

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR UNFALLCHIRURGIE  
PROF. DR. M. NERLICH  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Tissue Engineering**  
**mit Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrices**  
**zusätzlich stabilisiert mit Gelatine und Transglutaminase**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Andreas Seiler

**2017**



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR UNFALLCHIRURGIE  
PROF. DR. M. NERLICH  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Tissue Engineering**  
**mit Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrices**  
**zusätzlich stabilisiert mit Gelatine und Transglutaminase**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Andreas Seiler

**2017**

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Peter Angele
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Tag der mündlichen Prüfung:	27. Juni 2018

**Meiner Familie  
und  
meiner Ehefrau Mercy**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Meniskusersatz und die Rolle des „Tissue Engineering“	1
1.2	Die Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix als biologisches Ersatzmaterial	4
1.3	Gelatine: Herstellung, Struktur und physikalische Eigenschaften	6
1.4	Biologische Quervernetzung von Gelatine durch die Transglutaminase	8
1.5	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	10
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1	Material	12
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	12
2.1.2	Puffer und Lösungen	13
2.1.3	Medien und Seren	14
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.5	Kits	15
2.1.6	Geräte	15
2.1.7	Biomaterialien	16
2.1.8	Gelatine	16
2.1.9	Transglutaminasen	16
2.1.10	Sterilisation durch Gamma-Strahlen	17
2.2	Methoden	17
2.2.1	Prüfung der mechanischen Stabilität	17
2.2.1.1	Kompression der Proben in 96-well-plates	18
2.2.1.2	Herstellung und Kompression von freistehenden Proben	19
2.2.1.3	Zugbelastung der Proben	21
2.2.2	Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität	23

2.2.2.1	Kasein und Dansylcadaverin als Substrat	23
2.2.2.2	Kasein und BPNH2 als Substrat	24
2.2.3	Auflösung und Verarbeitung der Gelatine und der Transglutaminase	25
2.2.4	Zellzählung	26
2.2.5	Bestimmung der metabolischen Aktivität von Mesenchymalen Stammzellen mit Resazurin	26
2.2.6	Life-Dead-Kit	28
2.2.7	Histologie	28
2.2.8	Statistik	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1	Ergebnisse aus der Methodenentwicklung	30
3.1.1	Auswahl des Stempels für die Kompression von Gelatine in 96- well-plates	30
3.1.2	Etablierung der Aktivitätsmessung für die Transglutaminase	33
3.1.3	Aktivitätsverlust der Transglutaminasen bei 4°C und 37°C	35
3.2	Ergebnisse aus den Hauptversuchen	38
3.2.1	Mechanische Stabilität der Gelatine	38
3.2.1.1	Einfluss von Inkubationsdauer und Temperatur auf die Festigkeit der Gelatine	38
3.2.1.2	Beeinflussung der Stabilität der Gelatine in Abhängigkeit von der Transglutaminase-Konzentration	41
3.2.1.3	Beeinflussung der Stabilität der Gelatine in Abhängigkeit von der Gelatine-Konzentration	44
3.2.1.4	Beeinflussung der Stabilität der Gelatine in Abhängigkeit von der Konzentration eines fetalen bovinen Serum	46
3.2.2	Beeinflussung der mechanischen Stabilität der ECM in Abhängigkeit von der Füllung mit quervernetzter und nicht quervernetzter Gelatine	48

3.2.3	Einfluss der Inkubationsdauer bei 4°C auf die Zellvitalität	53
3.2.4	Einfluss der Transglutaminase und des Maltodextrin auf die Zellvitalität	60
3.2.5	Einfluss der Gelatine auf die Zellvitalität	66
3.2.6	Histologische Betrachtung der Mesenchymalen Stammzellen in der 3-D-Kultur	69
3.2.7	Osteogene Differenzierung der Mesenchymalen Stammzellen in der 3-D-Kultur	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
7.1	Lebenslauf	95
7.1	Danksagung	96

# 1 Einleitung

## 1.1 Meniskusersatz und die Rolle des „Tissue Engineering“

Meniskusverletzungen gehören zu den häufigsten Knieproblemen. Ein Zusammenstoß mit einem Gegenspieler beim Sport, ein Verkehrsunfall oder auch nur eine falsche Bewegung im Alltag kann einen Meniskusriss zur Folge haben. Eine solche Verletzung ist nicht nur schmerzhaft, sondern erhöht das Risiko einer Arthroseentwicklung im Kniegelenk deutlich. Um einem Fortschreiten der arthrotischen Veränderungen nach Meniskusläsionen vorzubeugen, sind operative Verfahren zur Wiederherstellung der Funktion erforderlich. Diese gestalten sich jedoch äußerst schwierig. Meniskusnahten oder Teilresektionen versprechen kein zufriedenstellendes Langzeitergebnis. Die großen Herausforderungen an die Operateure kann man gut nachvollziehen, wenn man sich die komplexe Anatomie der menschlichen Menisken, ihre Fixierung im Gelenk und ihre Funktionsprinzipien vor Augen führt.

Die halbmondförmigen Menisken sind im Querschnitt keilförmig konfiguriert mit einer konkaven Oberfläche und einer geraden, dem Tibiaplateau aufliegenden Unterfläche. Diese Konfiguration vergrößert die Kongruenz zwischen den stark gekrümmten Femurkondylen und dem Tibiaplateau. Axiale Kompressionskräfte, die von den Femurkondylen übertragen werden, treiben die Menisken radiär auseinander. Die zirkumferenzielle Anordnung von Typ-1-Kollagenfasern ermöglicht die Umwandlung dieser Kompressionskräfte in Zugspannung, was neben der Form der Menisken zu einer deutlich verbesserten Druckverteilung am Tibiaplateau führt. Daher beeinträchtigen Meniskusrisse, die zur Zerstörung dieser zirkumferenziell angeordneten Kollagenfasern führen, die Funktion der Menisken erheblich und haben eine entsprechend schlechte Prognose. Neben der Druckverteilung verbessern die Menisken auch die Rotationsstabilität des Kniegelenks und tragen zur anteroposterioren Stabilisierung vor allem in endgradiger Flexions- und Extensionsstellung des Gelenks bei. Dies erfordert eine gewisse Mobilität der Menisken mit Verlagerung in Abhängigkeit von der Gelenkstellung, die dadurch gegeben ist, dass die Menisken nahezu unfixiert dem Tibiaplateau aufliegen und nur durch wenige, wichtige Bandzüge mit der Gelenkkapsel und dem Tibiaplateau verbunden sind. Wesentlich für die Stabilisierung der Menisken im Gelenk sind die anterioren und posterioren Meniskuswurzeln, die sowohl den Innen- als auch Außenmeniskus im Interkondylarraum über straffe Bindegewebszüge am Tibiaplateau

fixieren.<sup>41</sup> Insgesamt ist der Innenmeniskus weniger beweglich als der Außenmeniskus, da seine Verankerungen im Knochen weiter entfernt liegen und er zusätzlich mit dem Ligamentum collaterale mediale fest verbunden ist. Der Außenmeniskus hingegen hat keine Verbindung mit dem lateralen Kollateralband.<sup>31</sup>

Die Arthroseentwicklung nach Meniskuläsionen ist Ausdruck einer Reduktion der tibiofemorale Kontaktfläche und folglich Erhöhung der Spitzenkontaktdrücke im betroffenen Kompartiment. Auch nach Teilmenisektomien treten erhöhte Spitzenkontaktdrücke und die damit verbundenen Folgen auf. Eine suffiziente meniskuserhaltende oder -ersetzende Therapie ist deshalb notwendig, doch aufgrund der beschriebenen komplexen Meniskus-anatomie und -biomechanik sowie des eingeschränkten Heilungs- und Regenerationspotenzials gestaltet sie sich oft schwierig.<sup>18</sup> Somit ist die Meniskusteilresektion nach wie vor eine der häufigsten Knieoperationen. Die einzige Möglichkeit, den damit verbundenen arthrosefördernden Prozess aufzuhalten, besteht im Ersatz des fehlenden Meniskus durch ein hochwertiges Gewebe mit vergleichbaren biomechanischen Eigenschaften.<sup>20</sup>

Klinisch angewendet werden derzeit zwei unterschiedliche Implantate. Das sogenannte Actifit® besteht aus einem porösen Polyurethangerüst. Dieses dient als strukturelles Gerüst, meist Scaffold genannt. Es ermöglicht die Einwanderung von Zellen aus dem vaskularisierten Teil des Meniskus und infolgedessen die Bildung einer extrazellulären Matrix. In den Poren des Biomaterials bildet sich ein meniskusähnliches Gewebe. Im Verlauf kommt es zur Bioabsorption des Implantats.

In einer Studie wurden 52 Patienten mit irreparablen Meniskusdefekten innerhalb eines Zeitraumes von zwei Jahren nach Implantation dieses Scaffolds klinisch und MR-tomographisch nachuntersucht. Bei den Patienten kam es zu signifikanten Verbesserungen des klinischen Outcome-Scores. Bei 92,5% der Patienten zeigte sich gemäß der ICRS-Klassifikation eine Konstanz oder sogar Verbesserung der anfänglichen Knorpelsituation. Nichtsdestotrotz kann aufgrund der Kürze des beobachteten Zeitraumes noch keine langfristige Prognose abgegeben werden.<sup>40</sup>

Außerdem befindet sich das Menaflex®-Implantat (früher Collagen Meniscus Implantat®) in klinischer Anwendung. Es handelt sich hierbei um ein Gerüst aus Kollagenfasern, das aus der Achillessehne von Rindern hergestellt wird. Erstmals wurde dieser Meniskusersatz von Steadman und Rodeky 1997 implantiert. Ziel dieses Implantats ist es wiederum, durch die Besiedlung des Scaffolds durch einwandernde Zellen, welche einer chondrozytären Differenzierung entsprechen oder im Besitz eines entsprechenden Differenzierungspotentials

sind, eine Regeneration von meniskusähnlichem Gewebe zu ermöglichen.<sup>43</sup> Die umfangreichsten klinischen Daten kamen 2008 von Rodkey et al. , in deren randomisierter prospektiver Multicenterstudie die Kollagenmeniskusimplantation und die alleinige Meniskusteilresektion verglichen wurden: Bei chronisch teilmeniskektomierten Patienten wurde durch eine CMI-Implantation eine signifikante Verbesserung der klinischen Scores erzielt, sofern man sie mit Patienten vergleicht, die einer alleinigen Meniskusteilresektion unterzogen wurden. Eine sofortige CMI-Implantation bei akuter Meniskusteilresektion brachte dagegen keinen signifikanten Benefit.<sup>28</sup> In einer Second-look-Arthroskopie über fünf Jahre nach der Operation konnte bei Patienten mit Kollagenmeniskusimplantat keine Zunahme der Knorpeldegeneration festgestellt und eine Defektfüllung von 69% erreicht werden.<sup>39</sup> Trotz vielversprechender Ergebnisse aus Nachuntersuchungen über den Einsatz von Meniskusimplantaten stehen bis heute Langzeitergebnisse zum Nachweis des chondroprotektiven Effektes aus.

Das Problem des Meniskusersatzes mit Scaffolds ist die unkontrollierte Besiedlung der Prothesen unter In-vivo-Bedingungen. Nach dem Einsetzen wandern zuerst reparatorische Entzündungszellen in die Implantate ein. Diese Zellen bilden statt des meniskustypischen Faserknorpels nur ein biomechanisch insuffizientes Narbengewebe. Damit wird das Hauptziel, die Wiederherstellung oder Verbesserung der biomechanischen Meniskusfunktion, verfehlt.<sup>24</sup>

Die Zukunft in der Entwicklung suffizienter Meniskusersatzimplantate mag dem Tissue Engineering gehören. Dabei wird versucht, mit den Komponenten Zelle, Scaffold und modulierenden Faktoren wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren ein Konstrukt zu erzeugen, das den Eigenschaften von Meniskusgewebe möglichst ähnlich ist, um es dann in ein Defektareal einzupflanzen.

Die Forschung des Tissue Engineering zielt also auf eine Gewebezüchtung in vitro ab. Dabei werden die verwendeten Trägermatrices mit kompetenten Zellen besiedelt. Am Beispiel der MACT (Matrix-gestützte Chondrozyten-Transplantation) werden in einem operativen Schritt Knorpelproben an einem mechanisch weniger belasteten Areal des Gelenkes entnommen. Die dadurch gewonnenen autologen Chondrozyten werden in eine Trägermatrix eingebettet. Dann wird die Chondrozyten-besiedelte Trägermatrix – gegebenenfalls nach kurzzeitiger Kultivierung in vitro – in das Defektareal eingebracht. Die Gewinnung der Zellen erfolgt in einem vorausgehenden operativen Eingriff. Allerdings gibt es auch Versuche, die Zellen noch in der gleichen operativen Sitzung in die Trägermatrix einzubetten und diese unmittelbar danach in das Defektareal einzupflanzen versuchen. Durch die Stabilisierung von Zellen im

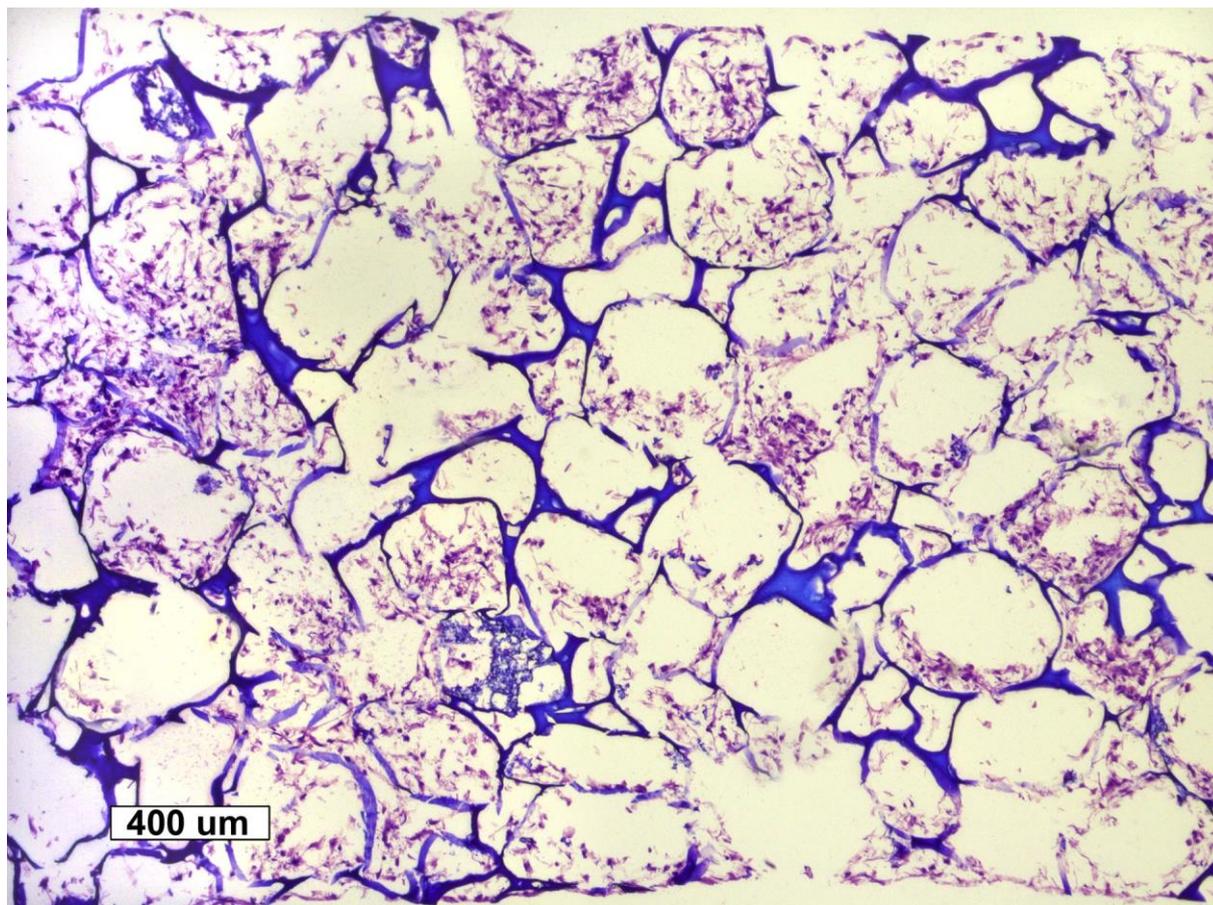
Biomaterial sollen im Vergleich zu den bisher klinisch angewandten azellulären Scaffolds ein besseres Meniskusregenerat geschaffen und folglich bessere klinische Erfolge erzielt werden. Bisher brachten Versuche mit Benetzung und ggf. Konditionierung der Scaffolds mit mesenchymalen Stammzellen<sup>3 42 45</sup>, autologen Meniskuszellen<sup>6 16 19</sup> oder Fibrochondrozyten<sup>24</sup> in Tier- oder In-vitro-Versuchen gute Ergebnisse. Außerdem befinden sich Stammzellen, die aus dem Fettgewebe<sup>27</sup> oder peripheren Blut<sup>14</sup> gewonnen werden können, in wissenschaftlicher Erprobung.

## 1.2 Die Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix als biologisches Ersatzmaterial

In der Abteilung für Unfallchirurgie der Universität Regensburg kam eine nach einem patentiertem Herstellungsverfahren hergestellte Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix als Scaffold in Tierversuchen zum Einsatz. An New Zealand White Rabbits wurden Kompletresektionen des Pars Intermedia der medialen Menisken durchgeführt. Die Defekte wurden entweder unbehandelt gelassen oder mit einer Implantation der Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix behandelt, wobei bei letzterer Methode sowohl zellfreie Matrices als auch solche Matrices zum Einsatz kamen, welche mit autologen dem Knochenmark entnommenen Mesenchymalen Stammzellen in vitro besiedelt und in einem chondrogenem Medium für 14 Tage kultiviert wurden.

In histologischen Untersuchungen zeigte sich, dass sich anstelle der eingesetzten zellfreien Matrices ein Regeneratgewebe bildete, das überwiegend fibröser Art war. Anstelle der vorkultivierten Matrices präsentierte sich ein fibrocartilaginäres meniskusähnliches Gewebe. In der Immunhistochemie wurde Kollagen Typ II nachgewiesen.<sup>3</sup>

Bei Betrachtung der histologischen Bilder fiel eine inhomogene Verteilung der Zellen auf. Die Zellen adhärten ungleichmäßig an den Rändern der Poren, wobei sich die Mitte der einzelnen Poren überwiegend zellfrei darstellte. Insgesamt zeigte sich eine unzureichende Adhäsion der Zellen, so dass folglich unter der im weiteren Verlauf erfolgten Arbeitsbelastung ein teilweiser Verlust der Zellen verzeichnet werden musste.



**Abb. 1:**

Histologische Betrachtung der Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix mit mesenchymalen Stammzellen

Als weiteres Problem stellte sich wie auch bei anderen Scaffolds die Tatsache dar, dass die biomechanische Stabilität der Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix nicht zufriedenstellend war. Eine zusätzliche Stabilisierung könnte erreicht werden, indem die Zellen zusammen mit einem weiteren Medium in die Scaffolds eingesiedelt werden, welches dann durch weitere Maßnahmen an eigener Stabilität gewinnt, so dass bei dem dadurch entstandenem Gesamtkonstrukt, also beim Matrixgerüst zusammen mit den Zellen und dem bestimmten Medium, eine Optimierung der Stabilität ermöglicht wird. Das zusätzliche Medium muss außerdem biokompatibel sein und idealerweise eine chondrokonduktive Eigenschaft besitzen.

Hierbei richtet sich das Interesse insbesondere auf das Kollagen, das ohnehin seit Jahren im Tissue Engineering eingesetzt wird. Insbesondere die oben beschriebene Kombination aus hydrolysiertem Kollagen, also Gelatine, mit Hyaluronsäure wurde vielfach für Untersuchungen eingesetzt, wobei die daraus entstehende Matrix unter anderem auf den Einfluss auf die osteochondrale Differenzierung mesenchymaler Stammzellen geprüft wurde. Es stellte sich heraus, dass Kollagen einen Einfluss auf die Wachstumseigenschaften der

Zellen hat und auch verschiedene weitere Aspekte der Zelleigenschaften beeinflusst, wie zum Beispiel die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung<sup>9 17 21 25 26 32 35 36 37 38</sup>.

Somit erscheint eine kollagenhaltige Matrix im Rahmen des Tissue Engineering sehr nützlich für zellbasierte Versuche mit mesenchymalen Stammzellen, insbesondere auch hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung<sup>4</sup>. Hydrolysiertes Kollagen können wir in flüssiger Form zusammen mit den Zellen in die Poren der Matrix einbringen. Wir sind dabei bereits im Vorfeld hinsichtlich der Biokompatibilität und Chondrokonduktivität dieses Mediums optimistisch und erhoffen uns zusätzlich eine weitere Stabilisierung der Matrix. Um dies zu gewährleisten, soll eine biologische Quervernetzung der Gelatine erfolgen. Auf jeden Fall muss eine Auflösung der zunächst flüssigen Gelatine verhindert werden. Für diesen Einsatz kommt das Enzym Transglutaminase ins Spiel.

### 1.3 Gelatine: Herstellung, Struktur und physikalische Eigenschaften

Grundsubstanz für die Herstellung von Gelatine ist Kollagen, welches aus der Haut, dem Bindegewebe und den Knochen von Tieren durch chemische und physikalische Vorbehandlung gewonnen wird. Grundbausteine des Kollagens sind 18 verschiedene Aminosäuren, die eine Polypeptidkette bilden und sich zu einer Tripel-Helix zusammenlagern. Durch Zusammenlagerung vieler Tripelhelices entstehen Kollagenfibrillen, die durch Quervernetzungen stabilisiert werden und ein dreidimensionales Netzwerk bilden. In Abhängigkeit von der Länge der tripelhelikalen Abschnitte, kurzen Unterbrechungen in der Tripelhelix und dem zusätzlichen Vorhandensein von globulären Domänen werden verschiedene Kollagentypen unterschieden. Das für die Gelatineherstellung bedeutendste Kollagen ist das Typ-I-Kollagen. Es kommt vor allem in Haut und Knochen vor. Kollagen-Typ-II tritt fast ausschließlich in Knorpelgeweben auf. In der Proteinkette des Kollagens findet sich die spezifische Aminosäureabfolge: Glycin – X – Y, wobei an der X-Position häufig ein Prolin und an der Y-Position meist ein Hydroxyprolin auftritt. Ferner tritt an der Y-Position Hydroxylysin auf. An Lysin- und Hydroxylysinresten wird das Kollagen quervernetzt und so wasserunlöslich gemacht. Die Hydroxylgruppen der Hydroxyproline können Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den benachbarten Polypeptidketten ausbilden, so dass die Tripelhelix bei physiologischen Temperaturen stabil ist.<sup>5 22</sup>

Bei der Gelatineherstellung werden im Rahmen der Vorbehandlung Fett und anorganische Bestandteile vom Ausgangsmaterial grob entfernt und das Material zerkleinert. Abhängig vom Ausgangsmaterial wird eine von zwei Behandlungsmethoden gewählt:

- (A) Säurebehandlung: Das Material mit weniger quervernetztem Kollagen (z. B. aus Schweineschwarte) wird einen Tag lang mit Schwefel- oder Salzsäure behandelt und dann neutralisiert. Nach intensiver Auswaschung der Salze wird das Kollagen extrahiert.
- (B) Basische Behandlung: Das Material mit stark quervernetztem Kollagen (z. B. aus Rind) wird für einen Zeitraum von einigen Wochen bis mehrere Monate unter Bildung von Ammoniak mit Kalkmilch behandelt.

Das vorbehandelte Material ist nun in warmem Wasser löslich (Bouillon) und wird über bis zu 5 Stufen mit steigender Temperatur extrahiert. Die Temperatur ist für die Gelierungsstärke (Bloomwert) bestimmend: Je niedriger sie ist, desto höher ist die Gelierungsstärke. Die zuletzt mit höchster Temperatur gewonnenen Extraktionsfraktionen ergeben die minderwertigsten Gelierungsstärken. Zuletzt werden verbliebene Fett-, Faser- und Salzreste entfernt. Die Gelatine wird auf einen Wassergehalt von 10-15% getrocknet.<sup>10</sup>

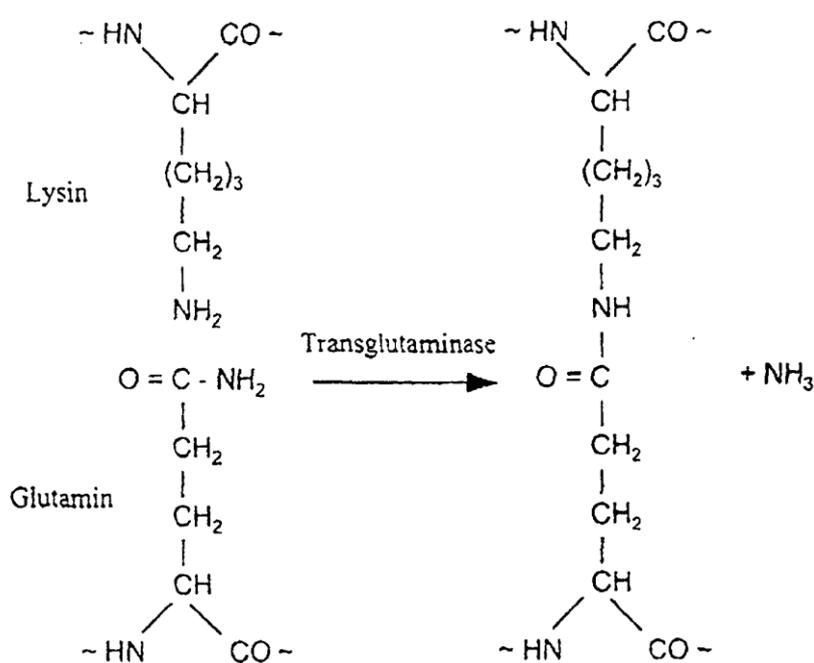
Gelatine besitzt die Fähigkeit zu einem temperaturabhängigen reversiblen Gel-Sol-Übergang. Dabei gibt der Erstarrungspunkt (EP) an, bei welcher Temperatur eine 10%ige wässrige Gelatinelösung geliert. Er wird über den exakter zu ermittelnden Schmelzpunkt errechnet. Bei 10%iger Gelatinegallerte liegt der Schmelzpunkt um genau 5°C höher als der EP. Der Schmelzpunkt für 10%ige Gelatinegallerten liegt je nach Bloomwert zwischen 21°C und 34°C.<sup>13</sup>

Folglich präsentiert sich Gelatine bei physiologischen Temperaturen im Gegensatz zu Kollagen als flüssiges Medium. Aufgrund dessen ist eine zusätzliche Maßnahme erforderlich, um Gelatine als Bestandteil einer extrazellulären Matrix nutzen zu können. Durch Zugabe des Enzyms Transglutaminase können auf biologische Weise kovalente Verbindungen zwischen den Molekülen gebildet werden. Die entstandenen Quervernetzungen ermöglichen, dass Gelatine wasserunlöslich wird und temperaturunabhängig eine feste gelartige Struktur annimmt.

## 1.4 Biologische Quervernetzung von Gelatine durch die Transglutaminase

Transglutaminasen gehören zur Enzymklasse der Transferasen und die Bezeichnung nach der Enzymnomenklatur lautet Protein-Glutamine  $\gamma$ -Glutamyltransferase (EC 2.3.2.13).

Es handelt sich um eine weit verbreitete Gruppe von Enzymen, die die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen einer freien Aminogruppe und der  $\gamma$ -Carboxylgruppe eines an ein Protein oder Peptid gebundenes Glutamin katalysieren. Als freie Aminogruppe dient zum Beispiel die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Aminosäure Lysin. Durch das Enzym quervernetzte Produkte sind sehr resistent gegenüber mechanischen und proteolytischen Einflüssen.<sup>11</sup>



**Abb. 2:** Durch die Transglutaminase katalysierte Bildung einer Isopeptidbindung zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Glutamin und Lysin.<sup>15</sup>

Transglutaminasen kommen in allen Eukaryoten vor. Beim Menschen sind acht solcher Enzyme bekannt. Neben der Verfestigung von Strukturproteinen spielt das Enzym auch in der Blutgerinnung eine wichtige Rolle. Der sogenannte Faktor XIII ist verantwortlich für die Stabilisierung von Fibrin.<sup>30</sup> Er unterscheidet sich von den anderen Transglutaminasen dadurch, dass er durch eine thrombin-abhängige Proteolyse in seine aktive Form, den Faktor XIIIa konvertiert wird. Gerinnungsstörungen können Folge eines Mangels oder einer Dysfunktion des Faktor XIII sein. Die Transglutaminase kann an einer Reihe weiterer Erkrankungen beteiligt sein, darunter neurodegenerative, neoplastische und Autoimmunerkrankungen wie die Zöliakie. Ebenso ist das Enzym mit bestimmten Hauterkrankungen und Gewebsfibrosen assoziiert.<sup>12</sup>

Humane Transglutaminasen (Ca <sup>++</sup> -abhängig)	Vorkommen/Funktion
Faktor XIII	Blutgerinnung, Wundheilung
Transglutaminase 1 (Transglutaminase K)	Bildung einer Zellohülle im Rahmen der Differenzierung der Keratinozyten
Transglutaminase 2 (Tissue Transglutaminase)	Ubiquitär; Zelldifferenzierung, Matrixstabilisierung; Zöliakie als Autoimmunerkrankung
Transglutaminase 3 (Transglutaminase E)	Bildung einer Zellohülle der terminal differenzierten Keratinozyten
Transglutaminase 4 (Prostata-Transglutaminase)	Koagulation der Samenflüssigkeit
Transglutaminase 5 (Transglutaminase X)	Epidermale Differenzierung
Transglutaminase 6 (Transglutaminase Y)	Assoziation mit der Neurogenese
Transglutaminase 7 (Transglutaminase Z)	Vorkommen in Hoden und Lunge

**Tab. 1: Humane Transglutaminasen**

Den Transglutaminasen eukaryoter Herkunft ist gemeinsam, dass sie ihre Aktivität nur in Anwesenheit von Calcium entfalten können. Daneben sind Transglutaminasen bakterieller Herkunft bekannt, die in ihrer Funktion calciumunabhängig sind. Deren strukturelle Gemeinsamkeit mit anderen Transglutaminasen beschränkt sich auf die katalytische Triade im aktiven Zentrum, die aus den Aminosäuren Cystein, Histidin und Aspartat besteht. Neben einer intrazellulären Transglutaminase von *Bacillus subtilis*, die an der Bildung der äußeren Sporenhülle beteiligt sein soll, wurden bisher nur bakterielle Transglutaminasen von Streptococcen isoliert und charakterisiert, u.a. von *Streptococcus mobaraense*.<sup>46</sup>

Um Stämme zu konstruieren, die dieses Enzym überproduzieren, wurden DNA-Rekombinationstechniken eingesetzt. Das *Streptococcus mobaraense*-Transglutaminase-Gen wurde bereits zur Expression in *Escherichia coli*, *Streptomyces lividans* und *Saccharomyces cerevisiae* kloniert.<sup>7</sup>

Aufgrund der Calciumunabhängigkeit sowie der relativ einfachen Isolierung aus dem Kulturmedium haben bakterielle Transglutaminasen eine große biotechnologische Bedeutung. Das Enzym findet Anwendung im Ernährungsbereich bei der Bildung von Formfleisch oder Konsistenzverbesserung von Joghurt oder Käse. Außerdem kommt das Enzym in der Bioanalytik, in der Immundiagnostik und in der Medizin zum Einsatz, wie bei der Herstellung von Hapten-Protein-Konjugaten oder Polyethylenglykol-Pharmaka-Konjugaten.<sup>46</sup>

Bei Anwendung der Transglutaminase im Bereich des Tissue Engineering erhoffen wir uns außerdem eine gute Bioverträglichkeit. Alternative Methoden zur Quervernetzung von Kollagenen bestehen in chemischen Substanzen, wie zum Beispiel Glutaraldehyd, die jedoch bekannterweise eine toxische Wirkung auf die Zellen besitzen.<sup>8</sup>

## 1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zusammenfassend kann man sagen, dass zur Erzeugung eines meniskusähnlichen Regeneratgewebes in vivo die Prinzipien des Tissue Engineering eine entscheidende Rolle spielen. Bereits in der unfallchirurgischen Abteilung der Universitätsklinik erbrachte die Defektversorgung durch eine Gelatine-Hyaluronsäure-Matrix, die mit Mesenchymalen Stammzellen und Differenzierungsfaktoren beimpft wurde, positive Ergebnisse in Anwendung bei Tierversuchen. Das implantierte Scaffold wurde im Laufe der Zeit resorbiert, während sich gleichzeitig ein knorpelartiges Gewebe an gleicher Stelle ausbildete. Außerdem zeigte sich ein gutes Einwachsverhalten mit dem benachbarten Meniskusgewebe. Somit konnten auf diese Weise deutliche Fortschritte erzielt werden, die vor allem bei Läsionen im avaskulären Bereich des Meniskus im Hinblick auf langfristig erfolgreiche klinische und chondroprotektive Ergebnisse vielversprechend sind.

Die durchgeführten Versuche zeigten jedoch auch, dass das eingesetzte Zell-Scaffold-System in einigen Punkten verbessert werden sollte.

Insbesondere sollte die mechanische Stabilität der Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrices verbessert werden.

Zweitens sollte durch weitere Maßnahmen eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen in den Poren der Matrices erreicht werden.

Als dritter Punkt ist zu nennen, dass hinsichtlich der Retention der Zellen, also des langfristigen Verbleibs der Zellen in den Scaffolds nach Beimpfung, ein weiterer Optimierungsbedarf wünschenswert ist.

Durch Einbringung einer zell- und transglutaminasehaltigen flüssigen Gelatinelösung in die Poren der Matrix und biologische Quervernetzung sollte eine Verbesserung hinsichtlich der oben genannten Punkte möglich sein.

