
***In vitro* Biokompatibilitätsanalysen mittels ESC-
abgeleiteter EBs mit Schwerpunkt Zellaktivität und
Adhäsion**

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Angefertigt am Universitätsklinikum Jena – Klinik für Innere Medizin I
Universitäts- Herzzentrum Thüringen
AG Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung

von: Mathias Reinhardt Disputation v om 07.10.2014

Gutachter: 1.Prof . Maria Wartenberg, Jena
2.Prof. Heinrich Sauer, Gießen
3.PD Gregor Franziskus Raschke, Bonn

I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
ANS	1-Anillino-8-naphthalensulfonat
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
cAMP / CAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CCl4	Tetrachlormethan
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C _T	<i>cycle treshold</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EB	<i>embryoid body</i>
EC cells	<i>embryonic carcinoma cells</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
ECTCPC	<i>extracardiac conduit total cavopulmonary connection</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG cells	<i>embryonic germ cells</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPO	Erythropoetin
ES cells / ESC	<i>embryonic stem cell</i>
EST	<i>embryonic stem cell test</i>
EthD-2	Ethidiumhomodimer-2
ECVAM	<i>European Center for the Validation of Alternative Methods</i>
FBS	fetales bovines Serum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
g	Normfallbeschleunigung
GMEM	<i>Glasgow minimum essential medium</i>
hTr	hängender Tropfen
Ig	Immunglobulin
ICM	innere Zellmasse
IL	Interleukin
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LIMA	<i>left internal mammary artery</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
MCC	Methylzellulose-Kultur
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i>
MHC	<i>myosin heavy chain</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>

-Abkürzungsverzeichnis-

Oct-1	<i>Octamer transcription factor 1</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	PBS-Triton X-100
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	primitives Endoderm
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PML	<i>polymorphonuclear leucocyte</i>
Pol2a	Polymerase 2a
PP	Petriperm
PVC	Polyvinylchlorid
RA	<i>retinoic acid</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>reactive oxygen intermediate</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SF	Spinnerflasche
TEVA	<i>tissue-engineered vascular autograft</i>
Tf	Transkriptionsfaktor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
3R	<i>refine, reduce, replace</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	- 2 -
2	Einleitung	- 4 -
2.1	<i>Die Implantation nicht-autogenen Gewebes</i>	<i>- 4 -</i>
2.2	<i>Tissue engineering als Ausweg ?</i>	<i>- 5 -</i>
2.3	<i>Embryonale Stammzellen und embryoid bodies als Modellsystem</i>	<i>- 7 -</i>
2.4	<i>Steuerbarkeit der Differenzierung und Aufrechterhaltung von Undifferenziertheit.....</i>	<i>- 9 -</i>
2.5	<i>Methoden der Kultivierung.....</i>	<i>- 12 -</i>
2.6	<i>Embryonale Stammzellen und embryoid bodies in Anwendungen</i>	<i>- 14 -</i>
3	Zielstellung.....	- 15 -
4	Material und Methoden	- 15 -
4.1	<i>Materialien.....</i>	<i>- 15 -</i>
4.1.1	Geräte.....	- 15 -
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	- 15 -
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	- 16 -
4.1.4	Puffer und Lösungen.....	- 17 -
4.1.5	Medien	- 17 -
4.1.6	Immunfluoreszenz.....	- 18 -
4.1.7	Primer.....	- 18 -
4.1.8	Software	- 19 -
4.1.9	Biomaterialien.....	- 19 -
4.2	<i>Methoden</i>	<i>- 21 -</i>
4.2.1	Zellkultur.....	- 21 -
4.2.1.1	Kultivierung undifferenzierter muriner embryonaler Stammzellen	- 21 -
4.2.1.2	Kultivierung von EBs in der SF	- 22 -
4.2.1.3	Kultur im hängenden Tropfen (hTr) mit Bioabbaubaren Materialien	- 22 -
4.2.1.4	Behandlung des hängenden Tropfens mit Blei- und Laktatlösungen.....	- 23 -
4.2.2	Immunofluoreszenz.....	- 24 -
4.2.3	Letalitätsmessung.....	- 25 -
4.2.4	Anwachsraten.....	- 25 -
4.2.5	Adhärenz	- 26 -
4.2.6	Genexpression.....	- 27 -
4.2.6.1	RNA-Isolation.....	- 27 -
4.2.6.2	cDNA-Herstellung	- 27 -
4.2.6.3	PCR.....	- 28 -
4.2.7	Software	- 28 -
5	Ergebnisse	- 30 -
5.1	<i>Experimente ohne bioabbaubare Materialien.....</i>	<i>- 30 -</i>
5.1.1	EBs auf wachstumsfördernd behandelten Zellkulturschalen.....	- 30 -
5.1.2	EBs in Konfrontation mit Blei und Laktat	- 31 -
5.2	<i>Experimente mit bioabbaubaren Materialien</i>	<i>- 35 -</i>
5.2.1	Anwachsverhalten von EBs auf bioabbaubaren Materialien.....	- 35 -
5.2.1.1	Anwachsraten.....	- 35 -
5.2.1.2	Adhärenz	- 37 -
5.2.2	Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz.....	- 39 -
5.2.2.1	Differenzierung zu Endothel (CD31).....	- 39 -
5.2.2.2	Differenzierung zu Monozyten und Makrophagen (CD68)	- 42 -
5.2.3	Untersuchung der Letalität.....	- 44 -
5.2.4	Genexpression.....	- 47 -

