

Monika Valtink, Mirko Nitschke, Thomas Götze, Katrin Engelmann und Carsten Werner

Kultivierung transplantierbarer Zellverbände aus cornealem Endothel

1 Corneale Endothel-Degeneration

Das corneale Endothel ist eine Schicht der Hornhaut (Cornea) des Auges (Bild 1), welche diese nach innen zur Augenvorderkammer hin abgrenzt. Die Hauptfunktion des cornealen Endothels besteht darin, den Wassergehalt der Hornhaut zu regulieren und eine Quellung des Gewebes und damit eine Veränderung der optischen Eigenschaften zu verhindern. Es trägt somit wesentlich zur Aufrechterhaltung der cornealen Transparenz bei. Humane corneale Endothelzellen (HCEC) sind hochspezialisiert und *in vivo* nicht mehr teilungsfähig. Das corneale Endothel unterliegt beim Menschen einem physiologischen Zellverlust von jährlich etwa 0,5 %, der jedoch bei degenerativen Erkrankungen oder nach Unfällen oder Operationen deutlich höher sein kann. Da die Zellen nicht mehr teilungsfähig sind, kann dieser Zellverlust nicht durch Regeneration aufgefangen werden. Wird die erforderliche Mindestzelldichte von 500 Zellen/mm² unterschritten, quillt das Gewebe durch die vermehrte Wassereinklagerung und die Hornhaut trübt ein. Das betroffene Auge verliert die Sehfähigkeit, da Lichtinformation nicht mehr bis zur Netzhaut und den dort lokalisierten Rezeptorzellen durchdringen kann. Dieser Zustand kann zurzeit nur durch eine Hornhauttransplantation (Keratoplastik) behoben werden, für die Hornhäute von verstorbenen Spendern benötigt werden. International hat sich als Standard für die Bereitstellung von Spenderhornhäuten und eine gute Operationsplanung die Organkonservierung etabliert. Dabei wird das Spendergewebe im Brutschrank bis zu vier Wo-

chen in einem Nährmedium mit Serumzusatz als Quelle für überlebenswichtige Proteine und Hormone vital gehalten, bevor es nach Untersuchung der Endothelzell-dichte als Qualitätsmerkmal einer Transplantation zugeführt wird [1]. Obwohl dies bereits eine Verbesserung gegenüber den vormals praktizierten Methoden der Transplantation von Frischgewebe oder kurzzeitig in Kaltmedien aufbewahrten Spenderhornhäuten darstellt, haben ca. 45 % der Spenderhornhäute eine zu geringe Endothelzell-dichte und sind qualitativ nicht ausreichend für die Transplantation, was in einem deutlichen Mangel an Spendergeweben resultiert.

2 Zellbasierte Therapieansätze

Um dem Mangel an Spendergewebe entgegenzuwirken, befassen sich einige Arbeitsgruppen mit der Kultivierung humaner cornealer Endothelzellen (HCEC). Ziel ist es dabei, die Zelldichte bei Spenderhornhäuten mit zu geringer Endothelzell-dichte durch Übertragung gezüchteter HCEC zu erhöhen und diese Hornhäute einer Transplantation zugänglich zu machen [2]. Aufgrund der geringen Größe der Hornhaut (Durchmesser 12 mm) ist die für eine *In-vitro*-Kultivierung benötigte und isolierbare Zellzahl jedoch gering. Darüber hinaus ist eine Vermehrung (Proliferation) der HCEC in der Zellkultur zwar möglich, aber auch hier begrenzt. Sie können nur schwer und unter bestimmten, an den Zelltyp angepassten Bedingungen *in vitro* zur Zellteilung angeregt werden. Dennoch ist es gelungen, Protokolle zur Kultivierung von HCEC zu

Die In-vitro-Kultivierung von cornealem Endothel, einer funktionalen, beim Menschen nicht regenerierbaren Schicht in der Hornhaut des Auges, eröffnet weitreichende Möglichkeiten zum Zell- und Gewebeersatz. Dieser Artikel beschreibt aktuelle und künftige Optionen für zellbasierte Therapieansätze sowie die Bedeutung unbegrenzt proliferationsfähiger (immortalisierter) Zellpopulationen als Modellsystem für die Entwicklung neuartiger Methoden. In diesem Zusammenhang werden schaltbare Zellkulturträger als Möglichkeit zur schonenden Gewinnung transplantierbarer „cell sheets“ vorgestellt. Darüber hinaus wird die serumfreie Kultivierung als wichtige Voraussetzung für eine Anwendung am Menschen diskutiert.

The in vitro cultivation of corneal endothelium – a functional, non-regenerable layer of the human cornea – is a promising approach for cell and tissue replacement. This paper introduces options for cell-based therapies and points out the importance of immortalised cell populations as a model system to develop tissue engineering strategies. In particular, the use of stimuli-responsive cell culture carriers for the gentle harvesting of “cell sheets” is described. Furthermore, serum-free cultivation is discussed as a prerequisite for future applications.