Hauptaufgabe meiner Arbeit war, zu prüfen, in wie weit eine Verbesserung bezüglich dieser Ansatzpunkte möglich ist. Als wichtigsten Punkt beschäftigte ich mich mit der mechanischen Stabilität der Matrices. Diese galt es, durch Einbringung flüssiger Gelatine und unmittelbar erfolgreicher Quervernetzung durch die Transglutaminase zu verbessern. Die mit diesen Maßnahmen zusätzlich erhofften Optimierungsmöglichkeiten hinsichtlich einer verbesserten Retention und gleichmäßigeren Verteilung der Zellen sollten mit histologischen Bildern verdeutlicht werden.

Im Vorfeld entwickelten wir Messmethoden, um die enzymatische Aktivität der verwendeten Transglutaminase bestimmen zu können. Da verschiedene Transglutaminase-Klassen

untersucht werden sollten, mussten wir diese durch enzymatische Messmethoden miteinander vergleichen, bevor wir diese in untereinander vergleichbaren Dosen in Verbindung mit der Gelatine einsetzten. Außerdem konnten äußere Einflussfaktoren, wie zum Beispiel Kälte, auf die Auswirkung auf die enzymatische Aktivität der Transglutaminase unabhängig von der Gelatine untersucht werden.

Um die mechanische Stabilität einer Matrix bestimmen zu können, wurden physikalische Parameter herangezogen, um die mechanischen Eigenschaften eines Produktes beschreiben zu können. Für diesen Zweck wurden eigene Messverfahren entwickelt. Als Proben wurde zunächst transglutaminase-freie Gelatine verwendet. Nach Optimierung der Messverfahren erfolgte dessen Anwendung auf quervernetzte Gelatine und schließlich auf die Matrices.

Für die Reaktion der Quervernetzung der Gelatine durch die Transglutaminase wurden verschiedene Inkubationsbedingungen getestet und jeweils auf die Auswirkungen auf die mechanische Stabilität überprüft. Dabei erfolgten Variationen hinsichtlich der Inkubationsdauer, den Konzentrationen an Gelatine und Transglutaminase sowie der Temperatur. Außerdem wurden verschiedene Transglutaminase-Klassen getestet.

Parallel dazu musste die Zellvitalität ebenfalls in Abhängigkeit von den jeweiligen Inkubationsbedingungen geprüft werden.

Somit geht es letztlich auch darum, sich für möglichst optimale Inkubationsbedingungen zu entscheiden, wobei es eine Vielzahl an zu prüfenden Variationsmöglichkeiten gibt und zugleich verschiedene Zielsetzungen beachtet werden müssen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	Sigma Aldrich, Steinheim
Biotin Pentylamin	Fisher Scientific, Schwerte
Blue Slick	SERVA Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
Casein from bovine milk	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Steinheim
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Fluorescamin-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Gelatine from porcine skin, Type A, 90-110 Bloom, cell-culture tested	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
HE-Färbung n. Mayer	Waldeck/Chroma Münster
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Maltodextrin	Ajinomoto, Hamburg
Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Mono-Dansylcadaverin	Sigma Aldrich, Steinheim
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Thiosulfat	Merck, Darmstadt
Nystatin-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Paraffin	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
PMSF	Sigma Aldrich, Steinheim
Resazurin	Sigma Aldrich, Steinheim

Salzsäure 37%, rauchend	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Streptavidin–Peroxidase from Streptomyces avidinii	Sigma Aldrich, Steinheim
Streptomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma Aldrich, Darmstadt
Trypan blue solution (0,4 %)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach
TWEEN	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	Merck, Darmstadt

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

### m-PBS-Puffer 1M:

47,2g Kaliumhydrogenphosphat K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O)

6,6 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat

36 g NaCl

Mit Aqua dest. Auf 500 ml auffüllen

pH 7,0 bis 7,4

### Trispuffer 0,2 M:

1000 ml Aqua dest.

24,225 g Tris

Mit HCl (37%) auf pH 7 einstellen

### Tris-Waschpuffer:

2220 ml Aqua dest.

780 ml 0,2 M Trispuffer

24,96 g NaCl

TWEEN-Waschpuffer:

0,05% TWEEN in PBS

### 2.1.3 Medien und Seren

DMEM (flüssig)	Gibco/invitrogen, Auckland, NZ
DMEM (Pulver, ohne L-Glutamine, L-Lysine, NaHCO <sub>3</sub> )	PAN Biotech, Aidenbach
Fetales bovines Serum	PAN Biotech, Aidenbach

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Kulturschalen 96, 48, 24 well	BD Falcon, Heidelberg
Neubauer Zählkammer	Blaubrand, Wertheim
Objektträger Starfrost adhäsiv	Knittel, Braunschweig
Pipetten Costar (5/10/15/50 ml)	Corning, Corning USA
Pipettensets (10/100/1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenfolien aus Prospekthüllen	Milan, InterEs GmbH & Co. KG, Nürnberg
Rasierklingen Persona	American Safety Razor Company, Verona, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (5/10/20 ml)	BD Falcon, Heidelberg
Sterilfilter (0,45 µl, 0,2 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Teflonformen (Innenmaße 6 x 10 mm)	Feinmechaniker-Werkstatt Universität Regensburg
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	BD Falcon, Heidelberg

### 2.1.5 Kits

#### Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit von Invitrogen Eugene, Oregon USA:

Ein Zwei-Farben-Fluoreszenz-Test mit Ethidium-Homodimer und Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM).

Das Ethidium-Homodimer (Stammlösung: 2 mM in DMSO/H<sub>2</sub>O 1:4) in einer PBS-Lösung auf 8 µM verdünnen. Dann Calcein-AM (Stammlösung: 4 mM in DMSO) ergänzen, so dass dieses auf eine Konzentration von 4 µM verdünnt wurde.

### 2.1.6 Geräte

Brutschrank Heracell 240	Heraeus, Hanau
Digitalkamera EX-Z4	Casio, JP
ELISA-Reader Genios	Tecan, AT
Färbekammer Coverplates	Thermo Shandon, Frankfurt a.M.
Glasküvetten	Roth, Karlsruhe
Heizplatte Monotherm	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Infusiomat	Firma Braun-Melsungen; Typ 871030
Kryostat HM 500 OM	Microm, Berlin
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Para-Formaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
PH Meter pH 315	WTW, Weilheim
Pipettierhilfe Falcon Express	BD Falcon, Heidelberg
Sicherheitswerkbank Herasafe HS18	Heraeus Hanau
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waagen	Analysewaage Kern 770
	Analysewaage Kern EW
	4200-2NM
	Analysewaage Kern
	PBS/PBJ 6200-2M

Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Combi-Spin FVL 2400	Kisker, Steinfurt
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau

### 2.1.7 Biomaterialien

Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix:

Herstellung nach eigenem patentiertem Verfahren (Europäisches Patent Nr.: EP1135177B1),  
Mischungsverhältnis 7:3, Porengröße 350 – 450  $\mu\text{m}^4$

### 2.1.8 Gelatine

Gelatine from porcine skin, Type A, 90-110 Bloom, cell-culture tested (Sigma Aldrich, Steinheim)

### 2.1.9 Transglutaminasen

Transglutaminase ACTIVA WM (Ajinomoto, Hamburg)

Meerschweinchentransglutaminase (Guinea Pig Liver) (Sigma Aldrich, Steinheim; T 5398)

Bakterielle rekombinante Transglutaminase (Zedira; T001)

Humane Gewebstransglutaminase (Zedira; T022)

Faktor XIII (Fibrogammin®) (CSL Behring, Marburg)

### 2.1.10 Sterilisation durch Gamma-Strahlen

Für einen Versuchsteil (Kap. 3.2.5) wurde die Gelatine der Firma Beta-Gamma-Service in Saal a.d. Donau zur Sterilisation mit Gamma-Strahlen überlassen. Die Strahlendosis lag bei 25 kGy. Bei den übrigen Versuchen erfolgte die Sterilisation durch Sterilfiltration.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Prüfung der mechanischen Stabilität

Unsere Messeinrichtung zur Prüfung der mechanischen Stabilität von quervernetzter Gelatine bestand aus einem Infusiomat (Firma Braun-Melsungen; Typ 871030) und einer Waage (Kern PBS 6200-2M). Der Infusiomat bewegte einen Stempel mit einer einstellbaren Geschwindigkeit auf die zu untersuchende Probe zu oder von dieser weg, wodurch einerseits eine Kompression, andererseits eine Zugbelastung erfolgen konnte. Neben quervernetzter Gelatine ohne sonstige Bestandteile wurden hierbei auch dreidimensionale Komposit-Matrices untersucht, deren Poren mit Gelatine und Transglutaminase gefüllt wurden. Der Stempel konnte nach Form und Größe variiert werden. Quervernetzte Gelatine wurde zum Teil in 96-Well-Platten, zum Teil als freistehende Proben komprimiert. Die Proben befanden sich auf der Waage. Die im Verlauf der Kompression bzw. Zugbelastung einwirkende Kraft wurde von der Waage gemessen. Pro Sekunde wurden 8,3 Datensätze auf einen Rechner übertragen und für die weitere Auswertung herangezogen.

Streng genommen würde man bei senkrecht auf die Oberflächen eines Körpers einwirkenden Kräften von einer „Stauchung“ sprechen, während sich eine Kompression auf eine allseitige Krafteinwirkung, zum Beispiel bei hydrostatischem Druck in einer Flüssigkeit, bezieht.

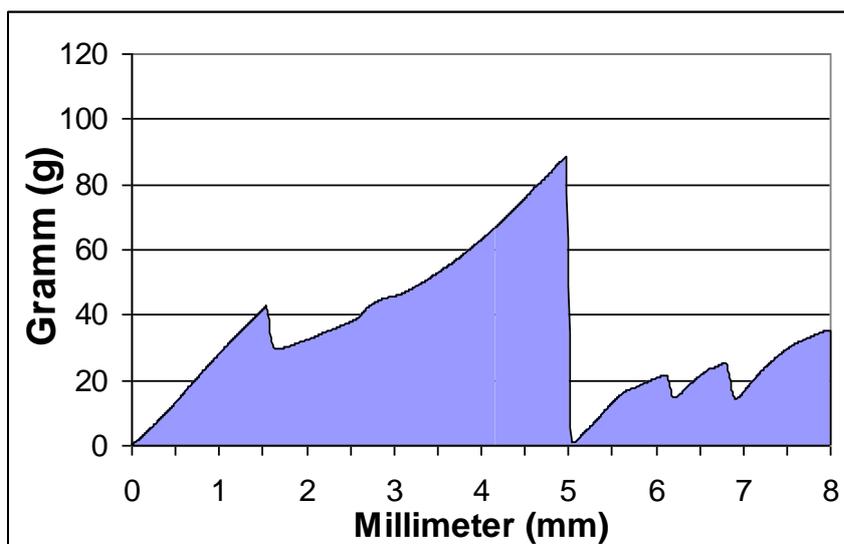
Der Einfachheit wegen verwendeten wir jedoch sowohl bei den Versuchen mit den freistehenden Proben als auch denen mit den 96-Well-Platten, bei denen auch Krafteinflüsse durch die die Proben umgebenden Wände eine Rolle spielen, den Begriff „Kompression“.

### 2.2.1.1 Kompression der Proben in 96-well-plates

Für die Kompression von Gelatineproben in 96-well-plates entschieden wir uns für die Verwendung des Stempels mit der Bezeichnung „4 mm-platt-gestielt“ bei einer Kompressionsgeschwindigkeit von 2 mm/min. Im Kapitel 3.1.1 wird die Anwendung der genannten Messmethoden begründet.

Die reguläre Kompression erfolgte bis zu einer Tiefe von 8 mm. Folglich dauert ein Messvorgang vier Minuten. Ein Messwert stellt die auf das Gel ausgeübte Kraft zum aktuellen Zeitpunkt dar, wobei die Einheit „Gramm“ verwendet wird. „Gramm“ ist eine physikalische Maßeinheit für die Masse. Die Maßeinheit für die Kraft ist „Newton“. Der Umrechnungsfaktor beträgt bei einer mittleren Erdbeschleunigung auf Meereshöhe 0,00981. 1 Gramm entspricht somit 0,00981 Newton. Auf eine Umrechnung wurde bei unseren Methoden verzichtet und die Masseinheit „Gramm“ belassen. Da die Masse mit der Einheit „Gramm“ (g) in einem proportionalen Verhältnis zur Kraft mit der Einheit „Newton“ (N) steht und das Produkt aus Kraft und Weg den Wert der „Arbeit“ mit der Einheit „Joule“ wiedergibt, entspricht das Produkt aus Masse und Weg einem Wert, welcher in einem proportionalen Verhältnis zur Arbeit steht. Wir bezeichneten diesen Wert als „Work“ und verwandten die Einheit „g\*mm“. Unsere hierfür entsprechende Formel lautet somit: „Work“ = Masse x Weg.

Anhand eines Kompressionsvorganges wird ein Masse-Weg-Diagramm aufgezeichnet. Die errechnete Fläche unterhalb der Diagrammlinie entspricht dem Wert von „Work“.



**Abb. 3:**  
Bestimmung von „Work“ anhand der Fläche im Masse-Weg-Diagramm.

Gel 3%, TG 1%; Inkubation für 4h bei 4°C, Messung bei 37°C.

Der Wert für „Work“ liegt bei diesem Beispiel bei 276 g\*mm

### 2.2.1.2 Herstellung und Kompression von freistehenden Proben

Für die Erstellung freier zylinderförmiger Gelatinekörper wurden Teflonformen verwendet, die eine Grundfläche von 10 mm und eine Höhe von 6 mm enthalten. Die Formen wurden mit der Gelatine-Transglutaminase-Lösung randvoll gefüllt und für eine bestimmte Zeit in den Kühlschrank gegeben. Als Grund- und Deckplatte diente eine hydrophobe Folie. Nach Ende der Inkubationszeit im Kühlschrank wurden die gelierten Proben durch vorsichtiges Umfahren mit einer Nadel aus der Teflonform befreit und einzeln in die Wells einer 24er-Wellplatte verteilt. Unter Zugabe von Transglutaminase-Medium in die Wells wurden die Proben freischwimmend bei 37°C über Nacht weiterinkubiert.

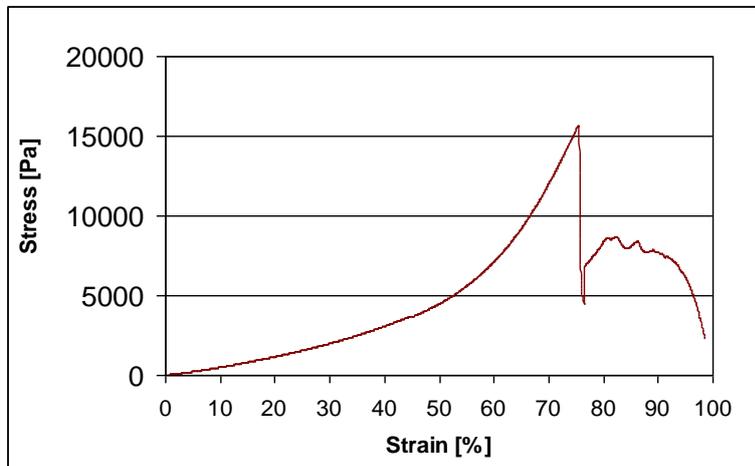
Nach Inkubationsende wurden die Proben mit einer Schieblehre vermessen und somit die aktuelle Höhe sowie der Durchmesser jeder einzelnen Probe unmittelbar vor dem Messvorgang bestimmt.

Zur Messung wurden die Proben einzeln auf die Waage gesetzt und mit einem flachen Stempel mit der Geschwindigkeit 2 mm/min komprimiert. Im Verlauf der Kompression ist zunächst ein stetiger Anstieg der angezeigten Masse, entsprechend der wirkenden Kraft, zu erkennen. Für die Bestimmung des sogenannten E-Modul wurde für alle Messungen ein Bereich ausgewählt, der bei einer relativen Kompression zwischen 2,0% und 6,0% liegt. Dieser Bereich beginnt also, nachdem die Probe auf 98% der Ausgangslänge durch Kompression verkürzt wurde und endet, wenn die Probe eine Länge entsprechend 94% der Ausgangslänge erreicht hat. In diesem Bereich sahen wir für die Proben einen geradlinigen Kurvenverlauf im Spannungs-Dehnungs-Diagramm und damit eine Proportionalität zwischen der Spannung und der Längenänderung der Probe. Dieser Bereich wird auch als Hooke-Bereich bezeichnet. Die relative Änderung der Probenlänge bezeichnen wir auch als Strain.

Der E-Modul entspricht dem Quotienten aus der Spannung und der relativen Längenänderung, also dem Strain.

Die Spannung, auch als Stress bezeichnet, entspricht der Kraft, die pro Flächeneinheit wirksam ist, enthält also die Einheit Newton pro Quadratmeter, oder Pascal. Für die Berechnung der Spannung wurden die von der Waage in der Einheit Gramm angezeigten Werte für die Masse in die Einheit der Kraft, also Newton, umgerechnet. Da es bei der Kompression von freistehenden Gelkörpern zu einer Verformung und damit zu einer Vergrößerung der Querschnittsfläche kommt, musste mit Hilfe von Excel für jeden einzelnen Messpunkt eine Flächenkorrektur durchgeführt werden, um den korrekten Wert für die Spannung zu ermitteln.

Der E-Modul kann auch als Steigung im Stress/Strain-Diagramm angesehen werden. Wie gesagt legten wir uns für die E-Modul-Bestimmung auf den Bereich zwischen 2,0 und 6,0% des Strains fest.



**Abb. 4:**

Kompression einer freien Gelatineprobe

Gel3%, TG1%, Inkubation für 6 Stunden im Kühlschrank in der Teflonform (10 mm x 6 mm) und für weitere 16 Stunden freischwimmend im glutaminfreien Medium bei 37°C

Neben dem E-Modul wurde auch die Bruchfestigkeit als Messparameter herangezogen, also der Wert der Spannung, bei dem es zu einem Bruch der Probe und damit zu einer Strukturzerstörung kommt. Im Diagramm entspricht dieser Wert dem ersten Peak der Diagrammkurve.

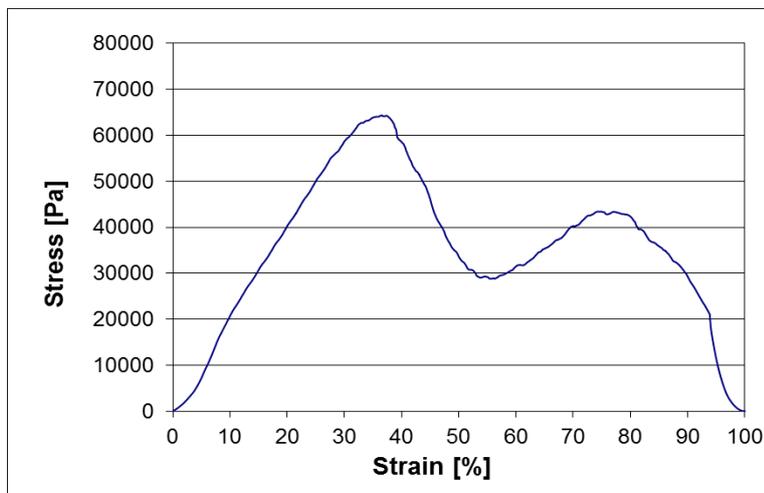
Weiterhin wurde die Bruchdehnung als weiterer Parameter bestimmt. Hiermit ist der relative Wert der Längenänderung (Strain) am Punkt des ersten Bruches der Probe gemeint.

Nicht nur von freistehenden quervernetzten Gelatineproben, sondern auch von Matrices führten wir Kompressionsmessungen durch. Die Matrixporen wurden hierfür unter Unterdruckbedingungen mit einer frisch angesetzten Lösung aus Gelatine und Transglutaminase befüllt. Die Lösung wurde in einen Behälter, in dem sich bereits mehrere Matrixproben befanden, gegeben und sofort für mehrere Minuten in eine Unterdruckkammer gesetzt. Ein schnelles Handeln war erforderlich, da bereits nach wenigen Minuten nach Mischen von Gelatine und Transglutaminase die enzymatische Reaktion und folglich Quervernetzung der Gelatine eintritt. Für Vergleichsproben wurden Lösungen, die nur Gelatine, nur Transglutaminase oder keines der beiden Komponenten, also reines Zellmedium, enthielten, verwendet. Die Proben wurden mit der Geschwindigkeit 1 mm/s komprimiert.

Bei den Kompressionen der Matrices bestimmten wir auf gleiche Weise den E-Modul wie bei den freistehenden quervernetzten Gelatineproben, sofern die Matrices mit Gelatine gefüllt waren. Hierbei wählten wir, anders als bei den quervernetzten Gelatineproben, den Bereich 15 bis 20% des Strains zur Berechnung des E-Moduls aus. Die Maße der Matrixzylinder waren ca. 6,6 mm in der Höhe und ca. 5,5 mm im Durchmesser, wobei vor jeder mechanischen Messung auch hier eine exakte Vermessung der Matrixgröße mittels einer Schieblehre erfolgte.

Matrices ohne Gelatinefüllung zeigten bei der Kompression eine vernachlässigbar geringe Änderung der Querschnittsfläche, weswegen hierfür keine Flächenkorrektur zur Berechnung der Spannung und letztlich des E-Moduls durchgeführt wurde.

Matrices ohne Gelatinefüllung zeigten außerdem die Besonderheit, dass bei Kompression kein Bruch zu erkennen war. Somit war eine Kompression bis zum Erreichen der maximalen Belastbarkeit der Waage möglich, wobei es nach Entfernung des Stempels zu einer nahezu vollständigen Wiederherstellung der ursprünglichen Form der Matrix kam. Somit ist bei diesen Proben eine Bestimmung der Bruchfestigkeit und Bruchdehnung nicht möglich.



**Abb. 5:**

Kompression einer mit quervernetzter Gelatine gefüllten Matrix

Gel3% und TG2% wurden in einer Unterdruckkammer in die Matrix eingebracht, anschließend für 6h bei 4°C und weitere 20h freischwimmend im glutaminfreien Medium bei 37°C inkubiert.

### 2.2.1.3 Zugbelastung der Proben

Im Rahmen der Messungen der mechanischen Stabilität wurden die Matrices auch Zugbelastungen ausgesetzt. Hierfür wurden die Matrixzylinder, die einer Größe wie derer der Kompressionsmessungen entsprachen, jeweils auf der Unter- und Oberseite mit einer Metallscheibe mittels Wachs beklebt. Nach dem Erstarren des Wachses wurden die Matrices

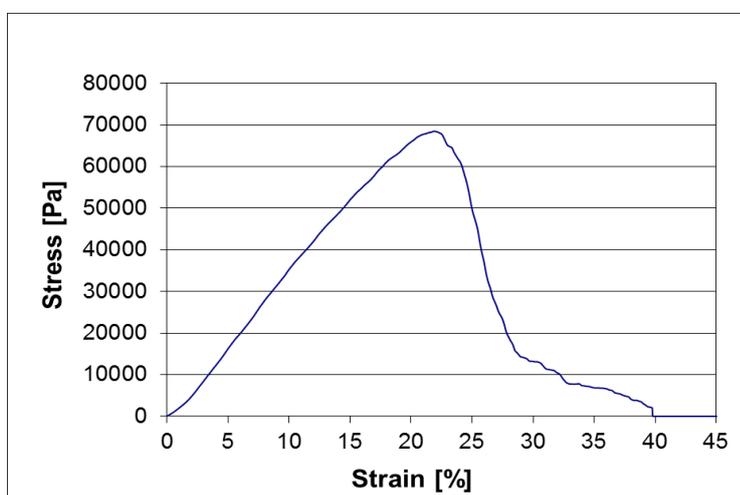
ebenfalls in einer Unterdruckkammer mit den entsprechenden Lösungen aus Gelatine und Transglutaminase behandelt. Eine Zugbelastung von quervernetzter Gelatine wurde nur in Verbindung mit den Matrices durchgeführt, da ein Bekleben von quervernetzter Gelatine ohne Matrixanteil nicht mit ausreichender Festigkeit möglich war.

Die vorbereiteten und mit den Metallscheiben beklebten Matrixzylinder wurden mit der oberen Metallscheibe am Arm des Infusiometers fixiert, wo sich bei den Kompressionsmessungen der austauschbare Stempel befand. Die untere Metallscheibe wurde an einem Gewicht fixiert, welches auf der Waage stand. Nach Trieren der Waage wurde der Messvorgang begonnen, indem sich der Arm des Infusiometers mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/s nach oben bewegte. Die Waage zeigte im Messverlauf zunehmend negative Werte an, da sie eine Abnahme des darauf stehenden Gewichts durch die nach oben wirkende Kraft detektierte. Diese Werte entsprachen, nach Weglassen des negativen Vorzeichens und Umrechnung von der Einheit Gramm in Joule, den auf die Proben wirkenden Kräften.

Für jeden einzelnen Messpunkt wurden die jeweilige Spannung und weiterhin der E-Modul bestimmt. Eine Flächenkorrektur war in diesem Fall bei vernachlässigbar geringer Änderung der Querschnittsfläche nicht erforderlich.

Im Gegensatz zu den Kompressionsmessungen wurde bei den Zugmessungen kein bestimmter Bereich des Strains zur Beurteilung des E-Modul verwendet, sondern es wurde der maximale Wert für den E-Modul herangezogen, der aus dem gesamten Bereich hervorging.

Außerdem wurde die Zugbelastung zur Auswertung verwendet, also der Wert der Spannung, der dem Peak im Spannung-Strain-Diagramm und bildlich gesprochen dem Wert der Spannung bei Einsetzen des Reißens der Probe entspricht. Die Bruchdehnung, wie bei den Kompressionsversuchen beschrieben, wurde hier nicht verwendet, da sich eine zu große Schwankungsbreite für diese Werte ergeben hätte.



**Abb. 6:**

Zugbelastung einer mit quervernetzter Gelatine gefüllten Matrix

Gel3% und TG2% wurden in einer Unterdruckkammer in die Matrix eingebracht, anschließend für 6h bei 4°C und weitere 20h im glutaminfreien Medium freischwimmend bei 37°C inkubiert.

## 2.2.2 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität

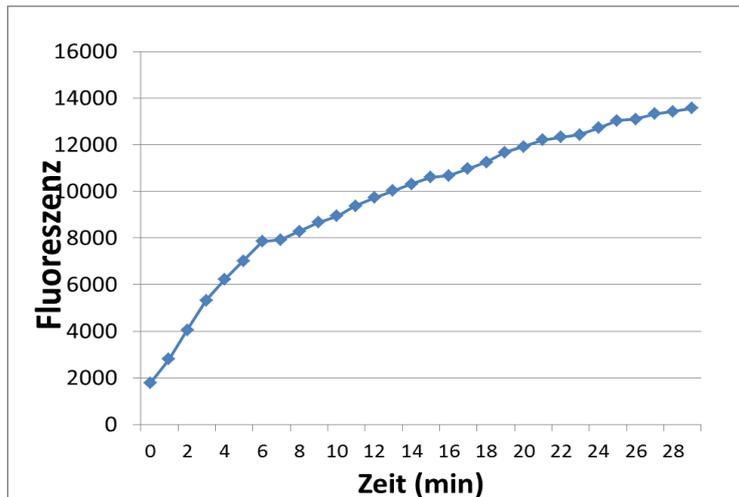
Wir etablierten zwei Messmethoden zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität. Für beide Methoden diente Casein als Substrat und Donor der Glutamin-Gruppe. Als Donor der Lysin-Gruppe wurde Dansylcadaverin bzw. Biotinpentylamin verwendet.

### 2.2.2.1 Kasein und Dansylcadaverin als Substrat

Für folgende Methode zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität wurden zum einen 0,4% Casein, gelöst in H<sub>2</sub>O, zum anderen 400 µM Mono-Dansylcadaverin (MDC) als Substrate verwendet. MDC wurde in einem glycerin-freien DMEM-Medium mit 1mM Mercaptoethanol, 15 mM CaCl<sub>2</sub> und 15 mM NaHCO<sub>3</sub> gelöst. Der pH dieser Lösung lag bei 6,6.

Zunächst wurden die zu testenden Transglutaminase-Lösungen in doppelter Konzentration bezüglich der gewünschten Endkonzentrationen in die Wells einer auf Eis stehenden 96-Well-Platte verteilt, und zwar 50 µl/Well. Von den beiden Substratlösungen wurden jeweils 25 µl/Well appliziert. Somit lagen Endkonzentrationen von 0,1% Casein und 100 µM MDC vor. Unverzüglich erfolgte die Einleitung der Messung. Über einen Zeitraum von 20 Minuten erfolgten jede Minute Fluoreszenzmessungen bei einer Wellenlänge von 635 nm. Die Excitation erfolgte mit einer Wellenlänge von 450 nm. Aus den Einzelmessungen wurde die Zunahme der Fluoreszenz pro Zeiteinheit errechnet. Hierbei wurde der Messzeitraum ´5 bis 20 Minuten´ für die Endauswertung herangezogen.

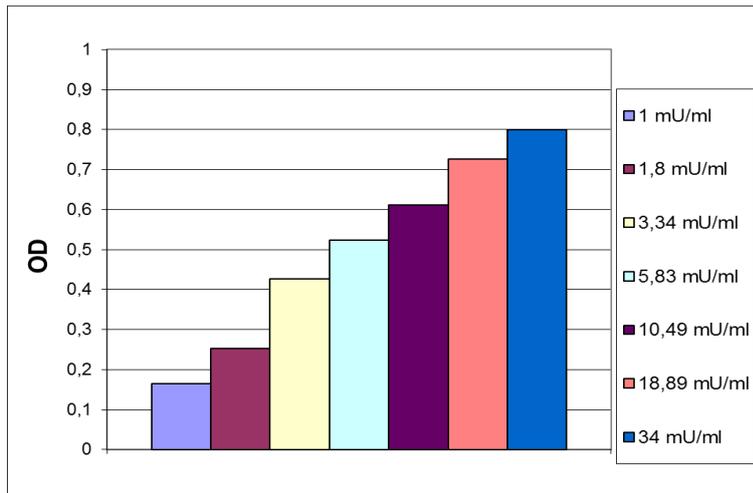
Demzufolge handelt es sich um eine dynamische Messung. Wir bezeichnen sie auch als Kinetik-Methode.

**Abb. 7:**

Kinetik-Methode zur Darstellung der Transglutaminase-Aktivität von Ajinomoto 1U/ml (nach Herstellerangabe). Fluoreszenzmessung über einen Zeitraum von 30 Minuten bei einer Wellenlänge von 635 nm.

### 2.2.2.2 Kasein und BPNH2 als Substrat

Im Rahmen folgender alternativen Methode zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität wurden zunächst 96-Well-Platten mit Casein beschichtet. Hierfür wurde eine Lösung mit 0,1 M Tris-Puffer und 10 mM Dithiothreitol (DTT) als Pufferlösung verwendet. Durch Ergänzung von Salzsäure wurde ein pH-Wert von 7,0 eingestellt. Die Pufferlösung wurde 1:1 mit einer 2%igen Caseinlösung, gelöst in H<sub>2</sub>O, vermischt und in die Wells appliziert. Nach einer Stunde Aufbewahrung bei 37°C wurden die Platten zweimalig mit der Trispufferlösung gespült und anschließend für 30 Minuten getrocknet. Die Substratlösung mit Biotinpentylamin wurde in der Konzentration 1mM im Trispuffer gelöst. Davon wurden je 50 µl in die casein-beschichteten Wells appliziert. Von den zu testenden Transglutaminase-Lösungen wurden ebenfalls jeweils 50 µl in die Wells appliziert. Es folgte eine Inkubationzeit von 90 Minuten auf Eis. Die Wells wurden dreimalig mit H<sub>2</sub>O gespült. Dann wurde 200 µl/Well Streptavidinperoxidase, gelöst in 0,1% PBS-Tween, appliziert. Nach einer 30-minütigen Inkubationsdauer bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimalig mit PBS-Tween gespült. Als Nächstes wurden 200 µl/Well Tetramethylbenzidin als Farbsubstrat verabreicht. Nach 10 Minuten wurden 50 µl/Well einer 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung als Stopp-Lösung ergänzt. Es folgte eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm. Im Gegensatz zur Methode aus dem vorigen Kapitel handelt es sich hierbei um keine dynamische Messung. Wir bezeichnen diese Methode auch als Endpunkt-Methode.

**Abb. 8:**

Endpunktmethode zur Darstellung der Transglutaminase-Aktivität von Ajinomoto. Die Aktivitätsangaben 1 mU/ml bis 34 mU/ml entsprechen den Herstellerangaben.

Absorptionsmessungen (OD = Optische Dichte) erfolgten bei einer Wellenlänge von 450 nm.

### 2.2.3 Auflösung und Verarbeitung der Gelatine und der Transglutaminase

Da Gelatine und Transglutaminase letztlich in einem Verhältnis 1:1 vermischt werden, erfolgte das Ansetzen der beiden Komponenten jeweils in der doppelten Konzentration bezüglich der gewünschten Endkonzentration. Als Erstes wurde Gelatine-Pulver in der jeweiligen Konzentration in ein DMEM-Medium gegeben. Als Behälter wurde ein 50ml-Zentrifugen-Röhrchen verwendet. Dieses wurde nur bis maximal zur Hälfte mit der Gelatine-Lösung befüllt. Das Röhrchen wurde dann für 5 Minuten in eine Schüssel mit 60 °C warmen Wasser getaucht. In dieser Zeit kommt es zum vollständigen Lösen des Gelatine-Pulvers. Inzwischen wurde die Transglutaminase in gleichem Medium in der jeweiligen Konzentration bei Raumtemperatur gelöst, ebenfalls in einem 50ml-Zentrifugen-Röhrchen. Die beiden Komponenten wurden dann, wie gesagt im Verhältnis 1:1, vermischt. Somit entstand eine lauwarmer Lösung mit einer Temperatur von ca. 35 °C. Unverzüglich erfolgte die weitere Verarbeitung (z.B. Pipettieren der Lösungen in 96-Well-Platten oder Teflonformen für Stabilitätsmessungen), da sofort die enzymatische Reaktion einsetzt und bereits nach wenigen Minuten eine Verarbeitung unmöglich macht.

