildung 104 a), die für die Kultivierung von humanen Stammzellen geeignet sind. Nach eigener Einschätzung sind einige Ansätze in der gezeigten Form zunächst für einfache Zellsysteme wie z. B. Fibroblasten einsetzbar. Dennoch kann durch eine weitere Verfeinerung der Modifikationen z. B. durch die chemische Modifikation des Alginats eine Zellreaktion in Form einer Adhäsion erwartet werden. Insbesondere topographische Strukturierungen von Alginaten wie z. B. die Aufbringung von Fasern können hierdurch zu neuartigen ECM-Derivaten bzw. Zellmodellen führen. Die Modifikationen mit Metallen (Titan) und ECM-Mischungen sind potenzielle Ansätze auch für komplexere Zellsysteme, sind aber durch den Herstellungsprozess auf einfache Gerüststrukturen wie z. B. planare oder sphärische begrenzt. Die Modifikation mit Nano- bzw. Mikropartikeln ist insbesondere von der Funktionalisierung der Partikel selbst abhängig. Mit entsprechender Modifikation kann hier ein elegantes Baukas-

tenprinzip entwickelt werden, das es erlaubt Alginat-Gerüststrukturen je nach Anforderung im Vernetzungsprozess zu modifizieren. Dennoch bleibt offen, ob die partikulären Systeme mit komplexen Proteingemischen wie Matrigel funktionalisiert werden können und ob diese dann immer noch mit dem Alginat interagieren können, da dies hauptsächlich durch die elektrostatische Interaktion des PEI mit dem Alginat initiiert wird. Die Mischung von Alginaten mit ECM Proteinen mit anschließender Aufkonzentrierung ist ferner auf planare Gerüststrukturen begrenzt und kann daher für die Nutzung bei komplexen Gerüststrukturen ausgeschlossen werden. Die bestmögliche Kombination stellt demnach die kovalente Kopplung von Molekülen mit (strukturierten) Alginat-Gerüststrukturen dar. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass strukturierte Alginate mittels der chemischen Modifikation derart funktionalisiert werden können, dass hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten auf diesen Gerüststrukturen kultiviert werden können und sollte somit auch auf beliebige Alginatstrukturen übertragbar sein (Abbildung 104 b). In dieser Arbeit wurden ferner lediglich zweidimensionale Gerüststrukturen untersucht. Es kann angenommen werden, dass die Übertragung der chemischen Funktionalisierung auf dreidimensionale Gerüststrukturen ebenso anwendbar ist.



**Abbildung 104: ZUKÜNFTIGE ANWENDUNGEN VON ALGINAT-GERÜSTSTRUKTUREN IM KONTEXT DES TISSUE ENGINEERING.** **a** Die untersuchten Modifikationen in der vorliegenden Arbeit führen zu einer Änderung der Oberflächeneigenschaften, die die Zellen im Gegensatz zur nativen Oberfläche zur Adhäsion befähigt. Die vielversprechendste und universale (planare und sphärische Gerüststrukturen) ist die kovalente Modifikation von Alginaten in Verbindung mit ECM-Proteinen. **b** Komplexere Modellsysteme müssen über die biochemische Modifikation planarer bzw. konvexer Gerüststrukturen hinausgehen, um die in-vivo-Situation der Zellen zu adaptieren. Die Einführung von Textureigenschaften wie Kanäle oder Fasern mit anschließender Biofunktionalisierung ist für weiterführende Untersuchungen geeignet. **c** Die Erkenntnisse aus diesen zukünftigen Studien können dann für die Konstruktion komplexer dreidimensionaler Gerüststrukturen verwendet werden, die möglicherweise in vivo angewendet werden können.

Die topographische Modifikation mit Fasern ist hierbei eine potenzielle Methode, um 3D-ähnliche Umgebungen zu erzeugen, die dennoch auf zweidimensionalen Oberflächen basieren und damit auch eine hohe Kompatibilität mit z. B. optischen Analysemethoden besitzen. Durch die Verlängerung der Fasern, wie es bereits in Abbildung 37 gezeigt wurde, können mit der chemischen Modifikation Umgebungen geschaffen werden, die eine dreidimensionale Interaktion der Zellen mit der Umgebung erlauben und dadurch eine weitere Annäherung an die in-vivo-Situation darstellen. Eine Kombination von den Methoden mit dem höchsten Potenzial kann zukünftig für die Untersuchung und Entwicklung von komplexen dreidimensionalen Gerüststrukturen genutzt werden (Abbildung 104 c).

### **Kern-Hülle-Alginatkugeln zur Einstellung der elastischen Eigenschaften**

Die zukünftigen Anwendungsfelder werden, ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, insbesondere in der Verfeinerung von bestehenden Zellmodellen gesehen. Durch das Alginat ist generell eine Einstellung der mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung möglich. Aus den Erfahrungen ist dies sowohl

für planare Oberflächen, als auch für sphärische Alginat-basierte Gerüststrukturen möglich. Hierfür können entweder die Parameter der Vernetzung geändert werden, aber auch die physiko-chemischen Eigenschaften des Alginats selbst [421].

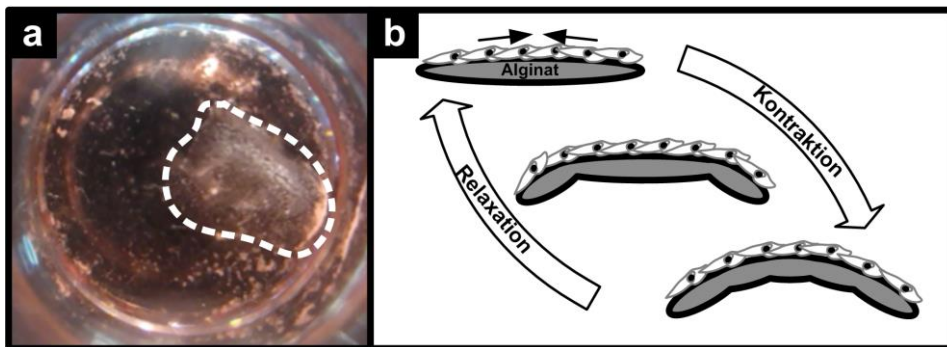
Durch die Möglichkeit Kern-Hülle-Alginatkugeln herzustellen (siehe [74]) könnte dies auch unter Konstanthaltung der unmittelbaren Adhäsionsfläche erfolgen, indem nur die mechanischen Eigenschaften des Kugelkerns variiert werden. Nach Biofunktionalisierung der Gerüststrukturen können diese für Screenings eingesetzt werden, um beispielsweise die optimalen mechanischen Eigenschaften der Gerüststruktur für z. B. die Proliferation aber auch Differenzierung der Zellen zu untersuchen. Ein hohes Potenzial wird bei dieser Methode bei der Differenzierung von z. B. hiPSCs gesehen, da bereits in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass die mechanischen Eigenschaften des Substrats maßgeblich die Differenzierung dieser Zellen beeinflussen kann [397, 422]. Ferner könnten dadurch in Kombination mit der hiPSC-Kultur krankheitsspezifische Zellmodelle entwickelt werden, die für eine personalisierte Medizin eingesetzt werden können. Beispielsweise könnte ein Zellmodell entwickelt werden, das sowohl die Struktur der Zellumgebung eines gesunden als auch eines pathologischen Myokards [423] (z. B. Kardiomyopathie) abbilden und zur Wirkstofftestung eingesetzt werden kann.

Ebenso ist es möglich, auf Grundlage der erzielten Ergebnisse, Alginat-basierte Gerüststrukturen die sowohl als Kultivierungsfläche für hiPSCs, als auch für hiPSC-abgeleitete (differenzierte) Zellen zu entwickeln. Der Vorteil hierbei wäre, dass man die hiPSC direkt auf den Oberflächen differenzieren könnten und dieses System danach dem *Tissue Engineering*, der Wirkstoffsuche, aber auch Zytotoxizitätstests zugänglich gemacht werden kann. Die Zwischenschritte von hiPSCs und differenzierten Zellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, sollte aber mit gängigen Differenzierungsprotokollen auf der Basis adhärenter Zellen [424] möglich sein. Die Strukturierung der Gerüststruktur wird zukünftig weiter in den Fokus rücken, da beispielsweise die Ausrichtung der Zellen in kardialen Gewebe [411] die Funktionalität des Gewebes mitbestimmen. In dieser Arbeit wurde auf Basis des  $\mu$ -Contact-Printing hierfür eine Methode zur Verfügung gestellt werden, die es erlaubt, teilautomatisiert die Hydrogele zu strukturieren. Würde die Differenzierung auf diesen Gerüststrukturen erfolgen, so lägen danach nicht nur spezialisierte Zellen vor, sondern eine Art „*Ready-to-use*“ Mikrogewebe, das direkt für z. B. Wirkstofftests genutzt werden könnte.

### Abschließendes Fazit und Ausblick

In einem kürzlich veröffentlichten Artikel von Badenes *et al.* [425] erfolgt eine im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit interessante Schlussfolgerung. Sinngemäß heißt es dort, dass „es vorstellbar ist, dass für jede spezifische Anwendung (Expansion, Differenzierung [...]) Mikroträger sorgfältig entworfen werden, um nicht nur die Zelladhäsion zu unterstützen, sondern [gleichzeitig] physikalische, mechanische und/oder biochemische Signale für die gewünschte Differenzierungsrichtung anzubieten“. Mögliche Strategien für die Entwicklung solcher verbesserten Mikroträger wären die Untersuchung von Biomaterialien mit verschiedenen Charakteristika (z. B. Festigkeit oder Oberflächeneigenschaften) sowie Kopplung von Biomolekülen an das Material selbst. Anhand des Biomaterials Alginat, wurde untersucht, welche Modifikationen letztendlich eine Kultivierung von humanen Stammzellen erlauben. Die zelluläre Reaktion auf das modifizierte Biomaterial wurde anhand der automatisierten Lebendzell-Mikroskopie nicht-invasiv in zweidimensionalen Kulturschalen untersucht und, wenn möglich, auf Mikroträger übertragen. Darüber hinaus wurden an das Biomaterial Moleküle gekoppelt, um die Bioaktivität des Materials weiter zu verbessern und auch für die komplexe Kultivierung von pluripotenten Stammzellen nutzen zu können. Die geforderten Charakteristika des Biomaterials bzgl. Festigkeit konnten mit dem Biomaterial Alginat bedient werden, bei dem es mehrere Möglichkeiten der Variation dieses Parameters gibt. Der direkte Effekt konnte dabei auf hiPSC-abgeleitete Kardiomyozyten beobachtet werden, der eine Interaktion von Zellen und Gerüststruktur beinhaltet. Zusätzlich wurden Methoden zur Degradierung der Gerüststruktur untersucht, deren Ergebnisse auch für Mikroträger Gültigkeit besitzen. Alginat-basierte Gerüststrukturen lassen sich

demnach enzymatisch degradieren, was auf biologischer Ebene einen Vorteil gegenüber der enzymatischen Degradierung der Zell-Matrix-Interaktion durch z. B. Trypsin darstellt. Um den steigenden Bedarf dieser Untersuchungen zu bedienen, stehen als weitere Resultate dieser Arbeit mehrere Ansätze zur Verfügung, die entweder über einen fluidisch vernetzten Mikroskopieaufbau, oder ein Beutel-basiertes Kultivierungsgefäß zur effizienten Herstellung von „hängenden Tropfen“ realisiert werden können. Es zeigte sich, dass Alginate für die Herstellung bioaktiver Mikroträger hervorragend geeignet sind und sich insbesondere durch das Verfahren der Carbodiimid-Chemie vielfältig modifizieren lassen. Durch die Konjugation von Tyramin ist es ferner möglich ein universelles Oberflächensystem zur Verfügung zu stellen, dass nach weiterer Beschichtung sogar für Langzeit-Kultivierung von hiPSCs und davon abgeleitete hiPSC-CM geeignet ist. Die weiteren Anknüpfungspunkte sind die Untersuchung und Übertragung von Differenzierungsprotokollen auf die erzielten Resultate, um beispielsweise Differenzierungsprotokollen auf Oberflächen durchzuführen, die den mechanischen Eigenschaften des Zielzelltyps entsprechen.



**Abbildung 105:** ÜBERTRAGUNG DER MODIFIKATION VON FIXIERTEN ALGINATMEMBRANEN AUF FREI SCHWIMMENDE GERÜSTSTRUKTUREN MIT KARDIOMYOZYTEN (hiPSC-CM).

**a** Makroskopische Aufnahme der Gerüststruktur mit hiPSC-CM. **b** Schematische Zeichnung der Zell-Gerüststruktur-Interaktion auf frei schwimmenden Alginat-Hydrogelen. Die Kontraktion erfolgt nicht nur lateral, sondern verformt die Gerüststruktur dreidimensional.

Um den Anforderungen der aktuellen Ansätze des *Tissue Engineerings* zu genügen, ist letztendlich eine Übertragung auf dreidimensionale Alginat-GS erforderlich. In einem sich an diese Arbeit anknüpfenden Promotionsvorhaben wurden erste Experimente durchgeführt, die diese Übertragung beinhalteten. Als Zwischenergebnis dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass sich die Resultate der vorliegenden Arbeit nicht nur auf dreidimensionale Alginatkugeln (Mikroträger) übertragen lassen (wie in Abschnitt 4.3.5, Seite 118 gezeigt), sondern auch auf frei schwimmende, runde Alginatmembranen anwendbar sind. Mittels der Tyramin-Modifikation mit anschließender Beschichtung mit ECM-Proteinen (Matrigel) wurde die Gerüststruktur biofunktionalisiert und anschließend mit hiPSC-CM besiedelt. Durch das freie Schwimmen der Gerüststruktur im Medium besitzt diese Art der Gerüststruktur zusätzliche Freiheitsgrade, die sich auch in einer dreidimensionalen Kontraktion äußert (Abbildung 105). Die Art der Kontraktion weist weitere Strategien für die Konstruktion eines dreidimensionalen Myokards abgeleitet werden. Durch die Verbindung von zwei zellularisierter Gerüststrukturen entstünde eine Art Herzkammer, die insbesondere als Modellsystem genutzt werden könnte.

Das in der Einleitung verwendete Zitat „It takes a village to grow a tissue“ [16] von Kaplan *et al.* ist, nach den Erkenntnissen dieser Arbeit, eine berechtigte Metapher im Kontext des *Tissue Engineerings*. Durch die stetige Weiterentwicklung in diesem Wissenschaftsfeld werden die Möglichkeiten bzw. Herausforderungen tendenziell komplexer, sei es durch die Fortschritte im Bereich der Zellbiologie (z. B. induzierte Pluripotenz), als auch durch den Einzug von Technologie-Plattformen (z. B. 3D-Druck). Dennoch konnten in dieser Arbeit hierfür Ansätze entwickelt werden, die im Kontext des *Tissue Engineerings* dazu beitragen können, qualitativ hochwertige Zellmodelle effizienter und qualitativ hochwertiger herzustellen.