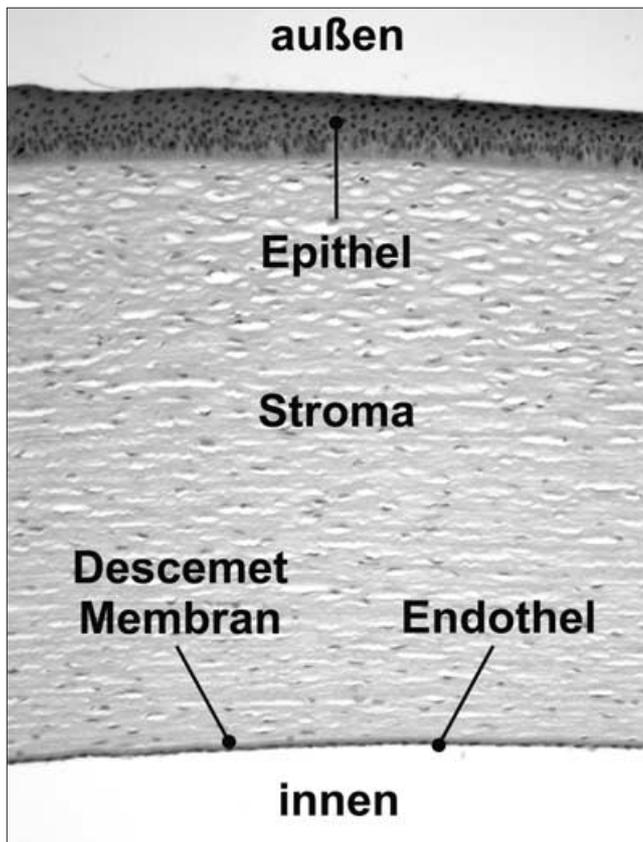


Bild 1. Mikroskopisches Schnittbild durch die Hornhaut/Cornea (beim Menschen 600 bis 800 μm dick)

entwickeln [3]. Dabei erkannte man auch, dass vor allem basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) ein wichtiger Faktor sowohl für das Überleben als auch für die Ausprägung der typischen hochspezialisierten Funktionen von HCEC ist [4].

Aufbauend auf diesen ersten Erfolgen wurde in der Arbeitsgruppe von Professorin KATRIN ENGELMANN in den neunziger Jahren an der Universitäts-Augenklinik Hamburg-Eppendorf die Transplantation kultivierter HCEC als Zellsuspension auf organkultivierte Hornhäute ohne eigenes Endothel entwickelt und etabliert [5]. Dabei zeigte sich, dass bei Verwendung primärer (also nur begrenzt teilungsfähiger) HCEC und Zugabe von FGF-2 das von den transplantierten Zellen neugebildete Endothel morphologisch dem Endothel einer normalen Spenderhornhaut ähnlich ist, und zwar hinsichtlich der Anheftung an die Descemet-Membran, der an das Endothel angrenzenden Schicht in der Hornhaut des Auges, und der Ausbildung interzellulärer Kontakte [6]. Allerdings war die Adhäsion der Zellen weniger stark ausgeprägt als *in vivo* und den transplantierten primären Zellen fehlte die typische Polarität als Voraussetzung für einen gerichteten Wassertransport. Zudem war die Zelldichte des neugebildeten Endothels infolge des verminderten Proliferationsvermögens der eingesetzten primären HCEC zu gering. Jüngste Bestrebungen zielen daher unter anderem auf die Herstellung geschlossener Zellverbände („cell sheets“) als Transplantat, da bei diesen bereits vor der Transplantation eine ausreichende Zelldichte erzielt werden kann.

3 Zellpopulationen als Modellsysteme

Primäre Zellen scheinen demnach weniger geeignet, da sie nur begrenzt *in vitro* kultivierbar sind und man auf Zellen von mehreren Spendern zurückgreifen muss. Die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen innerhalb eines experimentellen Ansatzes wird zudem durch individuelle Einflüsse verschiedener Spender erschwert. Des Weiteren ist humanes Spendergewebe aufgrund gesetzlicher Vorgaben nur beschränkt verfügbar. All dies sind Gründe dafür, dass viele Forschergruppen einschließlich der unsrigen immortalisierte, also unendlich teilungsfähige und somit permanent wachsende Zellpopulationen als Modellsysteme verwenden. Solche Modelle eignen sich sehr gut zur Entwicklung von Methoden für die Gewinnung therapeutischer Zellpräparate, um zum Beispiel notwendige technische Rahmenbedingungen zu definieren. Voraussetzung ist dabei die Ähnlichkeit der jeweiligen Zellpopulation mit den entsprechenden primären Zellen hinsichtlich zelltypspezifischer Charakteristika. Aus all jenen Gründen wurde in unserer Arbeitsgruppe durch das Einbringen eines bestimmten Virusgens in isolierte Endothelzellen einer Spenderhornhaut eine immortalisierte HCEC-Population erzeugt [7]. Abgesehen von der unbegrenzten Proliferationsfähigkeit entsprechen diese Zellen den primären HCEC und bilden nach Transplantation auf endothelfreie Hornhäute einen funktionellen Zellrasen mit charakteristischen Endothelzellichten und typischer Morphologie und Funktion [8].