Bei Versuchen mit Zellen als weiteren Bestandteil wurden die Komponenten Zellen und Transglutaminase initial jeweils in einer 4-fachen Konzentration bezüglich der gewünschten Endkonzentration gelöst, dann 1:1 miteinander vermischt, bevor eine erneute 1:1 Mischung dieser Transglutaminase-Zell-Lösung mit der Gelatine-Lösung erfolgt.

Da sich im Verlauf herausstellte, dass das glutamin-freie DMEM-Medium keine signifikante Verbesserung hinsichtlich Gelstabilität erbringt, wurde das glutaminhaltige DMEM-Medium von Gibco als Lösungsmittel aller Komponenten bevorzugt.

#### 2.2.4 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt. 20 µl einer Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau-Lösung gemischt und etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt. Während vitale Zellen in der Lage sind, den Farbstoff auszuschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen Trypanblau auf und stellen sich blau gefärbt dar.

Grundsätzlich wurden mindestens zwei Großquadrate ausgezählt. Die Zelldichte berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = (\text{Zellzahl/Zahl der Großquadrate}) \times 2 \times 10^4 \times \text{ml}^{-1}.$$

#### 2.2.5 Bestimmung der metabolischen Aktivität von Mesenchymalen Stammzellen mit Resazurin in der Monolayer- und in der 3-D-Zell-Kultur

Mit dem Resazurinreduktionstest ermittelten wir die Zellvitalität. Im Rahmen der dabei stattfindenden Reaktion wird Resazurin in fluoreszierendes Resorufin umgewandelt. Diese Reaktion erfolgt in den Mitochondrien und im Zytoplasma lebender Zellen unter NADH-Verbrauch.

Die Stammlösung bestand aus 0,07 mM Resazurin in einer PBS-Lösung.

Eine 24-Well-Platte wurde pro Well mit 450 µl zellhaltigem DMEM-Medium befüllt. Nach Zellzählung wurden dabei 10 000 Zellen pro Well eingepant. Danach wurden die Proben sofort den jeweiligen Untersuchungsbedingungen ausgesetzt und zum Beispiel zunächst in den Kühlschrank gegeben. Vor Messung der metabolischen Aktivität wurden alle Platten für mindestens 24 Stunden im Brutschrank gehalten. Eine gute Adhäsion aller vitalen Zellen auf dem Boden der Platte konnte somit erwartet werden und ein vorsichtiger Mediumwechsel

ohne Riskieren eines Zellverlusts erfolgen. In die Wells wurden dabei jeweils 450 µl DMEM-Medium und für die Bestimmung der metabolischen Aktivität jeweils 50 µl Resazurin-Stammlösung gegeben.

Alternativ wurden die Zellen zusammen mit einer Gelatine-Transglutaminase-Lösung, ebenfalls mit dem DMEM-Medium als Lösungsmittel, in der 24-Well-Platte inkubiert. In jedem Well waren hierbei initial 30 000 Zellen enthalten. Um eine Adhäsion der Zellen auf dem Boden der Platte zu vermeiden, wurde im Vorfeld eine zellfreie, aber ansonsten identische Gelatine-Transglutaminase-Lösung zu jeweils 250µl auf dem Boden der Wells verteilt und zwecks Optimierung der Quervernetzung zunächst für eine Stunde in den Kühlschrank gegeben. Anschließend wurde die zugehörige zellhaltige Lösung, mit Ausnahme einer Gruppe mit zellfreier Lösung für die spätere Blank-Bestimmung, zu jeweils 200 µl auf die vorbeschichteten Wells verteilt. Daraufhin erfolgte die Weiterinkubation mit den jeweiligen Inkubationsbedingungen. Nach spätestens 6-stündiger weiterer Inkubationsdauer, als bei allen Gruppen eine suffiziente Quervernetzung der Gelatine zu erwarten war, wurden jeweils 450 µl DMEM-Medium in die Wells ergänzt, um die Gelatine vor Austrocknung zu schützen. Im weiteren Verlauf erfolgten, je nach Dauer der Inkubation, wiederholte Mediumwechsel.

Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt erfolgte ein letzter Mediumwechsel. Das in den jeweiligen Wells enthalte Gesamtvolumen betrug 900 µl, bestehend aus jeweils 450 µl quervernetzter Gelatine mit den Zellen und dem reinen DMEM-Medium. Dann wurden jeweils 100 µl der Resazurin-Stammlösung lichtgeschützt ergänzt. Es folgte eine Inkubation für 3 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die Lösungen vorsichtig abgesaugt und zu jeweils 150 µl in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert.

Zur Messung der Fluoreszenz des Resazurins, das ein Exzitationsmaximum bei 545 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm besitzt, wurde ein ELISA-Reader verwendet. Die Zellvitalität werteten wir in Relation zur gemessenen Fluoreszenz nach Abzug des Blankwertes. Die Gain-Einstellung erfolgte zunächst automatisch, dann manuell und identisch für alle weiteren Messungen.

### 2.2.6 Life-Dead-Kit

Als fluoreszenzmikroskopische Methode zur Bestimmung der Zell-Vitalität verwendeten wir den Life-Dead-Kit, ein Zwei-Farben-Fluoreszenz-Test zur simultanen Identifizierung lebender und toter Zellen mittels der beiden Komponenten Ethidium-Homodimer und Calcein-Acetoxymethylester (Calcein-AM).

Das Ethidium-Homodimer (Stammlösung: 2 mM in DMSO/H<sub>2</sub>O 1:4) wurde in einer PBS-Lösung auf eine Konzentration von 8  $\mu$ M verdünnt. Dann wurde Calcein-AM (Stammlösung: 4 mM in DMSO) ergänzt, so dass dieses auf eine Konzentration von 4  $\mu$ M verdünnt wurde. Die entstandene Lösung wurde zu je 350  $\mu$ l in die Wells einer 24-Well-Platte gegeben, in der sich bereits 350  $\mu$ l quervernetzter Gelatine mit den zu untersuchenden Zellen befanden. Es folgte eine Inkubation über 1 h bei 37°C. Nach Diffusion der Lösung in die Gelatine und letztlich in das Zellplasma entstand eine ungefähre Endkonzentration von 4  $\mu$ M für Ethidium-Homodimer und 2  $\mu$ M für Calcein-AM. Anschließend wurden die Lösungen abgesaugt und die Wells mehrfach mit PBS gespült.

Im Zytoplasma der Zellen wird nach Abspaltung des Acetoxymethylesterrests von Calcein-AM durch unspezifische ubiquitäre Esteraseaktivität Calcein gebildet, welches eine Grünfluoreszenz zeigt ( $\lambda_{Em} = 530$  nm).

Der zweite enthaltene rotfluoreszierende Farbstoff, Ethidium-Homodimer-1 ( $\lambda_{Em} = 645$  nm), gelangt nur durch die defekte Membran toter Zellen und interkaliert dort in die zelluläre DNA.

Somit weisen lebende Zellen eine Grünfluoreszenz und tote Zellen eine Rotfluoreszenz auf. Die quantitative Bestimmung lebender und toter Zellen erfolgte durch Auszählung von jeweils vier zufällig ausgewählten Bildausschnitten des entsprechenden Glasplättchens im Fluoreszenzmikroskop.

### 2.2.7 Histologie

Die lichtmikroskopische histologische Beurteilung verschiedener Zell- und Gewebestrukturen erfolgte durch die Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Meyer (HE-Färbung).

Zunächst wurde die quervernetzte Gelatine mit den enthaltenen Zellen in ca. 5 mm große Gewebestücke geschnitten und über Nacht in einer Para-Formaldehydlösung fixiert. Die Para-

Formaldehydlösung wurde daraufhin mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Um dem Gewebe Wasser vollständig zu entziehen, wurden die Proben jeweils für ca. 1 Stunde in eine stufenweise aufsteigende Alkoholreihe und anschließend in reines Xylol eingesetzt. Schließlich wurden die Proben mit warmem Paraffin in Formen gegossen, nach dessen Aushärtung 15 bis 20 µm dicke Schichten mit Hilfe eines Mikrotoms geschnitten und auf einen Objektträger aufgetragen wurden.

Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst in eine Hämatoxylin-Eosin-Lösung gelegt und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach anschließendem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Präparate in Eosin eingelegt und erneut mit destilliertem Wasser gespült und mit Alkohol entwässert. Schließlich folgte ein luftfreies Eindecken der Schnitte unter einem Deckglas.

Die Beurteilung der fertig gestellten Präparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

In einem Versuchsteil erfolgte zusätzlich eine Anfärbung von Kalziumkristallen nach von Kossa. Hierfür wurden die Schnitte mit 5%iger Silbernitratlösung bedeckt und für 60 min bei Raumtemperatur und unter Einfluss von Tageslicht inkubiert. Danach erfolgten ein zweimaliges Spülen mit destilliertem Wasser und die Zugabe einer 5%igen Natriumthiosulfat-Lösung. Nach circa 2 Minuten erfolgte eine erneute Spülung mit destilliertem Wasser. Kalziumablagerungen in der extrazellulären Matrix färbten sich durch die Reduktion des Silbers braun bis schwarz.

## 2.2.8 Statistik

Im Rahmen einer statistischen Auswertung von Messergebnissen wurden Untersuchungen für die einzelnen Gruppen jeweils fünf bis zehnmal wiederholt und anschließend der jeweilige Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Die graphische Darstellung erfolgte durch Balken- oder Liniendiagramme. Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Werte um ihren Mittelwert, ermöglicht jedoch keine sichere Aussage über die Signifikanz. Um nachzuweisen, ob Unterschiede zwischen den verglichenen Messreihen als signifikant gewertet werden können, wurde ein unabhängiger T-Test mit dem Signifikanzniveau 5% verwendet. Dem entsprechend wurde dieser Test bei allen Messergebnissen durchgeführt, die im Text als „signifikant“ kommentiert sind.

## **3 Ergebnisse**

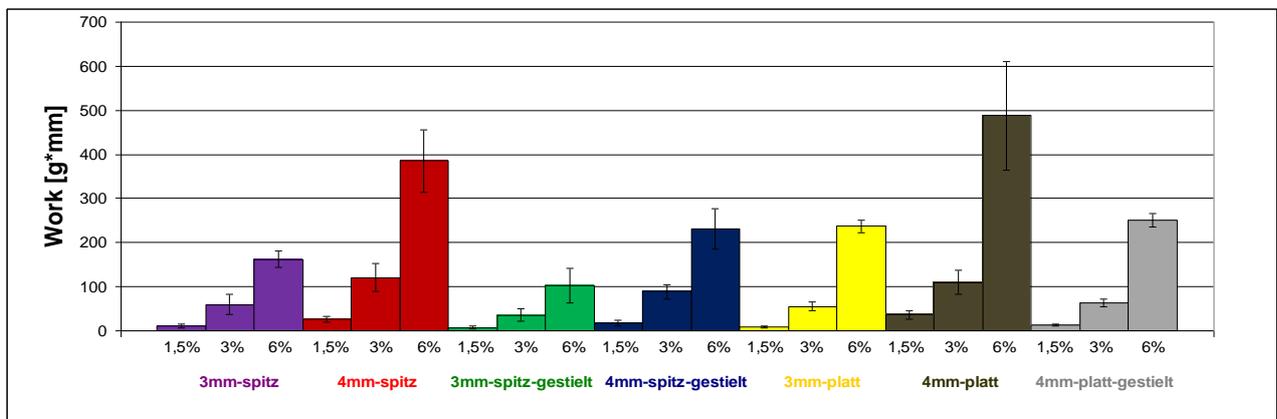
### **3.1 Ergebnisse aus der Methodenentwicklung**

#### **3.1.1 Auswahl des Stempels für die Kompression von Gelatine in 96-well-plates**

Für alle bevorstehenden Versuche, bei denen es um die Bestimmung der physikalischen Stabilität der Gelatine unter verschiedensten Einflussfaktoren geht, kann vorhergesagt werden, dass eine sehr große Vielzahl an Stabilitätsmessungen erforderlich war, um daraus repräsentative Schlüsse ziehen zu können. Deshalb musste eine Messmethode gefunden werden, die Stabilitätstests für eine große Anzahl einzelner Proben bei gleichzeitig relativ geringem Materialverbrauch ermöglicht. Zugleich wurde eine einfache und zeitsparende Handhabung bevorzugt.

Hierfür zeigte sich die Stempelimpressionmethode von Sakamoto<sup>29</sup> als geeignet. Sakamoto füllte eine Well-Platte mit Lösungen aus verschiedenen Proteinen, unter anderem Gelatine, die mit Transglutaminase quervernetzt wurden. Ein Stempel wurde mit der Geschwindigkeit 12 mm/min in die Probe gedrückt. Dabei wurde die Bruchkraft gemessen, also die Kraft, die erforderlich war, um eine Strukturzerstörung der jeweiligen Probe herbeizuführen. In Anlehnung daran erprobten wir eine vergleichbare Messmethode. Dabei prüften wir auch, mit welchen weiteren Parametern außer der Bruchkraft die Stabilität des getesteten Materials adäquat beurteilt werden kann. Im Vergleich zur Bruchkraft ergab aus unserer Sicht die Bestimmung von „Work“ aus dem Kraft-Weg-Diagramm eine bessere Reproduzierbarkeit der gemessenen Proben, so dass dieser Parameter für uns im weiteren Verlauf maßgeblich wurde. Die Errechnung von „Work“ wurde im Kapitel 2.2.1.1 ausführlicher erläutert. Außerdem untersuchten wir, wie sich die Form des angewandten Stempels auf die Reproduzierbarkeit der Messungen auswirkt. Für unsere Stempelimpressionsmethoden wurden daher Stempel mit verschiedenen Größen und Formen getestet. Es wurden für jede der zur Verfügung stehenden Stempelformen Kompressionsmessungen mit Bestimmung von „Work“ durchgeführt. Hierzu wurden Gelatinelösungen mit den Konzentrationen 1,5%, 3% und 6% hergestellt und in eine 96-Well-Platte zu 350µl/well verteilt. Es folgte eine Inkubation bei 4°C im Kühlschrank für 12 Stunden und eine anschließende Aufwärmphase für 3 Stunden auf 22°C. In diesem

Zustand erfolgte die Kompressionsmessung der physikalisch-festen Gelatine mit den verschiedenen Stempeln.



**Abb. 9:**

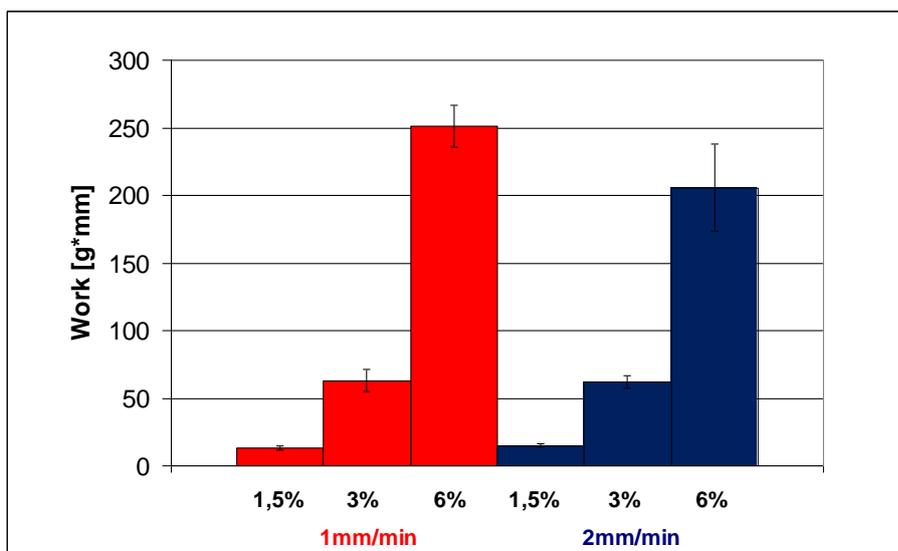
Bestimmung von „Work“ mittels sieben verschiedener Stempelvariationen. Für die Gelatine wurden jeweils die Konzentrationen 1,5%; 3% und 6% verwendet. Im Vorfeld erfolgte die physikalische Gelierung bei Raumtemperatur ohne Gelatine. Messung in 96-well-plates bis 8 mm Tiefe. Geschwindigkeit 1mm/min.

Bei jedem der verwendeten Stempelformen zeigten sich bei der Bestimmung von „Work“ signifikante Unterschiede, was die Werte für die jeweils verwendeten verschiedenen Gelatinelösungen betrifft. Zur Bewertung der Streuung der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen wurde die Standardabweichung in Relation zum Mittelwert der gemessenen Werte gesetzt. Dabei zeigte sich bei der Stempelform mit der Bezeichnung „4mm-platt-gestielt“ die geringste prozentuale Standardabweichung für die gemessenen Stabilitätswerte, wenn man die jeweils betrachtete Gelatinekonzentration mit den für diese verwendeten anderen Stempelformen vergleicht. Folglich wurde die Stempelform „4mm platt-gestielt“ für alle folgenden Kompressionsversuche mit 96-well-plates verwendet.

Stempelform	Gelatine 1,5%	Gelatine 3%	Gelatine 6%
3mm spitz	34,4%	38,7%	11,5%
4mm spitz	25,9%	25,8%	18,4%
3mm spitz-gestielt	41,7%	40,4%	38,7%
4mm spitz-gestielt	41,8%	18,4%	19,7%
3mm platt	13,0%	22,5%	12,9%
4mm platt	25,9%	24,9%	25,4%
4mm platt-gestielt	12,4%	13,1%	6,2%

**Tab. 2:** Bestimmung der prozentualen Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Hierzu erfolgte mittels Kompressionsmessungen von Gelatinelösungen der Konzentrationen 1,5%, 3% und 6% in 96-well-plates die Bestimmung von „Work“ und die jeweilige Standardabweichungen. Der Stempel mit der Form „4mm-platt-gestielt“ zeigte für alle Gelatinelösungen die günstigste Standardabweichung.

Nach Festlegung auf die Stempelform „4mm platt-gestielt“ für alle weiteren Kompressionsmessungen in 96er-Well-Platten wurde überlegt, zum Zweck der Zeitersparnis die bisher verwendete Kompressionsgeschwindigkeit von 1 Millimeter pro Minute zu verdoppeln. Somit erfolgte ein Test zum Vergleich der Kompressionsgeschwindigkeiten 1mm/min und 2mm/min unter Verwendung von 1,5%, 3% und 6% Gelatinelösungen bei Raumtemperatur. Im Vorfeld erfolgte wie zuletzt eine physikalische Gelierung bei 4°C.



**Abb. 10:** Kompressionsmessung mit Vergleich zweier unterschiedlicher Geschwindigkeiten der Kompression (1mm/min und 2mm/min). Jeweils wurden Gelatinelösungen mit den Konzentrationen 1,5%, 3% und 6% verwendet.

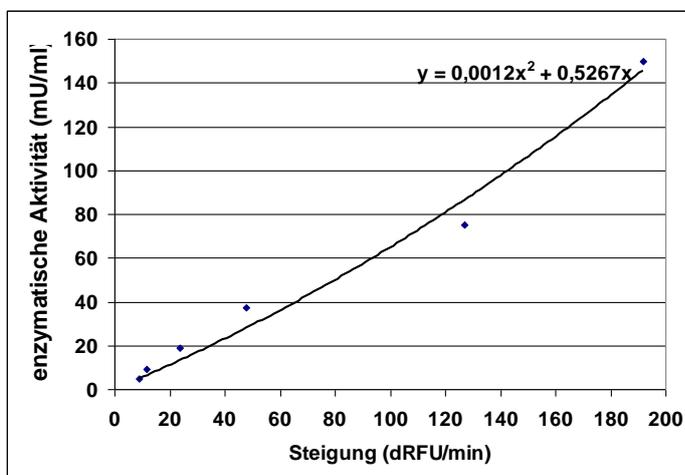
Als der Stempel mit einer Geschwindigkeit von 2mm/min anstatt 1mm/min in die Gelatine gefahren wurde, ergab sich für die beiden niedrigen Konzentrationen (1,5% und 3%) im

Vergleich zu den Gruppen mit der Geschwindigkeit 1 mm/min kein signifikanter Unterschied für die Bestimmung von „Work“. Bei einer Gelatinekonzentration von 6% stellte mit einem Wert von 206 g\*mm ein vergleichsweise niedrigerer Wert heraus. Bei einer Geschwindigkeit von 1mm/min betrug der entsprechende Wert dagegen 251 g\*mm. Für alle gemessenen Standardabweichungen wurden akzeptable Werte festgestellt.

Aufgrund der Ähnlichkeit der Werte von „Work“ beim Vergleich der genannten Geschwindigkeiten wurde für alle weiteren Kompressionsmessungen die Geschwindigkeit 2 Millimeter pro Minute gewählt.

### 3.1.2 Etablierung der Aktivitätsmessung für die Transglutaminase

Als Standardenzym wurde die Meerschweinchentransglutaminase von der Firma Sigma verwendet. Laut Hersteller war in einem Aliquot 1 Unit enzymatische Aktivität enthalten, die nach der Hydroxamat-Methode definiert wurde.



**Abb. 11:**

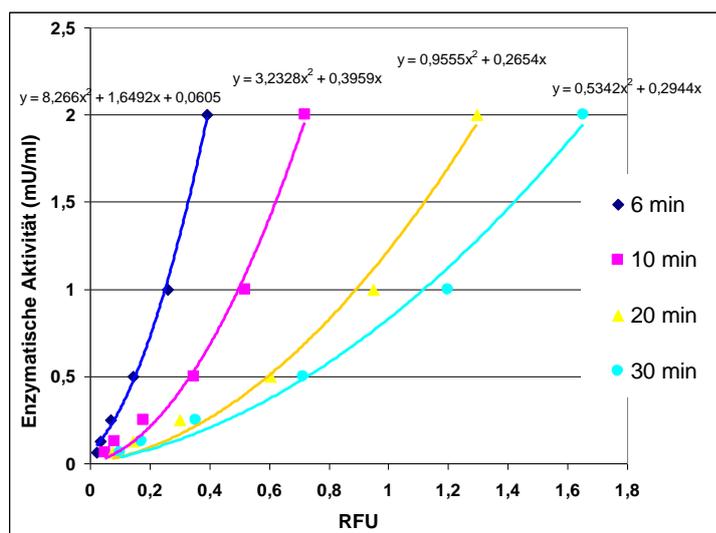
Standardkurve der Meerschweinchentransglutaminase (Sigma).

Fluoreszenzmessung nach der Dansylcadaverin-Casein-Methode (Kinetik-Messung).

Bestimmung der Steigungsachse innerhalb des Zeitraumes 5 bis 20 min.

Anhand verschiedener ausgewählter Konzentrationen der Meerschweinchentransglutaminase wurde in jedem Versuch zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Testtransglutaminasen eine Standardkurve erstellt. Bei der kinetischen Methode wurde der Wert der errechneten Aktivität der Meerschweinchentransglutaminase auf den Wert der Steigungsachse der gemessenen Relativen Fluoreszenzeinheit (RFU) aufgetragen. Die einzelnen Messpunkte wurden einer quadratischen Funktionsgleichung angeglichen. Im obigen Beispiel wurde diese Gleichung ermittelt:  $y = 0,0012x^2 + 0,5267x$ .

Bei der Endpunktmethode erfolgten kolorimetrische Transmissionsmessungen zu gewählten Zeitpunkten nach Zugabe des Farbgebers Tetramethylbenzidin. In folgendem Beispiel waren hierfür vier Zeitpunkte gewählt, nämlich 6, 10, 20 und 30 Minuten. Für jede Messung zum jeweiligen Zeitpunkt wurde eine Funktionsgleichung für die Standardkurve aufgestellt. Es handelte sich ebenfalls um quadratische Gleichungen. Daraus wurden die Aktivitäten der Testenzyme errechnet und gemittelt.



**Abb. 12:**  
Standardkurven  
der Meerschweinchen-  
glutaminase (Sigma).

Farbtransmissionsmessung nach der Endpunktmethode. Bestimmung des Fluoreszenzwertes zu den Zeitpunkten 6 min, 10 min, 20 min und 30 min.

Im Vergleich zur Endpunktmethode konnten bei der Kinetik-Bestimmung stabilere Testergebnisse erzielt werden, weswegen sich der Dansylcadaverin-Casein-Test als Methode der Wahl etablierte und dieser auch zur Prüfung folgender Testenzyme verwendet wurde:

	<i>Herstellerangabe</i>	<i>Eigene Messung</i>
<b>Activa® (Ajinomoto):</b>	81 - 135 Unit pro Gramm Pulver*	101 Unit pro Gramm Pulver
<b>Bakterielle Transglutaminase (Zedira):</b>	25 Unit*	26,75 Unit
<b>Humane Gewebstransglutaminase (Zedira):</b>	> 375 Unit** ?????	2,19 Unit
<b>Faktor XIII (Fibrogammin®):</b>	250 IE***	16,0 Unit

**Tab. 3:**

\*Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität mit dem Hydroxamattest nach Grossowicz *et al.*

\*\*Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität mit dem Dansylcadaverin-Casein-Test nach Lorand *et al.*

\*\*\*1 E entspricht der Faktor-XIII-Aktivität von 1 ml frischem Citratplasma (Mischplasma) gesunder Spender

Unsere gemessenen Einheiten wurden zwecks Vergleichbarkeit mit den Herstellerangaben auf das Originaltrockenprodukt umgerechnet.

Für unsere Aktivitätsmessungen hat sich die Fluoreszenzkinetikmessung mittels des Dansylcadaverin-Casein-Tests als Methode der Wahl etabliert.

Die Herstellerangaben der Transglutaminase von der Firma Ajinomoto sowie der bakteriellen Transglutaminase von Zedira stimmten gut mit den Ergebnissen aus eigenen Messungen überein. Die Aktivität dieser beiden Produkte wurde vom Hersteller jeweils nach der Hydroxamat-Methode definiert.

Für die Humane Gewebstransglutaminase von Zedira waren im Verhältnis zu den Herstellerangaben nur sehr schwache Aktivitäten nachweisbar. Diese Ergebnisse bestanden für dieses Enzym, obwohl der Hersteller ebenfalls einen Dansylcadaverin-Casein-Test als Methode zur Aktivitätsbestimmung anwendete.

Der Faktor XIII zeigte in unseren Messungen eine ansprechende Aktivität, auch wenn hierbei wiederum eine andersartige und daher nicht zwangsläufig vergleichbare Methode zur Aktivitätsbestimmung von Seiten des Herstellers herangezogen wurde.

Nachdem sich die angegebene hohe Aktivität für die Transglutaminase von der Firma Ajinomoto in unseren Messungen bestätigte, wurde dieses Enzym in den meisten Versuchen dieser Arbeit bevorzugt verwendet.

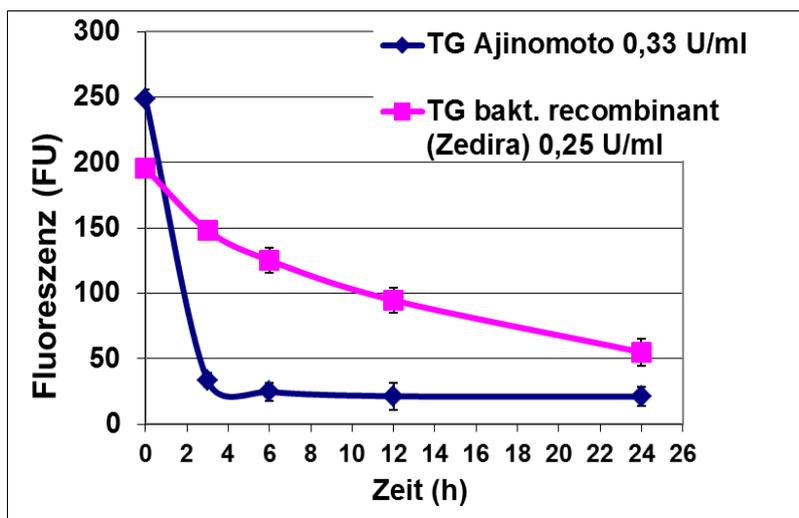
### 3.1.3 Aktivitätsverlust der Transglutaminasen bei 4°C und 37°C

In folgendem Versuch wurde der temperaturabhängige Aktivitätsverlust der Ajinomoto-Transglutaminase mit der Bakteriellen Transglutaminase von Zedira verglichen. Die Ajinomoto-Transglutaminase wurde auf 0,33% konzentriert, was, ausgehend von einer Aktivität von 100 Units pro Gramm Pulver, einem Wert von 0,33U/ml entspricht. Die Zedira-Transglutaminase wurde auf eine spezifische Aktivität von 0,25 U/ml verdünnt. Diese Aktivität bezog sich auf die Aktivitätsangabe des Herstellers, wobei sich anhand unserer eigenen Aktivitätsmessungen ähnliche Werte ergeben würden, was diese beiden Enzyme betrifft. Diese Tatsache wurde im vorangegangenen Kapitel beschrieben. Als Lösungsmittel wurde das glutaminfreie DMEM-Medium verwendet.

Im Vorfeld die Haltbarkeit der Transglutaminase zu prüfen, war deswegen interessant, weil bereits dadurch eine Vorstellung von den notwendigen Inkubationszeiten in Verbindung mit

der Gelatine gewonnen werden konnte. Vor allem bei Anwendung niedriger Temperaturen, die erwartungsgemäß ungünstige Bedingungen hinsichtlich der Zellvitalität darstellen, war es aus unserer Sicht sinnvoll, die Haltbarkeitsdauer der Transglutaminase und somit sinnvolle Inkubationsdauer abschätzen zu können. Allerdings konnte dabei nicht beurteilt werden, welchen Einfluss das Beisein von Gelatine auf die Haltbarkeit der Transglutaminase hat.

Die Enzymlösungen wurden in einem Gefäß mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren konserviert. Nach einer Stunde wurde das erste Probepaar in den Brutschrank überführt. Die übrigen Proben wurden nach insgesamt 13, 19 bzw. 22 Stunden Aufenthaltsdauer im flüssigen Stickstoff in den Brutschrank überführt. Das fünfte Probepaar wurde nach 25 Stunden Aufenthalt im flüssigen Stickstoff nur kurz durch die Handwärme aufgetaut und zur Aktivitätsmessung direkt auf die Well-Platte verteilt. Die gesamte Aufbewahrungszeit aller Proben betrug somit jeweils 25 Stunden. Die Aufenthaltsdauer im Brutschrank lag damit bei 0, 3, 6, 12 bzw. 24 Stunden.

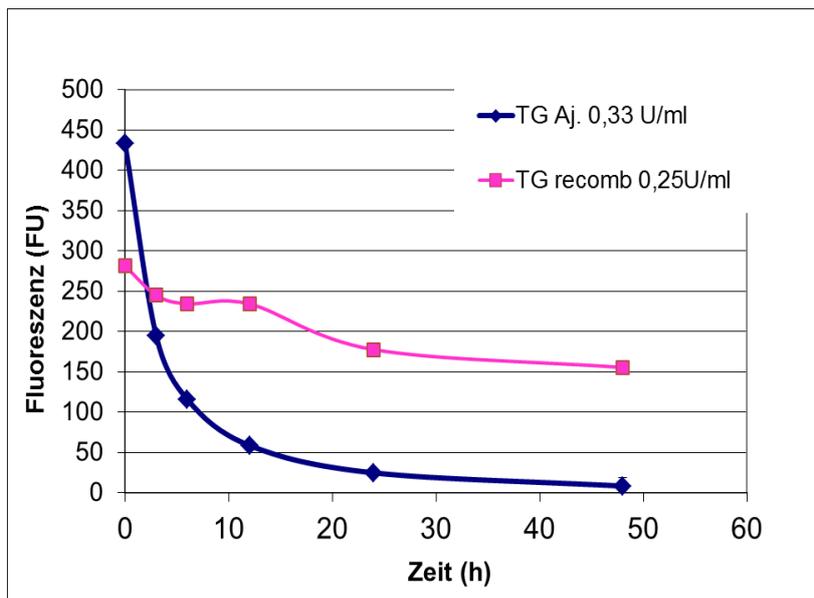


**Abb. 13:**  
Aktivitätsverlust der  
Transglutaminasen bei 37°C

Die Ajinomoto Transglutaminase zeigte einen raschen Aktivitätsverlust. Nach drei Stunden war die Aktivität bereits auf 13% des Ausgangswertes gesunken. Im weiteren Verlauf sank die Aktivität jedoch nicht unter 8% des Ausgangswertes.

Die Zedira-Transglutaminase zeigte sich deutlich stabiler. Nach 12 Stunden Brutschrankaufenthalt waren noch 48%, nach 24 Stunden noch 12% der Ausgangsaktivität enthalten.

In einem weiteren Versuch wurde der Aktivitätsverlust beider Transglutaminasen im Kühlschrank verfolgt. Adäquat zum vorherbeschriebenen Versuch wurden die Proben zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetaut, jedoch anschließend bei einer Temperatur von 4°C weiter aufbewahrt. Dabei wurde im Vergleich zum vorherbeschriebenen Versuch eine zusätzliche Messgruppe mit einer Aufenthaltsdauer von 48 h bei 4°C geplant.



**Abb. 14:**  
Aktivitätsverlust der  
Transglutaminasen bei 4°C

Die Beständigkeit der Aktivität zeigte sich bei einer Temperatur von 4°C für die Zedira-Transglutaminase deutlich höher im Vergleich zum vorhergegangenen Versuch, als die Aufbewahrungstemperatur bei 37°C gewählt wurde. Dabei waren nach 48 h sogar noch 55% der Ausgangsaktivität erhalten. Bei der Ajinomoto-Transglutaminase verblieben lediglich 2% der Anfangsaktivität nach gleichem Zeitraum und 6% nach 24h.

Letztlich musste stets ein vergleichsweise rascher Aktivitätsverlust der Ajinomoto-Transglutaminase verzeichnet werden, der in keiner bedeutsamen Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur stand.