6	Diskussion	- 50 -
6.1	<i>Kultur des hTr und Anwachsraten</i>	<i>- 50 -</i>
6.2	<i>Der Einfluss von Blei- und Laktationen auf den EB</i>	<i>- 51 -</i>
6.3	<i>Kokulturen mit bioabbaubaren Materialien</i>	<i>- 53 -</i>
6.3.1	<i>Anwachsraten und Adhärenz</i>	<i>- 53 -</i>
6.3.2	<i>Verhältnis von bioabbaubaren Materialien zur Vaskulogenese</i>	<i>- 54 -</i>
6.3.3	<i>Verhältnis von bioabbaubaren Materialien zu Monozyten und Makrophagen.....</i>	<i>- 56 -</i>
6.3.4	<i>Letalität in Kokultur mit bioabbaubaren Materialien.....</i>	<i>- 59 -</i>
6.3.5	<i>Expression der embryonalen Gene <i>nanog</i>, <i>oct-1</i> und <i>rex1</i></i>	<i>- 60 -</i>
7	Schlussfolgerung.....	- 62 -
8	Literaturverzeichnis.....	- 64 -
9	Anhang	- 71 -
9.1	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	<i>- 71 -</i>
9.2	<i>Danksagung</i>	<i>- 72 -</i>
9.3	<i>Lebenslauf.....</i>	<i>- 73 -</i>

1 Zusammenfassung

Ein wesentlicher Bestandteil der Medizin ist der Ersatz von defektem Gewebe durch körperfremde organische oder anorganische Materialien. Ein Ansatz der modernen Medizin ist es, ein körperfremdes Gewebe mit körpereigenen Zellen, welche noch ein hohes Differenzierungspotential besitzen, zu besiedeln und es zu implantieren. Dieses modifizierte Implantat sollte vom Körper definiert abgebaut werden können und der entstandene Raum durch körpereignes Gewebe ersetzt werden. Dieses, als *tissue engineering* bezeichnete Verfahren wird in Zukunft eine immer wichtigere Rolle spielen. In diesem Grenzbereich zwischen Medizin und Materialwissenschaften spielt die Suche nach geeigneten Materialien und deren präklinische Testung eine große Rolle.

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob und wie *in vitro* murine Stammzellen in Form von *embryoid bodies* (EB) auf bioabbaubare Materialien (Biomaterialien) reagieren. Die gewonnenen Ergebnisse sollen Aufschluss über geeignete Kultivierungsmethoden und Vitalitätsparameter geben um ein Testverfahren zu etablieren, welches neue Materialien standardisiert und ökonomisch, in einem relativ kurzen Zeitraum, auf Gewebsverträglichkeit prüft und ferner, als *in vitro* – Verfahren, Implantationen an Wirbeltieren teilweise zu reduzieren hilft. Diese Arbeit wird deshalb von der Stiftung 3R unterstützt, deren Anliegen es ist, Tierexperimente zu verringern.

Als Methode der Kultur von EB und Materialscheibe wurde der hängende Tropfen (hTr) gewählt. Die acht Tage alten EBs wurden fünf Tage lang mit drei bioabbaubaren Polymeren kokultiviert und anschließend untersucht. Die Polymere sind ein Gemisch aus Poly(L)-Lactid und ϵ -Caprolacton. Sie wurden von der Firma INNOVENT zur Verfügung gestellt. Als Referenzmaterialien dienten das sehr gut verträgliche inerte Material Petriperm und das nicht biokompatible Polyvinylchlorid-Blei (PVC-Pb).