Corneale Endothelzellen aus dem Zentrum der Hornhaut unterscheiden sich von denen der Peripherie unter anderem in der Expression verschiedener Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren und können daher in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden [9]. Die in unserer Arbeitsgruppe etablierte, immortalisierte HCEC-Population wurde aus dem Gesamtendothel einer Spenderhornhaut gewonnen. Sie besteht somit aus verschiedenen Subpopulationen und weist demgemäß eine heterogene Morphologie auf. Um zuverlässige und reproduzierbare Daten mit einem möglichst geringen experimentellen Aufwand zu erhalten, ist es jedoch von Vorteil, mit einer möglichst homogenen Zellpopulation zu arbeiten, um größere Variationen als Folge unterschiedlichen Zellverhaltens diverser Subpopulationen zu vermeiden. Solche homogenen Populationen sind im besten Falle klonal, d. h. aus einer einzigen Zelle entstanden und somit genetisch und morphologisch identisch.

4 Bedeutung der serumfreien Kultivierung

Heutige Bestrebungen zielen auf eine serumfreie Organkonservierung von Spendergewebe für die Patientenbehandlung. Serum wird aus dem Blut von Kälberföten gewonnen und kann als ein komplexes, undefiniertes Stoffgemisch angesehen werden, welches chargenabhängig starken Qualitätsschwankungen unterliegt. Des Weiteren gilt Serum als potenzielle Quelle infektiöser Proteine, z. B. Prionen. Bis vor wenigen Jahren war es ein überlebenswichtiger Zusatzstoff für Zellkulturen. Heutzutage kann in vielen Bereichen aufgrund verbesserter Nährmedien auf Serum verzichtet werden. Mittlerweile wurde auch eine erste klinische Studie zur Transplantation von Spenderhornhäuten aus serumfreier Organkonservierung von Professorin ENGELMANN geplant und begonnen (leitendes Studienzentrum: Augenklinik des Klinikums Chemnitz

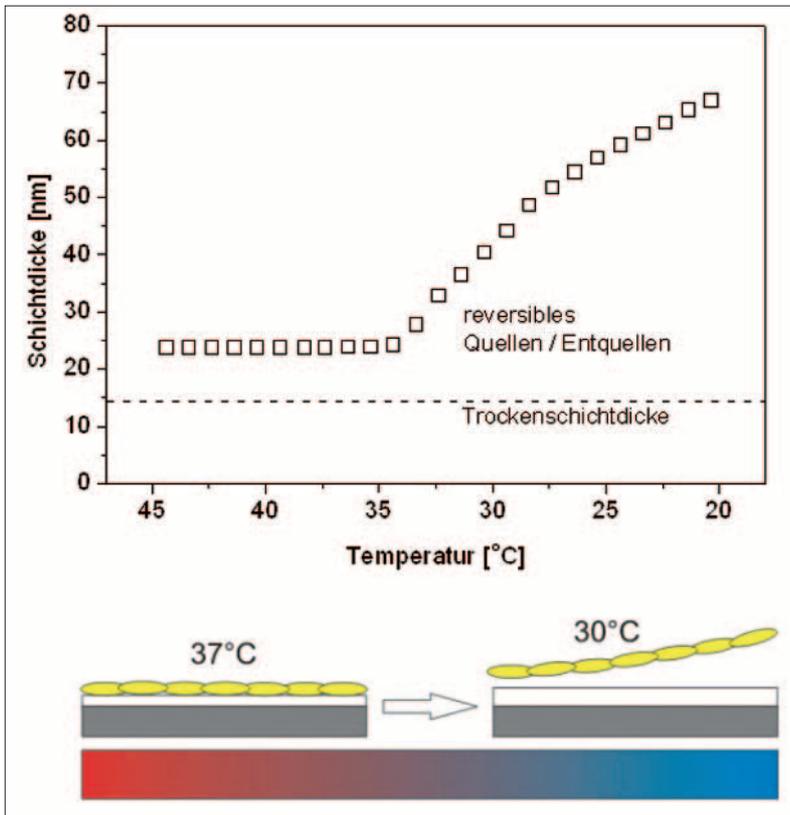


Bild 2. Thermo-reversibles Quellverhalten eines schaltbaren Zellkulturträgers (oben) und schematische Darstellung der Ablösung eines konfluenten Zellrasens (unten)

gmbH, in Kooperation mit dem Koordinierungszentrum für Klinische Studien Dresden). Dies hat unmittelbaren Einfluss auf die Entwicklung von Methoden zur Herstellung von Zelltransplantaten. Auch hier sollte Serumfreiheit zum Standard werden, um den heutigen medizinischen und klinischen Anforderungen gerecht zu werden.