Als erheblichen Vorteil der Ajinomoto-Transglutaminase kann die vergleichsweise deutlich bessere Preisgünstigkeit genannt werden, so dass eine Vielzahl von Versuchen im finanziellen Rahmen möglich war. Letztlich stand ein hervorragendes Preis-Aktivitäts-Verhältnis einer kurzen Haltbarkeitsdauer nach Auflösen des Pulvers gegenüber.

Allerdings stellt sich die Frage, inwiefern eine längere Haltbarkeitsdauer überhaupt sinnvoll wäre. Denn entscheidend sind letztlich diejenigen Inkubationsbedingungen, die zu einer ausreichenden Stabilisierung durch Quervernetzung der Gelatine notwendig sind.

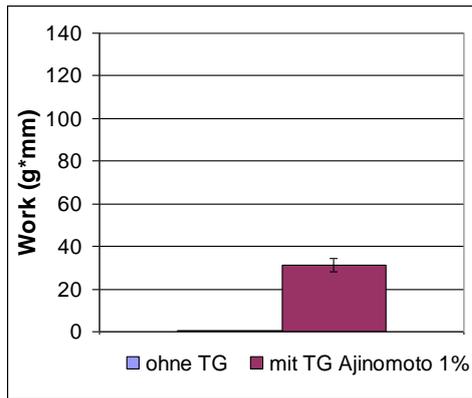
Eine wesentliche Erkenntnis aus diesem Versuch war außerdem, dass eine zügige Handhabung beim Ansetzen der Ajinomoto-Transglutaminase erforderlich ist, um einen unnötigen Aktivitätsverlust zu vermeiden.

## 3.2 Ergebnisse aus den Hauptversuchen

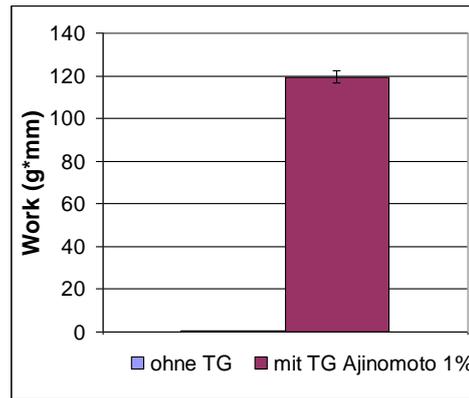
### 3.2.1 Mechanische Stabilität der Gelatine

#### 3.2.1.1 Einfluss von Inkubationsdauer und Temperatur auf die Festigkeit der Gelatine

Es ist bekannt, dass nicht-quervernetzte Gelatine einen temperaturabhängigen Gel-Sol-Übergang zeigt. Bei 37°C präsentierte sich demzufolge unbehandelte Gelatine stets in flüssigem Aggregatzustand, unabhängig von der Konzentration. Bei Kompressionsmessungen in 96-well-plates konnten bei dieser Temperatur daher bei nicht-quervernetzter Gelatine nur schwach-positive Werte erzielt werden, die vermutlich auf den Strömungswiderstand des Stempels zurückzuführen sind. Unter Zugabe von 1% Ajinomoto Transglutaminase zu 2%iger Gelatine zeigte sich nach 12h Inkubation im Brutschrank eine feste Struktur des Gels, was sich bei der unmittelbar anschließenden Kompressionsmessung mit einem deutlichen Anstieg von Work bestätigte (Abb. 15 A).



**Abb. 15 A:**  
Inkubation 2%iger Gelatine für 12 h im 37°C-Brutschrank, unmittelbar anschließend Messung



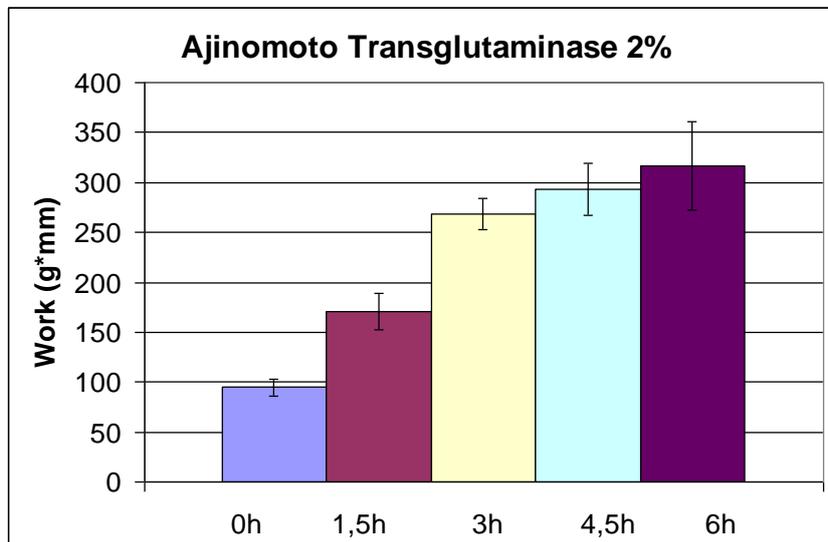
**Abb. 15 B:**  
Inkubation 2%iger Gelatine für 1 h im Kühlschrank (4°C) anschließend Aufwärmen im 37°C-Brutschrank für 11 h und Messung.

Im Vergleich dazu wurde im gleichen Versuch eine Variation durchgeführt, bei der die Gruppen initial 1 h bei 4°C im Kühlschrank und danach weitere 11 h im Brutschrank gehalten wurden. Die Gesamtinkubationsdauer von 12 h blieb konstant. Wie erwartet, stellte sich die unbehandelte transglutaminase-freie Gelatine zum Messzeitpunkt wiederum in einem flüssigen Aggregatzustand dar, obwohl sie zunächst im Kühlschrank physikalisch geliert war. Unter Zugabe von 1% Ajinomoto Transglutaminase wurde auch hier wiederum eine bei 4°C feste Gelstruktur erzeugt, die nach der fortgesetzten Inkubation bei 37°C im Vergleich zu dem Versuchsteil ohne Kältebehandlung sogar einen wesentlich höheren Anstieg von „Work“ um fast das Vierfache zeigte (Abb. 15 B).

Angesichts der langen Nachinkubation fallen die Unterschiede der jeweiligen Gesamtinkubationszeiten wenig ins Gewicht.

Im weiteren Verlauf wurde die Stabilität des Gels in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 4°C geprüft. Es wurden hierzu mehrere voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, wobei Variationen bezüglich der Transglutaminasekonzentrationen stattfanden. Im folgenden Versuch wurde 3%ige Gelatine mit 2%iger Transglutaminase für unterschiedliche Zeiten zwischen 0 und 6 Stunden bei 4°C gehalten. Nach der Kältebehandlung wurden die Gruppen für jeweils 22 Stunden im Brutschrank bei 37°C nachinkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Kompressionsmessung in 96-well-plates zur Bestimmung von „Work“. Die Nachinkubation diente einerseits der vollständigen Aufwärmung aller Gruppen auf die gleiche Temperatur, andererseits sollte während dieser Zeit das Enzym seine restliche Aktivität

vollständig ausnützen. Eine Verlängerung der Nachinkubation hätte, wie in anderen Versuchen gezeigt werden konnte, keine weitere Auswirkung auf die Stabilität der Gelatine gehabt.



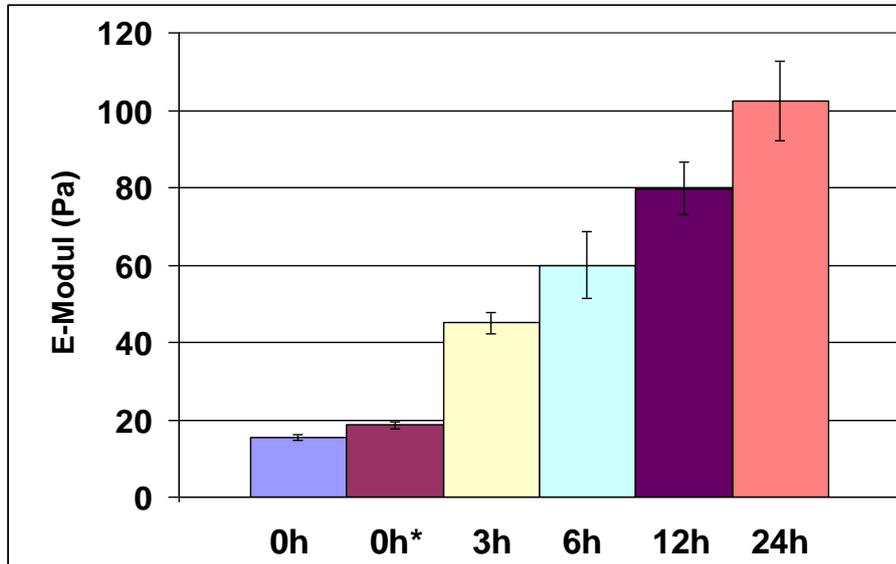
**Abb. 16:**

Inkubation 3%iger Gelatine mit 2%iger Ajinomoto Transglutaminase für unterschiedliche Zeiten (0 bis 6 Stunden) im Kühlschrank. Anschließend Nachinkubation für jeweils 22 Stunden bei 37°C.

In der Abbildung 16 wird deutlich, dass „Work“ von der Inkubationsdauer bei 4°C abhängig ist. Mit zunehmender Inkubationsdauer bei 4°C kommt es in allen Versuchen zu einem deutlichen Anstieg von „Work“.

Die Abhängigkeit der enzymatischen Quervernetzung und damit der Stabilität der behandelten Gelatine von der Inkubationsdauer bei niedrigen Temperaturen wurde auch mit freistehenden zylinderförmigen Gelen geprüft und eine Messung zur Bestimmung der E-Moduli durchgeführt (Abbildung 17). Es wurde hierzu eine Inkubation von 3%iger Gelatine mit 1%iger Ajinomoto Transglutaminase in Form von zylinderförmigen Proben mit einer Höhe von 6 mm und einem Durchmesser von 10 mm durchgeführt. Der erste Teil der Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 4° für 0 bis 24 Stunden. Der zweite Teil erfolgte, in flüssigem Medium schwimmend, bei 37°C und mit einer Dauer von mindestens 24 Stunden. Da für die Formung und ausreichende Stabilisierung des Gels vor der Übergabe in das flüssige Medium eine wenigstens kurzzeitige Inkubation in festen Formen essentiell ist, erfolgte bei den Gruppen ohne Kältebehandlung vor Übertragung in das flüssige Medium zunächst eine Inkubation in Teflonformen bei 37°C für 3 bzw. für 24 (mit „\*“ gekennzeichnet) Stunden, wobei sich zwischen diesen beiden Gruppen keine nennenswerten

Unterschiede bezüglich des E-Moduls zeigten, was ein Hinweis dafür ist, dass die Transglutaminaseaktivität bei einer Temperatur von 37°C bereits nach kurzer Zeit erschöpft ist.



**Abb. 17:**

Inkubation von 3%iger Gelatine mit 1%iger Ajinomoto Transglutaminase für 0 bis 24h bei 4°C in 6x10mm großen Teflonformen sowie für jeweils mindestens 24h bei 37°C in Medium schwimmend. Bei den beiden Gruppen ohne Kältebehandlung wurde die Gelatine zunächst für 3h bzw. für 24h (mit „\*“ markiert) in den Teflonformen belassen.

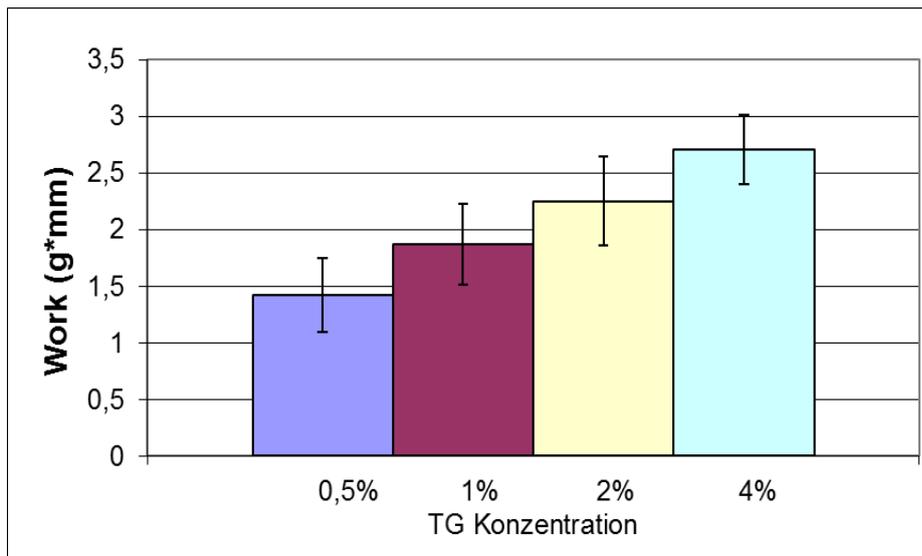
Insgesamt zeigte sich, dass mit zunehmender Inkubationsdauer bei 4°C eine deutliche Zunahme des E-Moduls erzielt werden konnte. Jede Verdopplung der Kältebehandlung bewirkte eine deutliche Zunahme des E-Moduls. Eine weitere Zunahme bei weiterer Verlängerung der Inkubationsdauer bei 4°C wäre zu erwarten.

### 3.2.1.2 Beeinflussung der Stabilität der Gelatine in Abhängigkeit von der Transglutaminase-Konzentration

Für folgende Versuche wurde die Transglutaminase in verschiedenen Konzentrationen (0,5%, 1%, 2%, 4%) eingesetzt. Die Gelatine-Konzentration wurde mit 3% konstant gehalten. Die Inkubation fand zunächst jeweils bei 4°C statt. Eine anschließende Nachinkubation erfolgte

bei 37°C, wobei diese von einer Dauer war, die mindestens dem Zeitraum der Inkubation bei Kälte entsprach. Unmittelbar nach der Nachinkubation fand die Messung statt.

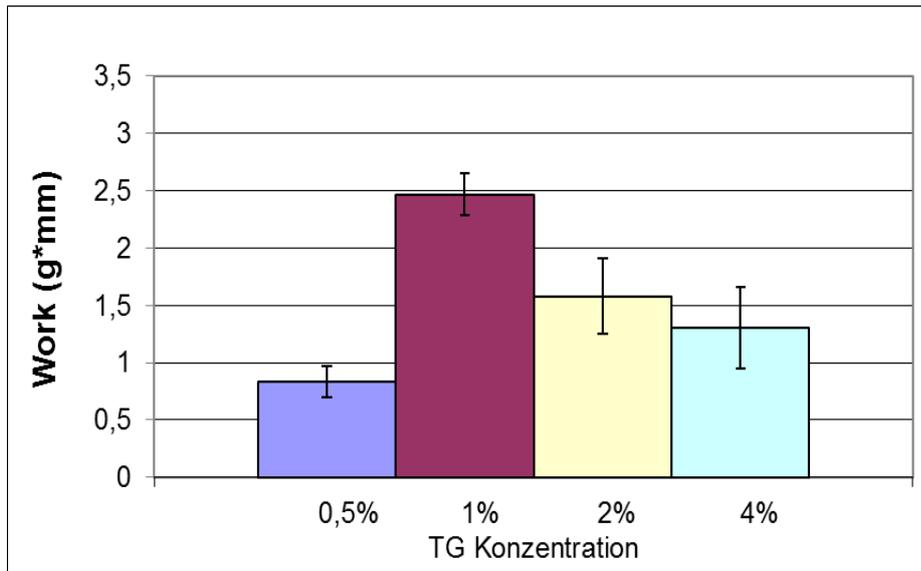
Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, konnten mit zunehmenden Transglutaminase-Konzentrationen höhere Werte für „Work“ gemessen werden, wobei hier die beiden unterschiedlichen Phasen der Inkubation jeweils 2 Stunden betragen.



**Abb. 18:**

Abhängigkeit von „Work“ von der Transglutaminase-Konzentration. 3%ige Gelatine wurde mit der jeweiligen Transglutaminase-Lösung für 2h bei 4°C, anschließend für weitere 2h bei 37°C inkubiert und gemessen.

In weiteren Versuchen mit längeren Inkubationszeiten bei 4°C und entsprechend längerer Inkubationsdauer bei 37°C war zwischen der Transglutaminasekonzentration und „Work“ keine Proportionalität mehr zu erkennen. Abbildung 19 zeigt ein Maximum für „Work“ bei einer Transglutaminasekonzentration von 1%.

**Abb. 19:**

Abhängigkeit von „Work“ von der Transglutaminase-Konzentration. 3%ige Gelatine wurde mit der jeweiligen Transglutaminase-Lösung für 6h bei 4°C, anschließend für weitere 18h bei 37°C inkubiert und gemessen.

Betrachtet man die entsprechenden Kraft-Weg-Diagramme, so fällt auf, dass eine höhere Transglutaminasekonzentration einen steileren Anstieg im Anfangsbereich des Diagramms, jedoch auch einen früher auftretenden Bruch zur Folge hat.

Im weiteren Verlauf wurden in einer Reihe von Kompressionstests die transglutaminaseabhängigen Materialeigenschaften von Gelatine an freien zylinderförmigen Gelen mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 6 mm geprüft. Die Inkubationszeit bei 4°C betrug wiederum 6h, die anschließende Nachinkubation bei 37°C dauerte 20h. Wie in Abbildung 20 A zu erkennen ist, steigt der E-Modul mit zunehmender Transglutaminasekonzentration stetig an. Auch die Maximale Bruchbelastung (Abbildung 20 B) nimmt mit steigender Transglutaminasekonzentration zu. Somit erhält man bei einer Transglutaminasekonzentration von 4% einen signifikant höheren Wert für die Bruchbelastung als bei einer Konzentration von 1%. Bei einer Transglutaminasekonzentration von 0,5% konnte bei den meisten Proben kein eindeutiger Bruch ermittelt werden, so dass diese Versuchsgruppe in den Abbildungen nicht auftaucht. Bei Transglutaminasekonzentrationen zwischen 1% und 4% lag die Maximale Bruchkompression (=Bruchdehnung) in einem Bereich zwischen 60% und 80% (Abbildung 20 C), wobei mit zunehmender Transglutaminasekonzentration eine rückläufige Tendenz der Bruchkompression erkennbar war.

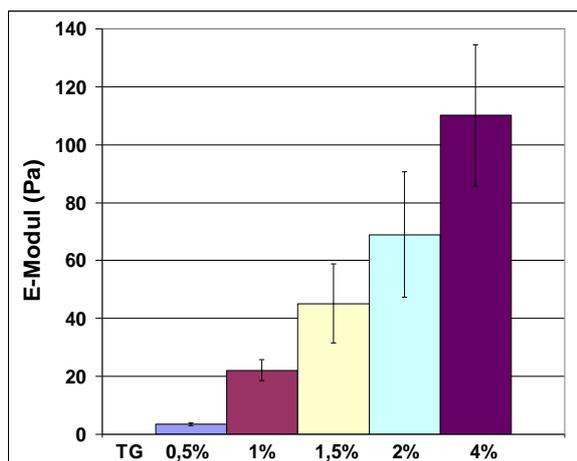


Abb. 20 A:

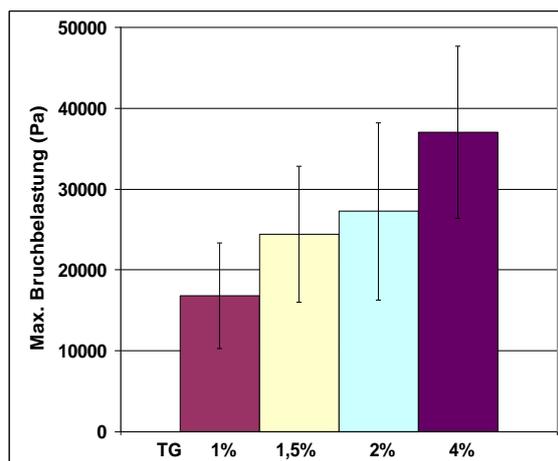


Abb. 20 B:

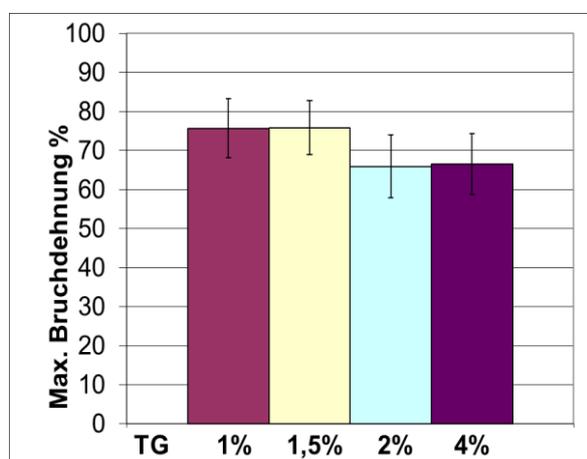


Abb. 20 C:

Abb. 20 A - C:

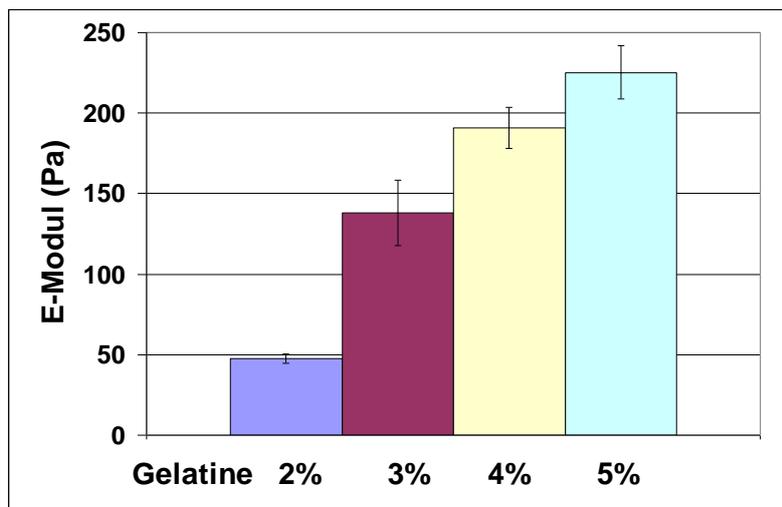
Bestimmung des E-Modul, der maximalen Bruchbelastung sowie der maximalen Bruchdehnung bei 3%igen freistehenden Gelatinezylindern der Größe 10 x 6 mm in Abhängigkeit verschiedener Transglutaminase (TG) -Konzentrationen (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 4%).

Inkubation jeweils für 6h bei 4°C und 20h bei 37°C.

### 3.2.1.3 Beeinflussung der Stabilität der Gelatine in Abhängigkeit von der Gelatine-Konzentration

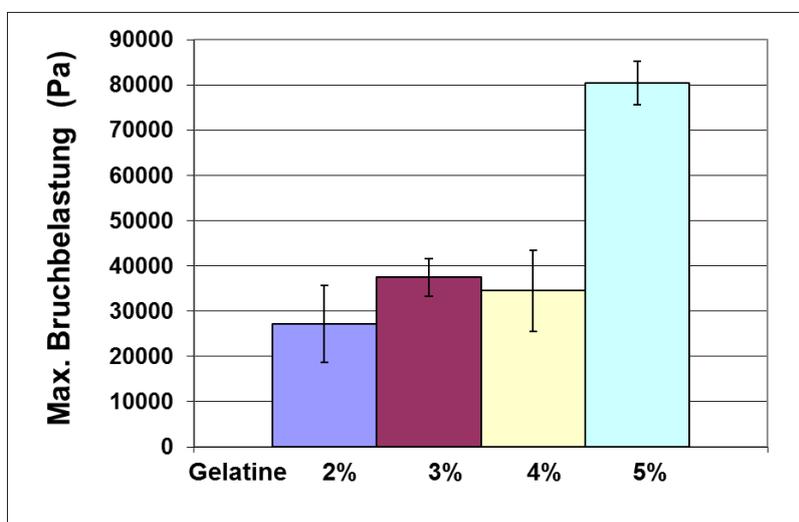
In den bisherigen Versuchen zur Bestimmung der Materialeigenschaften quervernetzter Gelatine wurde eine Gelatine-Konzentration von 3% konstant beibehalten. Im Folgenden wurde bei einer konstanten Ajinomoto Transglutaminase-Konzentration von 1% und konstanten Inkubationsbedingungen die Konzentration der Gelatine variiert (Abbildung 21).

Für die gewählten Konzentrationen 2%, 3%, 4%, 5% ergab die Bestimmung des E-Modul jeweils einen deutlichen Unterschied im Vergleich zu den übrigen Gruppen. Ein besonders deutlicher Unterschied für den Wert des E-Modul zeigte sich zwischen den beiden Gruppen mit den Konzentrationen 2% und 3%. Die Erhöhung der Konzentration von 2% auf 3% bewirkte fast eine Verdreifachung des E-Modul. Zwischen den Gruppen mit höheren Gelatine-Konzentrationen zeigte sich ein vergleichsweise geringer Unterschied. So ergab sich zwischen 4-prozentiger und 5-prozentiger Gelatine nur ein Unterschied von etwa 20%.



**Abb. 21:** Variation der Gelatine-Konzentration (2%, 3%, 4%, 5%). Die Transglutaminase-Konzentration lag jeweils bei 1%. Inkubationsdauer für 7h bei 4°C und 16h bei 37°C. Kompression freier Zylinderproben (6x10mm) und Bestimmung des E-Modul.

Außerdem wurde die maximale Bruchbelastung in Abhängigkeit von der Gelatinekonzentration bestimmt. Auffallend hierbei war eine enorm hohe Bruchfestigkeit der 5%igen Gelatine im Vergleich zu den übrigen Gruppen mit niedrigeren Konzentrationen (Abbildung 22).



**Abb. 22:** Variation der Gelatine-Konzentration (2%, 3%, 4%, 5%). Die Transglutaminase-Konzentration lag jeweils bei 1%. Inkubationsdauer für 7h bei 4°C und 16h bei 37°C. Kompression freier Zylinderproben (6x10mm) und Bestimmung der maximalen Bruchbelastung.

Insgesamt kann gesagt werden, dass mit zunehmender Gelatinekonzentration die mechanische Stabilität, sowohl gemessen am E-Modul als auch an der Bruchbelastung, ansteigt. Eine Wahl einer mindestens 3%igen Gelatinekonzentration scheint somit sinnvoll, wobei höher gewählte Konzentrationen natürlich ebenfalls unter dem Aspekt der Handhabbarkeit sowie der dadurch möglicherweise in Betracht kommenden Abhängigkeit der Zellvitalität gesehen werden müssen.

#### 3.2.1.4 Beeinflussung der Stabilität der Gelatine in Abhängigkeit von der Konzentration eines fetalen bovines Serum

In den bisherigen Versuchen zur Bestimmung der mechanischen Stabilität von quervernetzter Gelatine wurde ein Zellmedium verwendet, das kein Serum beinhaltet, da grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden konnte, dass Serum in irgendeiner Weise als Substrat mit der Transglutaminase interagiert und somit einen Einfluss auf die mechanische Stabilität der Gelatine haben könnte. Für Versuche mit lebenden Zellen gilt fetales bovines Serum allerdings als wichtiger Bestandteil eines Kulturmediums, weswegen dessen Auswirkung auf die Stabilität der quervernetzten Gelatine im Folgenden geprüft werden soll.

Hierfür wurde eine PBS-Lösung verwendet, der verschiedene Mengen an fetalem bovinem Serum zugefügt wurde, so dass als Endkonzentrationen 0, 5%, 10% und 20% erreicht wurden. Zusätzlich testeten wir eine Versuchsgruppe mit 10%iger Serumkonzentration, bei der im Vorfeld eine Hitzeinaktivierung stattfand. Hierzu wurde das Serum in einer 1:1-Verdünnung mit einem PBS-Medium für 45 Minuten bei 56°C inkubiert.

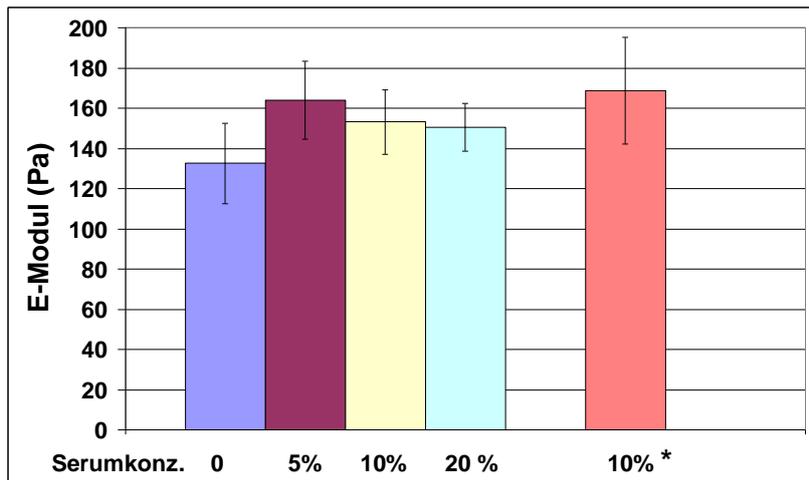


Abb. 23:

Variation des Anteils an fetalem bovinem Serum (0; 5%; 10%; 20% als Endkonzentration)

\*Bei einer weiteren Gruppe mit 10%iger Serumkonzentration wurde zuvor eine Hitzeinaktivierung durchgeführt. Das Serum wurde in einer 1:1-Verdünnung mit PBS in einem 2ml-Eppendorf-Cup für 45 min bei 56°C inkubiert.

Transglutaminase-Konzentration: jeweils bei 1%.

Gel-Konzentration: jeweils 3%

Medium: PBS

Inkubationsdauer für 6h bei 4°C und 18h bei 37°C.

Kompression freier Zylinderproben (6x10mm) und Bestimmung des E-Modul.

In insgesamt drei unabhängigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass bereits eine niedrige Konzentration von fetalem bovinem Serum eine Verbesserung der Gel-Stabilität, insbesondere des E-Modul, bewirkte (Abbildung 23). Ein deutlicher Unterschied war dabei bei einer 5%igen Serumkonzentration im Vergleich zu einer serumfreien Gelatine zu erkennen. Durch eine Steigerung der Serum-Konzentration auf über 10% konnte ein Rückgang des Wertes für den E-Modul verzeichnet werden, so dass eine Konzentration von 5% ein Optimum darstellte. Die E-Moduli lagen bei allen Gruppen mit Serum-Anteil höher als bei der serumfreien Gruppe.

In einem Versuch wurde in einer gesonderten Gruppe das Serum zuvor in einer 1:1-Verdünnung mit PBS bei einer Temperatur von 56°C über 45 Minuten inkubiert. Dadurch wurde eine Inaktivierung eventuell im Serum vorhandener Proteasen angestrebt, die die Struktur der Gelatine im weiteren Verlauf schwächen könnten. Am Beispiel eines 10%igen Serum-Anteils deutete sich eine – nicht eindeutig signifikante – Steigerung des E-Modul im

Vergleich zu der Gruppe mit gleichem Serum-Anteil ohne zuvor durchgeführter Hitzeinaktivierung an.

### 3.2.2 Beeinflussung der mechanischen Stabilität der ECM in Abhängigkeit von der Füllung mit quervernetzter und nicht quervernetzter Gelatine

Durch Einbringen der Gelatine in die Gelatine-Hyaluronsäure-Kompositmatrix und zusätzlicher Quervernetzung der Gelatine durch die Transglutaminase soll ein Konstrukt entstehen, das der herkömmlichen Matrix in der mechanischen Stabilität überlegen ist. In folgendem Versuch wurde ein DMEM-Medium mit 3%iger Gelatine und 2%iger Transglutaminase verwendet und in die Poren der Matrix eingebracht. Als Kontrollgruppen wurden Medien, die nur 2%ige Transglutaminase bzw. nur 3%ige Gelatine bzw. keine der beiden Komponenten enthielten, verwendet.

Bei der Herstellung der ECM und vor Beginn des eigentlichen Versuches wurde ein Teil der zylinderförmigen Proben in einer Transglutaminase-Lösung vorbehandelt. Zum Einbringen der jeweiligen Lösungen in die Poren der ECM wurden die Proben in einem 50ml-Falcon-Röhrchen mit dem Medium zusammengegeben und in einem Vakuumgefäß so lange gehalten, bis jede Probe auf den Boden gesunken ist. Der einwirkende Unterdruck wurde durch mehrere kurzzeitige Belüftungsphasen unterbrochen. Anschließend wurden die Proben in eine befeuchtete Petri-Schale gegeben und dort für 6 Stunden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Danach erfolgte die Überführung aller Proben in ein DMEM-Medium und die Aufbewahrung im Brutschrank bei 37°C. Nach weiteren 20 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Kompressionsmessung der freistehenden Proben. Die Kompression erfolgte mit der Geschwindigkeit 1 mm/min.