# Literaturverzeichnis

---

- [1] Goodbye, flat biology? *Nature*, 424 (6951): 861, 2003. Editorial.
- [2] E. S. Lander, L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822): 860–921, 2001.
- [3] J. C. Venter. The sequence of the human genome. *Science*, 291 (5507): 1304–1351, 2001.
- [4] E. S. Lander. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470 (7333): 187–197, 2011.
- [5] H. Liu, J. Lin, and K. Roy. Effect of 3D scaffold and dynamic culture condition on the global gene expression profile of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*, 27 (36): 5978–5989, 2006.
- [6] J. M. Kelm, N. E. Timmins, C. J. Brown, M. Fussenegger, and L. K. Nielsen. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol. Bioeng.*, 83 (2): 173–180, 2003.
- [7] T. T. Lau, L. Q. P. Lee, W. Leong, and D.-A. Wang. Formation of model hepatocellular aggregates in a hydrogel scaffold using degradable genipin crosslinked gelatin microspheres as cell carriers. *Biomed. Mater.*, 7 (6): 065003, 2012.
- [8] Pubmed. Datenbank-Abfrage: "tissue engineering". Internet, 12.01.2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=tissue+engineering>.
- [9] S. Smith. Creating body parts in a lab: 'Things are happening now'. CNN, 10.04.2014. <http://edition.cnn.com/2014/04/10/health/tissue-engineering-success/>.
- [10] C. Briseño. Experimente mit Ratten: Mediziner züchten erstmals künstliche Lunge. Spiegel Online, 13.07.2010. <http://www.spiegel.de/wissenschaft/medizin/experimente-mit-ratten-mediziner-zuechten-erstmal-kuenstliche-lunge-a-706190.html>.
- [11] P. Macchiarini, P. Jungebluth, T. Go, M. A. Asnaghi, L. E. Rees *et al.* Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet*, 372 (9655): 2023 – 2030, 2008.
- [12] B. D. Lawrence, J. K. Marchant, M. A. Pindrus, F. G. Omenetto, and D. L. Kaplan. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials*, 30 (7): 1299–1308, 2009.
- [13] H. Talacua, A. I. Smits, D. E. Muylaert, J. W. van Rijswijk, A. Vink *et al.* In situ tissue engineering of functional small-diameter blood vessels by host circulating cells only. *Tissue Eng. Part A*, 21 (19-20): 2583–2594, 2015.
- [14] C. Willyard. The boom in mini stomachs, brains, breasts, kidneys and more. *Nature*, 523 (7562): 520–522, 2015.
- [15] Y. S. Zhang, A. Arneri, S. Bersini, S.-R. Shin, K. Zhu *et al.* Bioprinting 3D microfibrinous scaffolds for engineering endothelialized myocardium and heart-on-a-chip. *Biomaterials*, 110: 45–59, 2016.
- [16] D. L. Kaplan, R. T. Moon, and G. Vunjak-Novakovic. It takes a village to grow a tissue. *Nat. Biotechnol.*, 23 (10): 1237–1239, 2005.
- [17] F. Brandl, F. Sommer, and A. Goepferich. Rational design of hydrogels for tissue engineering: impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*, 28 (2): 134–146, 2007.
- [18] D. E. Ingber, V. C. Mow, D. Butler, L. Niklason, J. Huard *et al.* Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic. *Tissue Eng.*, 12 (12): 3265–3283, 2006.
- [19] R. Milo, P. Jorgensen, U. Moran, G. Weber, and M. Springer. BioNumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res.*, 38 (suppl 1): D750–D753, 2010.
- [20] F. Grinnell, D. G. Hays, and D. Minter. Cell adhesion and spreading factor: Partial purification and properties. *Exp. Cell Res.*, 110 (1): 175–190, 1977.
- [21] A. E. M. Seiler and H. Spielmann. The validated embryonic stem cell test to predict embryotoxicity in vitro. *Nat. Protoc.*, 6 (7): 961–978, 2011.
- [22] E. Berthier, E. W. Young, and D. Beebe. Engineers are from PDMS-land, biologists are from polystyrenia. *Lab. Chip*, 12 (7): 1224–1237, 2012.
- [23] M. M. Stevens and J. H. George. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 310 (5751): 1135–1138, 2005.
- [24] J. Lovmand, J. Justesen, M. Foss, R. H. Lauridsen, M. Lovmand *et al.* The use of combinatorial topographical libraries for the screening of enhanced osteogenic expression and mineralization. *Biomaterials*, 30 (11): 2015–2022, 2009.
- [25] M. Krampera, G. Pizzolo, G. Aprili, and M. Franchini. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone*, 39 (4): 678–683, 2006.
- [26] A. I. Caplan. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.*, 213 (2): 341–347, 2007.
- [27] J. Pattasseril, H. Varadaraju, L. Lock, and J. Rowley. Downstream technology landscape for large-scale therapeutic cell processing. *BioProcess Int.*, 11: 46–52, 2013.
- [28] J. Rowley, E. Abraham, A. Campbell, H. Brandwein, and S. Oh. Meeting lot-size challenges of manufacturing adherent cells for therapy. *BioProcess Int.*, 10 (3): 16–22, 2012.

- [29] M. J. Evans and M. H. Kaufman. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292 (5819): 154–156, 1981.
- [30] J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282 (5391): 1145–1147, 1998.
- [31] M. Amit, V. Margulets, H. Segev, K. Shariki, I. Laevsky *et al.* Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.*, 68 (6): 2150–2156, 2003.
- [32] B. Lo and L. Parham. Ethical issues in stem cell research. *Endocr. Rev.*, 30 (3): 204–213, 2009.
- [33] H. Hentze, P. L. Soong, S. T. Wang, B. W. Phillips, T. C. Putti *et al.* Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.*, 2 (3): 198–210, 2009.
- [34] K. Takahashi and S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4): 663–676, 2006.
- [35] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131 (5): 861–872, 2007.
- [36] S. Yamanaka. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 1 (1): 39–49, 2007.
- [37] P. W. Burridge, E. Matsa, P. Shukla, Z. C. Lin, J. M. Churko *et al.* Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat. Methods*, 11 (8): 855–860, 2014.
- [38] B.-Y. Hu, J. P. Weick, J. Yu, L.-X. Ma, X.-Q. Zhang *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 107 (9): 4335–4340, 2010.
- [39] E. Matsa, P. W. Burridge, and J. C. Wu. Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. *Sci. Transl. Med.*, 6 (239): 239ps6, 2014.
- [40] R. Detsch, B. Sarker, T. Zehnder, G. Frank, and A. R. Boccaccini. Advanced alginate-based hydrogels. *Mater. Today*, 18 (10): 590–591, 2015.
- [41] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int. J. Polym. Sci.*, 2011 (Article ID 290602): 1–19, 2011.
- [42] M. L. McCain, A. Agarwal, H. W. Nesmith, A. P. Nesmith, and K. K. Parker. Micromolded gelatin hydrogels for extended culture of engineered cardiac tissues. *Biomaterials*, 35 (21): 5462–5471, 2014.
- [43] J. Lee, M. J. Cuddihy, and N. A. Kotov. Three-dimensional cell culture matrices: State of the art. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 14 (1): 61–86, 2008.
- [44] J. E. Marszalek, C. G. Simon, C. Thodeti, R. K. Adapala, A. Murthy *et al.* 2.5D constructs for characterizing phase separated polymer blend surface morphology in tissue engineering scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.*, 101A (5): 1502–1510, 2013.
- [45] G. Eng, B. W. Lee, H. Parsa, C. D. Chin, J. Schneider *et al.* Assembly of complex cell microenvironments using geometrically docked hydrogel shapes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110 (12): 4551–4556, 2013.
- [46] D. W. Huttmacher. Biomaterials offer cancer research the third dimension. *Nat. Mater.*, 9 (2): 90–93, 2010.
- [47] T. Jacks and R. A. Weinberg. Taking the study of cancer cell survival to a new dimension. *Cell*, 111 (7): 923–925, 2002.
- [48] F. Ramirez and D. B. Rifkin. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol.*, 22 (2): 101–107, 2003.
- [49] J. Zoldan, E. D. Karagiannis, C. Y. Lee, D. G. Anderson, R. Langer *et al.* The influence of scaffold elasticity on germ layer specification of human embryonic stem cells. *Biomaterials*, 32 (36): 9612–9621, 2011.
- [50] G. Kumar, C. K. Tison, K. Chatterjee, P. S. Pine, J. H. McDaniel *et al.* The determination of stem cell fate by 3D scaffold structures through the control of cell shape. *Biomaterials*, 32 (35): 9188–9196, 2011.
- [51] A. Birgersdotter, K. R. N. Baumforth, A. Porwit, A. Sundblad, K. I. Falk *et al.* Three-dimensional culturing of the Hodgkin lymphoma cell-line L1236 induces a HL tissue-like gene expression pattern. *Leuk. Lymphoma*, 48 (10): 2042–2053, 2007.
- [52] Z. Su, H. Ma, Z. Wu, H. Zeng, Z. Li *et al.* Enhancement of skin wound healing with decellularized scaffolds loaded with hyaluronic acid and epidermal growth factor. *Mater. Sci. Eng. C*, 44: 440–448, 2014.
- [53] M.-T. Kasimir, G. Weigel, J. Sharma, E. Rieder, G. Seebacher *et al.* The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering. platelet adhesion and activation. *Thromb. Haemost.*, 94 (3): 562–567, 2005.
- [54] P. E. Dijkman, A. Driessen-Mol, L. Frese, S. P. Hoerstrup, and F. P. Baaijens. Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts. *Biomaterials*, 33 (18): 4545–4554, 2012.
- [55] N. W. Guldner, H. Zimmermann, and H.-H. Sievers. Nano-coating with titanium of glutaraldehyde-fixed heart valve prostheses enables a reduced immune response and a self-seeding within circulation. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, 21, pp. 463–476. InTech, 2011.
- [56] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32 (12): 3233–3243, 2011.
- [57] G. Abouna. Organ shortage crisis: Problems and possible solutions. *Transplant. Proc.*, 40 (1): 34–38, 2008.
- [58] E. Santos, G. Orive, R. M., and J. Luis. Cell-biomaterial interaction: Strategies to mimic the extracellular matrix. In *On Biomimetics*. InTech, 2011.
- [59] E. Cukierman. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294 (5547): 1708–1712, 2001.
- [60] A. Katsen-Globa, I. Meiser, Y. A. Petrenko, R. V. Ivanov, V. I. Lozinsky *et al.* Towards ready-to-use 3-D scaffolds for regenerative medicine: adhesion-based cryopreservation of human mesenchymal stem cells attached and spread within alginate-gelatin cryogel scaffolds. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 25 (3): 857–871, 2013.
- [61] C. O. Heras-Bautista, A. Katsen-Globa, N. E. Schloerer, S. Dieluweit, O. M. Abd El Aziz *et al.* The influence of physiological matrix conditions on permanent culture of induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*, 35 (26): 7374–7385, 2014.
- [62] S. M. Willerth and S. E. Sakiyama-Elbert. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. In *StemBook*. www.stembook.org, 2008.
- [63] E. Eisenbarth. Biomaterials for tissue engineering. *Adv. Eng. Mater.*, 9 (12): 1051–1060, 2007.
- [64] D. F. Williams. *Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press, 1999. ISBN 9780853237341.
- [65] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons. *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor, pp. xxv–xxxix. Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.

- [66] B. D. Ratner. *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, A History of Biomaterials, pp. xli–liii. Academic Press, 2013. ISBN 978-0-12-374626-9.
- [67] T. Furuhashi, C. Schwarzingler, I. Miksik, M. Smrz, and A. Beran. Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 154 (3): 351–371, 2009.
- [68] T. Andersen, B. L. Strand, K. Formo, E. Alsberg, and B. E. Christensen. Alginates as biomaterials in tissue engineering. In *Carbohydrate Chemistry: Chemical and Biological Approaches*, volume 37, pp. 227–258. The Royal Society of Chemistry, 2012.
- [69] P. Gacesa. Alginates. *Carbohydr. Polym.*, 8 (3): 161–182, 1988.
- [70] R. Westermeier, D. Patino, M. I. Piel, I. Maier, and D. G. Mueller. A new approach to kelp mariculture in Chile: production of free-floating sporophyte seedlings from gametophyte cultures of *Lessonia trabeculata* and *Macrocystis pyrifera*. *Aquacult. Res.*, 37 (2): 164–171, 2006.
- [71] M. Fertah, A. Belfkira, E. m. Dahmane, M. Taourirte, and F. Brouillette. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. *Arabian J. Chem.*, 2014.
- [72] B. H. Rehm. *Alginates: Biology and applications*, volume 13. Springer, 2009. ISBN 978-3-540-92678-8.
- [73] H. J. Kong, M. K. Smith, and D. J. Mooney. Designing alginate hydrogels to maintain viability of immobilized cells. *Biomaterials*, 24 (22): 4023–4029, 2003.
- [74] F. Ehrhart, E. Mettler, T. Böse, M. M. Weber, J. A. Vásquez *et al.* Biocompatible coating of encapsulated cells using ionotropic gelation. *PLoS ONE*, 8 (9): e73498, 2013.
- [75] H. Storz, K. J. Müller, F. Ehrhart, I. Gómez, S. G. Shirley *et al.* Physicochemical features of ultra-high viscosity alginates. *Carbohydr. Res.*, 344 (8): 985–995, 2009.
- [76] I. D. Hay, Z. U. Rehman, M. F. Moradali, Y. Wang, and B. H. A. Rehm. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb. Biotechnol.*, 6 (6): 637–650, 2013.
- [77] P. Lembre, C. Lorentz, and P. D. Martino. Exopolysaccharides of the biofilm matrix: A complex biophysical world. In *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: The Complex World of Polysaccharides*, 13, pp. 371–392. InTech, 2012.
- [78] U. Remminghorst and B. H. Rehm. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett.*, 28 (21): 1701–1712, 2006.
- [79] B. H. Rehm. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8 (8): 578–592, 2010.
- [80] G. Michel, T. Tonon, D. Scornet, J. M. Cock, and B. Kloareg. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *ectocarpus siliculosus*. insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in eukaryotes. *New Phytol.*, 188 (1): 82–97, 2010.
- [81] G. A. Paredes-Juarez, B. J. de Haan, M. M. Faas, and P. de Vos. The role of pathogen-associated molecular patterns in inflammatory responses against alginate based microcapsules. *J. Control. Release*, 172 (3): 983–992, 2013.
- [82] H. Zimmermann, D. Zimmermann, R. Reuss, P. J. Feilen, B. Manz *et al.* Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 16 (6): 491–501, 2005.
- [83] O. Skaugrud, A. Hagen, B. Borgersen, and M. Dornish. Biomedical and pharmaceutical applications of alginate and chitosan. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 16: 23–40, 1999.
- [84] R. van Schilfgaarde and P. de Vos. Factors influencing the properties and performance of microcapsules for immunoprotection of pancreatic islets. *J. Mol. Med.*, 77 (1): 199–205, 1999.
- [85] W. R. Gombotz and S. F. Wee. Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 64: 194–205, 2012.
- [86] L. Zhou, K. Nyberg, and A. C. Rowat. Understanding diffusion theory and Fick’s law through food and cooking. *Adv. Physiol. Educ.*, 39 (3): 192–197, 2015.
- [87] A. D. Augst, H. J. Kong, and D. J. Mooney. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Biosci.*, 6 (8): 623–633, 2006.
- [88] E. R. Morris. Molecular interactions in polysaccharide gelation. *Brit. Poly. J.*, 18 (1): 14–21, 1986.
- [89] K. I. Draget and C. Taylor. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll.*, 25 (2): 251–256, 2011.
- [90] H. Zimmermann, M. Hillgärtner, B. Manz, P. Feilen, F. Brunnenmeier *et al.* Fabrication of homogeneously cross-linked, functional alginate microcapsules validated by NMR-, CLSM- and AFM-imaging. *Biomaterials*, 24 (12): 2083–2096, 2003.
- [91] U. Zimmermann, S. Mimietz, H. Zimmermann, M. Hillgärtner, H. Schneider *et al.* Hydrogel-based non-autologous cell and tissue therapy. *Biotechniques*, 29 (3): 564–581, 2000.
- [92] K. I. Draget, K. Østgaard, and O. Smidsrød. Homogeneous alginate gels: A technical approach. *Carbohydr. Polym.*, 14 (2): 159–178, 1990.
- [93] T. G. Franzesi, B. Ni, Y. Ling, and A. Khademhosseini. A controlled-release strategy for the generation of cross-linked hydrogel microstructures. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (47): 15064–15065, 2006.
- [94] S. Sakai, S. Ito, Y. Ogushi, I. Hashimoto, N. Hosoda *et al.* Enzymatically fabricated and degradable microcapsules for production of multicellular spheroids with well-defined diameters of less than 150µm. *Biomaterials*, 30 (30): 5937–5942, 2009.
- [95] S. Sakai and K. Kawakami. Both ionically and enzymatically crosslinkable alginate-tyramine conjugate as materials for cell encapsulation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 85A (2): 345–351, 2007.
- [96] S. Sakai and K. Kawakami. Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically cross-linkable alginate. *Acta Biomater.*, 3 (4): 495–501, 2007.
- [97] K. Moebus, J. Siepmann, and R. Bodmeier. Alginate–poloxamer microparticles for controlled drug delivery to mucosal tissue. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72 (1): 42–53, 2009.
- [98] S. Mandal, S. K. Basu, and B. Sa. Sustained release of a water-soluble drug from alginate matrix tablets prepared by wet granulation method. *AAPS PharmSciTech*, 10 (4): 1348–1356, 2009.
- [99] A. Groboillot, D. K. Boadi, D. Poncelet, and R. J. Neufeld. Immobilization of cells for application in the food industry. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 14 (2): 75–107, 1994.
- [100] F. Mancini, L. Montanari, D. Peressini, and P. Fantozzi. Influence of alginate concentration and molecular weight on functional properties of mayonnaise. *LWT - Food Sci. Technol.*, 35 (6): 517–525, 2002.
- [101] S. Pallandre, E. Decker, and D. McClements. Improvement of stability of oil-in-water emulsions containing caseinate-coated droplets by addition of sodium alginate. *J. Food Sci.*, 72 (9): E518–E524, 2007.
- [102] F. Paul, A. Morin, and P. Monsan. Microbial polysaccharides with actual potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.*, 4 (2): 245–259, 1986.
- [103] V. V. Nandini, K. V. Venkatesh, and K. C. Nair. Alginate impressions: A practical perspective. *J. Conserv. Dent.*, 11 (1): 37–41, 2008.