Um homogene Modellsysteme für weitere Entwicklungsarbeiten zur zellbasierten Therapie von cornealen Endothel-Degenerationen zur Verfügung zu haben und darüber hinaus gemäß den klinischen Ansprüchen serumfreie Methoden zur Herstellung von Zelltransplantaten zu entwickeln, wurde die heterogene, immortalisierte HCEC-Population an serumfreie Kulturbedingungen adaptiert und anschließend einem zweistufigen Klonierungsverfahren unterzogen. Dabei erhielt man zwei unterschiedliche klonale, also aus jeweils einer einzigen Zelle entstandene, Subpopulationen, die in ersten Studien bereits morphologisch charakterisiert wurden [10]. Beide Zellpopulationen exprimieren für corneales Endothel typische Proteine, differieren allerdings deutlich in ihrem Adhärenz- und Proliferationsverhalten. Während sich Zellen der proliferationsfähigeren, aber wenig adhären HCEC-Subpopulation für Untersuchungen zur Etablierung hoher Zelldichten eignen, repräsentieren die Zellen der äußerst adhären und weniger stark proliferierenden HCEC-Subpopulation eher die Situation primärer Zellen des cornealen Zentrums. Sie sind außerdem in der Lage, unter serumfreien Bedingungen einen funktionellen Zellrasen zu bilden und stellen somit ein ideales Modell dar, um Methoden zur Herstellung transplantierbarer Zellverbände zu entwickeln.

5 Schaltbare Zellkulturträger

Die *In-vitro*-Kultivierung derartiger HCEC-Zellverbände auf natürlichen oder künstlichen Matrices mit dem Ziel

eines therapeutischen Einsatzes ist Gegenstand einer Reihe von Arbeiten [11 bis 14]. Als besonders aussichtsreicher Ansatz gilt in diesem Zusammenhang die als „cell sheet engineering“ bezeichnete Technologie [15]. Sie ermöglicht durch die Verwendung schaltbarer Zellkulturträger eine schonende Gewinnung empfindlicher Gewebekulturen ohne enzymatische oder mechanische Hilfsmittel. Das Verfahren wurde weltweit von verschiedenen Arbeitsgruppen unter anderem an Epithelzellen der Luftröhre [16], Aortenendothelzellen [17], Herzmuskelzellen [18] und cornealen Epithel- [19] sowie Endothelzellen [20] demonstriert.

Schaltbare Zellkulturträger basieren auf Hydrogelen, die auf einen externen Stimulus mit einer Änderung von physikalischen Eigenschaften reagieren (stimuli-responsive polymers, SRP [21]). Für die Herstellung von Zellkulturträgern, die allein über eine kurzzeitige Temperaturabsenkung das schonende Ablösen adhärenter Zellen ermöglichen, sind SRP mit einem thermisch stimulierten Phasenübergang nahe 37 °C von besonderer Bedeutung. Bekannteste Beispiele hierfür sind Poly(N-isopropylacrylamid) (PNiPAAm) [22] und N-isopropylacrylamid (NiPAAm)-basierte Copolymere [23]. Diese lassen sich mit Techniken wie Photografting, elektronenstrahl-, gamma- oder plasmainduzierter Graftpolymerisation bzw. Plasmapolymerisation als Dünnschicht auf verschiedenste Trägermaterialien aufbringen. Eine Absenkung bzw. Erhöhung der Temperatur von wenigen Graden um einen kritischen Wert herum (lower critical solution temperature, LCST) führt in wässrigen Medien zu einem reversiblen Quellen bzw. Kollabieren der SRP-Schicht. Ein so ausgerüsteter Kulturträger gestattet oberhalb der LCST die Ausbildung einer geschlossenen Lage adhärenter Zellen, welche sich bei Unterschreitung der LCST als Ganzes vom Substrat löst (Bild 2, unten).

Am Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden wurde eine Reihe von Copolymeren, bestehend aus NiPAAm als thermisch schaltender Einheit und Como-