### Kompression und E-Modul-Bestimmung der ECM in Abhängigkeit einer Behandlung mit Transglutaminase und Gelatine:

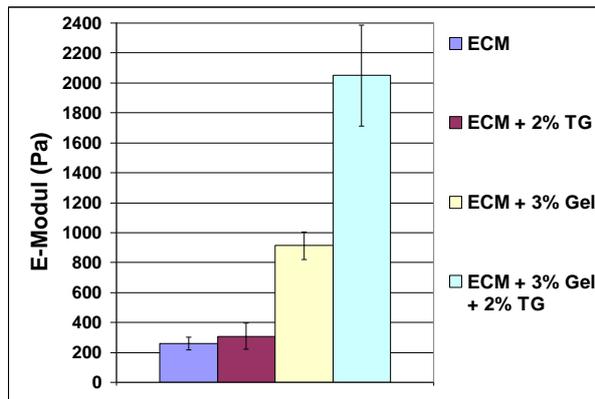


Abb. 24 A: Vorbehandlung der ECM mit TG

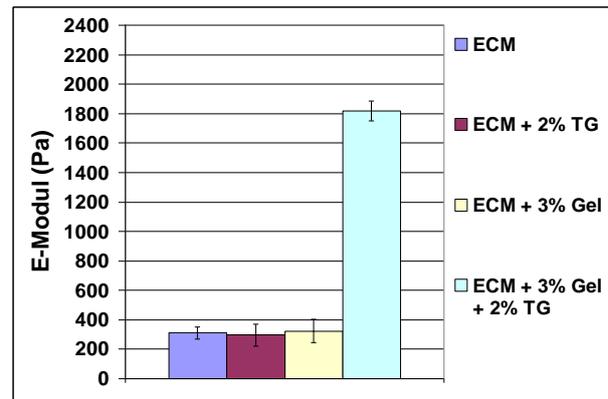


Abb. 24 B: Keine Vorbehandlung der ECM

Der Durchmesser der ECM-Zylinder lag in einem Bereich zwischen 5,3 und 5,5mm und die Länge zwischen 6,2 und 6,6 mm. Initial wurden die Matrices in einem Vakuum-Behälter im jeweiligen Medium so lange getränkt, bis alle Proben nach unten sanken. Dabei wurden vier verschiedene Medien eingesetzt: 1) DMEM-Zellmedium; 2) DMEM-Zellmedium + 2%TG; 3) DMEM-Zellmedium + 3% Gelatine; 4) DMEM-Zellmedium + 3% Gelatine + 2% TG. Nach der Vakuum-Behandlung folgte die Inkubation aller Proben in einer Petri-Schale bei 4°C für 6h. Anschließend wurden alle Proben in ein Gefäß mit DMEM-Medium gegeben und für weitere 20h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar nach Herausnehmen der Proben aus dem Brutschrank folgte die Kompressionsmessung mit einer Geschwindigkeit von 1mm/min.

Die Matrices mit der eingebrachten transglutaminase- und gelatinehaltigen Lösung zeigten bei allen Proben eine Zunahme des E-Modul um etwa das Achtfache bei den vorbehandelten Matrices und um etwa das Sechsfache bei den nicht-vorbehandelten Matrices, sofern man die Werte mit jenen vergleicht, die keines der beiden Komponenten in dem eingebrachten Medium enthielten. Die alleinige Zugabe einer Transglutaminase in das Medium bewirkte keine wesentliche Änderung des Wertes für den E-Modul. Die alleinige Zugabe von Gelatine in das Medium bewirkte eine deutliche Zunahme des E-Modul um fast das Vierfache, jedoch nur bei jenen Matrices, die einer Vorbehandlung mit einer Transglutaminase-Lösung ausgesetzt waren.

Alle Proben wurden um 90 Prozent ihrer ursprünglichen Länge komprimiert. Dabei wurde beobachtet, dass alle Matrices, in die ein transglutaminase- und gelatinehaltiges Medium eingebracht wurde, sowie alle transglutaminase-vorbehandelten Matrices, in die ein gelatinehaltiges Medium eingebracht wurde, eine im Verlauf der Kompression zunehmende Dicke annahmen. Das Volumen dieser Proben blieb somit im Verlauf der Kompression annähernd konstant. Gleiches Verhalten hatte sich bei der Kompression der freistehenden

Gelatinezylinder gezeigt. Am Ende der Kompression war die Struktur dieser Proben so weit zerstört, dass diese Veränderung der Form irreversibel war. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Kompression aller übrigen Matrices, dass es im Verlauf der Kompression zu keiner wesentlichen Dickenzunahme und somit zu einer Verringerung des Gesamtvolumens kam. Nach erfolgter Messung und Überführung der Proben in ein DMEM-Medium wurde nach einigen Stunden eine Zylinderlänge erreicht, die annähernd derjenigen Länge entsprach, die bei den jeweiligen Proben vor der Kompression gemessen wurden. Somit kam es bei der Kompression bei jenen Proben zu keiner irreversiblen Formveränderung.

Die Matrices wurden nicht nur einer Kompression, sondern auch einer Zugbelastung ausgesetzt. Hierfür wurden dieselben Gruppen, wie oben beschrieben, verwendet. Das Verfahren zur Einbringung der jeweiligen Lösung in die Matrix sowie die Art und Dauer der anschließenden Inkubation waren identisch mit den für die Kompressionsmessung beschriebenen Verfahren. Ebenfalls war ein Teil der Matrices mit einer Transglutaminase vorbehandelt worden.

Im Rahmen der Zugbelastung wurden folgende Parameter bestimmt: Der E-Modul, die maximale Zugbelastung und die maximale Zugdehnung. Die Geschwindigkeit der Zugbewegung lag bei 1mm/min.

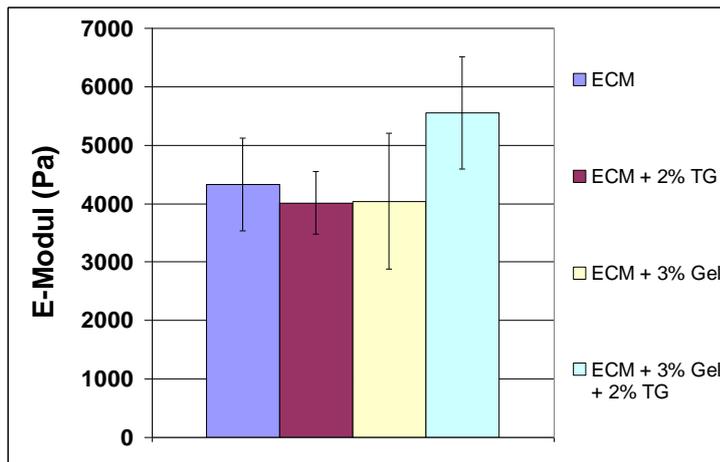


Abb. 25 A:

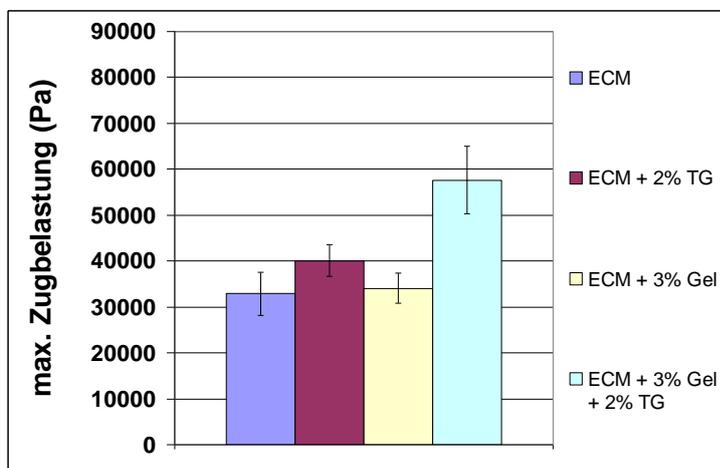


Abb. 25 B:

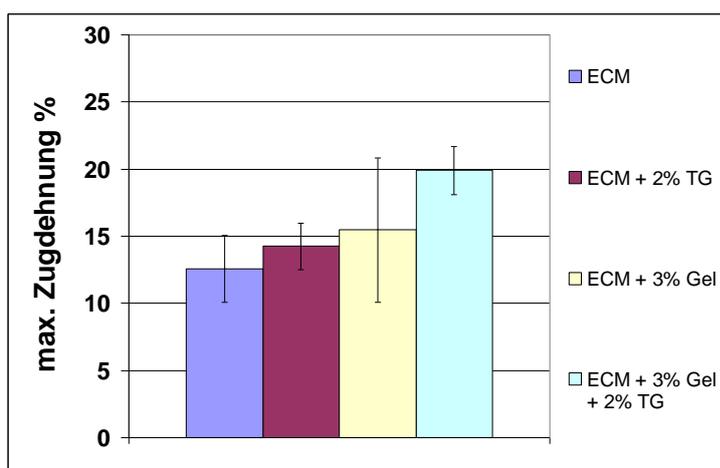


Abb. 25 C:

Abb. 25 A - C:

Zugbelastung der Matrices.

Bestimmung des E-Modul, der max. Zugbelastung und der max. Zugdehnung der ECM in Abhängigkeit einer Behandlung mit Transglutaminase und Gelatine.

Keine Vorbehandlung mit TG.

Der Durchmesser der ECM-Zylinder lag in einem Bereich zwischen 5,3 und 5,5mm und die Länge zwischen 6,2 und 6,6 mm.

Initial wurden die Matrices in einem Vakuum-Behälter im jeweiligen Medium so lange getränkt, bis alle Proben nach unten sanken. Dabei wurden vier verschiedene Medien eingesetzt: 1) DMEM-Zellmedium; 2) DMEM-Zellmedium + 2%TG; 3) DMEM-Zellmedium + 3% Gelatine; 4) DMEM-Zellmedium + 3% Gelatine + 2% TG.

Nach der Vakuum-Behandlung folgte die Inkubation aller Proben in einer Petri-Schale bei 4°C für 6h. Anschließend wurden alle Proben in ein Gefäß mit DMEM-Medium gegeben und für weitere 20h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar nach Herausnehmen der Proben aus dem Brutschrank folgte die Kompressionsmessung mit einer Geschwindigkeit von 1mm/min.

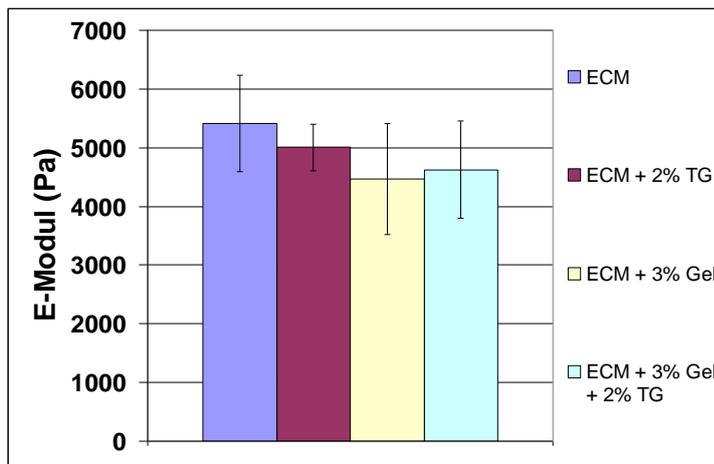


Abb. 26 A:

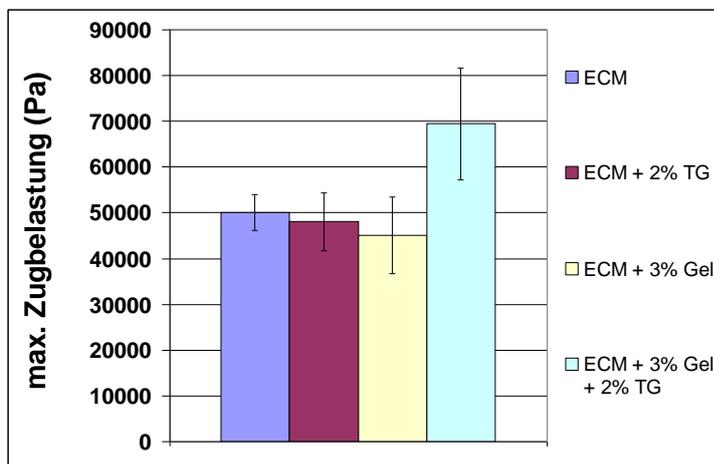


Abb. 26 B:

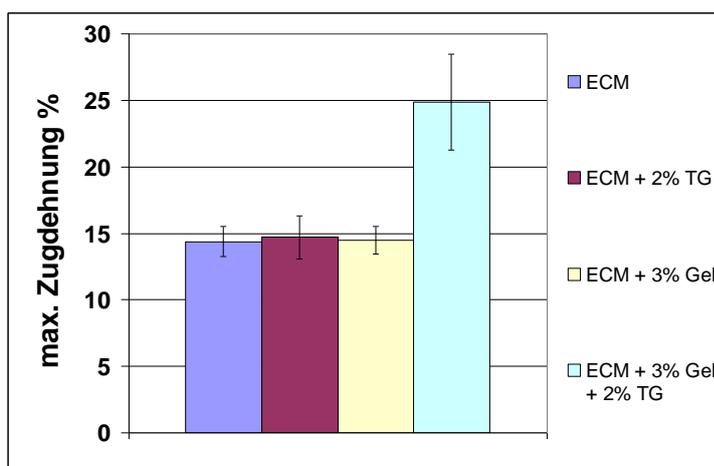


Abb. 26 C:

Abb. 26 A - C:

Zugbelastung der Matrices.

Bestimmung des E-Modul, der max. Zugbelastung und der max. Zugdehnung der ECM in Abhängigkeit einer Behandlung mit Transglutaminase und Gelatine.

Vorbehandlung der ECM mit TG.

Der Durchmesser der ECM-Zylinder lag in einem Bereich zwischen 5,3 und 5,5mm und die Länge zwischen 6,2 und 6,6 mm.

Initial wurden die Matrices in einem Vakuum-Behälter im jeweiligen Medium so lange getränkt, bis alle Proben nach unten sanken. Dabei wurden vier verschiedene Medien eingesetzt: 1) DMEM-Zellmedium; 2) DMEM-Zellmedium + 2%TG; 3) DMEM-Zellmedium + 3% Gelatine; 4) DMEM-Zellmedium + 3% Gelatine + 2% TG.

Nach der Vakuum-Behandlung folgte die Inkubation aller Proben in einer Petri-Schale bei 4°C für 6h. Anschließend wurden alle Proben in ein Gefäß mit DMEM-Medium gegeben und für weitere 20h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Unmittelbar nach Herausnehmen der Proben aus dem Brutschrank folgte die Kompressionsmessung mit einer Geschwindigkeit von 1mm/min.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Einbringung von Gelatine und Transglutaminase in die Matrix und Ausübung einer Zugbelastung auf die Proben keinen signifikanten Einfluss auf den E-Modul hatte. Bei den nicht-vorbehandelten Matrices bewirkte diese Füllung eine geringe Zunahme, bei den transglutaminase-vorbehandelten Matrices eine geringe Abnahme des E-Modul, sofern man die jeweiligen Testgruppen, die beide Komponenten im eingebrachten Medium enthielten, mit jenen vergleicht, die weder Transglutaminase noch Gelatine im eingebrachten Medium enthielten.

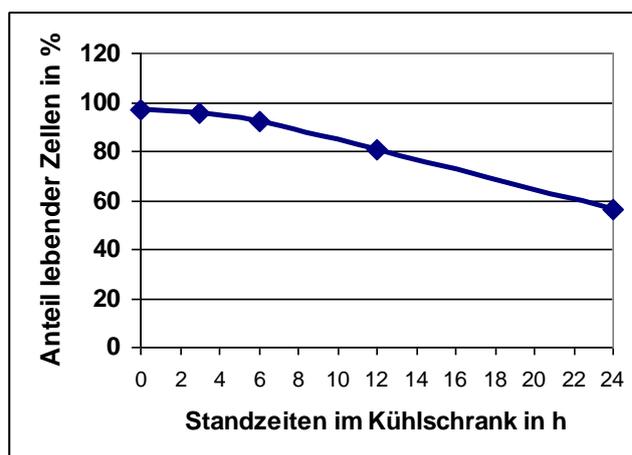
Bei Betrachtung der maximalen Zugbelastung fällt auf, dass die Vorbehandlung der Matrices mit einer Transglutaminase eine Zunahme in allen Gruppen erzielte, teilweise mit einer Signifikanz. Innerhalb beider Hauptgruppen, die sich anhand ihrer Vorbehandlung unterschieden, konnte gezeigt werden, dass die Einbringung eines transglutaminase- und gelatinehaltigen Mediums eine signifikante Zunahme der maximalen Zugbelastung bewirkte. Bei den transglutaminase-vorbehandelten Matrices lag die maximale Zugbelastung im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die keines der beiden Komponenten im eingebrachten Medium enthielt, um etwa 40% höher, bei den nicht-vorbehandelten Proben um etwa 75% höher. Die Gruppen, die nur eine der beiden Komponenten im eingebrachten Medium enthielten, zeigten keine wesentliche Änderung der maximalen Zugbelastung.

Bei Bestimmung der maximalen Zugdehnung konnte ebenfalls eine signifikante Zunahme verzeichnet werden, sofern man die Testgruppe, in die beide Komponenten eingebracht wurde, mit jener Kontrollgruppe vergleicht, die keine der beiden Komponenten im eingebrachten Medium enthielt. Bei den nicht-vorbehandelten Matrices lag der Wert der maximalen Zugdehnung bei der Testgruppe bei 20% und bei der Kontrollgruppe bei 13%. Bei den transglutaminase-vorbehandelten Proben lagen die entsprechenden Werte bei 25% bei der Testgruppe und bei 14% bei der Kontrollgruppe. Alle Matrices, die nur eine der beiden Komponenten, also nur Gelatine oder nur Transglutaminase, im eingebrachten Medium enthielten, zeigten bei Bestimmung der maximalen Zugdehnung keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe, die keine der beiden Komponenten enthielt.

### 3.2.3 Einfluss der Inkubationsdauer bei 4°C auf die Zellvitalität

Aus den Versuchen zur Bestimmung der mechanischen Stabilität von quervernetzter Gelatine konnte gezeigt werden, dass eine mehrstündige Inkubation der Gelatine-Transglutaminase-

Lösung bei niedrigen Temperaturen eine erhebliche Verbesserung der mechanischen Eigenschaften dieses Materials bewirkte. Somit ergibt sich die Frage, in welchem Maß eine Inkubation unter diesen Bedingungen einen negativen Einfluss auf Zellen hat. Im Folgenden wurden Mesenchymale Stammzellen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einem Aufenthalt bei 4°C geprüft. Eine Kultur mit 1,5 Millionen Zellen wurde in einem 1,5ml Eppendorf-Cup in 1 ml DMEM-Medium suspendiert und daraufhin auf fünf weitere 1,5ml-Cups zu jeweils 200 µl verteilt. Vier dieser fünf Proben wurden daraufhin im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die übrige Probe wurde erneut mittels einer Pipette in eine homogene Suspensionslösung gebracht. Es folgte die Anfärbung mit der Trypanblaulösung und Auszählung des Anteils lebender und toter Zellen in der Zählkammer. Die anderen Proben wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 12 und 24 Stunden aus dem Kühlschrank entnommen und ebenfalls nach gleichem Schema gefärbt und ausgezählt (Abbildung 27).



**Abb. 27:**

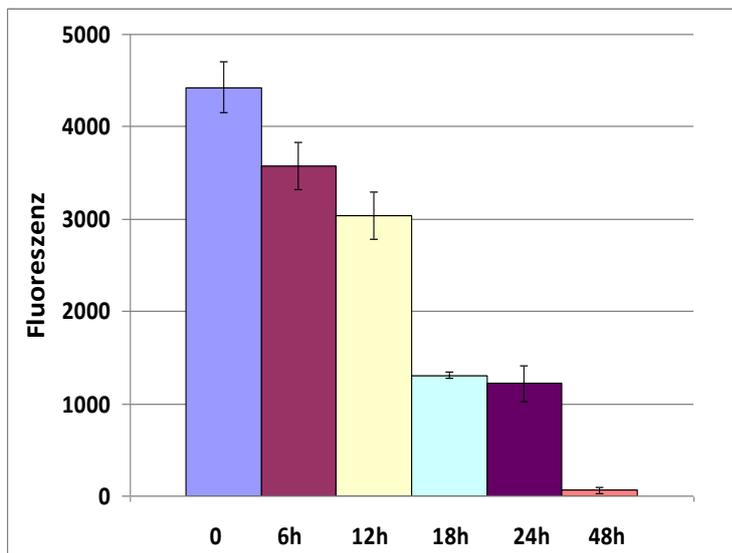
Bestimmung des Anteils lebender Zellen in Abhängigkeit von der Aufenthaltsdauer im Kühlschrank. Anfärbung mit Trypanblau.

1,5 Mio. MSCs wurden in 1 ml DMEM-Medium suspendiert und auf fünf 1,5ml-Eppendorf-Cups zu jeweils 200µl verteilt. Anschließend erfolgte die erste Zellzählung zum Zeitpunkt 0h. Hierzu wurde aus einem der fünf Cups 20 µl des enthaltenen Mediums entnommen, nachdem die Lösung mittels einer Pipette erneut homogenisiert wurde. Es folgte eine 1:1-Verdünnung mit der Trypanblaulösung und Auszählung der lebenden und toten Zellen in der Zählkammer. Die übrigen vier Proben wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und nach 3, 6, 12 und 24 Stunden nach gleichem Schema ausgezählt.

Im Verlauf kam es zu einer stetigen Abnahme des Anteils lebender Zellen. Über den betrachteten Zeitraum von 24 Stunden sank dieser Anteil von initial 97% auf 56%. Der Anteil toter Zellen nahm entsprechend zu.

Dass sich eine Aufbewahrung bei niedrigen Temperaturen negativ auf die Zellvitalität auswirkt, wurde, wie in Abbildung 28 zu sehen, außerdem durch eine Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels Resazurin verdeutlicht.

In folgendem Versuch wurden Mesenchymale Stammzellen auf sechs 24-well-plates als Monolayer-Kultur verteilt. In jedem Well waren initial 10 000 Zellen und 400 µl DMEM-Medium enthalten. Eine dieser Platten wurde als Kontrollgruppe von Beginn an in den Brutschrank zur weiteren Inkubation bei 37°C gegeben. Die übrigen Platten wurden zunächst im Kühlschrank bei 4°C gehalten. Nach unterschiedlicher Zeitdauer, nämlich nach 6, 12, 18, 24 bzw. 48 Stunden, wurde die entsprechende Platte in den Brutschrank überführt. Nach insgesamt 72 Stunden erfolgten ein Mediumwechsel und eine Fluoreszenz-Bestimmung aller Platten mittels Resazurin. Die jeweilige Inkubationsdauer im Brutschrank unterschied sich demzufolge zu diesem Zeitpunkt zwischen den einzelnen Gruppen und lag bei minimal 24 Stunden bei der 48-Stunden-Gruppe und bei maximal 72 Stunden bei der Kontrollgruppe.



**Abb. 28:**  
Metabolische Aktivität von MSCs nach initialer Kältebehandlung in Monolayer-Kultur.  
Resazurin-Fluoreszenz-Bestimmung nach 72h.

Die MSCs wurden auf sechs 24-well-plates verteilt. Pro Well waren 10 000 MSCs und 400 µl DMEM-Medium enthalten.

Eine Platte wurde anschließend in den Brutschrank bei 37°C gegeben, die übrigen fünf Platten wurden für unterschiedliche Zeiten (6h, 12h, 18h, 24h, 48h) in den Kühlschrank (4°C) gegeben und anschließend in den

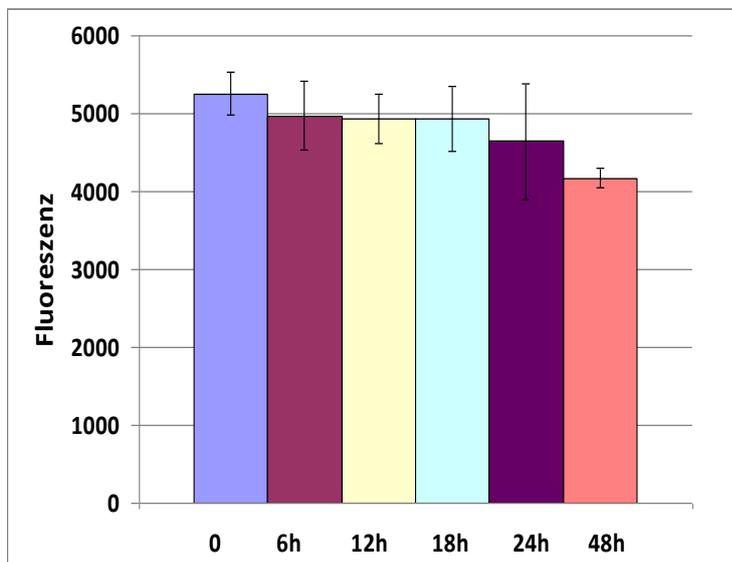
Brutschrank überführt. Nach insgesamt 72h folgte ein Mediumwechsel und eine Fluoreszenz-Messung nach Resazurinegabe.

Aus diesem Versuch wurde deutlich, dass ein Aufenthalt bei niedrigen Temperaturen sich negativ auf die metabolische Aktivität der gesamten Zellpopulation auswirkt. Eine Kultur mit Zellen, die initial 18 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt wurden, zeigte zu diesem Zeitpunkt eine Aktivität, die nur 30% der Aktivität der Zellen der Kontrollgruppe entsprach, die keiner Kälte ausgesetzt wurden. Zellen die initial 48 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt wurden, sind zu einem überwiegenden Teil gestorben, so dass hierbei eine Aktivität gemessen wurde, die unter 2% im Vergleich zur Kontrollgruppe lag.

Davon ausgehend, dass die Proliferationsrate bei 37°C wesentlich höher liegt als bei 4°C, ist es nachvollziehbar, dass sich die Gesamtzellzahl zwischen den einzelnen Gruppen zum Messzeitpunkt deutlich unterschied. Eine Bestimmung der metabolischen Aktivität lässt sich also nicht auf die einzelne Zelle, sondern nur auf die gesamte Zellpopulation beziehen.

Letztlich entscheidend für den weiteren Umgang mit niedrigen Temperaturen war jedoch nicht die Zellkultur als Monolayer, sondern als 3-D-Kultur in der quervernetzten Gelatine. In folgendem Versuch wurden Mesenchymale Stammzellen in ein TG-Medium mit 3,5% Gelatine und 1% Transglutaminase sowie 10 % bovinem Serum gegeben. Wie im vorherigen Versuch wurde diese Lösung auf sechs 24-well-plates verteilt und jeweils für eine unterschiedliche Zeitdauer, nämlich 0, 6, 12, 18, 24 bzw. 48 Stunden, im Kühlschrank bei 4°C gehalten. In jedem Well waren initial 30 000 Zellen enthalten. Um eine Adhäsion der Zellen auf dem Boden der Platte zu vermeiden, wurde im Vorfeld eine zellfreie, aber ansonsten identische Gelatine-Lösung zu jeweils 250µl auf dem Boden der Wells verteilt und zwecks Optimierung der Quervernetzung zunächst für eine Stunde in den Kühlschrank gegeben. Anschließend wurde die zellhaltige Lösung zu jeweils 200 µl auf die vorbeschichteten Wells verteilt und die Platten für die angegebenen Zeiten in den Kühlschrank überführt. Eine dieser Platten wurde sofort in den Brutschrank gegeben und entsprach der Kontrollgruppe. Die übrigen Platten wurden nach Herausnahme aus dem Kühlschrank ebenfalls im Brutschrank weiterinkubiert. Vor dem Wechsel der jeweiligen Platten in den Brutschrank bzw. nach sechs Stunden bei der Kontrollgruppe wurden 900 µl DMEM-Medium in jedes Well ergänzt. Nach

insgesamt 72 Stunden Inkubationsdauer erfolgten ein Mediumwechsel und eine Bestimmung der metabolischen Aktivität durch Resazuringabe und Fluoreszenzmessung (Abbildung 29)



**Abb. 29:**

Metabolische Aktivität von MSCs nach initialer Kältebehandlung in der 3-D-Kultur.  
Resazurin-Fluoreszenz-Bestimmung nach 72h.

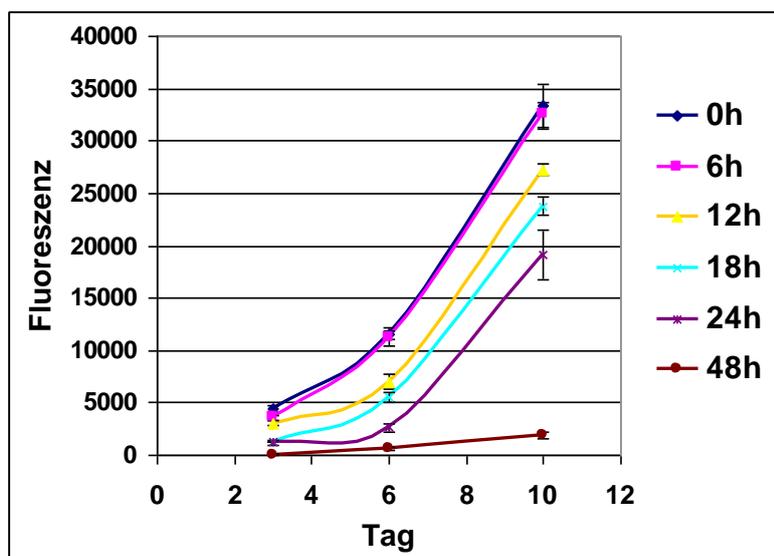
Die MSCs wurden auf sechs 24-well-plates verteilt. Pro Well waren 30 000 MSCs und insgesamt 450 µl TG-Medium incl. 3,5% Gelatine und 1% TG sowie 10% Serum enthalten. Davon wurden 250 µl verwendet, um eine zellfreie Vorbeschichtung zu erstellen. Alle Platten wurden hierzu 1 Stunde im Kühlschrank gehalten.

Eine Platte wurde anschließend in den Brutschrank bei 37°C gegeben, die übrigen fünf Platten wurden für unterschiedliche Zeiten (6h, 12h, 18h, 24h, 48h) in den Kühlschrank (4°C) gegeben und anschließend in den Brutschrank überführt. Nach insgesamt 72h folgte ein Mediumwechsel und eine Fluoreszenz-Messung nach Resazuringabe.

Im Unterschied zu den Zellen, die in einer Monolayer-Kultur niedrigen Temperaturen ausgesetzt wurden, schienen die Zellen, die in einer 3-D-Kultur in quervernetzter Gelatine gehalten wurden, eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber der Kälte zu haben. Nur bei der 48-Stunden-Gruppe zeigte sich in diesem Versuch eine deutlich niedrigere metabolische Aktivität. Hierbei muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass nicht die Aktivität der einzelnen Zelle, sondern die der gesamten Zellkultur bestimmt wird.

Um den weiteren Verlauf der metabolischen Aktivität dieser Zellen zu betrachten, erfolgten weitere Resazurin-Fluoreszenz-Bestimmungen nach sechs und zehn Tagen.

In Abb. 30 ist eine Betrachtung der weiteren Entwicklung der metabolischen Aktivität jener Zellkulturen zu sehen, die bereits in Abb. 28 beschrieben und dort zum Messzeitpunkt '72 Stunden' dargestellt wurden. In folgender Abbildung sind die darüber hinaus erfolgten Ergebnisse der Fluoreszenz-Messungen nach sechs und zehn Tagen als Liniendiagramm dargestellt.



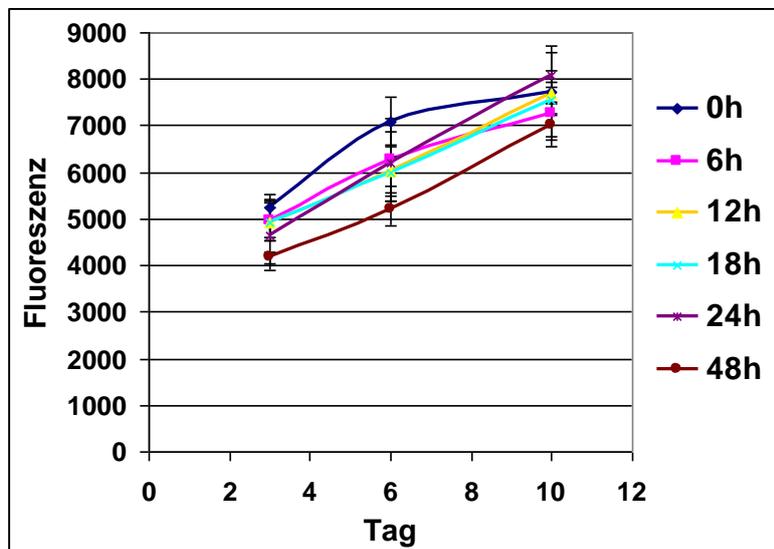
**Abb. 30:**  
Metabolische Aktivität von MSCs nach initialer Kältebehandlung in Monolayer-Kultur.  
Resazurin-Fluoreszenz-Bestimmung nach 3d, 6d und 10d.

Versuchsaufbau nach gleichem Schema, wie in Abb. 28 beschrieben.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die metabolische Aktivität von Monolayer-Kulturen nach 72 Stunden Gesamtkubationszeit umso geringer war, je länger die Zellen zuvor einer Temperatur von 4°C exponiert waren. Bei anschließend konstanten Bedingungen im Brutschrank zeigte sich in den folgenden Tagen in allen Gruppen eine im Verlauf zunehmende metabolische Aktivität, so dass sich der anfängliche Kälteeinfluss langfristig nicht negativ auf das Wachstumsverhalten auszuwirken scheint. Die anfängliche von der Kälte-dauer abhängige Aktivitätsminderung blieb jedoch im betrachteten Zeitraum von zehn Tagen erhalten, so dass die Kontrollgruppe, die keiner Kältebehandlung unterzogen wurde, zu jedem Zeitpunkt die maximale Aktivität aufwies.

In Abbildung 31 wird der aus Abbildung 29 bekannte Versuchsaufbau der 3-D-Zellkultur betrachtet, wobei hier die Messergebnisse der bekannten Versuchsgruppen zu denselben drei

Messzeitpunkten dargestellt werden, wie aus vorigem die Monolayer-Kultur betreffenden Versuchsteil bekannt, nämlich nach drei, sechs und zehn Tagen.



**Abb. 31:**  
Metabolische Aktivität von MSCs nach initialer Kältebehandlung in der 3-D-Kultur.  
Resazurin-Fluoreszenz-  
Bestimmung nach 3d, 6d und 10d.

Versuchsaufbau nach gleichem Schema, wie in Abb. 29 beschrieben.