Die Analyse beinhaltete die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen (CD68) und Endothel (CD31) mittels Immunfluoreszenzfärbungen, Letalitätsfärbung (Ethidium-Homodimer), die Expansion von EBs auf Materialscheiben (Adhärenz), das Anwachsverhalten von EBs an den unterschiedlichen Materialien im hTr, sowie die Genexpression der vier embryonalen Gene Nanog, Oct-1 und Rex1.

Besonders die Endotheldifferenzierung, die Adhärenz und die Letalität von EBs zeigen signifikante Unterschiede zwischen einer Kokultur mit bioabbaubaren Materialien und den Referenzmaterialien. Auch die Untersuchung der Monozyten/Makrophagen kommt als

-Zusammenfassung

Parameter in Frage. Die Anwachsraten sollten bedingt nur in Kombination mit einer automatisierten Generierung der Kokulturen angewendet werden.

Die untersuchten Parameter in Kombination mit der Methode des hTr sind in der Lage sehr wenig gewebsverträglich Materialien von gut gewebsverträglichen Materialien zu unterscheiden. Sie können Bestandteil eines standardisierten Tests sein. Es sollten noch weitere Parameter untersucht werden um die Biokompatibilität noch präziser vorhersagen zu können. Dies trifft besonders auf die embryonalen Marker zu, deren Untersuchung komplexe Ergebnisse hervorbrachte, die allerdings durchaus Tendenzen zwischen den bioabbaubaren Materialien untereinander zeigten.

2 Einleitung

2.1 Die Implantation nicht-autogenen Gewebes

Seit jeher ist ein zentraler Gegenstand der Chirurgie der Ersatz von Geweben, sei es weil sie nicht mehr funktionstüchtig sind, sei es weil sie fehlen. Unter Umständen kann das relativ unproblematisch durchgeführt werden, nämlich dann wenn es sich um autogene Implantate handelt. Ein Paradebeispiel hierfür ist das Legen eines Bypass zur Umgehung einer arteriosklerotisch veränderten Herzkranzarterie. Hierfür könnte jede körpereigene Arterie mit ähnlichem Durchmesser verwendet werden. Man verwendet am häufigsten die linke innere Brustarterie (LIMA) (Kato et al. 2011). Ähnlich komplikationsarm sind isogene Transplantate, wenn glücklicherweise eineiige Zwillinge vorhanden sind. Hier sei die Verpflanzung der Nebenschilddrüsen erwähnt, bei einem Hypoparathyreoidismus-Leiden (Segeberger et al. 1992). In vielen Fällen jedoch ist die Medizin gezwungen auf andere Gewebe zurückzugreifen. Sehr intensiv untersucht und bereits seit Jahrzehnten durchgeführt wird die Allotransplantation, die Spende von Organen oder Geweben von einem nicht genetisch verwandten menschlichen Spender. 1967 gelang in Südafrika die erste Herztransplantation. Der Empfänger überlebte 18 Tage, bis er einer Pneumonie erlag (Fu et al.). Zweifellos schenken Organspenden tausenden Betroffenen viele Lebensjahre, doch besonders angesichts steigender Lebenserwartung und sehr uneinheitlicher Organspendegesetze allein in Europa, ist die Diskrepanz zwischen Organangebot und –bedarf enorm. So kamen am Ende des Jahres 2011 1727 gespendete Lebern auf 2530 Wartende der Eurotransplantliste (EUROTRANSPLANT 2011). Ein weiterer Ansatz ist die Erforschung von Xenografts, die Transplantation von Geweben oder Organen anderer Arten. Hier rückt besonders das Schwein in den Fokus, aufgrund seiner ähnlichen Anatomie und Physiologie. Im Bemühen um die Verringerung von Abstoßungen werden genetisch veränderte Schweine gezüchtet (Ayares 2012). Tierische Gewebe werden bereits vielfach implantiert, z.B. in Form von Kollagen-haltigen Knochenersatzmaterialien oder beim *tissue engineering* (Anwendungen siehe 2.2.). Die Einsatzgebiete sind noch relativ begrenzt. Außerdem bestehen ethische Einwände über die Verwendung von Tieren als „Ersatzteilsponder“ einerseits und als Nahrungsmittel andererseits. Aus diesen Gründen beschäftigen die Medizin und die Materialwissenschaften in zunehmendem Maße die Entwicklung von künstlich hergestellten Stoffen mit sehr vielfältigem Aufbau, dem so genannten alloplastischen Transplantat oder Implantat. Mit Sicherheit stellt in diesem