- [104] Y. Qin. The characterization of alginate wound dressings with different fiber and textile structures. *J. Appl. Polym. Sci.*, 100 (3): 2516–2520, 2006.
- [105] F. Lim and A. M. Sun. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, 210 (4472): 908–910, 1980.
- [106] H. Zimmermann, S. G. Shirley, and U. Zimmermann. Alginate-based encapsulation of cells: past, present, and future. *Curr. Diab. Rep.*, 7 (4): 314, 2007.
- [107] S. Holtan, P. Bruheim, and G. Skjåk-Bræk. Mode of action and subsite studies of the guluronan block-forming mannuronan C-5 epimerases AlgE1 and AlgE6. *Biochem. J.*, 395 (2): 319–329, 2006.
- [108] A. Morea, K. Mathee, M. J. Franklin, A. Giacomini, M. O'Regan *et al.* Characterization of algG encoding C5-epimerase in the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens*. *Gene*, 278 (1-2): 107–114, 2001.
- [109] P. Nyvall, E. Corre, C. Boisset, T. Barbeyron, S. Rousvoal *et al.* Characterization of mannuronan C-5-epimerase genes from the brown alga *Laminaria digitata*. *Plant Physiol.*, 133 (2): 726–735, 2003.
- [110] A. Tøndervik, G. Klinkenberg, F. L. Aachmann, B. I. G. Svanem, H. Ertesvåg *et al.* Mannuronan C-5 epimerases suited for tailoring of specific alginate structures obtained by high-throughput screening of an epimerase mutant library. *Biomacromolecules*, 14 (8): 2657–2666, 2013.
- [111] K. Draget, G. Skjåk-Bræk, and O. Smidsrød. Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. *Carbohydr. Polym.*, 25 (1): 31–38, 1994.
- [112] J. Burana-osot, S. Hosoyama, Y. Nagamoto, S. Suzuki, R. J. Linhardt *et al.* Photolytic depolymerization of alginate. *Carbohydr. Res.*, 344 (15): 2023–2027, 2009.
- [113] B.-h. Chueh, Y. Zheng, Y.-s. Torisawa, A. Y. Hsiao, C. Ge *et al.* Patterning alginate hydrogels using light-directed release of caged calcium in a microfluidic device. *Biomed. Microdevices*, 12 (1): 145–151, 2010.
- [114] R. Malpique, L. M. Osório, D. S. Ferreira, F. Ehrhart, C. Brito *et al.* Alginate encapsulation as a novel strategy for the cryopreservation of neurospheres. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16 (5): 965–977, 2010.
- [115] O. Smidsrød and G. Skjåk-Bræk. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.*, 8 (0): 71–78, 1990.
- [116] H. S. Kim, C.-G. Lee, and E. Y. Lee. Alginate lyase: Structure, property, and application. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 16 (5): 843–851, 2011.
- [117] V. Breguet, U. v. Stockar, and I. W. Marison. Characterization of alginate lyase activity on liquid, gelled, and complexed states of alginate. *Biotechnol. Prog.*, 23 (5): 1223–1230, 2007.
- [118] M. Yamasaki, S. Moriwaki, O. Miyake, W. Hashimoto, K. Murata *et al.* Structure and function of a hypothetical pseudomonas aeruginosa protein PA1167-classified into family PL-7: A novel alginate lyase with a beta-sandwich fold. *J. Biol. Chem.*, 279 (30): 31863–31872, 2004.
- [119] K. Formo, O. A. Aarstad, G. Skjåk-Bræk, and B. L. Strand. Lyase-catalyzed degradation of alginate in the gelled state: Effect of gelling ions and lyase specificity. *Carbohydr. Polym.*, 110: 100–106, 2014.
- [120] S. K. Leslie, D. J. Cohen, J. Sedlacek, E. J. Pinsker, B. D. Boyan *et al.* Controlled release of rat adipose-derived stem cells from alginate microbeads. *Biomaterials*, 34 (33): 8172–8184, 2013.
- [121] T. Y. Wong, L. A. Preston, and N. L. Schiller. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annu. Rev. Microbiol.*, 54 (1): 289–340, 2000.
- [122] L. C. Lundqvist, M. Jam, T. Barbeyron, M. Czjzek, and C. Sandström. Substrate specificity of the recombinant alginate lyase from the marine bacteria *pseudomonas alginovora*. *Carbohydr. Res.*, 352: 44–50, 2012.
- [123] Y. Iwamoto, R. Araki, K. Iriyama, T. Oda, H. Fukuda *et al.* Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *alteromonas sp.* strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (1): 133–142, 2001.
- [124] J. Preiss and G. Ashwell. Alginic acid metabolism in bacteria I. enzymatic formation of unsaturated oligosaccharides and 4-deoxy-1-erythro-5-hexoseulose uronic acid. *J. Biol. Chem.*, 237 (2): 309–316, 1962.
- [125] J. A. Rowley, G. Madlambayan, and D. J. Mooney. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials*, 20 (1): 45–53, 1999.
- [126] E. Alsberg, K. Anderson, A. Albeiruti, R. Franceschi, and D. Mooney. Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J. Dent. Res.*, 80 (11): 2025–2029, 2001.
- [127] S. A. Bencherif, R. W. Sands, D. Bhatta, P. Arany, C. S. Verbeke *et al.* Injectable preformed scaffolds with shape-memory properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109 (48): 19590–19595, 2012.
- [128] J. L. Drury and D. J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24 (24): 4337–4351, 2003.
- [129] L. Fan, M. Cao, S. Gao, T. Wang, H. Wu *et al.* Preparation and characterization of sodium alginate modified with collagen peptides. *Carbohydr. Polym.*, 93 (2): 380–385, 2013.
- [130] G. T. Hermanson. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2nd edition, 2008. ISBN 978-0123705013.
- [131] M. M. Gepp, F. Ehrhart, S. G. Shirley, S. Howitz, and H. Zimmermann. Dispensing of very low volumes of ultra high viscosity alginate gels: a new tool for encapsulation of adherent cells and rapid prototyping of scaffolds and implants. *Biotechniques*, 46 (1): 31–43, 2009.
- [132] S. Khalil, J. Nam, and W. Sun. Multi-nozzle deposition for construction of 3D biopolymer tissue scaffolds. *Rapid Prototyping J.*, 11 (1): 9–17, 2005.
- [133] M. Gruene, M. Pflaum, A. Deiwick, L. Koch, S. Schlie *et al.* Adipogenic differentiation of laser-printed 3D tissue grafts consisting of human adipose-derived stem cells. *Biofabrication*, 3 (1): 015005, 2011.
- [134] D. L. Cohen, E. Malone, H. Lipson, and L. J. Bonassar. Direct freeform fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries. *Tissue Eng.*, 12 (5): 1325–1335, 2006.
- [135] C.-L. Ko, Y.-C. Tien, J.-C. Wang, and W.-C. Chen. Characterization of controlled highly porous hyaluronan/gelatin cross-linking sponges for tissue engineering. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 14: 227–238, 2012.
- [136] L. Shapiro and S. Cohen. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials*, 18 (8): 583–590, 1997.
- [137] A. Tripathi, T. Vishnoi, D. Singh, and A. Kumar. Modulated crosslinking of macroporous polymeric cryogel affects in vitro cell adhesion and growth. *Macromol. Biosci.*, 13 (7): 838–850, 2013.
- [138] J. M. Jones and J. A. Thomson. Human embryonic stem cell technology. *Semin. Reprod. Med.*, 18 (02): 219–224, 2000.
- [139] J. Beers, D. R. Gulbranson, N. George, L. I. Siniscalchi, J. Jones *et al.* Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nat. Protoc.*, 7 (11): 2029–2040, 2012.



- [140] Y. Morimoto and S. Takeuchi. Three-dimensional cell culture based on microfluidic techniques to mimic living tissues. *Biomater. Sci.*, 1 (3): 257–264, 2013.
- [141] S. M. Frisch and H. Francis. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.*, 124 (4): 619–626, 1994.
- [142] U. S. Schwarz and I. B. Bischofs. Physical determinants of cell organization in soft media. *Med. Eng. Phys.*, 27 (9): 763–772, 2005.
- [143] H.-I. Chang and Y. Wang. Cell responses to surface and architecture of tissue engineering scaffolds. In *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*, pp. 569–588. InTech, 2011.
- [144] E. Lih, S. H. Oh, Y. K. Joung, J. H. Lee, and D. K. Han. Polymers for cell/tissue anti-adhesion. *Progress in Polymer Science*, 44: 28–61, 2015.
- [145] S. Michaelis, R. Robelek, and J. Wegener. Studying cell–surface interactions in vitro: A survey of experimental approaches and techniques. In *Tissue Engineering III: Cell-Surface Interactions for Tissue Culture*, pp. 33–66. Springer, 2012.
- [146] S. L. Hirsh, D. R. McKenzie, N. J. Nosworthy, J. A. Denman, O. U. Sezerman *et al.* The vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids Surf., B*, 103: 395–404, 2013.
- [147] L. Vroman and A. L. Adams. Identification of rapid changes at plasma-solid interfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 3 (1): 43–67, 1969.
- [148] S.-W. Tsai, F.-Y. Hsu, and Y. J. Wang, C. Encapsulation and growth characteristics of three different cells in alginate gel beads containing reconstituted collagen fibers. *Biomed. Eng. Appl. Basis Commun.*, 18 (02): 62–66, 2006.
- [149] M. D. Mager, V. LaPointe, and M. M. Stevens. Exploring and exploiting chemistry at the cell surface. *Nat. Chem.*, 3 (8): 582–589, 2011.
- [150] G. Bell, M. Dembo, and P. Bongrand. Cell adhesion. competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys. J.*, 45 (6): 1051–1064, 1984.
- [151] J. Z. Borysenko and W. Woods. Density, distribution and mobility of surface anions on a normal/transformed cell pair. *Exp. Cell Res.*, 118 (2): 215–227, 1979.
- [152] M. H. Lee, P. Ducheyne, L. Lynch, D. Boettiger, and R. J. Composto. Effect of biomaterial surface properties on fibronectin alpha5beta1 integrin interaction and cellular attachment. *Biomaterials*, 27 (9): 1907–1916, 2006.
- [153] J. H. Lee, H. W. Jung, I.-K. Kang, and H. B. Lee. Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. *Biomaterials*, 15 (9): 705–711, 1994.
- [154] B. Li, Y. Ma, S. Wang, and P. M. Moran. Influence of carboxyl group density on neuron cell attachment and differentiation behavior: gradient-guided neurite outgrowth. *Biomaterials*, 26 (24): 4956–4963, 2005.
- [155] Y. Arima and H. Iwata. Effects of surface functional groups on protein adsorption and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayers. *J. Mater. Chem.*, 17 (38): 4079, 2007.
- [156] N. Maroudas. Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *J. Theor. Biol.*, 49 (1): 417–424, 1975.
- [157] I. Machida-Sano, M. Hirakawa, H. Matsumoto, M. Kamada, S. Ogawa *et al.* Surface characteristics determining the cell compatibility of ionically cross-linked alginate gels. *Biomed. Mater.*, 9 (2): 025007, 2014.
- [158] H. Zimmermann, F. Ehrhart, D. Zimmermann, K. Müller, A. Katsen-Globa *et al.* Hydrogel-based encapsulation of biological, functional tissue: fundamentals, technologies and applications. *Appl. Phys. A*, 89 (4): 909–922, 2007.
- [159] H. Zimmermann, F. Wählich, C. Baier, M. Westhoff, R. Reuss *et al.* Physical and biological properties of barium cross-linked alginate membranes. *Biomaterials*, 28 (7): 1327–1345, 2007.
- [160] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnol. Adv.*, 29 (6): 739–767, 2011.
- [161] X. Hu, S.-H. Park, E. S. Gil, X.-X. Xia, A. S. Weiss *et al.* The influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. *Biomaterials*, 32 (34): 8979–8989, 2011.
- [162] S. J. Sofia, V. Premnath, and E. W. Merrill. Poly (ethylene oxide) grafted to silicon surfaces: grafting density and protein adsorption. *Macromolecules*, 31 (15): 5059–5070, 1998.
- [163] A. Higuchi, Q.-D. Ling, Y. Chang, S.-T. Hsu, and A. Umezawa. Physical cues of biomaterials guide stem cell differentiation fate. *Chem. Rev.*, 113 (5): 3297–3328, 2013.
- [164] R. Kiss, H. Bock, S. Pells, E. Canetta, A. K. Adya *et al.* Elasticity of human embryonic stem cells as determined by atomic force microscopy. *J. Biomech. Eng.*, 133 (10): 101009, 2011.
- [165] A. Banerjee, M. Arha, S. Choudhary, R. S. Ashton, S. R. Bhatia *et al.* The influence of hydrogel modulus on the proliferation and differentiation of encapsulated neural stem cells. *Biomaterials*, 30 (27): 4695–4699, 2009.
- [166] G. Kaklamani, D. Cheneler, L. M. Grover, M. J. Adams, and J. Bowen. Mechanical properties of alginate hydrogels manufactured using external gelation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, 36: 135–142, 2014.
- [167] J. Ceccarelli, A. Cheng, and A. J. Putnam. Mechanical strain controls endothelial patterning during angiogenic sprouting. *Cell. Mol. Bioeng.*, 5 (4): 463–473, 2012.
- [168] A. Buxboim and D. E. Discher. Stem cells feel the difference. *Nat. Methods*, 7 (9): 695–697, 2010.
- [169] D. E. Discher, P. Janmey, and Y.-L. Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310 (5751): 1139–1143, 2005.
- [170] A. Buxboim, K. Rajagopal, A. E. X. Brown, and D. E. Discher. How deeply cells feel: methods for thin gels. *J. Phys.: Condens. Matter*, 22 (19): 194116–1–194116–13, 2010.
- [171] C.-H. R. Kuo, J. Xian, J. D. Brenton, K. Franze, and E. Sivaniah. Complex stiffness gradient substrates for studying mechanotactic cell migration. *Adv. Mater.*, 24 (45): 6059–6064, 2012.
- [172] Y. Wang, G. Wang, X. Luo, J. Qiu, and C. Tang. Substrate stiffness regulates the proliferation, migration, and differentiation of epidermal cells. *Burns*, 38 (3): 414–420, 2012.
- [173] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126 (4): 677–689, 2006.
- [174] I. Machida-Sano, Y. Matsuda, and H. Namiki. In vitro adhesion of human dermal fibroblasts on iron cross-linked alginate films. *Biomed. Mater.*, 4 (2): 025008, 2009.
- [175] I. Machida-Sano, S. Ogawa, H. Ueda, Y. Kimura, N. Satoh *et al.* Effects of composition of iron-cross-linked alginate hydrogels for cultivation of human dermal fibroblasts. *Int. J. Biomater.*, 2012: 820513, 2012.
- [176] P. Matricardi, C. D. Meo, T. Coviello, and F. Alhaique. Recent advances and perspectives on coated alginate microspheres for modified drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 5 (4): 417–425, 2008.
- [177] H. Terazono, H. Kim, M. Hayashi, A. Hattori, F. Nomura *et al.* A non-destructive culturing and cell sorting method for cardiomyocytes and neurons using a double alginate layer. *PLoS ONE*, 7 (8): e42485, 2012.