Die anfängliche von der initialen Kältebehandlung abhängige Aktivitätsminderung war bei den 3-D-Kulturen bereits relativ gering im Vergleich zu den Monolayer-Kulturen. Im weiteren Verlauf zeigte sich sogar, dass eine längere initiale Kältebehandlung sich positiv auf die Entwicklung der metabolischen Aktivität auswirkte. Nach zehn Tagen Gesamtkubationsdauer wies die 24-Stunden-Gruppe die maximale Aktivität auf. Die Zellen der 48-Stunden-Gruppe zeigten nach zehn Tagen zwar die geringste metabolische Aktivität, brachten aber die zweithöchste Wachstumsrate hervor, sofern man den Zehn-Tages-Wert mit dem Ausgangswert zum Zeitpunkt 'Drei Tage' vergleicht und somit die Wachstumsrate über sieben Tage bestimmt. Diese lag hier mit 67% hinter dem Spitzenwert der Wachstumsrate der 24-Stunden-Gruppe (74%). Die Wachstumsraten der Kontrollgruppe (47%) und der Sechs-Stunden-Gruppe (46%) ergaben die niedrigsten Werte. Die Wachstumsrate der 12-Stunden-Gruppe ergab 56%, die der 18-Stunden-Gruppe 53%.

### 3.2.4 Einfluss der Transglutaminase und des Maltodextrin auf die Zellvitalität

Nachdem bereits im Kapitel 3.2.1.2 verdeutlicht wurde, dass die Gelatine hinsichtlich ihrer Stabilität von einer möglichst hohen Konzentration der Transglutaminase profitiert, wird hiermit der Frage nachgegangen, ob die Art und Konzentration der Transglutaminase auch einen Einfluss auf die Zellvitalität von Mesenchymalen Stammzellen hat. Neben der Transglutaminase von Ajinomoto wurde hierfür die rekombinante bakterielle Transglutaminase von Zedira (T001) verwendet. Die Zellen wurden in Suspension gebracht und auf die vorbereiteten Lösungen verteilt. Als Lösungsmittel wurde das Transglutaminase-Medium verwendet. Bezüglich der Ajinomoto-Transglutaminase wurden die Konzentrationen 0,5%, 1%, 2%, 4% und 8% hergestellt. Die rekombinante bakterielle Transglutaminase von Zedira wurde nach Kontrolle der enzymatischen Aktivität mittels des Kasein-Dansylcadaverin-Fluoreszenztests auf Konzentrationen mit den entsprechenden Aktivitätswerten von 0,5 U/ml, 1 U/ml und 2 U/ml zubereitet. Die enzymatischen Aktivitäten dieser Lösungen entsprachen den Lösungen der Ajinomoto-Transglutaminase mit den Konzentrationen 0,5%, 1% bzw. 2%, wie wir sowohl nach Herstellerangabe als auch nach mehreren eigenen im Vorfeld durchgeführten enzymatischen Tests für die Ajinomoto-Transglutaminase wussten und somit errechnen konnten (vgl. Tabelle 3). Als weitere Versuchsgruppen wurden Lösungen mit transglutaminase-freiem Maltodextrin in den Konzentrationen 0,5%, 1%, 2%, 4% und 8% hergestellt.

Als Kontroll-Gruppe wurde ebenfalls das glutaminfreies Medium verwendet. In einer zusätzlichen Gruppe wurde glutaminhaltiges DMEM-Medium eingesetzt.

Alle Lösungen wurden auf zwei 96-well-plates verteilt. In jedem Well befanden sich initial 3000 Zellen auf 110 µl.

Zunächst wurden die Platten für sechs Stunden in den Kühlschrank (4°C) gegeben. Anschließend wurden in jedes Well 220 µl DMEM-Medium gegeben. Die in den einzelnen Gruppen verwendeten Mengen an der jeweiligen Transglutaminase bzw. an Maltodextrin wurden somit um den Faktor 2:1 verdünnt. Die weitere Inkubation fand im Brutschrank bei 37°C statt.

Nach weiteren 18 Stunden, also nach insgesamt 24 Stunden Gesamtinkubationszeit, erfolgten ein Mediumwechsel und eine Resazuringabe zur Prüfung der metabolischen Aktivität der einzelnen Zellkulturen. Nach drei, sieben und zehn Tagen wurden weitere Medienwechsel sowie Resazurin-Fluoreszenz-Tests durchgeführt.

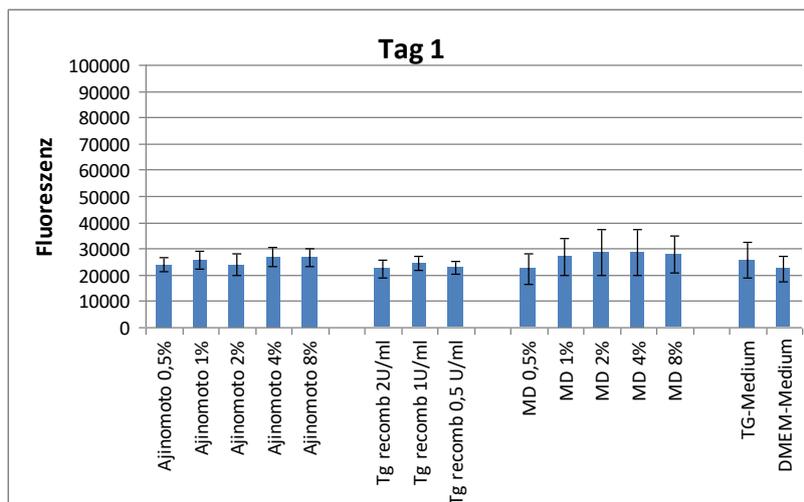


Abb. 32 A:

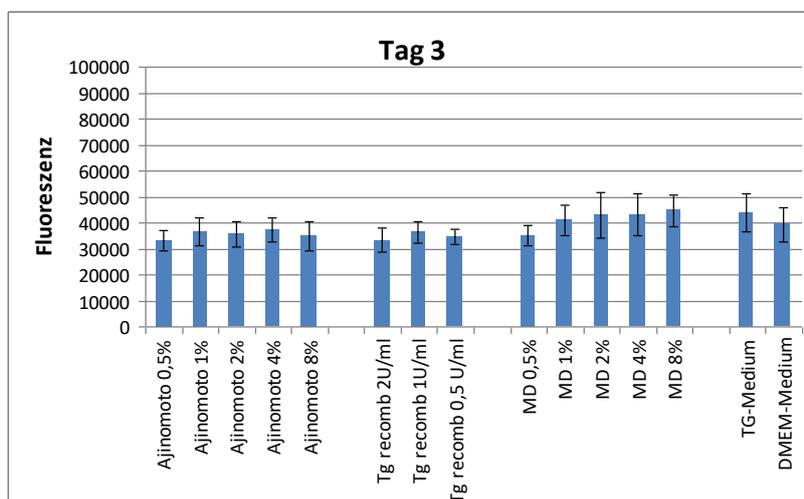


Abb. 32 B:

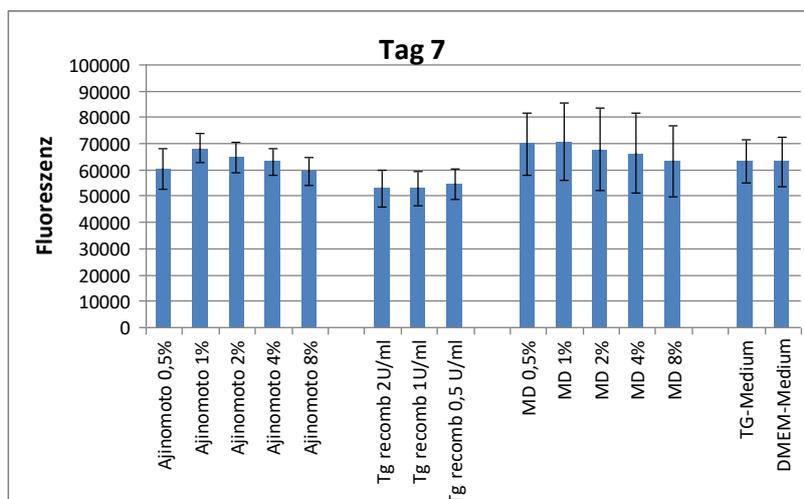


Abb. 32 C:

Abb. 32 A - D:

Metabolische Aktivität von MSCs in Ahhängigkeit von der Transglutaminase in der Monolayer-Kultur  
Resazurin-Fluoreszenz-Bestimmung nach 1, 3, 7 bzw. 10 Tagen.

Die MSCs wurden auf zwei 96-well-plates verteilt. Pro Well waren initial 3 000 MSCs enthalten.

In den Wells waren folgende Lösungen enthalten:

Ajinomoto-TG: 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8%;

recombinante TG von Sigma: 2U/ml, 1U/ml, 0,5U/ml;

Maltodextrin (MD) 0,5%, 1%, 2%, 4%, 8%;

Als Lösungsmittel wurde das glutaminfreie Transglutaminase-Medium (TG-Medium) verwendet.

Als Kontroll-Gruppe wurde ebenfalls das Transglutaminase-Medium verwendet. In einer zusätzlichen Gruppe wurde DMEM-Medium von Beginn an eingesetzt.

Das anfängliche Volumen betrug 110 µl pro Well.

Alle Platten wurden nach Verteilen der jeweiligen

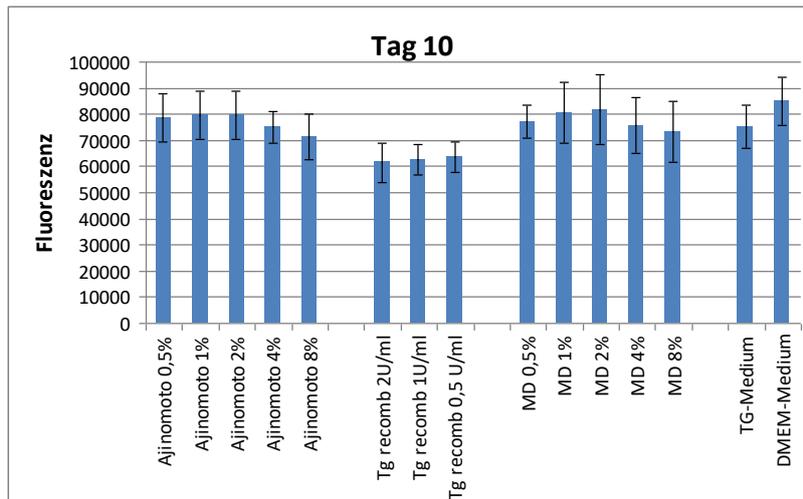


Abb. 32 D

Lösungen zunächst für 6 Stunden in den Kühlschrank bei 4°C gestellt.

Anschließend wurden in jedes Well 220 µl DMEM-Medium ergänzt. Die Platten wurden in den Brutschrank überführt.

Nach insgesamt 24 Stunden (Tag 1) sowie nach 3, 7 und 10 Tagen erfolgten Medienwechsel und eine Fluoreszenz-Messung nach Resazuringabe.

Nach verschiedenen Tests zur Prüfung des Einflusses der Transglutaminase auf die Vitalität von Mesenchymalen Stammzellen konnten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestätigt werden. Die Transglutaminase scheint in den verwendeten Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität von Zellen in Suspension oder in einer Monolayer-Kultur zu haben. Dies gilt sowohl für die akute Exposition als auch für die anschließende langfristige Entwicklung.

Die Transglutaminase von Sigma deutete zwar in einzelnen Versuchen auf einen leichten negativen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen hin; jedoch konnte dieser nicht eindeutig bestätigt werden. Das für die Konservierung der Aliquots enthaltene Glycerin hatte in den verwendeten Konzentrationen ebenfalls keinen toxischen Einfluss auf die Zellen, wie in gesonderten Versuchen gezeigt werden konnte.

Einzelne Versuche wiesen sogar auf eine Zunahme der metabolischen Aktivität in den ersten Tagen nach Exposition mit der Ajinomoto-Transglutaminase hin. Dies traf auch für die Exposition mit transglutaminase-freiem Maltodextrin zu. Nach Beobachtung über mehrere Tage hatte sich diese Erscheinung ausgeglichen, so dass auch eine Verabreichung von Maltodextrin am ersten Tag des Versuches sich langfristig nicht signifikant auf die Zellvitalität auswirkte.

Es konnte außerdem bestätigt werden, dass die Verwendung des glutaminfreien Transglutaminase-Medium über maximal 24 Stunden im Vergleich zum DMEM-Medium sich weder kurz- noch langfristig auf die Zellvitalität signifikant auswirkte.

Der Einfluss der Ajinomoto-Transglutaminase auf die Vitalität Mesenchymaler Stammzellen wurde auch in der 3-D-Kultur getestet. Hierbei war es nicht möglich, eine transglutaminase-freie Gruppe als Kontrollgruppe zu testen, da die Transglutaminase für den Erhalt einer dreidimensionalen Struktur der Gelatine bei 37°C essentiell ist. Somit konnten nur Gruppen mit verschiedenen Konzentrationen an Transglutaminase untereinander verglichen werden. Die gewählten Konzentrationen lagen bei 0,5%, 1%, 2% und 4%. Von der Gelatine wurden jeweils zwei verschiedene Konzentrationen geplant, nämlich 3% und 5%, so dass insgesamt acht verschiedenen Gruppen zum Einsatz kamen. Von jeder Gruppe wurden 16 Proben angefertigt. Diese entsprachen dem Volumen 100µl und wurden in die Wells einer 96-Konus-Well-Platte eingebracht. Pro Well waren initial 150 000 Zellen enthalten. Zunächst wurden die Proben für 24 Stunden im Kühlschrank gehalten. Anschließend wurden sie mit einem Spatel aus der Platte herausgelöst und einzeln in ein Well einer 24-Well-Platte überführt. In jedes Well wurde 1 ml DMEM-Medium ergänzt. Die Inkubation wurde im Brutschrank fortgesetzt. Am folgenden Tag (Tag 2) wurden nach einem Mediumwechsel von jeder Gruppe vier Proben ausgewählt, um eine Bestimmung der metabolischen Aktivität durchzuführen. Hierzu wurde in die Wells der ausgewählten Proben Resazurin gegeben; nach dreistündiger Inkubationszeit wurden aus den entsprechenden Wells zweimal 100 µl Medium zur Bestimmung der Fluoreszenz entnommen. Nach der Fluoreszenz-Messung wurden die Proben fixiert. Die übrigen Proben wurden nach 7, 14 und 28 Tagen mit der gleichen Methode auf ihre Aktivität getestet.

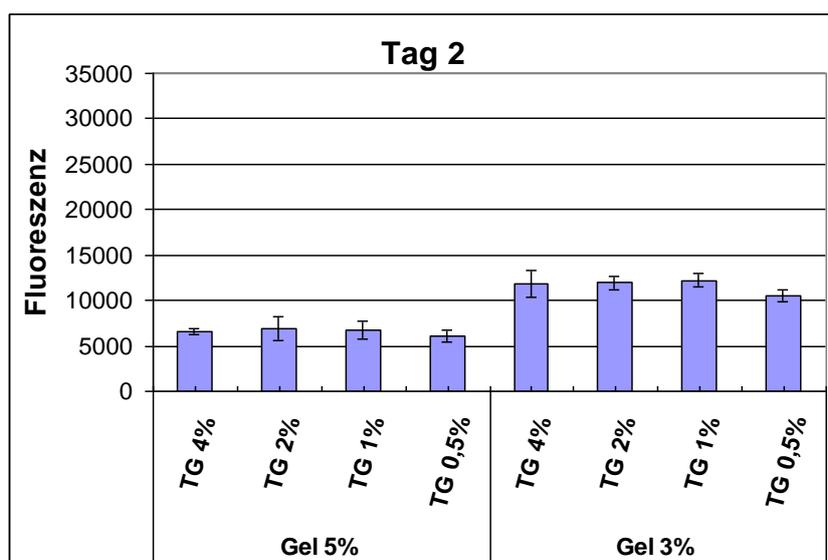


Abb. 33 A:

Abb. 33 A - D:

Metabolische Aktivität von MSCs in Abhängigkeit von der Ajinomoto-Transglutaminase in der 3D-Kultur. Resazurin-Fluoreszenz-Bestimmung nach 2, 7, 14 bzw. 28 Tagen.

Die MSCs wurden auf 96-konus-well-plates verteilt. Pro Well waren initial 150 000 MSCs auf

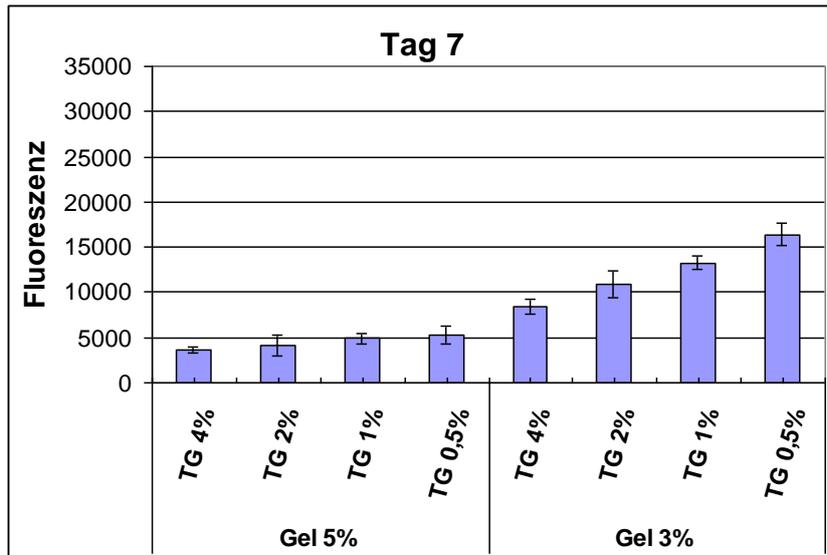


Abb. 33 B:

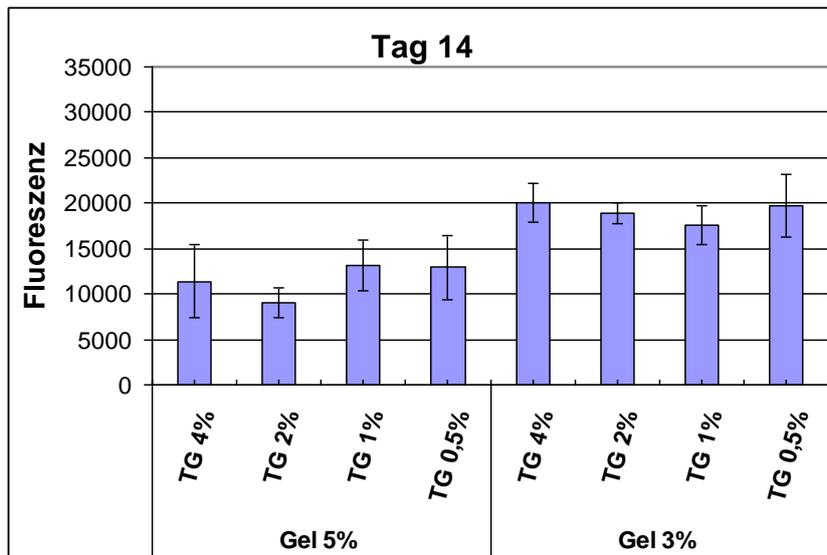


Abb. 33 C:

100 µl Gelatine-TG-Lösung enthalten.

Es wurden 8 Gruppen getestet, die sich in der Konzentration der Gelatine- und Transglutaminasekonzentration unterschieden:

1. Gel 3%, TG 0,5%
2. Gel 3%, TG 1%
3. Gel 3%, TG 2%
4. Gel 3%, TG 4%
5. Gel 5%, TG 0,5%
6. Gel 5%, TG 1%
7. Gel 5%, TG 2%
8. Gel 5%, TG 4%

Von jeder Gruppe wurden 16 Proben angefertigt. Als Lösungsmittel wurde das TG-Medium verwendet.

Alle Proben wurden zunächst für 24 Stunden im Kühlschrank bei 4°C gehalten. Anschließend wurden die Proben von den Konus-Wells in 24-well-plates zu jeweils 1 Probe pro Well

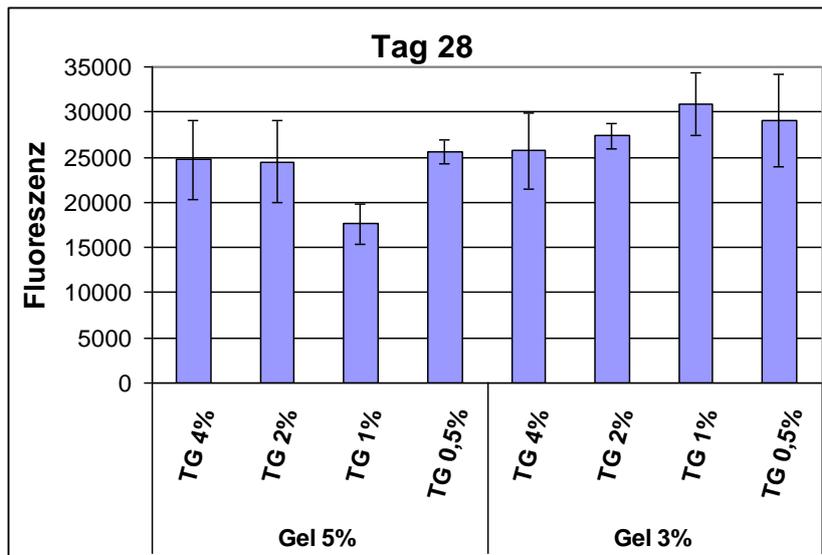


Abb. 33 D:

überführt. In jedes Well wurde 1 ml DMEM-Medium ergänzt. Die weitere Inkubation fand im Brutschrank bei 37°C statt.

Zu den Zeitpunkten 2, 7, 14 und 28 Tagen wurden von jeder Gruppe vier Proben verwendet, um eine Inkubation mit Resazurin und anschließende Fluoreszenz-Messung durchzuführen.

Zum ersten Messzeitpunkt (Tag 2) traten keine signifikanten Unterschiede der Fluoreszenz-Werte innerhalb einer Hauptgruppe mit gleicher Konzentration an Gelatine und verschiedenen Konzentrationen an Transglutaminase auf. Erst an Tag 7 fiel auf, dass sich höhere Konzentrationen an Transglutaminase negativ auf die Entwicklung der metabolischen Aktivität der jeweiligen Zellkulturen auswirkten. Insbesondere bei den Gruppen mit 3%iger Gelatine fielen die Unterschiede deutlich aus. Im weiteren Verlauf glichen sich diese Unterschiede wieder aus, so dass diese Erscheinung bereits an Tag 14 nicht mehr erkennbar war. Auch an Tag 28 war keine Abhängigkeit der metabolischen Aktivität von der gewählten Transglutaminase-Konzentration anzunehmen. Lediglich die Gruppe 'Gel 5%, TG 1%' fiel mit einem signifikanten Unterschied negativ aus der Reihe und erbrachte zu diesem Zeitpunkt die geringsten Werte. Die Zellkultur mit der höchsten metabolischen Aktivität nach 28 Tagen war die Gruppe 'Gel 3%, TG 1%'.

Die relative Zunahme der metabolischen Aktivität innerhalb des Zeitraumes zwischen Tag 2 und Tag 28 war in den Gruppen mit der 5%igen Gelatine höher als in den Gruppen mit der 3%igen Gelatine. Die Tatsache, dass die absoluten Werte bei den Gruppen mit 3%iger Gelatine höher als bei den Proben mit 5%iger Gelatine waren, kann einfach dadurch erklärt werden, dass bei niedriger konzentrierter Gelatine bessere Diffusionsbedingungen für das Resazurin vorliegen und somit eine höhere Stoffwechselaktivität der Zellen vorgetäuscht wird. Darum ist ein Vergleich zwischen Gruppen mit unterschiedlichen Gelatinekonzentrationen nur anhand des beobachteten Zuwachses der Stoffwechselaktivität

im Zeitverlauf sinnvoll und nicht anhand der Messergebnisse zu einem bestimmten Zeitpunkt möglich.

Die größte relative Zunahme erfolgte in der Gruppe 'Gel 5%, TG 0,5%'. Dort nahm die metabolische Aktivität um den Faktor 4,2 zu. Innerhalb der Gruppen mit 3%iger Gelatine nahm die Aktivität der Gruppe 'Gel3%, TG 0,5%' am meisten zu, nämlich um den Faktor 2,8. Als Schlussfolgerung kann gesagt werden, dass die Transglutaminase auch in höheren Konzentrationen keinen wesentlichen wachstumshemmenden Einfluss auf die Zellen hat. Das Bevorzugen zu niedriger Konzentrationen des Enzyms scheint also nicht von relevantem Nutzen im Sinne der Zellvitalität zu sein.

### 3.2.5 Einfluss der Gelatine auf die Zellvitalität

Im vergangenen Kapitel 3.2.4 wurde der Einfluss der variablen Konzentrationen der Gelatine und Transglutaminase auf die Zellvitalität getestet. Dabei wurden die zellhaltigen Gele in freischwimmender Form eingesetzt.

In folgendem Versuch wurden die Zellen als 3-D-Kultur in Form einer Bodenbeschichtung in 24-well-plates verwendet. Um einen direkten Zellkontakt mit dem Boden zu vermeiden, was zu einem abweichenden Verhalten der Zellen führen könnte, wurde zunächst eine zellfreie Gelschicht gegossen, worauf sandwichartig eine weitere Schicht gegeben wurde, in der die komplette Menge an Zellen enthalten war.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass in der kommerziellen Gelatine technologisch bedingte Verunreinigungen verblieben sind, haben wir geprüft, ob die Zellfreundlichkeit der Gelatine durch zusätzliche Spülschritte verbessert werden kann beschrieben. Hierbei wurde die Gelatine in 3 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Sterilisierung erfolgte hierbei durch Filtration.

Zusätzlich wurde geprüft, ob eine alternative Methode der Sterilisation mittels Gamma-Strahlen einen Vorteil für die Zellvitalität bietet.

Bei der gamma-sterilisierten Gelatine war die Verwendung einer Konzentration unter 3% nicht möglich, weil dadurch keine ausreichende Stabilität erreicht werden konnte.

Somit lassen sich folgende Gruppen unterscheiden:

- 1,5% ungewaschen, sterilfiltriert
- 3% ungewaschen, sterilfiltriert

- 5% ungewaschen, sterilfiltriert
- 1,5% gewaschen, sterilfiltriert
- 3% gewaschen, sterilfiltriert
- 5% gewaschen, sterilfiltriert
- 3% ungewaschen, gamma-sterilisiert
- 5% ungewaschen, gamma-sterilisiert

Initial waren 30000 Zellen pro Well vorhanden. Die Konzentration der Ajinomoto-Transglutaminase betrug in allen Lösungen 2%. Das Gesamtvolumen der beiden Schichten betrug 450 µl.

Alle Proben wurden zunächst 24 Stunden im Kühlschrank gehalten, danach wurden in jedes Well 900 µl DMEM-Medium ergänzt. Die weitere Inkubation fand im Brutschrank bei 37°C statt. Nach insgesamt zwei Tagen folgten ein Mediumwechsel und die Bestimmung der metabolischen Aktivität durch Resazuringabe.

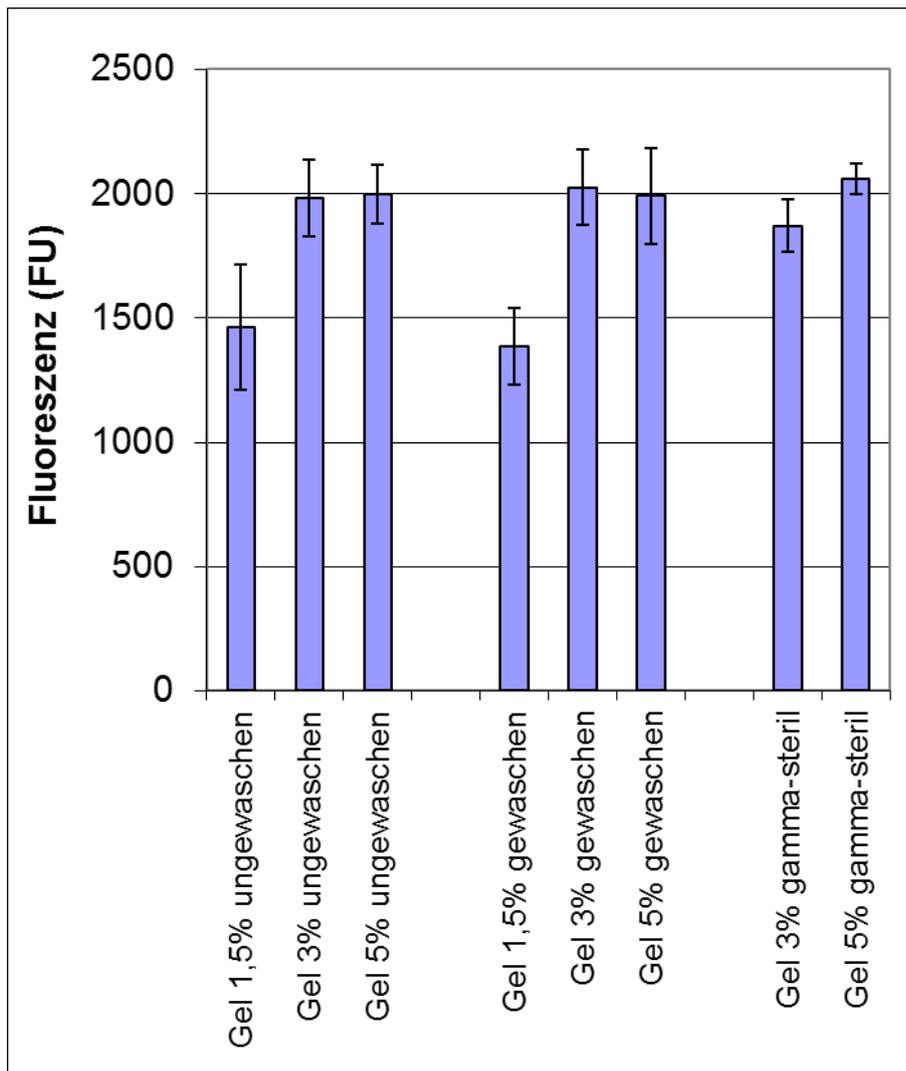


Abb. 34:

Metabolische  
Aktivität von MSCs in  
Abhängigkeit von der  
Konzentration und  
Behandlung der  
Gelatine in der 3D-  
Kultur.

Resazurin-Fluoreszenz-  
Bestimmung nach 2  
Tagen.

Die Ergebnisse zeigen, dass weder eine Vorbehandlung der Gelatine durch mehrmaliges Waschen noch die Art der Sterilisation einen entscheidenden Einfluss auf die Vitalität der Zellen haben. Die Gruppen mit der 1,5%igen Gelatinekonzentration zeigten im Vergleich zu den höherprozentigen Gruppen eine signifikant niedrigere metabolische Aktivität. Zwischen den Gruppen mit 3%iger und 5%iger Gelatinekonzentration deutete sich lediglich bei den gammasterilisierten Proben ein Unterschied zugunsten der 5%igen Gelatine an. Dieser Unterschied wurde auch in weiteren Versuchen, die in dieser Form der Bodenbeschichtung gestaltet wurden, bestätigt.

In allen Versuchen, in denen die Ergebnisse der Zellvitalität in Gelatine zwischen Gruppen unterschiedlicher Gelatinekonzentrationen verglichen wurden, konnte kein Hinweis auf einen negativen Einfluss höherprozentiger Gelatine auf die Zellen erkannt werden. Dies konnte auch im Kapitel 3.2.4 dargestellt werden.

### 3.2.6 Histologische Betrachtung der Mesenchymalen Stammzellen in der 3-D-Kultur

Alle Proben des Versuches aus dem Kapitel 3.2.4 wurden fixiert und histologisch untersucht. Es wurde eine HE-Färbung verwendet. In den Abbildungen 35 A - D sind Histoschnitte nach 2-, 7-, 14- und 28-tägiger Inkubation in 3%iger Gelatine und 2%iger Transglutaminase dargestellt.