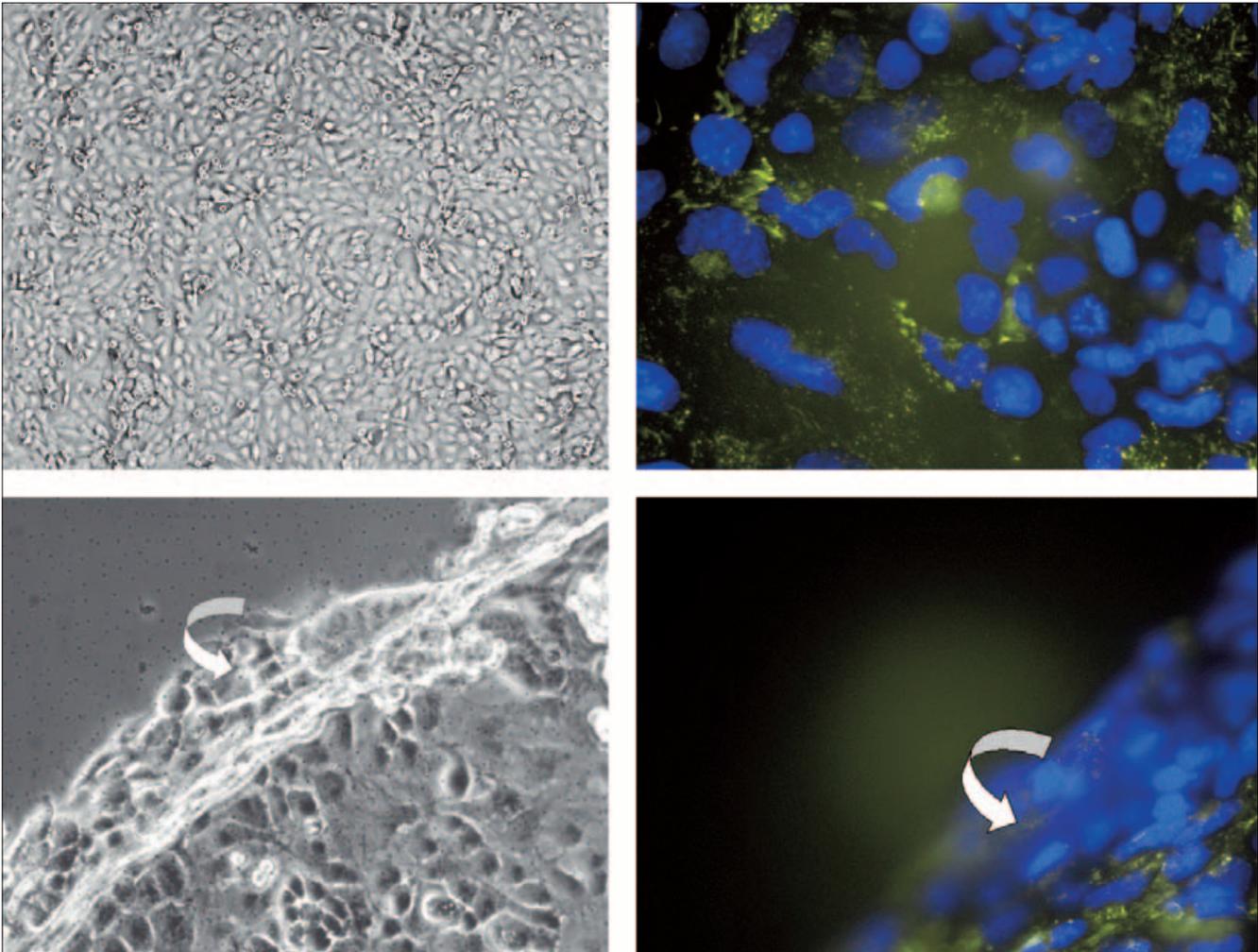


Bild 3. Ablösung humaner cornealer Endothelzellen von einem schaltbaren Kulturträger. Aufnahmen nach Standardkultivierung bei 37 °C (oben) sowie nach Temperaturabsenkung auf 30 °C (unten). Links: mikroskopische Aufnahmen (1747 x 1385 μm^2 , 436 x 346 μm^2), rechts: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (213 x 162 μm^2 , Zellkerne blau, Fibronectin gelb). Nachdruck mit Genehmigung aus [14] © Wiley 2007.

nomeren mit einer Poly(ethylenglykol) (PEG)-Seitenkette, synthetisiert [24]. Diese wurden mittels Plasmaimmobilisierung [25] als Dünnschicht auf polymeren Trägern immobilisiert. Amplitude und Kinetik des Schaltvorgangs konnten mittels spektroskopischer Ellipsometrie dokumentiert werden (Bild 2, oben) [26]. Die erhaltenen Oberflächen wurden erfolgreich als schaltbare Zellkulturträger eingesetzt. Die Einstellbarkeit der physiko-chemischen Eigenschaften über Anzahl und Länge der PEG-Seitenketten ermöglichte dabei die Anpassung an die speziellen Erfordernisse unterschiedlicher Zelltypen. Nach ersten Versuchen mit Mausfibroblasten [27] konnten die Resultate auf anspruchsvollere Systeme wie humane Gefäßendothelzellen [28] und humane corneale Endothelzellen [14] übertragen werden.

6 Tissue Engineering

Bild 3 zeigt die Ausbildung eines geschlossenen Zellrasens humaner cornealer Endothelzellen auf einem schaltbaren Kulturträger nach Standardkultivierung bei 37 °C. Nach Absenkung der Temperatur auf 30 °C löst sich der Zellverband innerhalb weniger Minuten vom Substrat (hier von links oben nach rechts unten). Der Mechanismus der

thermisch stimulierten Zellablösung lässt sich durch fluoreszenzmikroskopische Beobachtung von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) weiter aufklären. In diesem Beispiel wurde der Kultur fluoreszenzmarkiertes Fibronectin zugefügt, welches innerhalb weniger Stunden von den Zellen erkennbar reorganisiert und in die extrazelluläre Matrix integriert wurde. Bei Temperaturabsenkung wird das markierte Fibronectin – stellvertretend für die Visualisierung der ECM – zusammen mit dem Zellverband abgelöst. Der Versuch verdeutlicht die Möglichkeit der Gewinnung von „cell sheets“ (d. h. von Zellverbänden inklusive der extrazellulären Matrix) als eine wesentliche Voraussetzung für einen Einsatz derartiger Strukturen im Tissue Engineering. Die extrazelluläre Matrix verbleibt bei der sonst üblichen enzymatischen Zellablösung in der Kulturschale bzw. wird durch die Enzymbehandlung angehaut. Zusätzlich kann es durch die Enzymbehandlung zu zellulären Schäden kommen, was durch die vorbeschriebene Methode ausgeschlossen ist.