- [178] K. Smetana. Cell biology of hydrogels. *Biomaterials*, 14 (14): 1046–1050, 1993.
- [179] D. Docheva, F. Haasters, and M. Schieker. Mesenchymal stem cells and their cell surface receptors. *Curr. Rheumatol. Rev.*, 4 (3): 155–160, 2008.
- [180] D. Docheva, C. Popov, W. Mutschler, and M. Schieker. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J. Cellular Mol. Med.*, 11 (1): 21–38, 2007.
- [181] S. Jin, H. Yao, J. L. Weber, Z. K. Melkounian, and K. Ye. A synthetic, xeno-free peptide surface for expansion and directed differentiation of human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, 7 (11): e50880, 2012.
- [182] G. L. Cromar, X. Xiong, E. Chautard, S. Ricard-Blum, and J. Parkinson. Toward a systems level view of the ecm and related proteins: a framework for the systematic definition and analysis of biological systems. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, 80 (6): 1522–1544, 2012.
- [183] F. Piccinini, M. Pierini, E. Lucarelli, and A. Bevilacqua. Semi-quantitative monitoring of confluence of adherent mesenchymal stromal cells on calcium-phosphate granules by using widefield microscopy images. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 25 (10): 2395–2410, 2014.
- [184] C. D. Reyes and A. J. Garcia. A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 67A (1): 328–333, 2003.
- [185] Pubmed. Datenbank-Abfrage: "hela". Internet, 16. Februar 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=hela>.
- [186] J. N. Weinstein. Drug discovery: Cell lines battle cancer. *Nature*, 483 (7391): 544–545, 2012.
- [187] J. R. Masters. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1 (3): 233–236, 2000.
- [188] E. F. Ryder, E. Y. Snyder, and C. L. Cepko. Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-mediated oncogene transfer. *J. Neurobiol.*, 21 (2): 356–375, 1990.
- [189] W. F. Scherer. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. iv. viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain hela) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, 97 (5): 695–710, 1953.
- [190] M. Irfan Maqsood, M. M. Matin, A. R. Bahrami, and M. M. Ghasrolasht. Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell Biol. Int.*, 37 (10): 1038–1045, 2013.
- [191] W. R. Earle, E. L. Schilling, T. H. Stark, N. P. Straus, M. F. Brown *et al.* Production of malignancy in vitro. IV. the mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 4 (165–212): 51, 1943.
- [192] L. Stingl, T. Stühmer, M. Chatterjee, M. R. Jensen, M. Flentje *et al.* Novel HSP90 inhibitors, NVP-AUY922 and NVP-BEP800, radiosensitize tumour cells through cell-cycle impairment, increased DNA damage and repair protraction. *Br. J. Cancer*, 102 (11): 1578–1591, 2010.
- [193] C. S. Djuzenova, C. Blassl, K. Roloff, S. Kuger, A. Katzer *et al.* Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 enhances radiation sensitivity of tumor cell lines under hypoxia. *Cancer Biol. Ther.*, 13 (6): 425–434, 2012.
- [194] Y. T. Phung, D. Barbone, V. C. Broaddus, and M. Ho. Rapid generation of in vitro multicellular spheroids for the study of monoclonal antibody therapy. *J. Cancer*, 2: 507–514, 2011.
- [195] C. R. Thoma, M. Zimmermann, I. Agarkova, J. M. Kelm, and W. Krek. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 69-70: 29–41, 2014.
- [196] G. Mehta, A. Y. Hsiao, M. Ingram, G. D. Luker, and S. Takayama. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Controlled Release*, 164 (2): 192–204, 2012.
- [197] A. Y. Hsiao, Y.-C. Tung, X. Qu, L. R. Patel, K. J. Pienta *et al.* 384 hanging drop arrays give excellent z-factors and allow versatile formation of co-culture spheroids. *Biotechnol. Bioeng.*, 109 (5): 1293–1304, 2011.
- [198] J. M. Kelm and M. Fussenegger. Microscale tissue engineering using gravity-enforced cell assembly. *Trends Biotechnol.*, 22 (4): 195–202, 2004.
- [199] Y.-C. Tung, A. Y. Hsiao, S. G. Allen, Y.-s. Torisawa, M. Ho *et al.* High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst*, 136 (3): 473, 2011.
- [200] F. Ehrhart, J. Schulz, A. Katsen-Globa, S. Shirley, D. Reuter *et al.* A comparative study of freezing single cells and spheroids: Towards a new model system for optimizing freezing protocols for cryobanking of human tumours. *Cryobiology*, 58 (2): 119–127, 2009.
- [201] F. Bordeleau, T. A. Alcoser, and C. A. Reinhart-King. Physical biology in cancer. 5. the rocky road of metastasis: the role of cytoskeletal mechanics in cell migratory response to 3D matrix topography. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 306 (2): C110–C120, 2013.
- [202] C. M. Kraning-Rush, S. P. Carey, M. C. Lampi, and C. A. Reinhart-King. Microfabricated collagen tracks facilitate single cell metastatic invasion in 3D. *Integr. Biol.*, 5 (3): 606, 2013.
- [203] H. R. Schöler. Das Potential von Stammzellen – Ist der Mensch regenerierbar? *Naturwissenschaftliche Rundschau*, 53 (10): 525–539, 2003.
- [204] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhyan, N. V. Latsinik, A. F. Panasyuk, and I. V. Keiliss-Borok. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17 (4): 331–340, 1974.
- [205] D. J. Prockop. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. *Mol. Ther.*, 17 (6): 939–946, 2009.
- [206] F. P. Barry and J. M. Murphy. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36 (4): 568–584, 2004.
- [207] R. Hass, C. Kasper, S. Bohm, and R. Jacobs. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal*, 9 (1): 12, 2011.
- [208] J. Peng, Y. Wang, L. Zhang, B. Zhao, Z. Zhao *et al.* Human umbilical cord Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells differentiate into a Schwann-cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Brain Res. Bull.*, 84 (3): 235–243, 2011.
- [209] P. P. Van. Stem cell therapy for islet regeneration. In *Stem Cells in Clinic and Research*, 22, pp. 551–578. InTech, 2011.
- [210] M. Zeddou, A. Briquet, B. Relic, C. Josse, M. G. Malaise *et al.* The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol. Int.*, 34 (7): 693–701, 2010.
- [211] M. Secco, E. Zucconi, N. M. Vieira, L. L. Fogaça, A. Cerqueira *et al.* Mesenchymal stem cells from umbilical cord: Do not discard the cord! *Neuromuscul. Disord.*, 18 (1): 17–18, 2008.
- [212] D. L. Troyer and M. L. Weiss. Concise review: Wharton’s jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26 (3): 591–599, 2008.
- [213] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4): 315–317, 2006.

- [214] L. P. Roncoroni, J. K. Maerz, B. Angres, H. Steuer, K. Benz *et al.* Adhesion to extracellular matrix proteins can differentiate between human bone marrow derived mesenchymal stem cells and fibroblasts. *J. Tissue. Sci. Eng.*, 11 (8): 1–6, 2013.
- [215] S. Neuss, C. Apel, P. Buttler, B. Denecke, A. Dhanasingh *et al.* Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials*, 29 (3): 302–313, 2008.
- [216] R. Schneider, R. Knüchel, and S. Neuss. Mesenchymale Stammzellen und ihre Interaktionen mit Biomaterialien. *Der Pathologe*, 32 (S2): 296–303, 2011.
- [217] A. McArdle, K. J. Paik, M. T. Chung, M. S. Hu, G. Walmsley *et al.* Manipulation of stem cells and their micro environment for tissue engineering. *Surgery Curr. Res.*, 3 (3), 2013.
- [218] H. Hao, G. Chen, J. Liu, D. Ti, Y. Zhao *et al.* Culturing on wharton’s jelly extract delays mesenchymal stem cell senescence through p53 and p16INK4a/pRb pathways. *PLoS ONE*, 8 (3): e58314, 2013.
- [219] B. P. Chan, T. Hui, C. Yeung, J. Li, I. Mo *et al.* Self-assembled collagen–human mesenchymal stem cell microspheres for regenerative medicine. *Biomaterials*, 28 (31): 4652–4666, 2007.
- [220] J. E. Meredith and M. A. Schwartz. Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 7 (4): 146–150, 1997.
- [221] C. R. Nuttelman, M. C. Tripodi, and K. S. Anseth. In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells photoencapsulated in PEG hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.*, 68A (4): 773–782, 2004.
- [222] S. R. Chastain, A. K. Kundu, S. Dhar, J. W. Calvert, and A. J. Putnam. Adhesion of mesenchymal stem cells to polymer scaffolds occurs via distinct ECM ligands and controls their osteogenic differentiation. *J. Biomed. Mater. Res.*, 78A (1): 73–85, 2006.
- [223] E. H. J. Danen and A. Sonnenberg. Integrins in regulation of tissue development and function. *J. Pathol.*, 200 (4): 471–480, 2003.
- [224] A. S. Rowlands, P. A. George, and J. J. Cooper-White. Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.*, 295 (4): C1037–C1044, 2008.
- [225] A. Zemel, F. Rehfeldt, A. E. X. Brown, D. E. Discher, and S. A. Safran. Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells. *Nat. Phys.*, 6 (6): 468–473, 2010.
- [226] B. Li, C. Moshfegh, Z. Lin, J. Albuschies, and V. Vogel. Mesenchymal stem cells exploit extracellular matrix as mechanotransducer. *Sci. Rep.*, 3 (2425): 1–8, 2013.
- [227] P. Bianco, R. Barker, O. Brüstle, E. Cattaneo, H. Clevers *et al.* Regulation of stem cell therapies under attack in Europe: for whom the bell tolls. *EMBO J.*, 32 (11): 1489–1495, 2013.
- [228] P. Bianco, X. Cao, P. S. Frenette, J. J. Mao, P. G. Robey *et al.* The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.*, 19 (1): 35–42, 2013.
- [229] P. Bianco. Reply to MSCs: science and trials. *Nat. Med.*, 19 (7): 813–814, 2013.
- [230] W. E. Fibbe, F. Dazzi, and K. LeBlanc. MSCs: science and trials. *Nat. Med.*, 19 (7): 812–813, 2013.
- [231] M. F. Pittenger. MSCs: science and trials. *Nat. Med.*, 19 (7): 811–811, 2013.
- [232] M. Munsie and I. Hyun. A question of ethics: Selling autologous stem cell therapies flaunts professional standards. *Stem Cell Res.*, 2014.
- [233] C. E. Murdoch and C. T. Scott. Stem cell tourism and the power of hope. *Am. J. Bioeth.*, 10 (5): 16–23, 2010.
- [234] C. Xu, M. S. Inokuma, J. Denham, K. Golds, P. Kundu *et al.* Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 19 (10): 971–974, 2001.
- [235] S. K. Oh, H. S. Kim, Y. B. Park, H. W. Seol, Y. Y. Kim *et al.* Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem cells*, 23 (5): 605–609, 2005.
- [236] J. Alper. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat. Biotechnol.*, 27 (3): 213–214, 2009.
- [237] clinicaltrials.gov. Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE(MA09-hRPE)Cells in Patients With Stargardt’s Macular Dystrophy, ID: NCT01345006. Internet, 16. Februar 2017. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01345006>.
- [238] clinicaltrials.gov. Safety and Tolerability of Sub-retinal Transplantation of hESC Derived RPE (MA09-hRPE) Cells in Patients With Advanced Dry Age Related Macular Degeneration (Dry AMD), ID: NCT01344993. Internet, 16. Februar 2017. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01344993>.
- [239] clinicaltrials.gov. A Safety, Tolerability, and Efficacy Study of VC-01™ Combination Product in Subjects With Type I Diabetes Mellitus, ID: NCT02239354. Internet, 16. Februar 2017. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02239354>.
- [240] J. Driehaus, A. Hüttermann, and U. Storz. Humane Embryonale Stammzellen in Deutschland und Europa: Ein Überblick zur Gewinnung, Nutzung und Patentierung. *Bioethica Forum*, 2 (1): 37–42, 2009.
- [241] K. Takahashi, K. Okita, M. Nakagawa, and S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.*, 2 (12): 3081–3089, 2007.
- [242] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318 (5858): 1917–1920, 2007.
- [243] K. Watanabe, M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura *et al.* A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 25 (6): 681–686, 2007.
- [244] M. Bellin, M. C. Marchetto, F. H. Gage, and C. L. Mummery. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13 (11): 713–726, 2012.
- [245] A. D. Ebert, P. Liang, and J. C. Wu. Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 60 (4): 408–416, 2012.
- [246] D. Ma, H. Wei, J. Lu, S. Ho, G. Zhang *et al.* Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur. Heart J.*, 34 (15): 1122–1133, 2012.
- [247] M. A. Israel, S. H. Yuan, C. Bardy, S. M. Reyna, Y. Mu *et al.* Probing sporadic and familial alzheimer’s disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482 (7384): 216–220, 2012.
- [248] D. A. Brafman. Constructing stem cell microenvironments using bioengineering approaches. *Physiol. Genomics*, 45 (23): 1123–1135, 2013.
- [249] A. Bratt-Leal, R. Carpenedo, and T. McDevitt. Integration of biomaterials into 3D stem cell microenvironments. In *Biomaterials as Stem Cell Niche*, pp. 45–59. Springer, 2010.
- [250] A. J. Keung, P. Asuri, S. Kumar, and D. V. Schaffer. Soft microenvironments promote the early neurogenic differentiation but not self-renewal of human pluripotent stem cells. *Integr. Biol.*, 4 (9): 1049–1058, 2012.
- [251] C. M. Metallo, J. C. Mohr, C. J. Detzel, J. J. de Pablo, B. J. Van Wie *et al.* Engineering the stem cell microenvironment. *Biotechnol. Prog.*, 23 (1): 18–23, 2007.