#### Tag 2

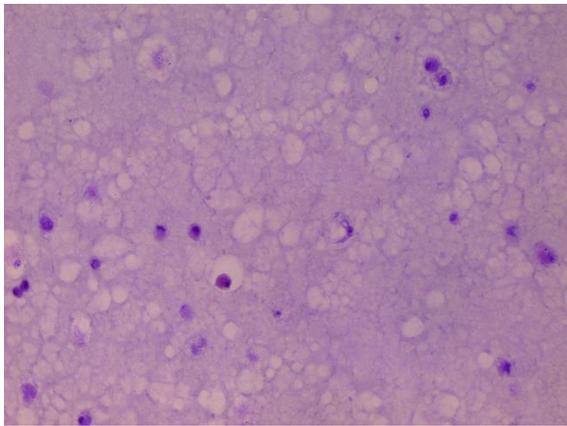


Abb. 35 A:

#### Tag 7

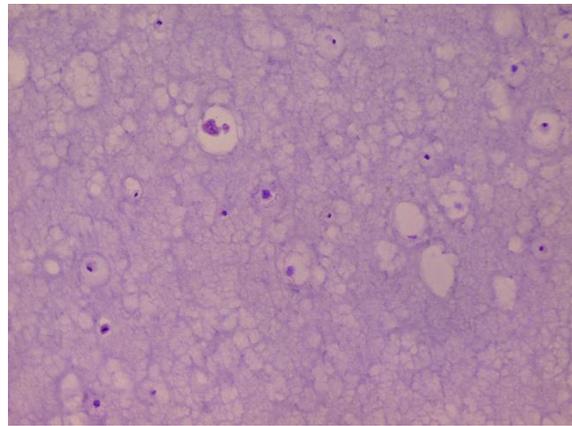


Abb. 35 B:

#### Tag 14

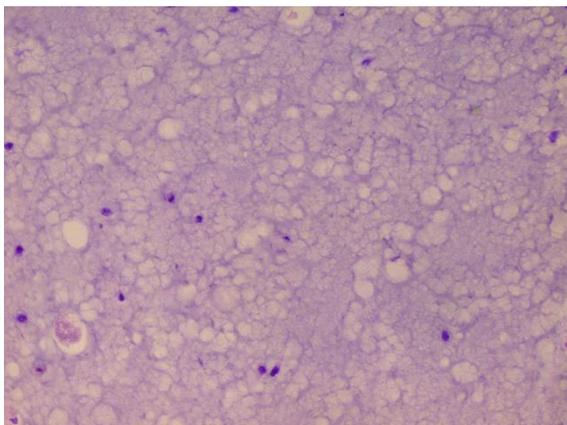


Abb. 35 C:

#### Tag 28

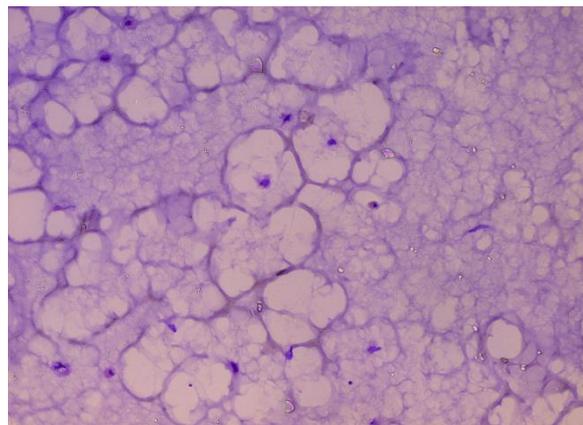
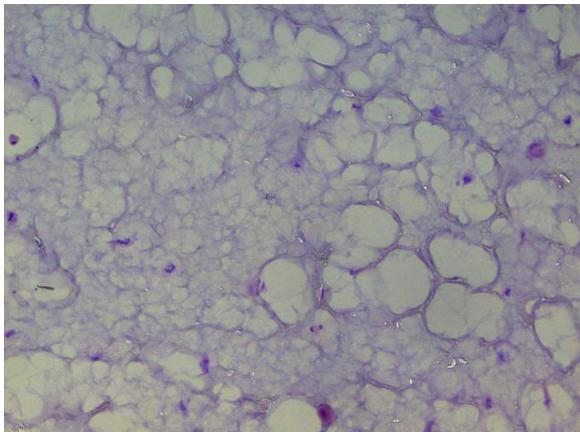


Abb. 35 D:

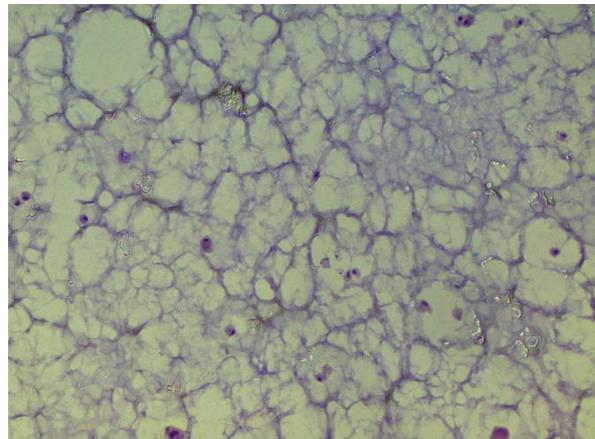
**Abb. 35 A – D:** HE-Färbung Mesenchymaler Stammzellen nach 2, 7, 14 und 28 Tagen. Inkubation in quervernetzter Gelatine (3% Gelatine, 2% Transglutaminase)

Es ist zu erkennen, dass es im Verlauf zu keiner deutlichen Hyperplasie der Zellen kam. Nur vereinzelt waren Zellen in einer Mitosephase zu finden. Vor allem zu den Zeitpunkten '2 Tage' und '7 Tage' waren einige pyknotische Zellen erkennbar. Nach 14 Tagen bildeten sich Pseudopodien in Form von Zytoplasmaausstülpungen aus. Die Gel-Matrix zeigte sich nicht als eine homogene Einheit, sondern als ein poröses Gewebe. Die Poren nahmen im Verlauf an Größe zu, wobei es gleichzeitig zu Verdichtungen der umliegenden Matrix kam, wie es vor allem zum Zeitpunkt '28 Tage' zu erkennen ist. Der Großteil aller Zellen hielt sich innerhalb dieser Poren auf. Ein kleinerer Anteil der Zellen war auch innerhalb der Matrix zu finden.

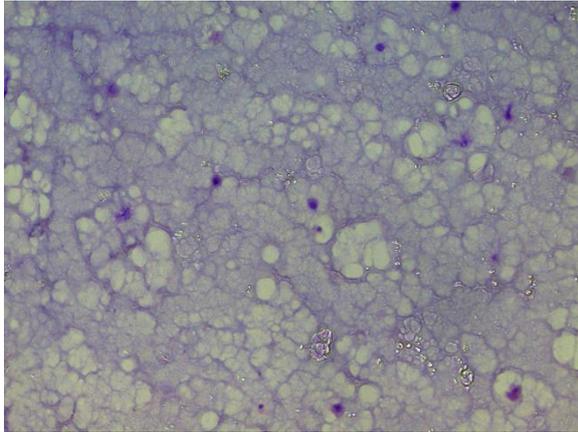
Zum Zeitpunkt '28 Tage' zeigten sich in allen Gruppen unabhängig von der Gelatine- und Transglutaminasekonzentration vitale Zellen mit teilweise lobären Zytoplasmaausläufern. Aufgrund der inhomogenen Struktur der Gelatine, die durch Poren und Verdichtungen geprägt ist, ist eine Zellzählung erschwert. Zwischen den einzelnen Gruppen fallen hierbei keine Unterschiede in der Zelldichte auf (Abbildung 36 A - H).



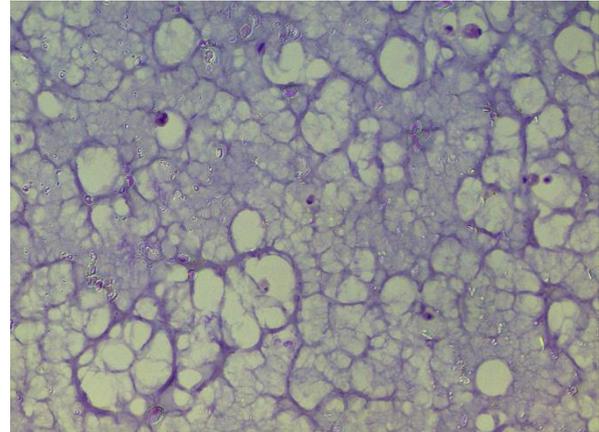
**Abb. 36 A:** 3% Gelatine, 0,5% Transglutaminase



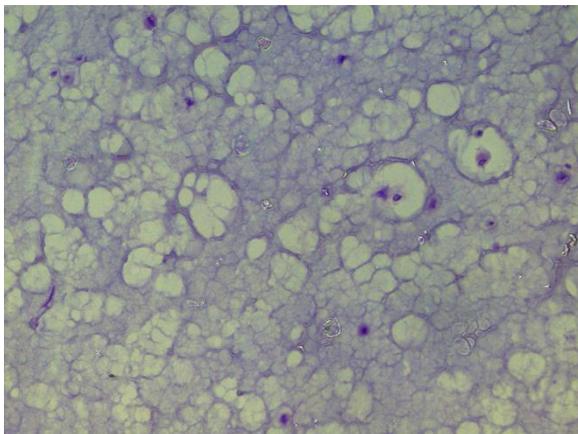
**Abb. 36 B:** 5% Gelatine, 0,5% Transglutaminase



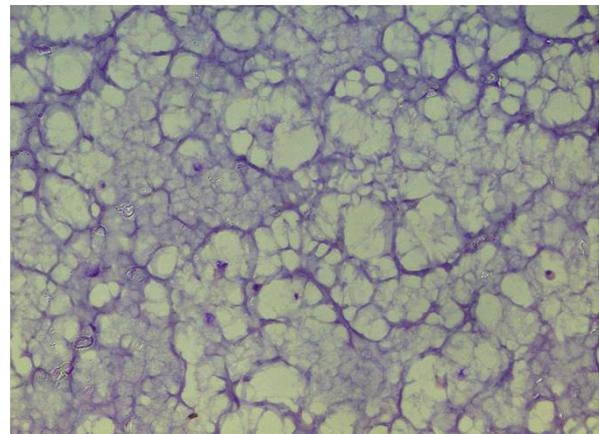
**Abb. 36 C:** 3% Gelatine, 1% Transglutaminase



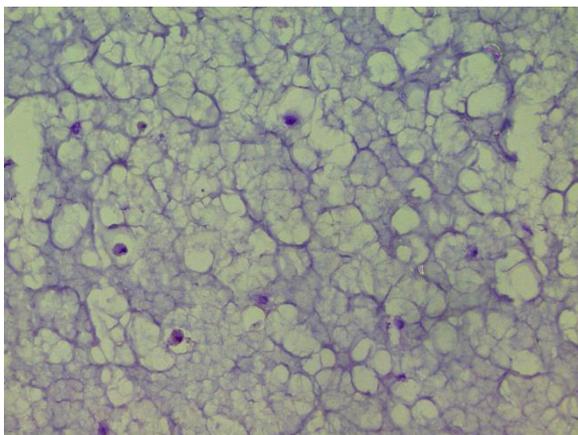
**Abb. 36 D:** 5% Gelatine, 1% Transglutaminase



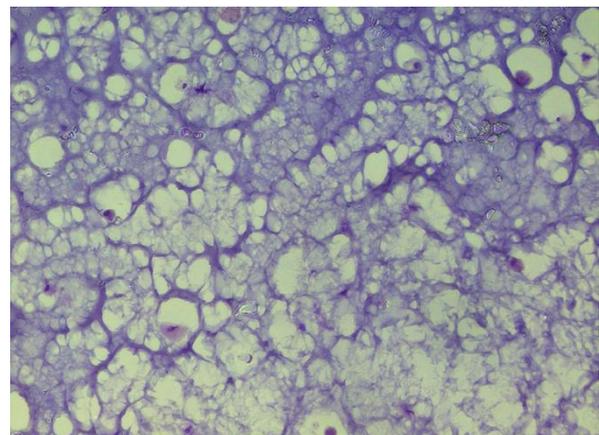
**Abb. 36 E:** 3% Gelatine, 2% Transglutaminase



**Abb. 36 F:** 5% Gelatine, 2% Transglutaminase



**Abb. 36 G:** 3% Gelatine, 4% Transglutaminase



**Abb. 36 H:** 5% Gelatine, 4% Transglutaminase

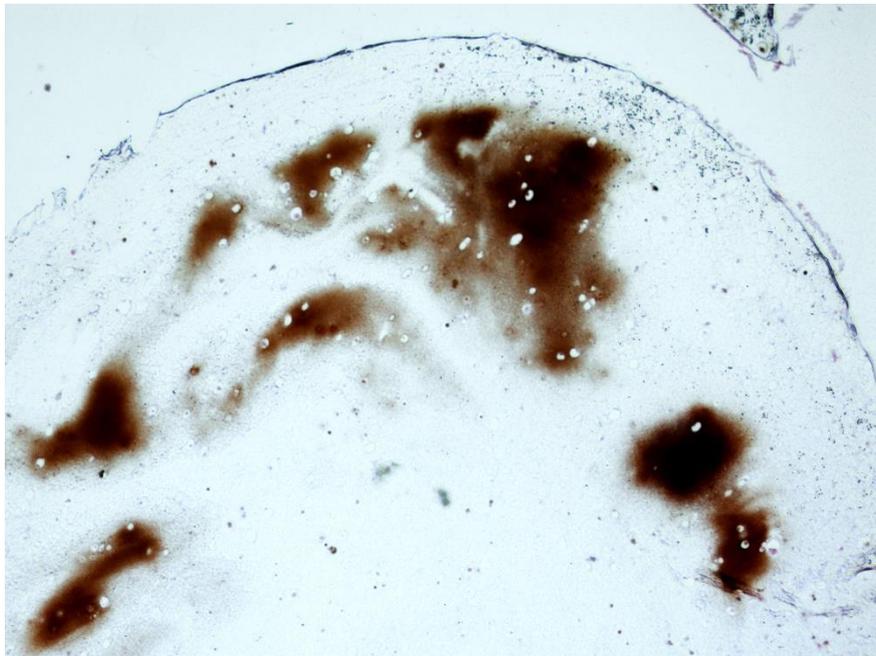
**Abb. 36 A - H:** HE-Färbung Mesenchymaler Stammzellen nach 28 Tagen Inkubation in quervernetzter Gelatine

Die mittels der Resazurin-Tests dargestellten Wachstumsraten der metabolischen Aktivität scheinen nach Interpretation der histologischen Bilder nicht mit einer vergleichbaren Proliferationsrate der Zellen einherzugehen, da mitotische Zellen nur selten zu finden sind.

Das Wachstumsverhalten ergibt sich demzufolge eher durch Volumenzuwachs der einzelnen Zellen, weniger durch Proliferation.

### 3.2.7 Osteogene Differenzierung der Mesenchymalen Stammzellen in der 3-D-Kultur

Nebenbefundlich fielen nach 28 Tagen einzelne kristallförmige Calcium-Ablagerungen auf, die wir mit der von-Kossa-Färbung nachweisen konnten. Somit ergaben sich Hinweise für eine spontane osteogene Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen.



**Abb. 37:** Von Kossa-Färbung einer 3-D-Zellkultur nach 28-tägiger Inkubation

## 4 Diskussion

Ein Kernpunkt im Tissue Engineering ist es, ein strukturelles Gerüst, auch Scaffold genannt, zu entwickeln, das die wesentlichen Voraussetzungen erfüllen muss, sowohl biokompatibel als auch ausreichend physikalisch stabil zu sein. Zudem muss das Scaffold in einem bestimmten zeitlichen Rahmen biologisch abbaubar sein.

Seit langem kommt Gelatine als eines der am häufigsten verwendeten Biomaterialien zum Einsatz. Ebenso erwies sich die in meiner Arbeit verwendete, meist mikrobielle, Transglutaminase als biokompatibel und geeignet, eine Gelatine-Lösung durch enzymatische Quervernetzung physikalisch und gegenüber proteolytischen Einflüssen ausreichend zu stabilisieren<sup>44</sup>. Demgegenüber werden chemische Methoden der Quervernetzung, z.B. mit Glutaraldehyd, im Rahmen der in vivo Anwendung als zellschädlich angesehen.

Zu Grunde liegend war eine bereits im eigenen Labor entwickelte Hyaluronsäure-Gelatine-Kompositmatrix. Diese erbrachte bereits gute Ergebnisse bei Versuchen mit Benetzung der Matrix mit mesenchymalen Stammzellen und chondrogener Differenzierung. Bei in vivo Versuchen mit Kaninchen zeigte sich jedoch, dass nach Implantation einer vorkultivierten Matrix in einen Meniskusdefekt zwar eine Regeneration von knorpelartigem Gewebe möglich ist, hierbei aber keine zufriedenstellende Herstellung eines Gewebes möglich war, das den mechanischen Eigenschaften von natürlichem Meniskusgewebe soweit entspricht, dass gute Langzeitergebnisse in vivo erwartet werden konnten.<sup>3</sup>

Durch die Integration einer Lösung bestehend aus Gelatine, Transglutaminase sowie mesenchymalen Stammzellen in die bestehende Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix verfolgte ich zwei wesentliche Ziele:

Zum Ersten sollte dadurch die mechanische Stabilität der Komposit-Matrix verbessert werden.

Zum Zweiten sollte durch diese Methode ein höherer Anteil der in die Matrix eingebrachten Zellen dauerhaft immobilisiert werden und nicht, bedingt durch die poröse Grundstruktur der Matrix, verloren gehen. Letztlich sollte dadurch eine höhere Zelldichte im Gewebeersatz erwartet werden können.

### Bewertung der mechanischen Stabilität:

Um nun die verwendeten Komponenten einzeln und in Kombination miteinander hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität bewerten zu können, entwickelten wir eigene Messmethoden.

Zunächst orientierten wir uns an Hiroko Sakamoto, der Gelatine und andere Proteingele in einer Microwellplatte mit einem Presstempel komprimierte und dabei die Bruchfestigkeit bestimmte.<sup>29</sup> Wir verwendeten hierfür einen umfunktionierten Infusiomaten, der mit einem aufgesetzten Stempel und mit konstanter Geschwindigkeit eine Verformung der Probe erzielte. Um die Reliabilität dieser Messmethode zu optimieren, entschieden wir uns, den sogenannten „Work“, ein Flächenprodukt im Kraft-Weg-Diagramm, als geeigneten Messwert heranzuziehen, der im Vergleich zur Bruchfestigkeit eine geringere Streuung zeigte und zudem eindeutig definiert werden konnte. Zudem erfolgte die Auswahl einer Stempelform, die aus einer kleinen kreisrunden Platte bestand, die über einen schmalen Stil mit dem Infusiomaten verbunden war. Bei dieser Auswahl wurde ebenso auf die Reliabilität sowie auf möglichst deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Messgruppen Wert gelegt.

Weiterhin führten wir auch Stabilitätsmessungen von freistehenden zylinderförmigen Proben bestehend aus quervernetzter Gelatine oder Matrices, die zum Teil mit quervernetzter Gelatine befüllt waren, durch. Hierbei waren nicht nur Kompressions-, sondern auch Zugbelastungen möglich, wobei Zugbelastungen nur bei Proben durchführbar waren, die die Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix als Bestandteil enthielten, wo zum Einspannen der Proben Metallplättchen aufgeklebt werden konnten, an denen die Zugkräfte wirken konnten. Sowohl bei den Zug- als auch Kompressionsbelastungen von freistehenden Proben wurden Spannungs-Dehnungs-Diagramme erstellt und daraus drei verschiedene Materialkennwerte ermittelt:

- 1) Der Elastizitätsmodul (E-Modul)
- 2) Die Bruchfestigkeit (bei den Zugversuchen auch Zugfestigkeit genannt)
- 3) Die Bruchdehnung

Der E-Modul entspricht der Steigung des Graphen im Spannungs-Dehnungs-Diagramm, üblicherweise am Beginn des Messvorganges, und somit nach dem Hooke'schen Gesetz dem Quotienten aus dem Spannungsunterschied und dem Dehnungsunterschied.

Im Rahmen der E-Modul-Bestimmungen führten unsere Überlegungen dazu, bestimmte Bereiche im Graphen zu definieren, die zwischen den einzelnen Proben einer Messgruppe eine möglichst geringe Streuung aufwiesen. Zu Grunde liegend waren Erkenntnisse, dass insbesondere am unmittelbaren Beginn einer Messung eine hohe Schwankungsbreite zwischen den Messwerten innerhalb einer Messgruppe festzustellen war. Diese

Uneinheitlichkeit am Beginn einer Messung führten wir auf eine unmerkliche leichte Vordehnung bei Kontaktherstellung zwischen der Probe und dem Kompressionsstempel bzw. dem Zuggewicht zurück, wofür unsere Messeinrichtung nicht ausreichend präzise war.

Die maximale Bruchfestigkeit entspricht der maximalen Spannung, die unmittelbar vor Eintritt einer Strukturzerstörung der Probe während des Kompressions- bzw. Zugbelastungsvorgangs erreicht wird. Im Spannungs-Dehnungs-Diagramm ist dies der höchste Punkt des Graphen vor Eintritt des ersten Rücksetzers. Bei den Kompressionsmessungen kam es im weiteren Verlauf der Kompression noch zu höheren Spannungswerten, nachdem die Probe bereits Strukturzerstörungen aufwies. Dieser Bereich des Graphen nach Eintritt der ersten Strukturzerstörung war für die Interpretation unserer Messungen nicht mehr relevant. Die Bestimmung der Bruchfestigkeit war allerdings bei Kompressionen von Matrices, die nicht mit quervernetzter Gelatine gefüllt wurden, nicht möglich. Hierbei kam es zu einem stetigen Anstieg des Graphen ohne Rücksetzer, also ohne erkennbare Strukturzerstörung, bis der Messvorgang bei Erreichen des Endes der Messstrecke beendet werden musste. Bei allen übrigen für die Kompressionsmessungen angewandten Probenarten sowie bei allen durchgeführten Zugmessungen war ein eindeutiger Bruch verifizierbar und somit die Bruchfestigkeit bestimmbar.

Mit der maximalen Bruchdehnung ist derjenige Wert der Dehnung, also des Verhältnisses zwischen Längenänderung und Ausgangslänge, gemeint, der bei Eintreten des ersten Bruches vorliegt. Hierbei ist ebenso das Stattfinden eines erkennbaren Bruchs Voraussetzung, was wie gesagt bei Kompression von Matrices, die nicht mit Gelatine gefüllt wurden, nicht vorlag.

#### Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Transglutaminase:

Für die Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität etablierten wir zwei Methoden, die sich im Wesentlichen durch die verwendeten Substrate unterscheiden:

- 1) Kinetik-Methode mit Kasein und Dansylcadaverin als Substrate
- 2) Endpunkt-Methode mit Kasein und Biotinpentylamin (BPNH<sub>2</sub>) als Substrate

Transglutaminasen stellen Quervernetzungen zwischen den Aminosäuren Glutamin und Lysin her. Bei beiden Methoden diente Kasein als Substrat für die Glutamin-Gruppe. Dansylcadaverin bzw. Biotinpentylamin dienten als Donor für die Lysin-Gruppe.

Auf die zunächst entwickelte Endpunktmethode wurden wir durch Thomas F. Slaughter aufmerksam, der bereits 1992 die Substrate Dimethylcasein, mit dem eine Mikrotiter-Platte

beschichtet wurde, und Biotinpentylamin, welches in gelöster Form hinzugegeben wurde, für eine solche Methode zur Messung der Transglutaminase-Aktivität verwendete<sup>34</sup>. Die Firma Sigma-Aldrich gibt in einem Technical Bulletin eine Versuchsanleitung für ein Transaminase Assay Kit, welches uns als Orientierung diente<sup>33</sup>.

Die enzymatische Reaktion mit Transglutaminase findet bei dieser Methode bereits vor der kolorimetrischen Messung über eine von uns gewählte Inkubationsdauer von 90 Minuten statt, bevor die Reaktion durch mehrfache Spülungen abgebrochen wurde und die Zugabe von Streptavidinperoxidase erfolgte, welches mit hoher Affinität an das Biotin bindet. Nach erneuter Spülung und Hinzugabe von Tetramethylbenzidin fand eine weitere enzymatische Reaktion mit Reduzierung und Blaufärbung des Tetramethylbenzidin statt. Diese Reaktion wurde nach 10 Minuten durch Hinzufügen von Schwefelsäure abgebrochen, wodurch eine Gelbfärbung entstand und eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm erfolgte.

Somit diente der Messwert der kolorimetrischen Messung als Maß für die Anzahl der transglutaminase-vermittelten Bindungen zwischen Kasein und Biotinpentylamin und damit für die Transglutaminase-Aktivität.

Bei der Kinetik-Methode mit den in freier Lösung befindlichen Substraten Kasein und Dansylcadaverin leiteten wir bereits unmittelbar nach Zusammenführen der Lösungen mit der Transglutaminase eine Fluoreszenzmessung bei einer Absorptionswellenlänge von 635 nm und mit einer Excitation bei 450 nm ein, während die laufende enzymatische Reaktion mit Bindung von Dansylcadaverin an Kasein einen Shift von Intensität und Wellenlänge der Dansylgruppe bewirkte, wie L. Lorand bereits 1971 erkannte, als er diese Methode zur direkten Bestimmung der Aktivität des Faktor XIII entwickelte.<sup>23</sup> Der Anstieg der Fluoreszenzintensität mit der Zeit, also der Wert der Steigung im Fluoreszenz-Zeit-Diagramm, war hierbei ein Maß für die Transglutaminase-Aktivität.

Um nun die Aktivität einer Transglutaminase, die in einer bestimmten Konzentration vorliegt, genauer quantifizieren zu können, musste stets eine Standard-Transglutaminase mit bekannter Aktivität als Vergleichsenzym verwendet werden. Anhand mehrerer Aktivitätsstufen durch verschiedene Verdünnungsstufen der Standard-Transglutaminase wurde eine Gleichung entwickelt, die für die Errechnung der im gleichen Versuchsaufbau verwendeten Test-Transglutaminase verwendet wurde. Bei der Endpunkt-Methode wurde die gemessene Absorption direkt auf die Transglutaminase-Aktivität bezogen und daraus ein Aktivitäts-Absorptions-Diagramm erstellt, während bei der Kinetik-Methode für jede Probe zunächst die Steigung des Graphen im Fluoreszenz-Zeit-Diagramm errechnet werden musste, um letztlich

den Wert dieser Steigung dann auf die Transglutaminase-Aktivität auftragen zu können, also ein Aktivitäts-Steigungs-Diagramm zu erstellen.

Bei beiden Methoden fiel auf, dass der Funktionsgraph im Aktivitäts-Absorptions-Diagramm bzw. Aktivitäts-Steigungs-Diagramm sich am besten an die jeweiligen Messpunkte anschmiegte, wenn er der Form einer Parabel entsprach. Mit Hilfe von Excel entwickelten wir die hierfür entsprechende Gleichung und errechneten daraus die Aktivität der Test-Transglutaminasen.

Auch wenn somit die Berechnung der Aktivität bei der Kinetik-Methode im Vergleich zur Endpunkt-Methode aufwändiger war, bevorzugten wir letztlich diese Methode, da hier insgesamt weniger Arbeitsschritte und Zeit als bei der Endpunkt-Methode erforderlich waren. Die Endpunkt-Methode schien durch eine höhere Sensitivität bei schwachen Transglutaminase-Aktivitäten zu punkten, so dass hierbei auch Aktivitäten unter 1 mU/ml ohne Weiteres gemessen und quantitativ beurteilt werden konnten, während wir bei der Kinetik-Methode einen Aktivitätsrahmen von 10 bis 100 mU/ml bevorzugten. Dieser Pluspunkt für die Endpunkt-Methode wurde jedoch insbesondere bei der vergleichsweise preisgünstigen Ajinomoto-Transglutaminase uninteressant.

#### Wesentliche Besonderheiten von Gelatine:

Nachdem wir uns Möglichkeiten erarbeitet haben, die mechanische Stabilität von Gelatine und die Aktivität der Transglutaminase messen und beurteilen zu können, war es uns zunächst wichtig, uns mit der Struktur und den physikalischen Eigenschaften von Gelatine zu beschäftigen. Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei Gelatine um eine denaturierte Form von fibrillärem Kollagen. Als wesentliche physikalische Besonderheit ist zu nennen, dass Gelatine einen Erstarrungs- und einen Schmelzpunkt besitzt, die in Abhängigkeit von der Gelatine-Konzentration und dem Bloom-Wert variieren. Bei einer physiologischen Temperatur von 37° liegt Gelatine auch bei höheren Konzentrationen und Bloom-Werten als flüssiges gelartiges Medium vor. Durch das Hinzufügen von Transglutaminase, die Quervernetzungen zwischen den Aminosäuren Lysin und Glutamin herstellt, wurde Gelatine auch bei physiologischer Temperatur eine feste Struktur.

Das grobe Prinzip der weiteren Verarbeitung mit Einbezug der Zellen und der Matrix wurde von uns dann folgendermaßen überlegt: Gelatine sollte in flüssiger Form und zusammen mit den Zellen in die Poren der Matrix eingebracht werden und unverzüglich mit Hilfe der Transglutaminase quervernetzt und gefestigt werden, so dass im Vergleich zur ursprünglichen Matrix eine stabilere und zellreiche Struktur entsteht.

Mechanische Stabilität der Gelatine unter Einfluss verschiedener Inkubationsbedingungen:

Weiterhin stellte sich die Frage nach den optimalen Reaktions- oder Quervernetzungsbedingungen, die eine maximale Festigkeit der Gelatine bzw. der gelatinegefüllten Matrix erzielten, wobei die Inkubationsbedingungen vereinbar mit einer möglichst guten Zellvitalität sein mussten.

Hiroko Sakamoto testete 1994 die Bruchfestigkeit von Gelatine und anderen Proteinen, die er mit mikrobieller Transglutaminase quervernetzte, in Abhängigkeit von Inkubationsdauer, Transglutaminasekonzentration, Inkubationstemperatur und dem pH des Mediums.<sup>29</sup>

Laut Sakamoto lag der optimale pH-Wert für die Inkubation mit Gelatine bei 6, welchen wir auch für unsere Messungen übernahmen und entsprechend einstellten. Je länger die Inkubationsdauer und je höher die Transglutaminasekonzentration, desto höher war die Bruchfestigkeit der quervernetzten Gelatine, wobei sich ab einer bestimmten Dauer bzw. Transglutaminasekonzentration eine Sättigung einstellte und somit eine Verlängerung der Inkubationsdauer oder Erhöhung der Transglutaminasekonzentration keinen weiteren Nutzen mehr brachte. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch wir, insbesondere bezüglich des E-Modul und der maximalen Bruchfestigkeit. Nur die Bestimmung der maximalen Bruchdehnung sowie des „Work“ in den 96-Well-Platten zeigte keinen derartigen Zusammenhang mit Inkubationsdauer und Transglutaminase-Konzentration.

Auch eine Erhöhung der Gelatine-Konzentration bewirkte in unseren Versuchen erwartungsgemäß eine Zunahme von E-Modul und Bruchfestigkeit, ohne dass hierbei ein Sättigungsniveau erreicht werden konnte. Letztlich lag hierbei die Problematik in der Verarbeitung. Bei höheren Gelatinekonzentrationen von 5% oder mehr war bereits nach wenigen Sekunden nach Zusammenmischen der Gelatine-Lösung mit der Transglutaminase-Lösung eine Reaktion erkennbar, die sich durch Zäh-Werden der Lösungsmischung äußerte, so dass eine weitere Verarbeitung der Lösung, z.B. das Einbringen der Lösung in die Scaffolds, erschwert war. Vor allem eine Erhöhung der Gelatine-Konzentration, aber auch eine Erhöhung der Transglutaminase-Konzentration, machte also die weitere Verarbeitung schwierig und ab einer zu hohen Konzentration unmöglich.

Zusätzlich testeten wir die Auswirkung von fetalem bovinem Serum auf die Gel-Stabilität, zumal ein solches Serum, das einen hohen Anteil an vielen verschiedenen Proteinen und Wachstumsfaktoren besitzt, ein häufig verwendeter Bestandteil bei der Kultivierung von Zellen, insbesondere Stammzellen, ist. Ein Serum-Anteil von 5% zeigte sich hierbei als optimal. Unsere Theorie ist, dass im Serum vorkommende Proteine als Substrate durch die

Transglutaminase so quervernetzt werden, dass zusätzliche Brücken zwischen den Polypeptidketten der Gelatine entstehen, die die Gelatine-Struktur zusätzlich stabilisieren. Eine weitere Erhöhung des Serum-Anteils könnte jedoch dazu führen, dass Serum-Anteile als Substrate mit der Gelatine konkurrieren und dadurch die enzymatische Quervernetzung der Gelatine negativ beeinflussen können. Außerdem muss damit gerechnet werden, dass im Serum vorkommende Proteasen zu einer Spaltung von Gelatine-Bestandteilen und damit zu einer Schwächung der Struktur führen. Letztere Annahme bestätigte sich durch einen Versuch mit im Vorfeld durchgeführter Hitzeinaktivierung des Serums, was nach im Anschluss erfolgter Quervernetzung der Gelatine eine leichte Steigerung des E-Modul im Vergleich zur Vergleichsgruppe ohne Hitzeinaktivierung des Serums bewirkte.

Sehr interessant war unsere Beurteilung der optimalen Inkubationstemperatur. Für Gelatine testete Sakamoto nur einen Temperaturbereich zwischen 37 und 80°C, mit der Bemerkung, dass bei niedrigerer Temperatur keine Möglichkeit einer Mischung mit der Transglutaminase aufgrund der physikalischen Gelierung von Gelatine gegeben ist. Letztlich kam er zu dem Ergebnis, dass die optimale Inkubationstemperatur bei 50°C liegt. Eine höhere Temperatur würde demnach zur Inaktivierung der Transglutaminase führen. Anzumerken ist, dass Sakamoto Temperatur-Variationen nur bei konstanter Inkubationsdauer von 10 Minuten durchführte, so dass nach seinen Versuchen die Frage offen blieb, ob eine Verlängerung der Inkubationsdauer bei niedrigeren Temperaturen diese zunächst geringere Bruchfestigkeit ausgleichen oder vielleicht sogar übertreffen könnte.

In unseren Versuchen testeten wir, ob eine Inkubation bei Temperaturen deutlich unterhalb der physiologischen Temperatur einen Benefit im Hinblick auf die mechanische Stabilität der Transglutaminase bewirkte. Genau genommen erfolgte die Mischung der Komponenten Gelatine und Transglutaminase zwar zunächst noch bei physiologischen Temperaturen, was, wie bereits erwähnt, aufgrund der temperaturabhängigen physikalischen Gelierung der Gelatine nicht anders möglich war; unmittelbar nach der Mischung wurden die Proben jedoch auf niedrigere Temperaturen gekühlt. Tatsächlich stellten wir fest, dass eine Inkubation bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt oder bei der von uns gewählten Temperatur von 4 °C eine signifikant mechanisch stabilere quervernetzte Gelatine erzeugte als eine Inkubation bei Raumtemperatur oder physiologischer Temperatur. Wohlgedemerkte beziehen sich diese Temperaturangaben nur auf die Inkubation zur Quervernetzung selbst und nicht auch auf den Moment der mechanischen Stabilitätsmessung, vor dem wir alle Proben bewusst und ausreichend lange auf eine physiologische Temperatur erwärmten.

Nach unserer Kenntnis gibt es in der Literatur keine Berichte, dass eine enzymatische Quervernetzung von Gelatine bei kühlen Temperaturen festere Strukturen erzeugt als bei physiologischer oder höherer Temperatur. Dafür haben wir zwei Erklärungsansätze:

Beim Abkühlen einer Gelatinelösung lagern sich die einzelnen Polypeptidketten durch Wasserstoffbrückenbindungen abschnittsweise zu tripelhelikalen Strukturen zusammen, ähnlich der Tripelhelix des Kollagens, wobei diese Abschnitte nur kurzstreckig sind und dem Zufall unterliegen und damit nicht die geordnete Quartärstruktur des Kollagens mit den typischen Mikrofibrillen aufweisen. Dennoch ergeben sich durch diese Aneinanderlagerung der Polypeptidketten mehr Kontaktpunkte für die – für die Transglutaminase relevanten – Substrate Glutamin und Lysin. Nach erfolgter enzymatischer Quervernetzung wird diese Struktur so gefestigt, dass sie auch bei Wiedererwärmung bestehen bleibt und der Gelatine zu einer dauerhaft höheren Stabilität verhilft.