Rahmen die Implantation der ersten künstlichen Herzklappe durch den amerikanischen Chirurgen Charles Anthony Hufnagel 1952 ein Meilenstein dar (DeWall et al. 2000), sowie der erste künstliche Hüftersatz aus Elfenbein 1891 (Gluck 2011).

Das grundsätzliche Problem aller dieser Maßnahmen besteht in der Aktivierung des Immunsystems, da jedes Transplantat (außer autologes) und Implantat ein Fremdmaterial ist, besetzt mit Antigenen. Der Organismus versucht sich des Fremdkörpers zu entledigen oder ihn abzukapseln durch spezifische entzündliche Reaktionen (siehe 5.3.3).

2.2 Tissue engineering als Ausweg ?

Um die beschriebene Problematik zu umgehen, wurden in den letzten 30 Jahren Methoden entwickelt, die unter dem Begriff *tissue engineering* zusammengefasst werden. Es ist die Anpassung eines Implantates an das Gewebe. Dieses Implantat dient als Matrix, genannt *scaffold*, auf welche Zellen ausgesät werden. Es bildet somit eine Brücke zwischen Implantat und *autograft*. Das Material sollte eine ausreichende Stabilität besitzen, aber gleichzeitig so biokompatibel sein, dass es Körperzellen als Gerüst dient und außerdem in einem kalkulierten Zeitfenster resorbiert werden kann. Der Begriff *Regenerative Medizin* wird oft synonym verwendet, allerdings verstehen darunter viele Autoren auch die ausschließliche Verwendung von Stammzellen. Auch hier sei ein kurzer Rückblick angeführt. Die Grundlagen dieser Forschung liegen in der Dermatologie, genauer in der Gewinnung von „künstlicher Haut“ zur Versorgung schwerer Verbrennungen.

Nach Versuchen Haut einzufrieren ab den vierziger Jahren (Webster 1944) und rein synthetische Kunststoffe zu verwenden, in den sechziger Jahren (Chardack *et al.* 1962), gelang in den späten siebziger Jahren die Proliferation von Keratinozyten in Kokultur mit murinen embryonalen Stammzellen (Green *et al.* 1979). Dies war das erste künstliche Gewebe, das auf autogenen Zellen basierte. Es wurde auch unter dem Namen Epicel® vermarktet. In den achtziger Jahren entwickelten Amerikaner ein Hauttransplantat, das als bioabbaubare Matrix eine Kombination aus Kollagen I vom Rind und Chondroitin 6-sulfat vom Hai hatte. Es fand kommerzielle Anwendung in der Behandlung sehr tiefer Verletzungen der Dermis, da es

vollständig durch körpereigenes Gewebe ersetzt werden konnte (Burke *et al.* 1981). Ein Meilenstein folgte 1988 mit der Entwicklung eines bioabbaubaren Materials auf Kunststoff – Basis (Vacanti *et al.* 1988). Im Zusammenhang mit diesen Polymeren kam erstmals der

Begriff *tissue engineering* auf. In den darauf folgenden Jahren entstand eine enorme Industrie. Zunächst beschränkten sich die Produkte noch auf den Ersatz von Haut und Knorpel, später folgten weitere Gewebe wie Herzklappen. Auch die Materialien wurden immer ausgereifter. Neben Materialien auf Kollagenbasis erwiesen sich künstliche Polymere als geeignet sowie das Einsetzen von Medikamentenreservoirs die gesteuerte Mengen abgeben.

Viel versprechend sind hierzu auch klinische Studien. Hier angeführt seien Ergebnisse über die ersten 23 cavo-pulmonalen extrakardialen Umgehungsgefäße (ECTCPC) unter Verwendung eines *Tissue-Engineered Vascular Autograft* (TEVA), zusammengesetzt aus L-Lactid und ϵ -Caprolacton (Verhältnis 50:50). Die Matrix war zu 80 % porös, wobei jede Pore einen Durchmesser zwischen 20 und 100 μm hatte. Die Patienten wurden 3 bis 6 Monate nach der Operation mit Antikoagulantien behandelt. Nach 6 Jahren gab es 3 TEVA-assoziierte Komplikationen in Form von Stenosen kleiner als 18 mm. Es kam zu keiner Thrombosierung, keiner Ruptur, keinen Aneurysmen, keinen weiteren hämorrhagischen Veränderungen (Naito *et al.* 2003; Shin'oka *et al.* 2005).