- [252] H. Obokata, T. Wakayama, Y. Sasai, K. Kojima, M. P. Vacanti *et al.* Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature*, 505 (7485): 641–647, 2014.
- [253] N. Tandon, D. Marolt, E. Cimetta, and G. Vunjak-Novakovic. Bioreactor engineering of stem cell environments. *Biotechnol. Adv.*, 31 (7): 1020–1031, 2013.
- [254] F. Ulloa-Montoya, C. M. Verfaillie, and W.-S. Hu. Culture systems for pluripotent stem cells. *J. Biosci. Bioeng.*, 100 (1): 12–27, 2005.
- [255] P. Viswanathan, T. Gaskell, N. Moens, O. J. Culley, D. Hansen *et al.* Human pluripotent stem cells on artificial microenvironments: a high content perspective. *Front. Pharmacol.*, 5, 2014.
- [256] E. Muybridge. *Descriptive Zoopraxography, or the science of animal locomotion made popular*. University of Pennsylvania, 1893.
- [257] E.-J. Marey. *Movement*, volume 73. D. Appleton, 1895. <https://catalog.hathitrust.org/Record/008567933>.
- [258] P. Ehrlich. Beiträge zur Kenntniss der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 13 (1): 263–277, 1877.
- [259] H. Landecker. Seeing things: from microcinematography to live cell imaging. *Nat. Methods*, 6 (10): 707–709, 2009.
- [260] A. Carrel. The New Cytology. *Science*, 73 (1890): 297–303, 1931.
- [261] F. Frischknecht, M. Gunzer, and S. L. Shorte. Retrospective: Birth of the cool–imaging and microbiology from Ibn al-Haytham to Jean Comandon. *Biotechnol. J.*, 4 (6): 787–790, 2009.
- [262] Microbes caught in action. *The New York Times*, 31.10.1909.
- [263] J. Ries. Kinematographie der Befruchtung und Zellteilung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 74 (1): 1–31, 1909.
- [264] S. M. Chirieleison, T. A. Bissell, C. C. Scelfo, J. E. Anderson, Y. Li *et al.* Automated live cell imaging systems reveal dynamic cell behavior. *Biotechnol. Prog.*, 27 (4): 913–924, 2011.
- [265] B. Neumann, M. Held, U. Liebel, H. Erfle, P. Rogers *et al.* High-throughput RNAi screening by time-lapse imaging of live human cells. *Nat. Methods*, 3 (5): 385–390, 2006.
- [266] M. Kreft, M. Stenovec, and R. Zorec. Focus-drift correction in time-lapse confocal imaging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1048 (1): 321–330, 2005.
- [267] A. D. Edelstein, M. A. Tsuchida, N. Amodaj, H. Pinkard, R. D. Vale *et al.* Advanced methods of microscope control using µmanager software. *J. Biol. Methods.*, 1 (2), 2014.
- [268] Nikon Instruments Europe BV. Biostation CT, Biostation IM. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.nikon.com/products/microscope-solutions/lineup/integrated/index.htm>.
- [269] PAN Systech GmbH. PANsys 3000, PANsys 4000. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.pan-systech.de>.
- [270] PerkinElmer Inc. Operetta CLS. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.perkinelmer.de/product/operetta-cls-system-hh16000000>.
- [271] PerkinElmer Inc. Opera. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.perkinelmer.de/product/opera-phenix-configuration-hh14000000>.
- [272] Essen BioScience Inc. Incucyte. Internet, 16. Februar 2017. [http://essenbioscience.com/incucyte\\_overview.html](http://essenbioscience.com/incucyte_overview.html).
- [273] GE Healthcare. DeltaVision Microscopy Imaging Systems. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/GELifeSciences-de/brands/deltavision>.
- [274] Carl Zeiss AG. Lightsheet Z.1. Internet, 16. Februar 2017. [http://www.zeiss.de/microscopy/de\\_de/produkte/imaging-systems/lightsheet-z-1.html](http://www.zeiss.de/microscopy/de_de/produkte/imaging-systems/lightsheet-z-1.html).
- [275] NanoEnTek Inc. (VWR). JuLI Stage - Real-Time Cell History Recorder. Internet, 16. Februar 2017. <https://de.vwr.com/store/product/15981544/juli-stage-live-cell-imaging-system>.
- [276] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.*, 267 (17): 5421–5426, 2000.
- [277] S. Lee, I. Sohn, M. Park, I. Park, Y. Sohn *et al.* Culture of human umbilical vein endothelial cells using 96-well microplates and position effects on cell growth. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 5 (3): 207–210, 2000.
- [278] O. Blein, X. Ronot, and M. Adolphe. Cross contamination associated with the use of multiwell culture plates for cytotoxicity assessment of volatile chemicals. *Cytotechnology*, 6 (1): 79–82, 1991.
- [279] T. Hoffman. Counting cells. In *Cell biology. A Laboratory Handbook*, 3, pp. 21–24. Elsevier, 2006.
- [280] H. R. Hulett, W. A. Bonner, J. Barrett, and L. A. Herzenberg. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science*, 166 (3906): 747–749, 1969.
- [281] P. S. Mischel, T. F. Cloughesy, and S. F. Nelson. DNA-microarray analysis of brain cancer: molecular classification for therapy. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5 (10): 782–792, 2004.
- [282] T. Gebäck, M. M. P. Schulz, P. Koumoutsakos, and M. Detmar. Tscratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *Biotechniques*, 46 (4): 265–274, 2009.
- [283] M. Lamprecht, D. Sabatini, and A. Carpenter. Cellprofiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*, 42 (1): 71–75, 2007.
- [284] R. Murphy, E. Meijering, and G. Danuser. Special issue on molecular and cellular bioimaging. *IEEE Trans. Image Process*, 14 (9): 1233–1236, 2005.
- [285] M. D. Abramoff, P. J. Magalhães, and S. J. Ram. Image processing with ImageJ. *Biophoton. Int.*, 11 (7): 36–42, 2004.
- [286] ImageJ. Internet, 16. Februar 2017. <http://rsbweb.nih.gov/ij>.
- [287] A. E. Carpenter, T. R. Jones, M. R. Lamprecht, C. Clarke, I. Kang *et al.* Cellprofiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.*, 7 (10): R100, 2006.
- [288] CellProfiler. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.cellprofiler.org>.
- [289] ilastik. Internet, 16. Februar 2017. <http://ilastik.org>.
- [290] C. Sommer, C. Straehle, U. Kothe, and F. A. Hamprecht. ilastik: Interactive learning and segmentation toolkit. In *2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro*, pp. 230–233. IEEE, Institute of Electrical & Electronics Engineers (IEEE), 2011.
- [291] S. V. Alworth, H. Watanabe, and J. S. Lee. Teachable, high-content analytics for live-cell, phase contrast movies. *J. Biomol. Screen.*, 15 (8): 968–977, 2010.
- [292] DRVision Technologies LLC. SVCCell RS. Internet, 16. Februar 2017. <https://www.svcell.com>.
- [293] The MathWorks GmbH. MATLAB, Image Processing Toolbox. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.mathworks.de/products/image>.

- [294] EBImage. Internet, 16. Februar 2017. <http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/EBImage.html>.
- [295] G. Pau, F. Fuchs, O. Sklyar, M. Boutros, and W. Huber. Ebimage—an R package for image processing with applications to cellular phenotypes. *Bioinformatics*, 26 (7): 979–981, 2010.
- [296] openCV. Internet, 16. Februar 2017. <http://opencv.org>.
- [297] Nikon Instruments Europe BV. NIS-Elements AR. Internet, 16. Februar 2017. [https://www.nikoninstruments.com/en\\_DE/Products/-Software/NIS-Elements-Advanced-Research](https://www.nikoninstruments.com/en_DE/Products/-Software/NIS-Elements-Advanced-Research).
- [298] Definiens AG. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.definiens.com>.
- [299] Wimasis GmbH. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.wimasis.com>.
- [300] N. Jaccard, L. D. Griffin, A. Keser, R. J. Macown, A. Super *et al.* Automated method for the rapid and precise estimation of adherent cell culture characteristics from phase contrast microscopy images. *Biotechnol. Bioeng.*, 111 (3): 504–517, 2013.
- [301] Molecular Devices, LLC. MetaMorph. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.moleculardevices.com/products/software/meta-imaging-series/metamorph.html>.
- [302] Pubmed. Datenbank-Abfrage: "quantitative phase contrast microscopy". Internet, 16. Februar 2017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=quantitative+phase+contrast+microscopy>.
- [303] C. L. Curl, C. J. Bellair, P. J. Harris, B. E. Allman, A. Roberts *et al.* Quantitative phase microscopy: a new tool for investigating the structure and function of unstained live cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 31 (12): 896–901, 2004.
- [304] C. L. Curl, T. Harris, P. J. Harris, B. E. Allman, C. J. Bellair *et al.* Quantitative phase microscopy: a new tool for measurement of cell culture growth and confluency in situ. *Pflügers Archiv*, 448 (4): 462–468, 2004.
- [305] F. Ambriz-Colín, M. Torres-Cisneros, J. Aviña-Cervantes, J. Saavedra-Martínez, O. Debeir *et al.* Detection of biological cells in phase-contrast microscopy images. In *Fifth Mexican International Conference on Artificial Intelligence, 2006. MICAI'06.*, pp. 68–77. IEEE, 2006.
- [306] J. Chalfoun, M. Kociolek, A. Dima, M. Halter, A. Cardone *et al.* Segmenting time-lapse phase contrast images of adjacent NIH 3T3 cells. *J. Microsc.*, 249 (1): 41–52, 2013.
- [307] T. Kazmar, M. Smid, M. Fuchs, B. Luber, and J. Mattes. Learning cellular texture features in microscopic cancer cell images for automated cell-detection. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology*, 2010: 49–52.
- [308] C. Sommer and D. W. Gerlich. Machine learning in cell biology—teaching computers to recognize phenotypes. *Journal of cell science*, 126 (24): 5529–5539, 2013.
- [309] T. R. Jones, A. E. Carpenter, M. R. Lamprecht, J. Moffat, S. J. Silver *et al.* Scoring diverse cellular morphologies in image-based screens with iterative feedback and machine learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106 (6): 1826–1831, 2009.
- [310] K. Wallat, M. M. Gepp, S. Berger, R. Le Harzic, J. C. Neubauer *et al.* *Optically Induced Nanostructures. Biomedical and Technical Applications*, Nanoparticle-loaded bioactive hydrogels, pp. 217–238. DeGruyter, 2015.
- [311] L. Shamir, C. A. Wolkow, and I. G. Goldberg. Quantitative measurement of aging using image texture entropy. *Bioinformatics*, 25 (23): 3060–3063, 2009.
- [312] S.-H. Hsu and W. M. Sigmund. Artificial hairy surfaces with a nearly perfect hydrophobic response. *Langmuir*, 26 (3): 1504–1506, 2010.
- [313] N. W. Guldner, I. Jasmund, H. Zimmermann, M. Heinlein, B. Girndt *et al.* Detoxification and endothelialization of glutaraldehyde-fixed bovine pericardium with titanium coating a new technology for cardiovascular tissue engineering. *Circulation*, 119 (12): 1653–1660, 2009.
- [314] L. Damink, P. Dijkstra, M. Van Luyn, P. Van Wachem, P. Nieuwenhuis *et al.* In vitro degradation of dermal sheep collagen cross-linked using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17 (7): 679–684, 1996.
- [315] L. Olde Damink, P. Dijkstra, M. Van Luyn, P. Van Wachem, P. Nieuwenhuis *et al.* Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. *Biomaterials*, 17 (8): 765–773, 1996.
- [316] M. M. Gepp, B. Fischer, A. Schulz, J. Dobringer, L. Gentile *et al.* Bioactive surfaces from seaweed-derived alginates for the cultivation of human stem cells. *Journal of Applied Phycology*, pp. 1–11, 2017.
- [317] A. V. Vashi, J. A. M. Ramshaw, V. Glattauer, C. M. Elvin, R. E. Lyons *et al.* Controlled surface modification of tissue culture polystyrene for selective cell binding using resilin-inspired polypeptides. *Biofabrication*, 5 (3): 035005, 2013.
- [318] F. Lottspeich and H. Zorbas. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1998. ISBN 3827400414.
- [319] G. M. Whitesides, E. Ostuni, S. Takayama, X. Jiang, and D. E. Ingber. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 3 (1): 335–373, 2001.
- [320] A. Agarwal, Y. Farouz, A. P. Nesmith, L. F. Deravi, M. L. McCain *et al.* Micropatterning alginate substrates for in vitro cardiovascular muscle on a chip. *Adv. Funct. Mater.*, 23 (30): 3738–3746, 2013.
- [321] A. Weissbach and J. Hurwitz. The formation of 2-Keto-3-deoxyheptonic Acid in extracts of *Escherichia coli* B: I. identification. *J. Biol. Chem.*, 234 (4): 705–709, 1959.
- [322] P. Michaud, A. Da Costa, B. Courtois, and J. Courtois. Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 23 (4): 233–266, 2003.
- [323] H. Düpow and G. Blount. A review of reliability prediction. *Aircr. Eng. Aerosp. Tec.*, 69 (4): 356–362, 1997.
- [324] C. Tscheka, M. M. Gepp, H. Zimmermann, and M. Schneider. Novel protocol for the formation of biomimetic alginate hydrogels with hairy texture, altering the cell-surface interaction of fibroblasts. Manuskript in Vorbereitung, 2016.
- [325] M. M. Gepp, B. B. Fischer, S. Bur, N. W. Guldner, J. C. Neubauer *et al.* Modified hydrogel surfaces: towards a versatile toolset for in vitro manipulation of anchorage-dependent pluripotent and multipotent stem cells. Manuskript vorbereitet zur Einreichung, 2015.
- [326] C. S. Hughes, L. M. Postovit, and G. A. Lajoie. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10 (9): 1886–1890, 2010.
- [327] S. G. Shirley, C. H. Durst, C. C. Fuchs, H. Zimmermann, and F. R. Ihmig. A large-scale cryoelectronic system for biological sample banking. *Cryogenics*, 49 (11): 638–642, 2009.
- [328] J. Cai, A. DeLaForest, J. Fisher, A. Urlick, T. Wagner *et al.* Protocol for directed differentiation of human pluripotent stem cells toward a hepatocyte fate. In *StemBook*. [www.stembook.org](http://www.stembook.org), 2008.
- [329] Molecular Devices, LLC. ImageXpress Micro XLS. Internet, 16. Februar 2017. <http://www.moleculardevices.com/systems/high-content-imaging>.
- [330] C. J. Bradhurst, W. Boles, and Y. Xiao. Segmentation of bone marrow stromal cells in phase contrast microscopy images. In *Image and Vision Computing New Zealand, 2008. IVCNZ 2008. 23rd International Conference*, pp. 1–6. IEEE, 2008.

- [331] M. Athelougou, M. Eblenkamp, G. Schmidt, F. Novotny, E. Wintermantel *et al.* Image analysis for calculation of the toxicity degree of cells in phase contrast microscopy images. In *Bildverarbeitung für die Medizin 2011*, pp. 134–138. Springer, 2011.
- [332] K. Sasaki, H. Miyata, H. Sasaki, S. Kang, T. Yuasa *et al.* Image-based focused counting of dividing cells for non-invasive monitoring of regenerative medicine products. *J. Biosci. Bioeng.*, 120 (5): 582–590, 2015.
- [333] S. Busschots, S. O’Toole, J. J. O’Leary, and B. Stordal. Non-invasive and non-destructive measurements of confluence in cultured adherent cell lines. *MethodsX*, 2 (2015): 8–13, 2015.
- [334] M. Maddah and K. Loewke. Dynamic morphology-based characterization of stem cells enabled by texture-based pattern recognition from phase-contrast images. In *Biomedical Imaging (ISBI), 2014 IEEE 11th International Symposium on*, pp. 77–80. IEEE, 2014.
- [335] M. Maddah, U. Shoukat-Mumtaz, S. Nassirpour, and K. Loewke. A system for automated, noninvasive, morphology-based evaluation of induced pluripotent stem cell cultures. *J. Lab. Autom.*, pp. 1–7, 2014.
- [336] S. Weber, M. L. Fernández-Cachón, J. M. Nascimento, S. Knauer, B. Offermann *et al.* Label-free detection of neuronal differentiation in cell populations using high-throughput live-cell imaging of PC12 cells. *PLoS ONE*, 8 (2): e56690, 2013.
- [337] M. Maddah, J. D. Heidmann, M. A. Mandegar, C. D. Walker, S. Bolouki *et al.* A non-invasive platform for functional characterization of stem-cell-derived cardiomyocytes with applications in cardiotoxicity testing. *Stem Cell Rep.*, 4 (4): 621–631, 2015.
- [338] P. Choudhry. High-throughput method for automated colony and cell counting by digital image analysis based on edge detection. *PLoS ONE*, 11 (2): e0148469, 2016.
- [339] Y. Zhang, C.-W. Lo, J. A. Taylor, and S. Yang. Replica molding of high-aspect-ratio polymeric nanopillar arrays with high fidelity. *Langmuir*, 22 (20): 8595–8601, 2006.
- [340] V. A. Schulte, M. Díez, M. Möller, and M. C. Lensen. Surface topography induces fibroblast adhesion on intrinsically nonadhesive poly(ethylene glycol) substrates. *Biomacromolecules*, 10 (10): 2795–2801, 2009.
- [341] J.-W. Lu, Y.-L. Zhu, Z.-X. Guo, P. Hu, and J. Yu. Electrospinning of sodium alginate with poly (ethylene oxide). *Polymer*, 47 (23): 8026–8031, 2006.
- [342] H. Nie, A. He, J. Zheng, S. Xu, J. Li *et al.* Effects of chain conformation and entanglement on the electrospinning of pure alginate. *Biomacromolecules*, 9 (5): 1362–1365, 2008.
- [343] S. I. Jeong, M. D. Krebs, C. A. Bonino, S. A. Khan, and E. Alsberg. Electrospun alginate nanofibers with controlled cell adhesion for tissue engineering. *Macromol. Biosci.*, 10 (8): 934–943, 2010.
- [344] D. Khang, J. Lu, C. Yao, K. M. Haberstroh, and T. J. Webster. The role of nanometer and sub-micron surface features on vascular and bone cell adhesion on titanium. *Biomaterials*, 29 (8): 970–983, 2008.
- [345] C. X. Resende, I. R. Lima, E. Gemelli, J. M. Granjeiro, and G. d. Soares. Cell adhesion on different titanium-coated surfaces. *Materia*, 15: 386–91, 2010.
- [346] L. L. Guéhenec, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent. Mater.*, 23 (7): 844–854, 2007.
- [347] A. J. Engler, M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bönnemann, H. L. Sweeney *et al.* Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.*, 166 (6): 877–887, 2004.
- [348] W. S. Leong, C. Y. Tay, H. Yu, A. Li, S. C. Wu *et al.* Thickness sensing of hMSCs on collagen gel directs stem cell fate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 401 (2): 287–292, 2010.
- [349] L. Han, Z. Mao, J. Wu, Y. Zhang, and C. Gao. Influences of surface chemistry and swelling of salt-treated polyelectrolyte multilayers on migration of smooth muscle cells. *J. R. Soc. Interface*, 9 (77): 3455–3468, 2012.
- [350] Y. Yang, R. Cavin, and J. L. Ong. Protein adsorption on titanium surfaces and their effect on osteoblast attachment. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 67 (1): 344–349, 2003.
- [351] D. Lehnert, B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem *et al.* Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J. Cell Sci.*, 117 (1): 41–52, 2004.
- [352] M. Kawaguchi, H. Ueno, Y. Takahashi, T. Watanabe, H. Kato *et al.* Transitional mesh repair for large incisional hernia in the elderly. *Int. J. Surg. Case Rep.*, 7: 70–74, 2015.
- [353] Y. F. Yano. Kinetics of protein unfolding at interfaces. *J. Phys.: Condens. Matter*, 24 (50): 503101, 2012.
- [354] H. H. de Jongh, H. A. Kusters, E. Kudryashova, M. B. Meinders, D. Trofimova *et al.* Protein adsorption at air–water interfaces: a combination of details. *Biopolymers*, 74 (1-2): 131–135, 2004.
- [355] Y. Sun, K. M. A. Yong, L. G. Villa-Díaz, X. Zhang, W. Chen *et al.* Hippo/YAP-mediated rigidity-dependent motor neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *Nat. Mater.*, 13 (6): 599–604, 2014.
- [356] Y. Sun and J. Fu. Harnessing mechanobiology of human pluripotent stem cells for regenerative medicine. *ACS Chem. Neurosci.*, 5 (8): 621–623, 2014.
- [357] N. O. Dhoot, C. A. Tobias, I. Fischer, and M. A. Wheatley. Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 71 (2): 191–200, 2004.
- [358] P. Gröhn, G. Klöck, and U. Zimmermann. Collagen-coated Ba2+-alginate microcarriers for the culture of anchorage-dependent mammalian cells. *Biotechniques*, 22 (5): 970–975, 1997.
- [359] R. Yao, R. Zhang, F. Lin, and J. Luan. Biomimetic injectable HUVEC-adipocytes/collagen/alginate microsphere co-cultures for adipose tissue engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, 110 (5): 1430–1443, 2013.
- [360] Y. J. Kwon and C.-A. Peng. Calcium-alginate gel bead cross-linked with gelatin as microcarrier for anchorage-dependent cell culture. *Biotechniques*, 33 (1): 212–218, 2002.
- [361] M. Yamamoto, D. James, H. Li, J. Butler, S. Rafii *et al.* Generation of stable co-cultures of vascular cells in a honeycomb alginate scaffold. *Tissue Eng. Part A*, 16 (1): 299–308, 2009.
- [362] S. R. Caruso, M. D. Orellana, A. Mizukami, T. R. Fernandes, A. M. Fontes *et al.* Growth and functional harvesting of human mesenchymal stromal cells cultured on a microcarrier-based system. *Biotechnol. Prog.*, 30 (4): 889–895, 2014.
- [363] F. dos Santos, A. Campbell, A. Fernandes-Platzgummer, P. Z. Andrade, J. M. Gimble *et al.* A xenogeneic-free bioreactor system for the clinical-scale expansion of human mesenchymal stem/stromal cells. *Biotechnol. Bioeng.*, 111 (6): 1116–1127, 2014.
- [364] T. K.-P. Goh, Z.-Y. Zhang, A. K.-L. Chen, S. Reuveny, M. Choolani *et al.* Microcarrier culture for efficient expansion and osteogenic differentiation of human fetal mesenchymal stem cells. *BioRes. open access*, 2 (2): 84–97, 2013.
- [365] T. R. Heathman, V. A. Glyn, A. Picken, Q. A. Rafiq, K. Coopman *et al.* Expansion, harvest and cryopreservation of human mesenchymal stem cells in a serum-free microcarrier process. *Biotechnol. Bioeng.*, 112 (8): 1696–1707, 2015.