Eine weitere Erklärung für die positive Auswirkung der Kühlung auf die enzymatische Quervernetzung ist die Thermolabilität der Transglutaminase. Bei kühleren Temperaturen hält die enzymatische Aktivität der Transglutaminase vergleichsweise länger an, insbesondere bei der bakteriellen Transglutaminase von Ajinomoto, die bei physiologischen Temperaturen bereits nach etwa 3 Stunden den Großteil ihrer Aktivität einbüßt, wie wir auch durch entsprechende Aktivitätstestungen belegten.

Die enzymatische Aktivität der Transglutaminase mag nach unseren Erkenntnissen zwar bei physiologischen Temperaturen oder sogar bei 50 °C höher sein, um mich nochmal auf Sakamoto zu beziehen, allerdings trifft dies scheinbar nur für einige Minuten nach Lösen in einem physiologischen Medium zu, bevor die Transglutaminase durch verschiedene Faktoren und temperaturabhängig schnell an Aktivität verliert.

Wir konnten also zeigen, dass eine Inkubation bei 4 °C eine Verbesserung der mechanischen Stabilität der Gelatine erzielte und dies umso mehr, je länger die Inkubation bei dieser Temperatur andauerte. Wir testeten hierbei Inkubationszeiten bis 24 Stunden. Auch nach dieser maximalen Inkubationszeit war noch keine Sättigung zu erkennen. Eine noch weitere Verlängerung der Inkubation bei 4 °C über mehr als 24 Stunden kam für uns aber deswegen nicht in Frage, weil sich gleichzeitig die Frage stellte, ob die Zellen eine so lange Exposition gegenüber niedrigen Temperaturen überhaupt tolerieren würden.

#### Einbringung der Gelatine und Transglutaminase in die ECM:

Bevor wir die Zellen als weitere Komponente hinzufügten, prüften wir das Einbringen der Gelatine und der Transglutaminase in die Matrices auf praktische Durchführbarkeit und dessen Auswirkung auf die mechanische Stabilität der Matrices.

Als praktikabel erwies sich das Eintauchen der Matrices in die Gelatine-Transglutaminase-Lösung in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen und eine unverzügliche Vakuum-Exposition mit anschließender Belüftung, wodurch größere und besser homogen verteilte Mengen der Lösung in die Poren der Matrices eingebracht werden konnten als dies durch lokales Einspritzen durch eine Spritzennadel möglich war. Wir bevorzugten diese Vakuum-Methode, wenngleich hierbei ein erhöhter Materialverbrauch ein Nachteil war.

Bei der Kompression von Matrices zeigte sich eine signifikante Steigerung des E-Modul, wenn die Poren mit einer Gelatine-Transglutaminase-Lösung befüllt wurden. Noch deutlicher fiel diese Zunahme aus, wenn die Matrices zusätzlich im Vorfeld durch Inkubation in einer Transglutaminase-Lösung vorbehandelt wurden, so dass die dadurch an der Matrix adhärierte Transglutaminase unterstützend zu der Transglutamine hinzukam, die zusammen mit der Gelatine von außen eingebracht wurde. Sogar das Einbringen von transglutaminase-freier Gelatinelösung bewirkte eine Erhöhung des E-Modul, wenn die Transglutaminase in adhärerter Form nach entsprechender Vorbehandlung vorlag; diese E-Modul-Steigerung war jedoch dennoch deutlich geringer, als bei Hinzugabe der Transglutaminase zusammen mit der Gelatine-Lösung. Am wirksamsten bezüglich des E-Modul war also das Einbringen einer Gelatine-Transglutaminase-Lösung in die Poren einer zusätzlich mit Transglutaminase vorbehandelten Matrix. Das in Kauf nehmen der auf Grund der unverzüglich einsetzenden Quervernetzung schwierigen Handhabung einer Gelatine-Transglutaminase-Lösung zeigte sich gewinnbringend.

Die Bestimmung der maximalen Bruchfestigkeit und Bruchdehnung war bei der Kompression von Matrices nicht wegweisend, da sich selbst bei Ausnützung der maximalen Belastungsfähigkeit unserer Messeinrichtung bei nicht mit Gelatine befüllten Matrices kein Bruch erkennen ließ, sondern sich mit zunehmender Komprimierung ein kontinuierlicher Kraftanstieg zeigte. Die zylinderförmigen nicht mit Gelatine befüllten Matrices reduzierten dabei im Gegensatz zu den mit quervernetzter Gelatine befüllten Matrices ihr Gesamtvolumen unter Konstant-Haltung des Querdurchmessers, was bei der Berechnung der Spannung zu berücksichtigen war, und sie nahmen nach Beendigung der Kompression und nach erneutem Eintauchen in ein Medium sogar die nahezu ursprüngliche Länge wieder ein. Zu einem Bruch kam es hierbei also nur bei der Kompression von mit quervernetzter Gelatine gefüllter Matrix. Der Vorteil bei mechanischen Messungen von Matrices im Vergleich zu Messungen mit reiner quervernetzter Gelatine ohne Matrix-Anteil war die Tatsache, dass ein Bekleben der Enden des Prüfkörpers mit Metallplättchen und darüber die Durchführung einer Zugbelastung möglich war.

Im Gegensatz zur Kompression war uns bei der Zugbelastung auch die Bestimmung der maximalen Bruchbelastung und der maximalen Bruchdehnung möglich.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Einbringung von Gelatine und Transglutaminase in die Matrix eine signifikante Zunahme sowohl der maximalen Zugbelastung als auch der maximalen Zugdehnung bewirkte. Durch eine Vorbehandlung der Matrices mit Inkubation in einer Transglutaminase-Lösung konnte die maximale Zugbelastung und -dehnung noch deutlicher verbessert werden.

Bezüglich der mechanischen Stabilität bleibt letztlich festzuhalten, dass durch Befüllen der Matrixporen mit quervernetzter Gelatine eine vielversprechende Verbesserung der mechanischen Eigenschaften zu erzielen war. Als auffälliger Makel ergab sich allein die Tatsache, dass durch die Kompression von mit quervernetzter Gelatine befüllter Matrix überhaupt eine irreversible Strukturzerstörung zu Stande kam, was wie gesagt bei der Kompression von nicht befüllten Matrices nicht der Fall war. Entscheidend ist somit die Frage, ob die Bruchbelastung ausreichend im Hinblick auf die klinische Anwendung ist. Ausgehend von den von uns in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren gemessenen Bruchbelastungswerten in einem Bereich zwischen 10 000 und 100 000 Pascal müssen wir feststellen, dass weitere Maßnahmen zur Optimierung der mechanischen Stabilität überlegt werden sollten, bevor man eine Anwendung in vivo versucht.

#### Überprüfung der Vitalität von MSCs in Verbindung mit den für die Quervernetzung von Gelatine geplanten Inkubationsbedingungen:

Jegliche Maßnahmen, die der weiteren Verbesserung der mechanischen Stabilität der quervernetzten Gelatine und letztlich der Komposit-Matrix dienen sollten, mussten auch mit der Kultivierung der Zellen vereinbar sein. Die gewählten Inkubationsbedingungen durften keine relevanten zytotoxischen oder zytostatischen Effekte aufweisen. Insbesondere die Inkubation bei niedrigen Temperaturen, welche nach ausführlichen Untersuchungen einen erheblichen Benefit bezüglich der mechanischen Stabilität erbrachte, zeigte sich zunächst ernüchternd, da die Zellen nach 24-stündiger Kälteexposition einen Rückgang der Vitalität um etwa die Hälfte zeigten. Die metabolische Aktivität der Zellen nach Kälteexposition nahm im Vergleich zu den nicht kälte-exponierten Zellen sogar noch deutlicher ab, und dies auch nach anschließender mehrstündiger Erwärmung. Dies galt für die Beurteilung von Zellen, die sich in einer Suspension befanden oder an einer Zellkultur-Platte adhärirt waren.

Daraufhin führten wir Bestimmungen der metabolischen Aktivität auch an Zellen in der 3-D-Kultur, also in quervernetzter Gelatine durch, zumal diese Kulturform für uns relevanter war.

Wir stellten fest, dass Zellen in der 3-D-Kultur eine wesentlich höhere Kälteresistenz zeigten als in Suspension oder Monolayer-Kultur. So zeigte sich auch nach 24-stündiger Kälteexposition keine wesentliche Minderung der metabolischen Aktivität und auch nach mehrtägiger Nachbeobachtung keine nennenswerte Veränderung des Wachstums. Erst nach 48-stündiger Kälteexposition zeigte sich eine nachhaltige Aktivitätsminderung und deutlich verzögertes Wachstum.

Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Transglutaminase keinen wesentlichen Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen sowie deren langfristige Entwicklung hatte. Dies galt sowohl für die Anwendung in der 3-D-Kultur als auch in der Monolayer-Kultur. In der Monolayer-Kultur wurden Transglutaminase-Konzentrationen bis 8 U/ml, entsprechend 8%iger Lösung der Ajinomoto-Transglutaminase, getestet. Auch der darin enthaltene stabilisierende Zucker Maltodextrin selbst zeigte nach mehrtägiger Verlaufskontrolle ebenfalls keinen nennenswerten Einfluss auf die metabolische Aktivität der Zellen, sondern bewirkte allenfalls sogar eine kurzfristige Steigerung der metabolischen Aktivität. Nur bei Testung der rekombinanten Transglutaminase von der Firma Sigma, die bis zu einer Konzentration von 2 U/ml angewandt wurde, deutete sich ein geringer wachstumshemmender Effekt an, der jedoch nicht mit einer Signifikanz bestätigt werden konnte.

Bei Testung verschiedener Konzentrationen der Gelatine und deren Einfluss auf die Zellvitalität, konnte gezeigt werden, dass sich die höchstgewählte Gelatine-Konzentration von 5% günstiger auf die metabolische Aktivität der Zellen auswirkte als dies bei 1,5%iger Gelatine und – nach mehrtägiger Verlaufsbeobachtung – auch bei 3%iger Gelatine der Fall war. Die metabolische Aktivität war unabhängig von der jeweils gewählten Art der Vorbehandlung der Gelatine, die der Reinigung und Sterilisation diente, wie etwa wiederholtes Spülen, Sterilfiltration und Sterilisation durch Gammastrahlen.

Als Konsequenz aus den Versuchen kann gezogen werden, dass sich in Bezug auf die von uns gewählten Gelatine- und Transglutaminase-Konzentrationen noch höhere Konzentrationen sowohl der Gelatine als auch der Transglutaminase nicht negativ auf die Zellvitalität und das Zellwachstum auswirken sollten. Eine Steigerung dieser Konzentrationen würde sich auf jeden Fall sehr positiv auf die mechanische Stabilität der quervernetzten Gelatine und damit auch auf das Endkonstrukt bestehend aus der mit quervernetzter Gelatine und Zellen befüllter Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix auswirken. Um diese Konzentrationserhöhungen in die Tat umsetzen zu können, müssen einzelne Prozesse bei der Herstellung von quervernetzter Gelatine optimiert werden. Die Komponenten bestehend aus erwärmter und somit flüssiger Gelatine-Lösung, Transglutaminase-Lösung und Medium mit in Suspension vorliegenden

mesenchymalen Stammzellen sollten innerhalb weniger Sekunden nach Zusammenmischung in die Poren der Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix eingebracht werden, bevor die unmittelbar einsetzende enzymatische Quervernetzung eine weitere Verarbeitung behindert. Je höher die Konzentrationen der Gelatine und Transglutaminase, desto schneller ist nach deren Zusammenmischung zunächst ein Zähwerden und schließlich eine Verfestigung zu erwarten und desto größer wird die Herausforderung bei der anschließenden weiteren Verarbeitung.

Voraussetzung bei diesen Arbeitsprozessen ist selbstverständlich auch, dass die Vorgänge in sterilem Umfeld stattfinden.

#### Histologische Beurteilung:

Bei der Einbringung der Gelatine-Transglutaminase-Lösung in die Matrix zwecks Stabilitätsmessungen verzichteten wir auf das Beifügen der Zellen, da wir bis dato keine Möglichkeit hatten, die Einbringung im Vakuumbehälter steril durchzuführen.

Unsere histologischen Beurteilungen beschränkten sich somit auf Schnitte mit Zellen, die in quervernetzter Gelatine ohne weitere Anteile, wie etwa der Matrix, inkubiert wurden.

Nachdem mittels Resazurin-Test gezeigt werden konnte, dass die metabolische Aktivität der Zellen in der 3-D-Kultur in quervernetzter Gelatine innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 28 Tagen kontinuierlich zunahm, war von einem Zellwachstum auszugehen. Die histologische Beurteilung ergab, dass es sich hierbei überwiegend um Wachstum der einzelnen durch Größenzunahme handelte und weniger um Proliferation der Zellen, da mitotische Teilungen nur selten zu finden waren. Eine Zellzählung gestaltete sich dabei jedoch erschwert, zumal die Gelatine im Laufe der Zeit eine poröse Struktur annahm. Zugleich verdichtete sich das Fasernetz zwischen den Poren. Während dieser vierwöchigen Inkubation zeigten die Zellen eine morphologische Veränderung durch Ausbildung von Pseudopodien. Zudem konnte eine osteogene Differenzierung nachgewiesen werden, so dass ein weiterführendes Ziel die Beeinflussung der Zelldifferenzierung durch Anwendung entsprechender chondrogener Differenzierungsfaktoren sein muss.

Insgesamt konnte eine zufriedenstellende Vitalität der Zellen auch nach mehrwöchiger Inkubation in quervernetzter Gelatine und nach initialer Kälteexposition auch histologisch dargestellt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Zellen in der Gelatine in homogenem Verteilungsmuster stabilisiert werden konnten.

Dass bei Inkubation von mesenchymalen Stammzellen in der herkömmlichen Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix ein Überleben, eine Proliferation und eine Differenzierung

möglich ist, konnte in wiederholten Versuchen in unserem Labor bestätigt werden.<sup>1 2 3</sup> In Verbindung mit den Ergebnissen meiner Arbeit sollte ein Wachstum der Zellen auch in Matrices erwartet werden können, deren Poren mit quervernetzter Gelatine ausgefüllt werden. Darüber hinaus kann eine homogene Verteilung und Stabilisierung der Zellen in diesem Konstrukt erwartet werden. Das Zellwachstum sowie die Differenzierung in die gewünschte Richtung sollte dann durch die gezielte Wahl von Medium und entsprechenden Wachstumsfaktoren optimiert werden.

Ausblick:

Nach Optimierung der Arbeitsschritte und Erhöhung der Gelatine- und Transglutaminasekonzentrationen sowie unter Beibehaltung der – auch unter Berücksichtigung der Zellvitalität – optimalen Inkubationsbedingungen sollte eine noch stabilere Matrix bestehend aus unserem Scaffold und einer quervernetzten Gelatine hergestellt werden können. Weiterhin muss zunächst eine in vitro Studie über die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in die gewünschte Richtung systematisch durchgeführt werden. Dann muss die in vivo Anwendung beweisen, dass die Stabilität der erzeugten Matrix ausreichend ist, um in in vivo Bedingungen langfristig zu bestehen und dass gleichzeitig ein zufriedenstellendes Überleben, Wachstum und Differenzierung der Zellen möglich ist.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war, die Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix durch Einbringen von Gelatine und Transglutaminase zu stabilisieren. Gleichzeitig sollten die enthaltenen mesenchymalen Stammzellen in diesem Gesamtkonstrukt besser fixiert werden.

Zur Messung der Stabilität der mit Transglutaminase enzymatisch quervernetzten Gelatine bestimmten wir unter anderem den „Work“ im Rahmen der Kompression des Gels in einer Well-Platte mit Hilfe eines umfunktionierten Infusiomaten und eines ausgesuchten Stempels. Außerdem erfolgten Kompressionen von freien Gelen und Matrices – bei Messung der Matrices zusätzlich auch Zugbelastungen – und daraus die Bestimmung weiterer physikalischer Parameter wie den E-Modul, die maximale Bruchbelastung und die maximale Bruchdehnung.

Als Transglutaminase verwendeten wir hauptsächlich die bakterielle Transglutaminase von Ajinomoto, die in Pulverform vorlag, calciumunabhängig und im Gefrierschrank gut lagerfähig war, und vor allem durch den vergleichsweise günstigen Kaufpreis überzeugte. Das darin enthaltene Maltodextrin und sonstige mögliche Verunreinigungen wirkten sich nicht nachteilhaft auf die Zellvitalität und das Zellwachstum aus.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität bevorzugten wir die Kinetik-Methode mit Kasein und Dansylcadaverin als Substrate vor allem auf Grund der im Vergleich zur alternativen Endpunkt-Methode mit Kasein und BPNH<sub>2</sub> als Substrate rascheren Durchführbarkeit bei weniger Arbeitsschritten. Unter Verwendung der Meerschweinchentransglutaminase von Sigma als Standardtransglutaminase konnten wir die Aktivität der Transglutaminase von Ajinomoto dosieren und unter verschiedenen Einflussfaktoren, z.B. Kälteexposition, überprüfen und mit weiteren Transglutaminasen, nämlich mit der bakteriellen Transglutaminase von Zedira und der humanen Gewebstransglutaminase von Zedira, vergleichen.

Um eine möglichst feste Gelstruktur herzustellen, erwies es sich als vorteilhaft, die enzymatische Quervernetzung für mindestens 24 Stunden bei 4 °C stattfinden zu lassen. Zudem zeigte die Ergänzung von 5% fetalem bovinem Serum einen leichten positiven Effekt auf die Gel-Stabilität. Die Gelatine- und Transglutaminasekonzentrationen sollten am besten möglichst hoch sein, wobei sich dabei die Handhabung, insbesondere das rechtzeitige Einbringen der Gelatine-Transglutaminase-Lösung in die Matrix vor dem Zäh-Werden und schließlich Hart-Werden der Lösung als Problem darstellte. Somit wandten wir die Gelatine in

maximal 5%iger Konzentration und die Transglutaminase in einer maximalen Konzentration von 3 U/ml an.

Was das Überleben der Zellen unter den gewählten Inkubationsbedingungen betrifft, konnte gezeigt werden, dass sich bei der maximal gewählten Gelatinekonzentration von 5% bessere Bedingungen für die Vitalität und das Wachstum der Zellen als bei niedrigeren Konzentrationen ergaben. Für die Transglutaminase konnte kein wachstumshemmender Einfluss nachgewiesen werden, insbesondere nicht bei der am häufigsten verwendeten bakteriellen Transglutaminase von Ajinomoto. Eine bis zu 24-stündige Kälteexposition der Zellen in Form einer 3-D-Kultur in der quervernetzten Gelatine stellte langfristig keine relevante negative Auswirkung auf die metabolische Aktivität und das Wachstum dar.

Das Einbringen einer Gelatine-Transglutaminase-Lösung in die Poren der Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrix und die anschließende Inkubation bei 4°C zeigte eine erhebliche Verbesserung des E-Modul bei Kompression und Zugbelastung. Bei Zugbelastungen zeigte sich dadurch auch eine signifikante Steigerung der maximalen Bruchbelastung und Bruchdehnung. Diese Verbesserung fiel noch deutlicher aus, wenn die Matrices mit Transglutaminase vorbehandelt waren, so dass eine zusätzliche Dosis von Transglutaminase an die Matrix vorweg adhären konnte. Bei der Kompression der Matrices ohne Füllung mit quervernetzter Gelatine war es nicht möglich, einen Bruch zu erzwingen und somit die maximale Bruchbelastung und Bruchdehnung zu bestimmen. Die durch die Kompression entstandene Verformung zeigte sich innerhalb weniger Minuten nach Beendigung der Kompression als nahezu vollständig reversibel. Dagegen kam es bei den Matrices, die mit quervernetzter Gelatine befüllt wurden, zu einem Bruch mit irreversibler Strukturzerstörung. Trotz dieses Nachteils muss festgehalten werden, dass durch die Einbringung von quervernetzter Gelatine eine Verbesserung von Materialeigenschaften gelang, die bei den herkömmlichen Matrices unbefriedigend waren. Bei Kompressionen konnte etwa eine Verzehnfachung des E-Modul erreicht werden. Die maximale Zugbelastung konnte ungefähr verdoppelt werden.

Die histologische Beurteilung von mesenchymalen Stammzellen in quervernetzter Gelatine zeigte im Rahmen des 28-tägigen Beobachtungszeitraumes eine sehr hohe Überlebensrate der Zellen bei allerdings kaum feststellbarer Proliferation. Auf jeden Fall sprach eine Zunahme der metabolischen Aktivität für ein Wachstum der einzelnen Zellen. Die Zellmorphologie zeigte die Ausbildung von Pseudopodien. Nach 28 Tagen ergaben sich Hinweise für eine

osteogene Differenzierung. Insgesamt konnten die Zellen gut und in homogener Anordnung in der Gelatine stabilisiert werden.

Sollte sich künftig die in meiner Arbeit beschriebene Verbesserung der Materialeigenschaften der Matrices als unzureichend erweisen, scheint eine weitere Verbesserung möglich zu sein. Dabei muss das Ziel sein, die Methoden zur Herstellung von Hyaluronsäure-Gelatine-Komposit-Matrices, die quervernetzte Gelatine sowie die Zellen in ihren Poren enthalten, so zu optimieren, dass höhere Gelatine- und Transglutaminasekonzentrationen verwendet werden können. Unter Beibehaltung der weiteren von uns geprüften positiv einflussnehmenden Faktoren wie die Inkubation bei 4 °C sollte die mechanische Stabilität dieses Konstrukts möglichst der von natürlichem Meniskusgewebe entsprechen, so dass unter in vivo Bedingungen keine unmittelbare Strukturzerstörung zu befürchten wäre.

## 6 Literatur

1. **Angele P, Kujat R, Nerlich M, Yoo J, Goldberg V, Johnstone B (1999).** *Engineering of osteochondral tissue with bone marrow mesenchymal progenitor cells in a derivatized hyaluronan-gelatin composite sponge.* Tissue Eng. 1999 Dec;5(6), Seite 545-554
2. **Angele P, Schumann D, Angele M, Kinner B, Englert C, Hente R, Füchtmeier B, Nerlich M, Neumann C, Kujat R (2004).** *Cyclic, mechanical compression enhances chondrogenesis of mesenchymal progenitor cells in tissue engineering scaffolds.* Biorheology. 2004;41(3-4), Seite 335-46
3. **Angele P, Johnstone B, Kujat R et al (2008)** *Stem cell based tissue engineering for meniscus repair.* J Biomed Mater Res A, 2008 May;85(2), Seite 445–455
4. **Angele P, Müller R, Schumann D, Englert C, Zellner J, Johnstone B, Yoo J, Hammer J, Fierlbeck J, Angele M.K, Nerlich M, Kujat R (2008)** *Characterization of esterified hyaluronan-gelatin polymer composites suitable for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells.* J Biomed Mater Res A. 2009 Nov;91(2), Seite 416-427
5. **Babel W (1996)** *Gelatine – ein vielseitiges Biopolymer,* Chemie in unserer Zeit 1996;30, Seite 86–95
6. **Baker B, Nathan A, Huffman G et al (2009).** *Tissue engineering with meniscus cells derived from surgical debris.* Osteoarthritis Cartil 17, Seite 336–345
7. **Bech L, Norrevang I, Halkier T, Rasmussen G, Schäfer T, Andersen J T (2000)** *Microbial transglutaminases, their production and use.* US Patent 6100053 A, Veröffentlichungsdatum 08.August 2000

8. **Bertoni F, Barbani N, Giusti P, Ciardelli G (2006)**, *Transglutaminase reactivity with gelatine: perspective applications in tissue engineering*, *Biotechnol Lett* (2006) 28, Seite 697–702
9. **Fujisato T, Sajiki T, Liu Q, Ikada Y (1996)**. *Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold*. *Biomaterials* 1996;17, Seite 155–162
10. **Gelatine Manufacturers of Europe**. *Erstklassige Rohstoffe und modernste Industrieanlagen liefern ein reines, hochwertiges Protein*.  
<http://www.gelatine.org/de/ueber-gelatine/herstellung.html> (Stand 25.09.2017)
11. **Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH (1991)**. *Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues*. *The FASEB Journal* vol. 5 no. 15, Seite 3071-3077
12. **Griffin M, Casadio R, Bergamini CM (2002)**. *Transglutaminases: nature's biological glues*. *Biochem J* 368 (Pt 2): Seite 377–396
13. **Gustav Parmentier GmbH**. *Wichtige Kennzahlen von Gelatine*.  
<http://www.parmentier.de/gpfneu/gelatine/deutsch/kennzahl.php> (Stand 25.09.2017)
14. **Ha C.W, Park Y.B, Chung J.Y, Park Y.G (2015)**. *Cartilage Repair Using Composites of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Hyaluronic Acid Hydrogel in a Minipig Model*. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Sep; 4(9), Seite: 1044–1051
15. **Hoff K.A., Thorsen F.H. 16 (2004)**. *A method for the modification of protein structure in finish shaped feed pellets, balls or the like in order to achieve shape stability*, Patent EP 1073342 B1, Veröffentlichungsdatum 16.Juni 2004
16. **Kang S, Son S, Lee J et al (2006)**. *Regeneration of whole meniscus using meniscal cells and polymer scaffolds in a rabbit total meniscectomy model*. *J Biomed Mater Res A* 78, Seite 659–671

17. **Kinner B, Zaleskas J, Spector M (2001).** *Contractile behavior of human connective tissue and mesenchymal stem cells in collagen GAG matrices for tissue engineering.* Tissue Eng 2001;7, Seite 617
18. **Kohn L, Lorenz S, Hinterwimmer S (2011).** Springer-Verlag, Februar 2011, , Volume 24, Issue 1, Seite 42-47
19. **Kon E, Chiari C, Marcacci M et al (2008).** *Tissue engineering for total meniscal substitution: animal study in sheep model.* Tissue Eng Part A 14, Seite 1067–1080
20. **Kreuz PC, Lenz R, Vogt S, Imhoff AB, Tischler T (2011).** Springer-Verlag (2011), Arthroskopie 2011/1, Seite 57-61
21. **Lee CR, Grodzinsky AJ, Spector M (2001).** *The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis.* Biomaterials 2001;22, Seite 3145–3154
22. **Löffler G, Petrides P,** *Biochemie & Pathobiochemie*, Springerverlag (7.Auflage), Seite 754-761
23. **Lorand L, Lockridge O.M, Campbell L.K, Myhrman R, Bruner-Lorand J (1971).** *Transamidating enzymes: II. A continuous fluorescent method suited for automating measurements of factor XIII in plasma,* Analytical Biochemistry Volume 44, Issue 1, November 1971, Seite 221-231
24. **Martinek V, Ueblacker P, Braun K et al (2006).** *Second generation of meniscus transplantation: in-vivo study with tissue engineered meniscus replacement.* Arch Orthop Trauma Surg 126, Seite 228–234
25. **Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1997).** *Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes.* Biomaterials 1997;18, Seite 769–776

26. **Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M (1998).** *Chondrocyte-Chondrocyteseeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model.* *Biomaterials* 1998;19, Seite 2313–2328
27. **Pak J, Lee J.H, Lee S.H (2014)** *Regenerative Repair of Damaged Meniscus with Autologous Adipose Tissue-Derived Stem Cells.* *Biomed Res Int.*, Volume 2014 (2014), Artikelnr.: 436029
28. **Rodkey W, Dehaven K, Montgomery W 3rd et al (2008).** *Comparison of the collagen meniscus implant with partial meniscectomy. A prospective randomized trial.* *J Bone Joint Surg [Am]* 90, Seite 1413–1426
29. **Sakamoto H, Kumazawa Y, Motokih M (1994),** *Strength of Protein Gels Prepared with Microbial Transglutaminase as Related to Reaction Conditions,* *Journal of Food Science,* Volume 59, Issue 4, Juli 1994. Seite 866–871
30. **Schroeder V, Kohler H.P (2010).** *Hämostaseologie.* Springer-Verlag (2. Auflage) ISBN: 978-3-642-01543-4, Seite 219-225
31. **Schünke M, Schulte E, Schumacher U (2004).** *Prometheus-Allgemeine Anatomie des Bewegungssystems,* Thieme-Verlag (2004), Seite 396
32. **Shortkroff S, Barone L, Hsu HP, Wrenn C, Gagne T, Chi T, Breinan H, Minas T, Sledge CB, Tubo R, Spector M (1996).** *Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage.* *Biomaterials* 1996;17, Seite 147–154
33. **Sigma-Aldrich,** Produktinformation: Transglutaminase Assay Kit, Catalog Number CS1070, <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/cs1070bul.pdf> (Stand: September 2017)

34. **Slaughter TF, Achyuthan KE, Lai TS, Greenberg CS (1992).** *A microtiter plate transglutaminase assay utilizing 5-(biotinamido)pentylamine as substrate.* Anal Biochem. 1992 Aug 15;205(1), Seite 166-171
35. **Smith MD, Shearer MG, Srivastava S, Scott R, Courtney JM (1992).** *Quantitative evaluation of the growth of established cell lines on the surface of collagen, collagen composite and reconstituted basement membrane.* Urol Res 1992;20, Seite 285–288
36. **Spector M (2002).** *Novel cell-scaffold interactions encountered in tissue engineering contractile behavior of musculoskeletal connective tissue cells.* Tissue Eng 2002;8, Seite 351–357
37. **Srivastava S, Gorham SD, Courtney JM (1990).** *The attachment and growth of an established cell line on collagen, chemically modified collagen, and collagen composite surfaces.* Biomaterials 1990;11, Seite 162–168
38. **Srivastava S, Gorham SD, French DA, Shivas AA, Courtney JM (1990).** *In vivo evaluation and comparison of collagen, acetylated collagen and collagen/glycosaminoglycan composite films and sponges as candidate biomaterials.* Biomaterials 1990;11, Seite 155–161
39. **Steadman J, Rodkey W (2005).** *Tissue-engineered collagen meniscus implants: 5- to 6-year feasibility study results.* Arthroscopy 21, Seite: 515–525
40. **Verdonk R, Bellemans J, Colombet P et al (2010).** *Clinical outcome scores following implantation of a novel meniscal scaffold for the treatment of irreparable partial meniscus tears and/or partial meniscal tissue loss, 2 year follow up.* Abstract Book ICRS 2010, Seite 254
41. **Waldt S (2013),** Meniskus-Update, *Radiologie up2date 4*, Thieme-Verlag (2013), Seite 285-286
42. **Walsh C, Goodman D, Caplan A et al (1999).** *Meniscus regeneration in a rabbit partial meniscectomy model.* Tissue Eng 5, Seite 327–337

43. **Wincheringer D, Kohn D (2011).** Orthopädie & Rheuma 2011; 14 (9), Seite 35-39
44. **Yung C.W, Wu L.Q, Tullman J.A, Payne G.F, Bentley W.E, Barbari T.A (2007).**  
*Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold.* J Biomed Mater Res A. 2007 Dec 15;83(4), Seite 1039-1046
45. **Zellner J, Mueller M, Berner A et al (2010).** *Role of mesenchymal stem cells in tissue engineering of meniscus.* J Biomed Mater Res A 94, Seite 1150–1161
46. **Zotzel J (2002),** *Aktivierung von Transglutaminase von Streptomyces mobaraensis und ihre Regulation.* Dissertation: TU Darmstadt, Fachbereich Biologie

## 7 Anhang

### 7.1 Lebenslauf

13.07.1985: in Regensburg als erstes Kind von Agnes Seiler, geb. Teufel, und Dr. Gerhard

Seiler geboren

1991 – 1995 Grundschule Regenstauf

1995 – 2004 Albrecht-Altendorfer-Gymnasium Regensburg

2005 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

2006 – 2011 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg

2007 1. Staatsexamen

2011 2. Staatsexamen

2012 – 2017 Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin im St. Barbara Krankenhaus

Schwandorf

2016 Heirat meiner Ehefrau Mercyline Seiler, geb. Wabuke

2017 Facharztprüfung Innere Medizin

Seit Oktober 2017: Niedergelassen als hausärztlich tätiger Internist

## 7.2 Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. P. Angele für das freundliche Anvertrauen dieser interessanten und spannenden Arbeit. Das Forschungsgebiet Tissue Engineering, im Speziellen der Bereich Knorpel- und Meniskusgewebe, reizte mich von Anfang an. Die Aussicht, einen Beitrag zur Optimierung einer von ihm und seinem Team entwickelten Matrix leisten zu können, motivierte mich besonders.

Durch seine Ermöglichung meiner Teilnahme an Forschungswochenenden konnte ich verwandte Forschungsprojekte besser kennenlernen und ich wurde durch die Diskussionen mit anderen Wissenschaftlern zusätzlich inspiriert. Dafür möchte ich mich ebenfalls explizit bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinem unmittelbaren Betreuer Herrn Dr. R. Kujat für die einzigartige Unterstützung bei theoretischen Überlegungen, praktischen Labortechniken und nicht zuletzt bei der schriftlichen Verfassung meiner Arbeit. Sein Ideenreichtum war außergewöhnlich. Seine großartigen Hilfestellungen gab er mir zu jeder Zeit, auch außerhalb seiner üblichen Arbeitszeiten und immer mit kompromissloser Freundlichkeit. Sein Engagement und sein Streben nach Präzision und Detailgenauigkeit gelten für mich als Vorbild, nicht nur im Rahmen dieser Arbeit, sondern auch darüber hinaus in Bezug auf mein weiteres Leben. Somit kann ich sogar sagen, dass mich die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kujat nachhaltig überaus positiv geprägt hat.

Ebenso bedanke ich mich bei D. Drenkard. Immer wenn ich ihre kompetente Unterstützung bei labortechnischen Methoden benötigte, nahm sie sich großzügig Zeit. Mir gegenüber verhielt sie sich immer freundlich und zugleich motivierend.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei der pharmazeutischen Technik für die Unterstützung bei der Einrichtung der physikalischen Messgeräte sowie beim Team von Prof. Hammer für die Hilfestellungen bei technischen Fragestellungen ganz herzlich bedanken.