Bioabbaubarkeit beschreibt in jedem Fall die Fähigkeit eines Objektes, natürlichen oder synthetischen Ursprungs, in einem Organismus durch körpereigene Prozesse vollständig aufgelöst zu werden. Der Begriff Biomaterial wird in der Literatur z.T. vom bioabbaubaren Material abgegrenzt, indem er nicht abbaubare Xenografts (Herzklappen vom Schwein) einschließt. Besonders in den Materialwissenschaften, aber auch in vielen klinischen Studien werden die Begriffe identisch verwendet, ebenso in dieser Arbeit.

Die Komplexität des *tissue engineering* wird weiter zunehmen. Dies wird deutlich an der Vielzahl von Gerüstmaterialien, die sich bereits auf dem Markt befinden. Sie können an dieser Stelle nur in groben Gruppen genannt werden. Man unterscheidet generell abbaubare Biopolymere und abbaubare synthetische Polymere. Zu den Biopolymeren zählen u.a. Alginate, Fibrine, Kollagene, Hyaluronsäuren und deren Derivate. Die größtenteils verwendeten synthetischen Polymere sind Poly-(L)-Lactide, Poly-(ϵ)-Caprolactone, Polglykole, Polyesteramide, Methoxy- poly(ethylen oxide) (MPEO) und Polyurethane. Diese synthetischen Polymere werden untereinander zu neuen Polymeren kombiniert unter verschiedenen Bedingungen und Katalyseprozessen, sodass ein enorm diversifiziertes Spektrum entsteht (Chai and Leong 2007). Außerdem werden auch zunehmend mehr Zellarten in Frage kommen um *scaffolds* zu besiedeln. Beim Menschen haben neben mesenchymalen Stammzellen auch Präadipozyten, endotheliale Progenitorzellen oder Zellen der Zahnpulpa Multipotenz. In Zukunft wird die Art des

scaffolds und die Zellart immer weiter abgestimmt werden auf das zu ersetzende Gewebe. Es gibt bereits Ansätze über standardisierte Reihentests, die schnell vorhersagen sollen, welche Zellart mit welchem Material für einen bestimmten klinischen Zweck kombiniert werden können (Neuss *et al.* 2008).

2.3 Embryonale Stammzellen und *embryoid bodies* als Modellsystem

Die Kultivierung embryonaler Stammzelllinien bildet die Grundlage dieser Promotionsarbeit. 1981 erschienen erstmals zwei Veröffentlichungen über die Gewinnung pluripotenter, undifferenzierter Stammzellen (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981). Dies wurde schon nach wenigen Jahren praktisch genutzt, indem embryonale Stammzellen (ES-Zellen) einer Maus in die Blastozyste einer anderen Maus injiziert wurden. Sie integrierten sich in der inneren Zellmasse (ICM). Die Blastozysten wurden in die „Spendermaus“ zurückinjiziert, sodass Maus-Chimäre entstanden (Bradley *et al.* 1984). Dieses Verfahren ermöglichte die Nutzung von *knockout* – Mäusen. Permanente Linien embryonaler Stammzellen werden aus Mausblastozysten kultiviert wie ursprünglich beschrieben, sowie aus Blastomeren im 8-Zell Stadium (Wobus *et al.* 1984) oder aus der Morula (Eistetter 1988).