- [366] M. Hervy, J. L. Weber, M. Pecheul, P. Dolley-Sonneville, D. Henry *et al.* Long term expansion of bone marrow-derived hMSCs on novel synthetic microcarriers in xeno-free, defined conditions. *PLoS ONE*, 9 (3): e92120, 2014.
- [367] C. J. Hewitt, K. Lee, A. W. Nienow, R. J. Thomas, M. Smith *et al.* Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnol. Lett.*, 33 (11): 2325–2335, 2011.
- [368] J. Hupfeld, I. H. Gorr, C. Schwald, N. Beaucamp, K. Wiechmann *et al.* Modulation of mesenchymal stromal cell characteristics by microcarrier culture in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, 111 (11): 2290–2302, 2014.
- [369] A. W. Nienow, C. J. Hewitt, T. R. Heathman, V. A. Glyn, G. a. N. Fonte *et al.* Agitation conditions for the culture and detachment of hMSCs from microcarriers in multiple bioreactor platforms. *Biochem. Eng. J.*, 108: 24–29, 2016.
- [370] A. W. Nienow, Q. A. Rafiq, K. Coopman, and C. J. Hewitt. A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. *Biochem. Eng. J.*, 85: 79–88, 2014.
- [371] A. Moshnikova, V. Afanasyev, O. Proussakova, S. Chernyshov, V. Gogvadze *et al.* Cytotoxic activity of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide is underlain by DNA interchain cross-linking. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63 (2): 229–234, 2006.
- [372] Y. Hao, P. Xu, C. He, X. Yang, M. Huang *et al.* Impact of carbodiimide crosslinker used for magnetic carbon nanotube mediated GFP plasmid delivery. *Nanotechnology*, 22 (28): 285103, 2011.
- [373] H. Dannenberg. N-Hydroxy-succinimid, eine nicht krebserzeugende N-Hydroxy-verbinding. *Zeitschrift für Krebsforschung und Klinische Onkologie*, 76 (3): 216–218, 1971.
- [374] H. Al-Salami, A. Mooranian, R. Negrulj, N. Chen-Tan, H. Al-Sallami *et al.* Novel artificial cell microencapsulation of a complex glialactazide-deoxycholic bile acid formulation: a characterization study. *Drug Des. Dev. Ther.*, 8: 1003–1012, 2014.
- [375] S. L. Kosaraju, L. D’ath, and A. Lawrence. Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydr. Polym.*, 64 (2): 163–167, 2006.
- [376] J. Malakar, A. K. Nayak, D. Pal, and P. Jana. Potato starch-blended alginate beads for prolonged release of tolbutamide: Development by statistical optimization and in vitro characterization. *Asian J. Pharm.*, 7 (1): 43, 2013.
- [377] W.-P. Voo, C.-W. Ooi, A. Islam, B.-T. Tey, and E.-S. Chan. Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour. *Eur. Polym. J.*, 75: 343–353, 2016.
- [378] G. Pasparakis and N. Bouropoulos. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads. *Int. J. Pharm.*, 323 (1): 34–42, 2006.
- [379] J. Eyckmans, T. Boudou, X. Yu, and C. S. Chen. A hitchhikers guide to mechanobiology. *Dev. Cell*, 21 (1): 35–47, 2011.
- [380] S. J. King, K. Nowak, N. Suryavanshi, I. Holt, C. M. Shanahan *et al.* Nesprin-1 and Nesprin-2 regulate endothelial cell shape and migration. *Cytoskeleton*, 71 (7): 423–434, 2014.
- [381] B. Ladoux and A. Nicolas. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Rep. Prog. Phys.*, 75 (11): 1–25, 2012.
- [382] C. S. Chen, J. Tan, and J. Tien. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 6: 275–302, 2004.
- [383] J. D. Mih, A. S. Sharif, F. Liu, A. Marinkovic, M. M. Symer *et al.* A multiwell platform for studying stiffness-dependent cell biology. *PLoS ONE*, 6 (5): e19929, 2011.
- [384] W. Hu, J. Meier, and D. Wang. A mechanistic analysis of the inoculum requirement for the cultivation of mammalian cells on microcarriers. *Biotechnol. Bioeng.*, 27 (5): 585–595, 1985.
- [385] K. Nilsson. Microcarrier cell culture. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 6 (1): 404–439, 1988.
- [386] C. Weber, S. Pohl, R. Pörtner, C. Wallrapp, M. Kassem *et al.* Expansion and harvesting of hMSC-TERT. *Open Biomed. Eng. J.*, 1: 38, 2007.
- [387] GE Healthcare. Microcarrier cell culture - principles and methods. 18-1140-62, 2005.
- [388] R. Cherry and E. Papoutsakis. Hydrodynamic effects on cells in agitated tissue culture reactors. *Bioprocess. Eng.*, 1 (1): 29–41, 1986.
- [389] V. Jossen, R. Pörtner, S. C. Kaiser, M. Kraume, D. Eibl *et al.* Mass production of mesenchymal stem cells: Impact of bioreactor design and flow conditions on proliferation and differentiation. In *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine*. InTech, 2014.
- [390] M. L. Weiss, S. Medicetty, A. R. Bledsoe, R. S. Rachakatla, M. Choi *et al.* Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of parkinson’s disease. *Stem cells*, 24 (3): 781–792, 2006.
- [391] J. Steele, G. Johnson, C. McFarland, B. Dalton, T. Gengenbach *et al.* Roles of serum vitronectin and fibronectin in initial attachment of human vein endothelial cells and dermal fibroblasts on oxygen- and nitrogen-containing surfaces made by radiofrequency plasmas. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 6 (6): 511–532, 1995.
- [392] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel *et al.* Protein identification and analysis tools on the ExpASY server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, pp. 571–607. Springer, 2005.
- [393] S. Bajpai and S. Sharma. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *React. Funct. Polym.*, 59 (2): 129–140, 2004.
- [394] M. Ojala, K. Rajala, M. Pekkanen-Mattila, M. Miettinen, H. Huhtala *et al.* Culture conditions affect cardiac differentiation potential of human pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, 7 (10): e48659, 2012.
- [395] N. Bigdeli, M. Andersson, R. Strehl, K. Emanuelsson, E. Kilmare *et al.* Adaptation of human embryonic stem cells to feeder-free and matrix-free culture conditions directly on plastic surfaces. *J. Biotechnol.*, 133 (1): 146–153, 2008.
- [396] R. Olmer, A. Haase, S. Merkert, W. Cui, J. Palecek *et al.* Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium. *Stem Cell Res.*, 5 (1): 51–64, 2010.
- [397] S. Musah, S. A. Morin, P. J. Wrighton, D. B. Zwick, S. Jin *et al.* Glycosaminoglycan-binding hydrogels enable mechanical control of human pluripotent stem cell self-renewal. *ACS Nano*, 6 (11): 10168–10177, 2012.
- [398] J. Hou, C. Li, Y. Guan, Y. Zhang, and X. X. Zhu. Enzymatically crosslinked alginate hydrogels with improved adhesion properties. *Polym. Chem.*, 6 (12): 2204–2213, 2015.
- [399] M. Nakamura, K. Arai, Y. Tsukamoto, H. Yoshida, H. Sanae *et al.* The development of cell-adhesive hydrogel for 3D printing. *International Journal of Bioprinting*, 2 (2), 2016.
- [400] C. M. Bidan, K. P. Kommareddy, M. Rumpel, P. Kollmannsberger, Y. J. M. Bréchet *et al.* How linear tension converts to curvature: geometric control of bone tissue growth. *PLoS ONE*, 7 (5): e36336, 2012.
- [401] M. Chiquet, L. Gelman, R. Lutz, and S. Maier. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *BBA-Mol. Cell. Res.*, 1793 (5): 911–920, 2009.
- [402] M. Ghibardo, J.-M. D. Meglio, P. Hersen, and B. Ladoux. Mechanics of cell spreading within 3D-micropatterned environments. *Lab. Chip*, 11 (5): 805–812, 2011.

- [403] J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju *et al.* Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100 (4): 1484–1489, 2003.
- [404] M. T. Yang, J. Fu, Y.-K. Wang, R. A. Desai, and C. S. Chen. Assaying stem cell mechanobiology on microfabricated elastomeric substrates with geometrically modulated rigidity. *Nat. Protoc.*, 6 (2): 187–213, 2011.
- [405] K. Bhadriraju, M. Yang, S. A. Ruiz, D. Pirone, J. Tan *et al.* Activation of ROCK by RhoA is regulated by cell adhesion, shape, and cytoskeletal tension. *Exp. Cell Res.*, 313 (16): 3616–3623, 2007.
- [406] J. O. Mudd and D. A. Kass. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature*, 451 (7181): 919–928, 2008.
- [407] S. P. Sheehy, A. Grosberg, and K. K. Parker. The contribution of cellular mechanotransduction to cardiomyocyte form and function. *Biomech. Model. Mechanobiol.*, 11 (8): 1227–1239, 2012.
- [408] S.-J. Gwak, S. H. Bhang, I.-K. Kim, S.-S. Kim, S.-W. Cho *et al.* The effect of cyclic strain on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*, 29 (7): 844–856, 2008.
- [409] H.-Y. Yeh, B.-H. Liu, M. Sieber, and S.-H. Hsu. Substrate-dependent gene regulation of self-assembled human msc spheroids on chitosan membranes. *BMC Genomics*, 15 (1): 10, 2014.
- [410] S.-H. Hsu, T.-T. Ho, N.-C. Huang, C.-L. Yao, L.-H. Peng *et al.* Substrate-dependent modulation of 3D spheroid morphology self-assembled in mesenchymal stem cell-endothelial progenitor cell coculture. *Biomaterials*, 35 (26): 7295–7307, 2014.
- [411] W.-H. Zimmermann, K. Schneiderbanger, P. Schubert, M. Didie, F. Münzel *et al.* Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ. Res.*, 90 (2): 223–230, 2002.
- [412] M. R. Dusseiller, D. Schlaepfer, M. Koch, R. Kroschewski, and M. Textor. An inverted microcontact printing method on topographically structured polystyrene chips for arrayed micro-3-D culturing of single cells. *Biomaterials*, 26 (29): 5917–5925, 2005.
- [413] P.-Y. Wang, J. Yu, J.-H. Lin, and W.-B. Tsai. Modulation of alignment, elongation and contraction of cardiomyocytes through a combination of nanotopography and rigidity of substrates. *Acta Biomater.*, 7 (9): 3285–3293, 2011.
- [414] V. Vogel and M. Sheetz. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7 (4): 265–275, 2006.
- [415] N. Wang, J. D. Tytell, and D. E. Ingber. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10 (1): 75–82, 2009.
- [416] H. J. Levis, I. Massie, M. A. Dziasko, A. Kaasi, and J. T. Daniels. Rapid tissue engineering of biomimetic human corneal limbal crypts with 3D niche architecture. *Biomaterials*, 34 (35): 8860–8868, 2013.
- [417] Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Alginate Lyase, A1603. Internet, 16. Februar 2017. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a1603?lang=de&region=DE>.
- [418] X. Zheng, H. Baker, W. S. Hancock, F. Fawaz, M. McCaman *et al.* Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnol. Prog.*, 22 (5): 1294–1300, 2006.
- [419] L. Thiele, J. E. Diederichs, R. Reszka, H. P. Merkle, and E. Walter. Competitive adsorption of serum proteins at microparticles affects phagocytosis by dendritic cells. *Biomaterials*, 24 (8): 1409–1418, 2003.
- [420] S. Schneider, P. Feilen, H. Cramer, M. Hillgärtner, F. Brunnenmeier *et al.* Beneficial effects of human serum albumin on stability and functionality of alginate microcapsules fabricated in different ways. *J. Microencapsul.*, 20 (5): 627–636, 2003.
- [421] H. J. Kong, D. Kaigler, K. Kim, and D. J. Mooney. Controlling rigidity and degradation of alginate hydrogels via molecular weight distribution. *Biomacromolecules*, 5 (5): 1720–1727, 2004.
- [422] S. Musah, P. J. Wrighton, Y. Zaltsman, X. Zhong, S. Zorn *et al.* Substratum-induced differentiation of human pluripotent stem cells reveals the coactivator YAP is a potent regulator of neuronal specification. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 111 (38): 13805–13810, 2014.
- [423] P. Liang and J. Du. Human induced pluripotent stem cell for modeling cardiovascular diseases. *Regen. Med. Res.*, 2 (1): 4, 2014.
- [424] M. Zhang, J. S. Schulte, A. Heinick, I. Piccini, J. Rao *et al.* Universal cardiac induction of human pluripotent stem cells in two and three-dimensional formats: implications for in vitro maturation. *Stem Cells*, 33 (5): 1456–1469, 2015.
- [425] S. M. Badenes, T. G. Fernandes, C. A. Rodrigues, M. M. Diogo, and J. M. Cabral. Microcarrier-based platforms for in vitro expansion and differentiation of human pluripotent stem cells in bioreactor culture systems. *Journal of Biotechnology*, 234: 71–82, 2016.
- [426] R. M. Haralick, K. Shanmugam, and I. H. Dinstein. Textural features for image classification. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, (6): 610–621, 1973.
- [427] R. M. Haralick. Statistical and structural approaches to texture. *Proc. IEEE*, 67 (5): 786–804, 1979.
- [428] N. Zayed and H. A. Elnemr. Statistical analysis of haralick texture features to discriminate lung abnormalities. *Int. J. Biomed. Imaging*, 2015: 1–7, 2015.