Darüber hinaus ist die serumfreie Kultivierung ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf künftige Anwendungen. Bild 4 illustriert den Übergang von serumhaltiger zu serumfreier Kultur. Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen gelingt auch im serumfreien Fall die Bildung eines konfluenten Zellrasens. Allerdings ist dies mit einem veränder-

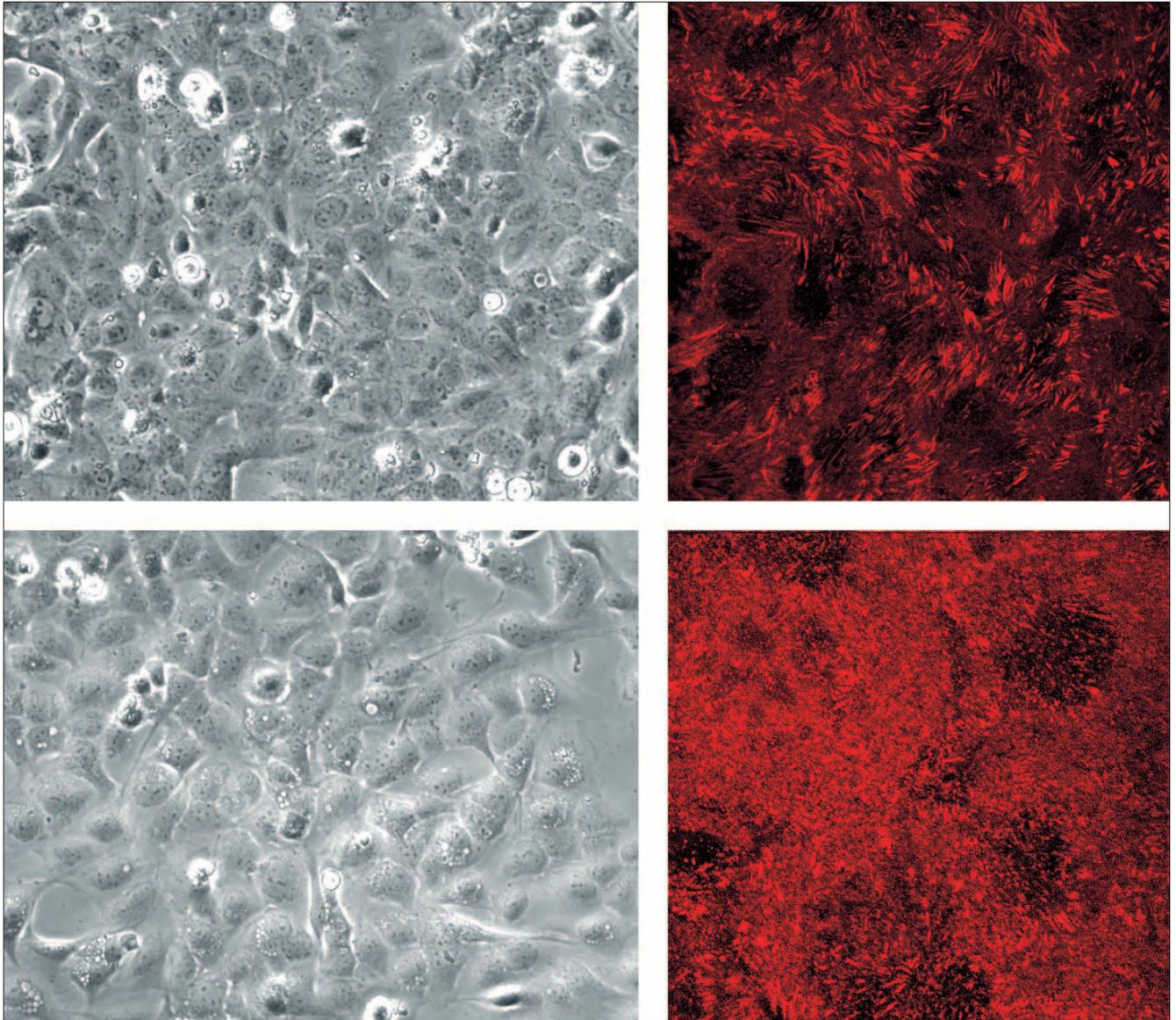


Bild 4. Kultivierung humaner cornealer Endothelzellen in serumhaltigem (oben) und serumfreiem Medium (unten). Links: mikroskopische Aufnahmen nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens ($436 \times 346 \mu\text{m}^2$), rechts: fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen ($125 \times 125 \mu\text{m}^2$, zelluläre Haftkomplexe rot).

ten Haftungsverhalten der Zellen verbunden – hier veranschaulicht durch die veränderte Konzentration des in zellulären Haftkomplexen lokalisierten Proteins Vinculin – was die stimulierte Ablösung von einem schaltbaren Kulturträger zunächst erschwert. Dem kann jedoch durch die Ausnutzung der oben genannten Freiheitsgrade bei der Wahl des SRP-Materials entgegengewirkt werden.