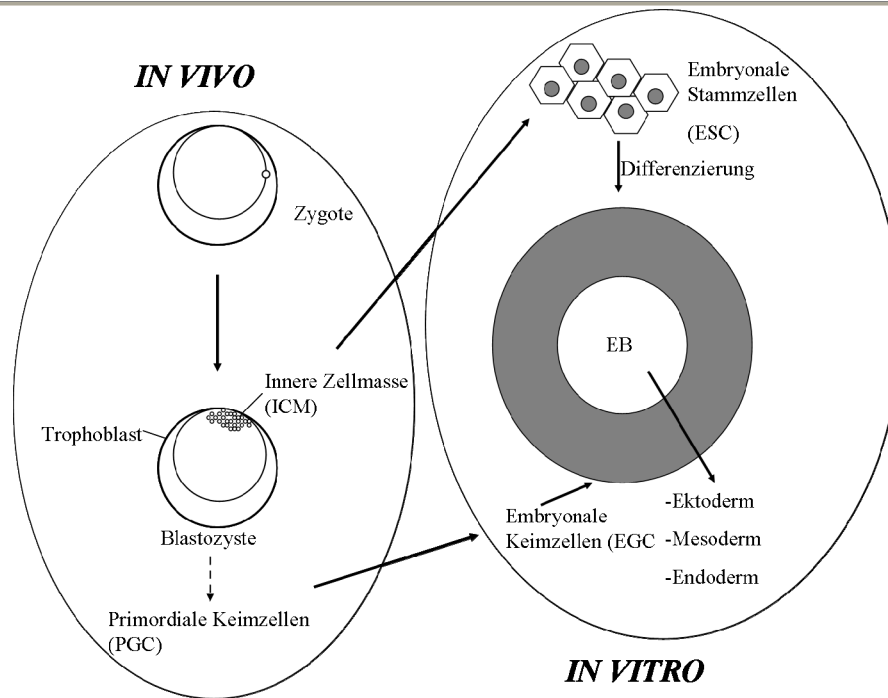


Abb. 1: Embryonale Zelllinien in vitro

Die Kultivierung embryonaler Stammzellen und embryonaler Keimzellen aus der ICM bzw. Primordialen Keimzellen. Diese sind in der Lage *embryoid bodies* zu formieren, die sich in Gewebe aller drei Keimblätter differenzieren können (modifiziert nach Guan et al. 1999).

Neben den embryonalen Stammzellen sind auch embryonale Karzinomzellen und embryonale Keimzellen pluripotent (Gardner and Brook 1997).

Um embryonale Stammzellen untersuchen zu können, macht man sich die Tatsache zu nutze, dass sie *in vitro* embryo-artige Aggregate bilden, die *embryoid bodies* (EBs). Die Stammzellen differenzieren sich in diesen Aggregaten zu Zellen aller drei Keimblätter aus. Dieser Vorgang ist *per se* ungerichtet. Aus anfangs totipotenten Zellen entsteht ein Gebilde, das schließlich myogene, kardiogene, neurogene, hämatopoetische, adipogene Zellen enthält, genauso wie Epithelzellen, Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen (Guan et al. 1999). Die ausdifferenzierten Zellen im EB zeigen die physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der adulten Zellen im extrauterinen Organismus, wie zum Beispiel der Vergleich von Kardiomyozyten im EB mit atrialen, ventrikulären Muskelzellen und Purkinje - Fasern zeigt (Maltsev et al. 1993). Da die ESCs ohne weitere Einflüsse in verschiedene Zellen differenzieren würden, ist es nötig sie unter Bedingungen zu kultivieren, die diesen Vorgang hemmen. Beschrieben ist hier die *feederlayer* – Kokultur (Wobus et al. 1984) oder die Kultivierung im Medium, dem *leukemia inhibitory factor* (LIF) zugesetzt wird (Smith et al. 1988). Dieses letztere Verfahren kommt in dieser Arbeit zur Anwendung.

2.4 Steuerbarkeit der Differenzierung und Aufrechterhaltung von Undifferenziertheit

Da für das Verständnis meiner Versuche die Differenzierung, besonders zu Monozyten und Endothelzellen eine wesentliche Rolle spielt, soll an dieser Stelle auf einige Aspekte hinsichtlich der Steuerbarkeit eingegangen werden (Abb. 3).

Interessanterweise scheint auch die Differenzierungsfähigkeit teilweise abhängig zu sein von der Präsenz interzellulärer Verbindungen. So triggert eine Bindung zweier homophiler Cadherin - Rezeptoren intrazelluläre Signalwege, die über bestimmte zytoplasmatische Proteine aus der Klasse der Catenine Einfluss nehmen auf den *Wnt* Signalweg. Dieser kann die Morphogenese und Differenzierung in größerem Maße modulieren (Gumbiner 1996). Weiterhin führt die Hemmung Cadherin-vermittelter interzellulärer Kontakte mittels spezifischer Cadherin – AK auch zu einer Hemmung der EB - Formation und darauf folgender Differenzierung (Dang et al. 2004). Ebenfalls zeigen einige Veröffentlichungen, dass die Art der exprimierten Cadherine auf das Schicksal der Zellen Einfluss nimmt. So neigen beim Vorhandensein von E-Cadherinen (epithelial) Zellen eher dazu sich in epitheliale Richtung zu differenzieren, wohingegen die Expression von N-Cadherinen eher die Umwandlung in Knorpelzellen oder Neuroepithel induziert (Larue et al. 1996). Inwiefern Umweltbedingungen, u. a. auch Polymere, die Expression von Cadherinen beeinflussen ist allerdings noch unzureichend erforscht.