# Publikationen

## Peer-reviewed Artikel

- **M. M. Gepp**, M. C. Hutter. Determination of hERG channel blockers using a decision tree. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 14: 5325-5332, 2006.  
doi: 10.1016/j.bmc.2006.03.043
- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, S. G. Shirley, S. Howitz, H. Zimmermann. Dispensing of very low volumes of ultra high viscosity alginate gels: a new tool for encapsulation of adherent cells and rapid prototyping of scaffolds and implants. *Biotechniques* 46:31-38, 2009.  
doi: 10.2144/000113014
- A. Kovtun, S. Neumann, M. Neumeier, H. Urch, R. Heumann, **M. M. Gepp**, K. Wallat, M. Koeller, H. Zimmermann, M. Epple. *Nanoparticle-Mediated Gene Transfer From Electrophoretically Coated Metal Surfaces*. *J. Phys. Chem. B*. 117:1550-1555, 2012.  
doi: 10.1021/jp303448v
- K. Wallat\*, **M. M. Gepp\***, R. Le Harzic, J. C. Neubauer, H. Zimmermann, F. Stracke, M. Epple. *Nanoparticle-loaded bioactive hydrogels*. In: *Optically Induced Nanostructures. Biomedical and Technical Applications*, DeGruyter, 217-223, 2015.  
doi: 10.1515/9783110354324-015
- A. Katsen-Globa, N. Pütz, **M. M. Gepp**, J. C. Neubauer, H. Zimmermann. Study of SEM Preparation Artefacts with Correlative Microscopy: Cell Shrinkage of Adherent Cells by HMDS-Drying, *Scanning*, 38:625-633, 2016.  
doi: 10.1002/sca.21310
- **M. M. Gepp**, B. B. Fischer, A. Schulz, J. Dobringer, L. Gentile, J. A. Vásquez, J. C. Neubauer, H. Zimmermann. Bioactive surfaces from seaweed-derived alginates for the cultivation of human stem cells, *Journal of Applied Phycology*, Online erschienen, 2017.  
doi: 10.1007/s10811-017-1130-6
- **M. M. Gepp**, B. B. Fischer, S. Bur, N. W. Guldner, J. C. Neubauer, H. Zimmermann. Modified Hydrogel Surfaces: towards a versatile toolset for in vitro manipulation of anchorage dependent pluripotent and multipotent stem cells. 2016.  
(Manuskript in Vorbereitung zur Einreichung im Journal of Applied Physics A)
- C. Tscheka\*, **M. M. Gepp\***, M. Schneider, H. Zimmermann. Novel Protocol for the Formation of Biomimetic Alginate Hydrogels with Hairy Texture, Altering the Cell-Surface Interaction of Fibroblasts, 2016.  
(Manuskript fertiggestellt zur Einreichung bei PLoS ONE).

\*: gleichberechtigte Autorenschaft

**Vorträge**

- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, I. Meiser and H. Zimmermann. Micro-Contact-Printing und Piezo-Non-Contact-Printing: zwei Methoden zur Strukturierung von Oberflächen für biotechnologische Anwendungen. 17. NDVak, Beschichtung und Modifizierung von Kunststoffoberflächen. Dresden, Deutschland, 2009.
- **M. M. Gepp**. Live Cell Imaging in Tissue Engineering, Stem Cell Research and Cryobiology. Nikon Workshop. Leipzig, Deutschland (Eingeladener Vortrag), 2009.
- **M. M. Gepp**, I. Meiser, H. Zimmermann and F. Ehrhart. Structured surfaces and hydrogels produced by micro-contact printing for biotechnological applications. Biomed Tech 2010 (55), 2010.
- **M. M. Gepp**. Analysis of cellular behaviour in biopolymer environments using live-cell imaging. Cells meet Surface 2 Symposium, Braunschweig, Deutschland (Eingeladener Vortrag), 2012.
- I. Meiser, H. Lorig, **M. M. Gepp**, G. Gastrock, K. Lemke, J. Schulz, H. Zimmermann. Automatisierte, oberflächenbasierte Kultivierung humaner Stammzellen in miniaturisierten Bioreaktoren. Technische Systeme für die Lebenswissenschaften. 16. Heiligenstädter Kolloquium 2012, Bad Heiligenstadt, Deutschland, 2012.
- **M. M. Gepp**. Hydrogel-based interfaces for the cultivation of human stem cells for applications in tissue engineering. Cells meet Surface 3 Symposium, Braunschweig, Deutschland (Eingeladener Vortrag), 2015.
- S. Berger, K. Wallat, **M. M. Gepp**, R. Le Harzic, H. Zimmermann, F. Stracke, M. Epple. Alginate hydrogels, coated with calcium phosphate nanoparticles by an electrophoretic deposition method. 27. European Conference on Biomaterials, Krakau, Polen, 2015.
- K. Loza, S. Berger, K. Wallat, **M. M. Gepp**, R. Le Harzic, H. Zimmermann, F. Stracke, M. Epple. Electrophoretic deposition of calcium phosphate nanoparticles on nanostructured silicon surfaces. Recent Advances In Nano-Science And Technology (RAINSAT-2015), Chennai, Indien, 2015.
- **M. M. Gepp**, I. Meiser, B. Fischer, H. Zimmermann. Integration von Automatisierungshardware in zellbiologischen Workflows im Kontext der regenerativen Medizin. 20 jähriges Firmenjubiläum GeSiM mbH, Dresden, Deutschland, 2015.

**Poster**

- **M. M. Gepp**, F. K. Groeber, A. F. J. Beier, H. Zimmermann, F. Ehrhart und J. C. Schulz. Ein neuer Ansatz zur Untersuchung dynamischer zellulärer Ereignisse mittels Lichtmikroskopie. In 2. Dresdner Medizintechnik Symposium. Dresden, Deutschland, 2008.
- **M. M. Gepp**, I. Sebastien, F. Groeber, J. Schulz, F. Ehrhart und H. Zimmermann. Revealing of Medical and Biological relevant Cellular Processes by Automated Time-lapse Microscopy, p. 204. In Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009. IFMBE, München, Deutschland, 2009.
- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, I. Meiser und H. Zimmermann. Micro-Contact-Printing und Nano-Imprinting-Technologien zur Herstellung bioaktiver Oberflächen für biotechnologische Anwendungen. In Mikrosystemtechnik Kongress 2009. Berlin, 2009.
- **M. M. Gepp**, S. Howitz, F. Baudisch und F.-U. Gast. A new instrument platform to stamp functional 2D and 3D structures in the micro- and nanometer range. In Eight International NNT'09 Conference (Nanoimprint and Nanoprint Technology). San Jose, California, USA, 2009.

- **M. M. Gepp**, I. Meiser, H. Zimmermann und F. Ehrhart. Structured surfaces and hydrogels produced by micro-contact printing for biotechnological applications. In Biomedizinische Technik Kongress 2010. Rostock, Deutschland, 2010
- Schulz, J. C., F. K. Groeber, **M. M. Gepp**, A. F. J. Beier, H. Zimmermann und A. Katsen-Globa. Optimisation of Cryopreservation Protocols for Cryo-banking of Human Stem Cells. In Optimisation of Cryopreservation Protocols for Cryo-banking of Human Stem Cells. Hannover, Deutschland, 2008.
- Meiser, I., S.C. Mueller, **M. M. Gepp**, H. Zimmermann und F. Ehrhart. Quantitative High Speed Video Analysis of Biopolymer Encapsulated Cells while Capsule Formation, 2008
- Meiser, I., S.C. Mueller, **M. M. Gepp**, H. Zimmermann und F. Ehrhart. Quantitative High Speed Video Analysis of Biopolymer Encapsulated Cells while Capsule Formation. In Congress for Medical and Biomedical Engineering 2008. Antwerpen, Belgien, 2008
- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, T. Böse, H. Zimmermann.  $\mu$ -Contact Printing: Alginate-Kapsel-folien als lebende, transplantierfähige Hormonpflaster, In Mikrosystemtechnik Kongress 2011. Darmstadt, Deutschland, 2011.
- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, H. Zimmermann. Neue In-Vitro Assays mit der "CellCartridge": Kombination von Kryokonservierung und Lebend-Zell Mikroskopie, In Mikrosystemtechnik Kongress 2011. Darmstadt, Deutschland, 2011.
- V. von Walcke-Wulffen, B. Schäfer, **M. M. Gepp**, T. Schmidt: Enabling the cryopreservation of parathyroid glands for hospitals without biobank. In 56. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie 2013, Düsseldorf, Deutschland, 2013.
- K. Bierkandt, **M. M. Gepp**, W. Poppendieck, R. Ruff, K.-P. Hoffmann, H. Zimmermann: A novel bioactive implant material based on a porous silicone-hydrogel-composite. In Biomedizinische Technik Kongress 2013. Graz, Österreich, 2013.
- K. Bierkandt, J. Lippek, **M. M. Gepp**, R. Ruff, W. Poppendieck, H. Zimmermann, K.-P. Hoffmann: Silicone-alginate-composite for cell based therapies: a novel silicone based implant material for immobilization of drug releasing cells. In Biomedizinische Technik Kongress 2014. Hannover, Deutschland, 2014.
- **M. M. Gepp**, A. Schulz, J. Dobringer, J. Vasquez, L. Gentile, J. C. Neubauer, H. Zimmermann: Bioactive surfaces for the cultivation of human stem cells on seaweed-derived alginates. In 22nd International Seaweed Symposium 2016. Kopenhagen, Dänemark, 2016.

### Scientific Paper

- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, I. Meiser und H. Zimmermann. Micro-Contact-Printing und Piezo-Non-Contact-Printing: zwei Methoden zur Strukturierung von Oberflächen für biotechnologische Anwendungen. In 17. NDVak, Beschichtung und Modifizierung von Kunststoffoberflächen. Dresden, Deutschland, 2009.
- **M. M. Gepp**, I. Sebastien, F. Groeber, J. Schulz, F. Ehrhart und H. Zimmermann. Revealing of Medical and Biological relevant Cellular Processes by Automated Time-lapse Microscopy: p. 204. In Medical Physics and Biomedical Engineering World Congress 2009. IFMBE, München, Deutschland, 2009.
- **M. M. Gepp**, I. Meiser, H. Zimmermann und F. Ehrhart. Structured surfaces and hydrogels produced by micro-contact printing for biotechnological applications. Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik 2010, Band 55, doi 10.1515/BMT.2010.120, 2010

- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, F.-U. Gast, M. Burger, F. Baudisch und S. Howitz. Microcontact Printing und Nanoimprint-Lithographie. GIT Laborzeitschrift 10:758-759, 2010.
- J. Schulz, K. Lemke, **M. Gepp**, A. Beier, V. Auernheimer, M. Quade, G. Gastrock, H. Zimmermann. New microfluidics-based technologies enable the high throughput screening for optimal cultivation and differentiation conditions: First adaptation to stem cell culture. Journal of stem cells & regenerative medicine, 6(2): 79-80, 2010.
- I. Meiser, **M. M. Gepp**, S. Kleer, A. Katsen-Globa, H. Zimmermann, F. Ehrhart. Thin Alginate Membranes Produced by Micro-Contact Printing for Tissue Engineering. Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik, Band 55, doi:10.1515/BMT.2010.170, 2010.
- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, T. Böse, H. Zimmermann.  $\mu$ -Contact Printing: Alginate-Kapsel-folien als lebende, transplantierfähige Hormonpflaster. Proceedings MikroSystemTechnik Kongress 2011, VDE-Verlag, ISBN 978-3-8007-3367-5, 2011.
- **M. M. Gepp**, F. Ehrhart, H. Zimmermann. Neue In-Vitro Assays mit der "CellCartridge": Kombination von Kryokonservierung und Lebend-Zell Mikroskopie. Proceedings MikroSystemTechnik Kongress 2011, VDE-Verlag, ISBN 978-3-8007-3367-5, 2011.
- V. von Walecke-Wulffen, J. Mohrbacher, **M. M. Gepp**, T. Schmidt: Standardization of the Cryopreservation Process for Parathyroid Glands. Proceedings The 12th CRYOGENICS, Seite 159-162, 2012.
- I. Meiser, H. Lorig, **M. M. Gepp**, G. Gastrock, K. Lemke, J. Schulz, H. Zimmermann. Automatisierte, oberflächenbasierte Kultivierung humaner Stammzellen in miniaturisierten Bioreaktoren. Proceedings 16. Heiligenstädter Kolloquium, Seite 55-62, ISBN: 978-3-00-039458-4, 2012.
- K. Bierkandt, **M. M. Gepp**, W. Poppendieck, R. Ruff, K.-P. Hoffmann, H. Zimmermann: A novel bioactive implant material based on a porous silicone-hydrogel-composite. In Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik, Band 58, SI-1, doi:bmt-2013-4387, 2013.
- K. Bierkandt, J. Lippek, **M. M. Gepp**, R. Ruff, W. Poppendieck, H. Zimmermann, K.-P. Hoffmann: Silicone-alginate-composite for cell based therapies: a novel silicone based implant material for immobilization of drug releasing cells. 2014. Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik 2014; Band 59, SI-1, doi:10.1515/bmt-2014-4492, 2014.
- B. Fischer, A. Schulz, **M. M. Gepp**, J. Neubauer, L. Gentile, H. Zimmermann: 3D printing of hydrogels in a temperature controlled environment with high spatial resolution. 2016. Current Directions in Biomedical Engineering. doi: 10.1515/cdbme-2016-0027, 2016.

## Patente

- „Vorrichtung und Verfahren zur Ablösung biologischen Materials von einer Oberfläche eines Trägers“ (DE102013013003A1, Offenlegung: 19. Februar 2015)

# Anhang

---

## CellProfilerPipeline – Simulation von Artefakten

- [01. LoadImages] Laden der Original-Bilder zur Modifikation
- [03./04. Resize] Bildgröße auf 20% skalieren und auf 100% zurück skalieren (Nearest Neighbor Interpolation)
- [06./07. Resize] Bildgröße auf 10% skalieren und auf 100% zurück skalieren (Nearest Neighbor Interpolation)
- [09./10. Resize] Bildgröße auf 50% skalieren und auf 100% zurück skalieren (Nearest Neighbor Interpolation)
- [12./13. Resize] Bildgröße auf 40% skalieren und auf 100% zurück skalieren (Nearest Neighbor Interpolation)
- [15. Smooth] Weichzeichnung mit Gauss-Filter, Artefakt Durchmesser: 5px
- [17. Smooth] Weichzeichnung mit Gauss-Filter, Artefakt Durchmesser: 7px
- [19. Smooth] Weichzeichnung mit Gauss-Filter, Artefakt Durchmesser: 10px
- [21. Smooth] Weichzeichnung mit Gauss-Filter, Artefakt Durchmesser: 15px
- [23. Smooth] Weichzeichnung mit Gauss-Filter, Artefakt Durchmesser: 20px
- [25. InvertForPrinting] Invertierung der Farben (Grauwerte)
- [27. FlipAndRotate] Spiegelung des Bildes (Top->Bottom)
- [29. EnhanceEdges] Anwendung des Sobel-Algorithmus zur Kantendetektion (Alle Kantenrichtungen)
- [XX. SaveImages] Abspeicherung der jeweiligen modifizierten Bilder (png)

## CellProfilerPipeline – Analyse Wachstum L929 Fibroblasten

- [01. LoadImages] Laden der einzelnen Bilder (Typ: png) in die Pipeline. Die Bilder befinden sich alle in einem Ordner und werden in aufsteigender Reihenfolge analysiert.
- [02. ClassifyPixels] Klassifizierung der Grauwertbilder (Ausgabe: Grauwertbild mit Werten zwischen 1.0 und 0, wobei 1.0 eine positive Klassifizierung bedeutet und 0 eine negative. Ebenso können Werte zwischen 1 und 0 liegen.). Die Parameter für die Texturfeatures wurden auf nur auf *Texture* gesetzt, die Skalierung auf *Medium* (7 px).
- [03. Morph] Das Grauwertbild aus Modul 03. wird mittels morphologischer Operatoren (close, Skalierung 3, einmal angewendet) verfeinert.
- [04. Smooth] Das Bild aus Modul 03. wird mittels eines Medianfilters (Skalierung 7) geglättet.
- [05. IdentifyPrimaryObjects] Mit dem Bild aus Modul 04. wird die Fläche der adhärennten Zellen bestimmt (Durchmesser: 10-800 px, Threshold: 0.3-1.0, Methode: Otsu Global).
- [06. GrayToColor] Konvertiert das Originalbild in eine RGB-Bild.
- [07. OverlayOutlines] Überlagerung der detektierten Grenzlinien der Zellen mit dem generierten Bild aus Modul 06.
- [08. ConvertObjectsToImage] Umwandlung der detektierten Zellfläche in ein Bild (Maske).
- [09.-11. SaveImages Speichern] der Bilder zu Evaluation der Daten.
- [12. MeasureObjectSizeShape] Messen der Fläche der detektierten Objekte.
- [13. MeasureObjectIntensity] Messen der Intensität der detektierten Objekte.
- [14. MeasureImageAreaOccupied] Messen der Fläche der Objekte im Gesamtbild.
- [15. MeasureImageIntensity] Messen der Intensität der Objekte im Gesamtbild.
- [16. MeasureTexture] Messen der Texture der Objekte
- [17. DisplayDataOnImage] Anzeige des Texturparameters Entropy(10) im Bild aus Modul 08.
- [18. SaveImages] Speichern des Bildes aus 17.
- [19. ExportToSpreadsheet] Export der Daten (Messwerte) in eine Textdatei (Typ: csv).
- [20. ConserveMemory] Löschen nicht verwendeter Daten aus dem Arbeitsspeicher.