7 Fazit und Ausblick

Noch ist die Endothelzelltransplantation ein experimentelles Verfahren und wurde sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell mit kultivierten cornealen Endothelzellen als Zellsuspensionen oder als Zellsheet durchgeführt [5, 8, 11 bis 13, 29, 30]. Die Herstellung von Zell-Matrix-Konstrukten, die als Sheet transplantiert werden können, stellt dabei eine qualitative Optimierung der Transplantate im Vergleich zu Zellsuspensionen dar. Auch im klinischen Bereich wird seit

einiger Zeit die Transplantation von cornealen Endothelsheets (posteriore lamelläre Keratoplastik) anstelle der Transplantation einer ganzen Spenderhornhaut bei cornealen Erkrankungen, die nur das Endothel betreffen, diskutiert und in ersten Ansätzen versuchsweise im Tiermodell und am Patienten erprobt [31, 32]. Hierbei werden entweder Sheets von cornealen Endothelzellen mit der Descemet-Membran von Spenderhornhäuten abgezogen oder auf Collagenmatrices gezüchtete Zellsheets transplantiert. Somit kann zwar die chirurgische Technik der Sheetransplantation entwickelt und verbessert werden, dem Mangel an Spendergewebe wird damit aber nicht Rechnung getragen. Die Transplantation von im Labor generierten Zelltransplantaten aus *in vitro* kultivierten Zellen nimmt somit an Bedeutung zu und Methoden zur Herstellung solcher transplantierbarer Zellsheets sind schon sehr weit fortgeschritten. Dem Einsatz in der Klinik steht aber noch entgegen, dass die momentan experimentell eingesetzten Zellen genetisch manipuliert wurden, um ihre Proliferationsfähigkeit dauerhaft zu erhö-

hen. Nächste Schritte zielen daher auf die Etablierung von Methoden, die nur eine vorübergehende Erhöhung der Proliferationsfähigkeit der Zellen während der Herstellungsphase erlauben, sodass nach erfolgter Transplantation kein unerwünschtes Zellwachstum möglich ist.