Ein weiterer Faktor stellt die Zusammensetzung der ECM dar. U. a. über Integrinrezeptor vermittelte Signalwege wirkt die ECM auf die Differenzierung ein (Czyz and Wobus 2001). Verdeutlicht werden soll der Zusammenhang anhand ECM Hydrogelen. Dazu wurden EBs auf Kollagen *scaffolds* mit verschiedenen Anteilen an Laminin und Fibronectin kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass sich auf dem Hydrogel mit höherem Laminin-Anteil eher Kardiomyozyten ausprägten während auf dem *scaffold* mit höherem Fibronectin-Anteil eher epitheliale und endotheliale Zellen entstehen (Bratt-Leal et al. 2009).

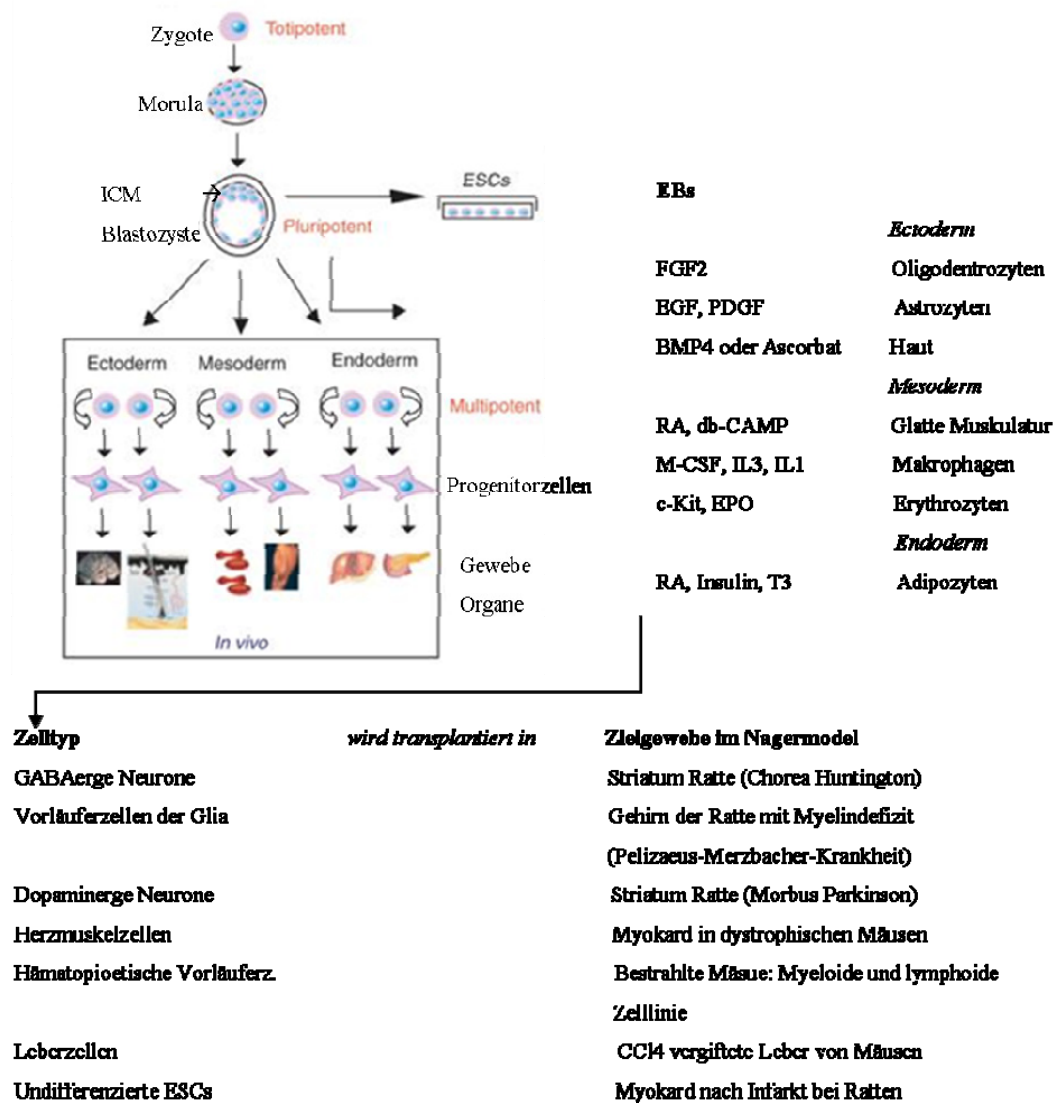


Abb. 2: Embryogenese in vivo vs. gerichtete Differenzierung im EB mittels Zytokinen

Die Abbildung zeigt am Modell der Ratte die Induktion von Zellen aller drei Keimblätter unter Zytokineinfluss und die Transplantation dieser differenzierten Zellen in die entsprechenden defekten Gewebe als Therapieansatz (modifiziert nach Guasch and Fuchs 2005)

Der gerichtetste Ansatz zur Differenzierung in bestimmte Zellen und Gewebe im EB, ist die Anwendung von Chemokinen, löslicher, diffusionsfähiger Moleküle, die über Rezeptoren und Signalwege direkt wirken. Dies können kleine Moleküle sein, wie Ascorbinsäure oder Retinsäuren (Gajovic *et al.* 1997; Takahashi *et al.* 2003) oder Zytokine wie der schon beschriebene FGF oder Proteine (Willerth *et al.* 2007) (Abb.2).

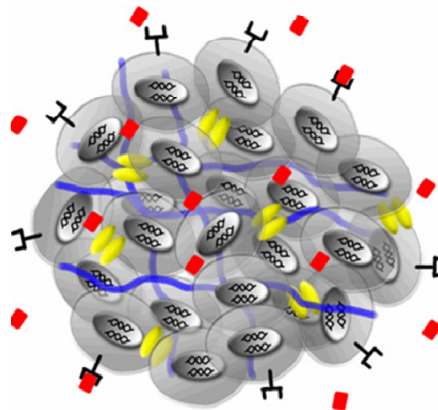