### CellProfilerPipeline – Analyse Wachstum humane mesenchymale Stammzellen

- [01. **LoadImages**] Laden der einzelnen Bilder (Typ: png) in die Pipeline. Die Bilder befinden sich alle in einem Ordner und werden in aufsteigender Reihenfolge analysiert.
- [02. **ClassifyPixels**] Klassifizierung der Grauwertbilder (Ausgabe: Grauwertbild mit Werten zwischen 1.0 und 0, wobei 1.0 eine positive Klassifizierung bedeutet und 0 eine negative. Ebenso können Werte zwischen 1 und 0 liegen.). Die Parameter für die Texturfeatures wurden auf *Color* und *Texture*, die Skalierung jeweils auf *Large* (11 px) gesetzt.
- [03. **Smooth**] Weichzeichnen des Bildes der Klassifizierung zur Verbesserung der Detektion in späteren Modulen. Es wird hier ein Gauss-Filter verwendet, wobei der Artefakt Durchmesser auf 10.0 px gesetzt wurde.
- [04. **IdentifyPrimaryObjects**] Identifizierung von Objekten anhand der Klassifizierung (Durchmesser: 20-307200 px, Threshold: 0.5-1.0, Methode: Otsu Global)
- [05. **ConvertObjectsToImage**] Konvertieren der Objekte zu einer Maske
- [06. **SaveImages**] Speichern der Maske aus 05. als Bild zur Evaluation bzw. Dokumentation
- [07. **MeasureTexture**] Messen der Textur der Objekte und Gesamtbildern
- [08. **MeasureImageAreaOccupied**] Messen der Fläche der Summe der detektierten Objekte
- [09. **GrayToColor**] Umwandeln der Grauwertbilder in Color-Bilder für spätere Annotationen
- [10. **OverlayOutlines**] Überlagerung der Auslinien der detektierten Objekte mit dem Originalbild. Hierdurch kann nach erfolgter Analyse die Güte bestimmt werden.
- [11. **SaveImages**] Speichern der Überlagerten Bilder zur Evaluation bzw. Dokumentation
- [12. **ExportToSpreadsheet**] Export der Daten (Messwerte) in eine Textdatei (Typ: csv)
- [13. **ConserveMemory**] Löschen nicht verwendeter Daten aus dem Arbeitsspeicher

### CellProfilerPipeline – Analyse Wachstum humanen induziert pluripotenten Stammzellen

- [01. **LoadImages**] Laden der einzelnen Bilder (Typ: png) in die Pipeline. Die Bilder befinden sich alle in einem Ordner und werden in aufsteigender Reihenfolge analysiert.
- [02. **GrayToColor**] Umwandeln der Grauwertbilder in Color-Bilder für spätere Annotationen
- [03. **ClassifyPixels**] Klassifizierung der Grauwertbilder (Ausgabe: Grauwertbild mit Werten zwischen 1.0 und 0, wobei 1.0 eine positive Klassifizierung bedeutet und 0 eine negative. Ebenso können Werte zwischen 1 und 0 liegen.)
- [04. **Smooth**] Weichzeichnen des Bildes der Klassifizierung zur Verbesserung der Detektion in späteren Modulen. Es wird hier ein Gauss-Filter verwendet, wobei der Artefakt Durchmesser auf 5.0 px gesetzt wurde.
- [05. **IdentifyPrimaryObjects**] Identifizierung von Objekten anhand der Klassifizierung (Durchmesser: 75-1000 px, Threshold: 0.3-1.0, Methode: Otsu Global)
- [06. **IdentifyPrimaryObjects**] Identifizierung von Objekten anhand der Klassifizierung nach Weichzeichnen (Durchmesser: 75-1000px, Threshold: 0.3-1.0, Methode: Otsu Global)
- [07. **OverlayOutlines**] Überlagerung der Auslinien der detektierten Objekte aus den Modulen 06. und 05. Hierdurch kann nach erfolgter Analyse die Güte bestimmt werden.
- [08. **SaveImages**] Speichern der Überlagerten Bilder zur Evaluation bzw. Dokumentation
- [09. **MeasureObjectIntensity**] Messen von Intensitätseigenschaften der detektierten Objekte
- [10. **MeasureObjectSizeShape**] Messen von Formeigenschaften der detektierten Objekte
- [11. **MeasureTexture**] Messen der Textur der Objekte und Gesamtbildern
- [12. **ExportToSpreadsheet**] Export der Daten (Messwerte) in eine Textdatei (Typ: csv)

### CellProfilerPipeline – Texturanalyse von zellbiologischen Bildausschnitten

- [01. **LoadImages**] Laden der Bildausschnitte für die Analyse der Textur
- [02. **MeasureTexture**] Messen der Textur der Bildausschnitte (Scale: 1, 5, 10, 20, 50, 100)
- [03. **MeasureGranularity**] Messen der Granularität der Bildausschnitte (Scale: 10-20, Downsampling: 0.25)
- [04. **MeasureImageIntensity**] Messen der Intensität der Bildausschnitte
- [05. **ExportToSpreadsheet**] Export der Daten (Messwerte) in eine Textdatei (Typ: csv)
- [06.-08. **DisplayScatterplot**] Generierung von Scatterplots zur Evaluierung der Messdaten

**Objekteigenschaften ([288, 297])**

$$Area_{Objekt} = \sum_{i,j}^{n,m} p(i,j)$$

$$FormFactor = Circularity = \frac{4 \cdot \pi}{Perimeter^2}$$

$$Eccentricity = \epsilon = \sqrt{\frac{a^2 - b^2}{a^2}} = \sqrt{1 - \left(\frac{b}{a}\right)^2}$$

$$Solidity = Solidität = \frac{Area}{Convex Area}$$

$$Mean Intensity_{Objekt} = \frac{\sum_{i,j}^{n,m} I(i,j)}{Area}$$

$$Equivalent diameter = \sqrt{\frac{4}{\pi} \cdot Area}$$

Fläche des detektierten Objekts [Anzahl Pixel] bzw. [ $\mu m^2$ ].

Quantifiziert die Form des detektierten Objekts, 1,0 für einen perfekten Kreis, kleiner 1,0 für unregelmäßige Formen.

Beschreibt die einen Kreis bei einem Wert von 0 und über elliptische Formen bis zu einer Linie bei einem Wert von 1,0.

Anteil der Pixel der konvexen Hülle eines Objektes, die sich auch im Objekt befinden. 1,0 bei einem soliden Objekt ohne Löcher oder konkaven Form, oder kleiner 1,0 bei einem Objekt mit Löchern oder einer unregelmäßigen Form.

Mittlere Pixelintensität eines Objektes.

Gibt den Durchmesser eines Kreises mit der gleichen Fläche des Objektes an.

**Textuelle dimensionslosen Eigenschaften von Objekten**

**Graylevel Cooccurrence Matrix, GLCM** (nach Haralick [426, 427])

Die symmetrische Matrix berechnet für adjazente, vorhandene Pixelwerte eines Bildes das paarweise Vorkommen.

**Contrast** (nach Haralick [426, 428])

Maß für die Variation von Pixelwerten zwischen Referenz-Pixel und Nachbar. Hoher Kontrast bedeutet große Intensitätsunterschiede in der GLCM.

**Correlation** (nach Haralick [426, 428])

Maß für die lineare Abhängigkeit von Pixelwerten in der GLCM

**Entropy** (nach Haralick [426, 428])

Berechnet anhand der GLCM die Zufälligkeit oder Grad der Unordnung von Pixelwerten (Homogenität) eines Bildes.

$$P(i,j,d,0) = \#\{(k,l), (m,n) \in (L_y \times L_x) \times (L_y \times L_x) | k-m = 0, |l-n| = d, I(k,l) = i, (m,n) = j\}$$

wobei # die Anzahl der Elemente darstellt.

$$Contrast(f_2) = \sum_{n=0}^{N_g-1} n^2 \left\{ \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i,j) \right\}$$

$$Correlation(f_3) = \frac{\sum_i \sum_j (ij)p(i,j) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

wobei  $\mu_x, \mu_y, \sigma_x$  und  $\sigma_y$  Mittelwert bzw. Standardabweichung von  $p_x$  bzw.  $p_y$  darstellen.

$$Entropy(f_9) = - \sum_i \sum_j p(i,j) \log(p(i,j))$$

## Python Skript (Pseudocode) für die Augmented Microscopy von hiPSC

**LADE LIBRARIES** cv, PIL, PIL.Image, PIL.ImageStat, scipy, numpy, scipy.ndimage.measurements, VideoCapture.Device, os, time

**INITIALISIERE** Mikroskopkamera

**SOLANGE** kein Benutzerabbruch:

**EMPFANGE** Mikroskopbild  
**KONVERTIERE** PIL to ndarray  
**KONVERTIERE** ndarray to PIL  
**KONVERTIERE** PIL to openCV  
**INITIALISIERE** Benutzerausgabe (Ausgabefenster)

**DETEKTIERE KANTEN (CANNY-EDGE)**

**VERBESSERE** Detektierte Kanten mit **DILATE** und **ERODE**  
**BERECHNE** Anzahl der Pixel von Vordergrund (weiß) und Hintergrund (schwarz)  
**BERECHNE** Konfluenzwert = Vordergrund/(Vordergrund + Hintergrund)\*100

**FINDE OBJEKTE** in Vordergrund  
**ZEICHNE MASKE** über Vordergrund

**ERSTELLE** Augmented Microscope Bild  
**FÜGE** Semitransparente Maske des Vordergrunds ein  
**FÜGE** Konfluenzwert in Augmented Microscope Bild  
**AKTUALISIERE** Ausgabefenster  
**WENN** Benutzer-Interaktionen  
    “s”-Taste **DANN** Dokumentation und Speichern der Bilder  
    “ESC” **DANN** Benutzerabbruch und Beenden des Programms

## Python Skript (Pseudocode) für die Augmented Microscopy von Kardiomyozyten

**LADE LIBRARIES** cv, PIL, PIL.Image, PIL.ImageFilter, PIL.ImageEnhance, PIL.ImageStat, PIL.ImageOps, ImageFilter, scipy, numpy, scipy.ndimage.measurements as snm, VideoCapture.Device, os, time, matplotlib.pyplot, math, scipy import signal

**INITIALISIERE** Mikroskopkamera

**SOLANGE** kein Benutzerabbruch:

**EMPFANGE** Mikroskopbild  
**VERBESSERE** Kontrast und **DETEKTIERE** Kanten  
**BERECHNE** Bildeigenschaften  
**KONVERTIERE** PIL to ndarray  
**KONVERTIERE** ndarray to PIL  
**KONVERTIERE** PIL to openCV  
**INITIALISIERE** Benutzerausgabe (Ausgabefenster)  
**WENN** Benutzerinteraktion durch “Space”  
    **BESTIMME** Intensität von jedem Bilde über eine Bildfolge von 400 Bildern  
    **SPEICHERE** Intensitätswerte in ARRAY  
    **BERECHNE** Min und Max Werte in ARRAY  
    **BERECHNE** Amplitude der Intensitätswerte durch Min - Max  
    **BERECHNE** reale Dauer der Bildsequenz  
    **ERSTELLE** Diagramm der Intensitätswerte über die Zeit  
    **BESTIMME** Kontraktion  
        **WENN** (Min – Max) < 0,1 **DANN** keine Kontraktion  
        **WENN** (Min – Max) > 0,11 **DANN** Kontraktion  
    **SPEICHERE** Bilder und Diagramm zur Dokumentation  
**AKTUALISIERE** Ausgabefenster  
**WENN** Benutzerinteraktion durch “ESC” **DANN** Beende Programm



# Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Heiko Zimmermann, geschäftsführender Institutsleiter des Fraunhofer IBMT, für die Möglichkeit danken, die vorliegende Arbeit in einem hervorragenden interdisziplinären und wissenschaftlichen Umfeld anzufertigen, sowie seine stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion. Die in den vielen Diskussionen entwickelten Ideen haben diese Arbeit in besonderem Maße beeinflusst und für das Gelingen beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. Elmar Heinzle, Lehrstuhlinhaber Technische Biochemie, Universität des Saarlandes, für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. Julia Neubauer für die konstruktiven Diskussionen bei zellbiologischen Fragestellungen bedanken.

Frau Dr. Friederike Ehrhart danke ich für die fachlichen Diskussionen bzgl. Alginaten bedanken.

Herrn Dr. Luca Gentile danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und Ratschläge im Bereich der Stammzellbiologie danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Marc Schneider und Herrn Apotheker Clemens Tscheka, Lehrstuhl für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlandes, für die Herstellung der mit Fasern modifizierten Alginat-Hydrogelen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Norbert W. Guldner, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, an dieser Stelle für die Titanisierung von Alginat-Hydrogelen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Matthias Epple und Frau Dr. Katrin Wallat, Institut für Anorganische Chemie, Universität Duisburg-Essen, für die Bereitstellung der Calcium-Phosphat Nanopartikel während des Projekts im DFG SPP 1327.

Herrn Dr. Michael Thomas (Fraunhofer IST, Braunschweig), Frau Dr. Kristina Lachmann (Fraunhofer IST, Braunschweig), Frau Dr. Cornelia Stramm (Fraunhofer IVV, Freising), Frau Dipl. Ing. Andrea Liebmann (Fraunhofer IVV, Dresden) und den jeweiligen Mitarbeitern möchte ich an dieser Stelle für die Herstellung der „LabBags“ im Fraunhofer Projekt WISA „Labor im Beutel“ danken.

Frau Dr.-Ing. Alisa Katsen-Globa danke ich für Präparation, Aufnahme und Diskussion der REM-Proben.

Herrn Dipl. Ing. (FH) Axel Brenner danke ich für die Herstellung der Silizium-Strukturen für das  $\mu$ -Contact Printing.

Frau Dipl. Biol. Jennifer Bosold danke ich für die manuelle Bildauswertung der hiPSCs-Kolonien.

Ich danke Frau Susan Zöllner und Frau Sybille Richter, für die Übernahme der alltäglichen Routinearbeiten im Labor.

Frau Lisa Wolf, M. Sc. danke ich für die Zuarbeit bei der Degradierung von Alginat-Hydrogelen. Herrn Adrian Fritz, M. Sc. danke ich für die systematische Untersuchung der Kultivierungsbedingungen von dissoziierten hiPSC-Kolonien. Herrn André Schulz, M. Sc. danke ich für die Funktionalisierung und Untersuchung von Alginat-Mikroträgern mit Tyramin, sowie die Extraktion der Alginate. Ich möchte mich bei Herrn Benjamin Fischer, M. Sc. für die Übertragung der Alginatmodifikation auf Alginat-Mikroträgern zur Kultivierung von hMSCs, sowie den Transfer der Modifikation mit Tyramin auf frei schwimmende Alginate für die Kultivierung von hiPSC-CMs bedanken. Ich danke Frau Katharina Schmidt, M. Sc. für die Kultivierung der hiPSCs auf Alginat-Mikroträgern im „Labor im Beutel“.

Ich danke meiner Familie, sowie Sabine Müller für die herzliche Unterstützung während der letzten Jahre.