Literatur

- [1] Draeger, J.; Böhnke, M.; Kohlhaas, M.; Engelmann, K.: Voraussetzungen für den Gebrauch konservierten Spendermaterials bei perforierender Keratoplastik. In: Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde **200** (1992), S. 392 – 394
- [2] Engelmann, K.; Bednarz, J.; Valtink, M.: Prospects for endothelial transplantation. In: Experimental Eye Research **78** (2004), S. 573 – 578
- [3] Engelmann, K.; Bohnke, M.; Friedl, P.: Isolation and Long-Term Cultivation of Human Corneal Endothelial-Cells. In: Investigative Ophthalmology & Visual Science **29** (1988), S. 1656 – 1662
- [4] Rieck, P.; Oliver, L.; Engelmann, K.; Fuhrmann, G.; Hartmann, C.; Courtois, Y.: The Role of Exogenous Endogenous Basic Fibroblast Growth-Factor (Fgf2) and Transforming Growth-Factor-Beta (Tgf-Beta-1) on Human Corneal Endothelial-Cells Proliferation In-Vitro. In: Experimental Cell Research **220** (1995), S. 36 – 46
- [5] Engelmann, K.; Drexler, D.; Bohnke, M.: Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part I: Cell culturing and transplantation procedure. In: Cornea **18** (1999), S. 199 – 206
- [6] Böhnke, M.; Eggli, P.; Engelmann, K.: Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope. In: Cornea **18** (1999), S. 207 – 213
- [7] Bednarz, J.; Teifel, M.; Friedl, P.; Engelmann, K.: Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. In: Acta Ophthalmologica Scandinavica **78** (2000), S. 130 – 136
- [8] Aboalchamat, B.; Engelmann, K.; Bohnke, M.; Eggli, P.; Bednarz, J.: Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. In: Experimental Eye Research **69** (1999), S. 547 – 553
- [9] Bednarz, J.; Weich, H. A.; Rodokanakovschrenck, A.; Engelmann, K.: Expression of Genes-Coding Growth-Factors and Growth-Factor Receptors in Differentiated and Dedifferentiated Human Corneal Endothelial-Cells. In: Cornea **14** (1995), S. 372 – 381
- [10] Valtink, M.; Gruschwitz, R.; Funk, R. H. W.; Engelmann, K.: Two clonal cell lines of immortalized human corneal endothelial cells show either differentiated or precursor cell characteristics. In: Cells Tissues Organs (im Druck)
- [11] Mimura, T.; Yamagami, S.; Yokoo, S.; Usui, T.; Tanaka, K.; Hattori, S.; Irie, S.; Miyata, K.; Araie, M.; Amano, S.: Cultured human corneal endothelial cell transplantation with a collagen sheet in a rabbit model. In: Investigative Ophthalmology & Visual Science **45** (2004), S. 2992 – 2997
- [12] Ishino, Y.; Sano, Y.; Nakamura, T.; Connon, C. J.; Rigby, H.; Fullwood, N. J.; Kinoshita, S.: Amniotic membrane as a carrier for cultivated human corneal endothelial cell transplantation. In: Investigative Ophthalmology & Visual Science **45** (2004), S. 800 – 806
- [13] Hsiue, G. H.; Lai, J. Y.; Chen, K. H.; Hsu, W. M.: A novel strategy for corneal endothelial reconstruction with a bioengineered cell sheet. In: Transplantation **81** (2006), S. 473 – 476
- [14] Nitschke, M.; Gramm, S.; Götze, T.; Valtink, M.; Drichel, J.; Voit, B.; Engelmann, K.; Werner, C.: Thermo-responsive poly(NiPAAm-co-DEGMA) substrates for gentle harvest of human corneal endothelial cell sheets. In: Journal of Biomedical Materials Research **A80** (2007), S. 1003 – 1010
- [15] Yamato, M.; Akiyama, Y.; Kobayashi, J.; Yang, J.; Kikuchi, A.; Okano, T.: Temperature-responsive cell culture surfaces for regenerative medicine with cell sheet engineering. In: Progress in Polymer Science **32** (2007), S. 1123 – 1133
- [16] Kanzaki, M.; Yamato, M.; Hatakeyama, H.; Kohno, C.; Yang, J.; Umemoto, T.; Kikuchi, A.; Okano, T.; Onuki, T.: Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea. In: Tissue Engineering **12** (2006), S. 1275 – 1283
- [17] Canavan, H. E.; Cheng, X. H.; Graham, D. J.; Ratner, B. D.; Castner, D. G.: Cell sheet detachment affects the extracellular matrix: A surface science study comparing thermal liftoff, enzymatic, and mechanical methods. In: Journal of Biomedical Materials Research Part A **75A** (2005), S. 1 – 13
- [18] Shimizu, T.; Yamato, M.; Isoi, Y.; Akutsu, T.; Setomaru, T.; Abe, K.; Kikuchi, A.; Umezumi, M.; Okano, T.: Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. In: Circulation Research **90** (2002), S. E40 – E48
- [19] Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y.; Watanabe, K.; Maeda, N.; Watanabe, H.; Yamamoto, K.; Nagai, S.; Kikuchi, A.; Tano, Y.; Okano, T.: Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. In: Transplantation **77** (2004), S. 379 – 385
- [20] Lai, J. Y.; Chen, K. H.; Hsu, W. M.; Hsiue, G. H.; Lee, Y. H.: Bioengineered human corneal endothelium for transplantation. In: Archives of Ophthalmology **124** (2006), S. 1441 – 1448
- [21] Kumar, A.; Srivastava, A.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B.: Smart polymers: Physical forms and bioengineering application. In: Progress in Polymer Science **32** (2007), S. 1205 – 1237
- [22] Schild, H. G.: Poly (N-Isopropylacrylamide) – Experiment, Theory and Application. In: Progress in Polymer Science **17** (1992), S. 163 – 249
- [23] Rzaev, Z. M. O.; Dincer, S.; Piskin, E.: Functional copolymers of N-isopropylacrylamide for bioengineering applications. In: Progress in Polymer Science **32** (2007), S. 534 – 595
- [24] Gramm, S.; Komber, H.; Schmaljohann, D.: Copolymerization kinetics of N-isopropylacrylamide and diethylene glycol monomethylether monomethacrylate determined by online NMR spectroscopy. In: Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry **43** (2005), S. 142 – 148
- [25] Nitschke, M.; Zschoche, S.; Baier, A.; Simon, F.; Werner, C.: Low pressure plasma immobilization of thin hydrogel films on polymer surfaces. In: Surface and Coatings Technology **185** (2004), S. 120 – 125
- [26] Schmaljohann, D.; Beyerlein, D.; Nitschke, M.; Werner, C.: Thermo-reversible swelling of thin hydrogel films immobilized by low-pressure plasma. In: Langmuir **20** (2004), S. 10107 – 10114
- [27] Schmaljohann, D.; Oswald, J.; Jorgensen, B.; Nitschke, M.; Beyerlein, D.; Werner, C.: Thermo-responsive PNiPAAm-g-PEG films for controlled cell detachment. In: Biomacromolecules **4** (2003), S. 1733 – 1739
- [28] Nitschke, M.; Götze, T.; Gramm, S.; Werner, C.: Detachment of human endothelial cell sheets from thermo-responsive poly(NiPAAm-co-DEGMA) carriers. In: Express Polymer Letters **1** (2007), S. 660 – 666
- [29] Chen, K. H.; Azar, D.; Joyce, N. C.: Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo – A morphologic study. In: Cornea **20** (2001), S. 731 – 737
- [30] Jumblatt, M. M.; Maurice, D. M.; McCulley, J. P.: Transplantation of Tissue-Cultured Corneal Endothelium. In: Investigative Ophthalmology & Visual Science **17** (1978), S. 1135 – 1141
- [31] Koizumi, N.; Sakamoto, Y.; Okumura, N.; Okahara, N.; Tsuchiya, H.; Torii, R.; Cooper, L. J.; Ban, Y.; Tanioka, H.; Kinoshita, S.: Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. In: Investigative Ophthalmology & Visual Science **48** (2007), S. 4519 – 4526
- [32] van Dooren, B. T. H.; Mulder, P. G. H.; Nieuwendaal, C. P.; Beekhuis, W. H.; Melles, G. R. J.: Endothelial cell density after posterior lamellar keratoplasty: Five- to seven-year follow-up. In: American Journal of Ophthalmology **144** (2007), S. 471 – 473

Manuskripteingang: 31.1.2008
Angenommen am: 26.2.2008