Eine simple Möglichkeit die Differenzierung im EB zu steuern, ist die Größe des EB. Dabei hängt die Größe, wie erwähnt, von der Anzahl der aggregierten Stammzellen ab. Die Größe nimmt indirekten Einfluss, indem sie sich auf die Diffusionsfähigkeit gelöster Stoffe, die Adhäsion und die ECM auswirkt. Die Kultivierung von EBs verschiedenen Zellgehaltes im hängenden Tropfen kann die chondrogene Differenzierbarkeit mitbestimmen (Kramer *et al.* 2000). Dazu gibt es Verfahren der forcierten Aggregation zur Erzeugung von EBs unterschiedlicher Größe.

Größen Kontrolle

- Physikalische Trennung
- Forcierte Aggregation
- Hydrodynamisches Mischen

Gelöste Faktoren

- Konditioniertes Medium
- Wachstumsfaktoren
- Kleine Moleküle



Interaktion der ECM

- scaffolds
- Hydrogele



Zell-Zell-Interaktion

- Cell engineering
- Immobilisation von Biomaterialien

Abb. 3: Möglichkeiten der Beeinflussbarkeit der Differenzierung von ESCs

(modifiziert nach Bratt-Leal et al. 2009)

Hier soll nicht unerwähnt bleiben, dass diese Erkenntnisse aus dem Modell *EB* auch zum Verständnis der Embryogenese auf zellulärer Ebene *in vivo* beitragen.

Die Erhaltung der Pluripotenz beruht auf der Expression von diversen Transkriptionsfaktoren (Tf). Da ein Großteil diese Faktoren in erheblichem Umfang nur im embryonalen Stadium auftritt, werden sie auch embryonale Marker, ihre Gene entsprechend embryonale Gene, genannt. Sie sind in ihrer Struktur und Größe äußerst mannigfaltig. Zu diesen bereits sehr zahlreichen Faktoren kommen stetig Neue hinzu. Von den meisten dieser Transkriptionsfaktoren ist die Funktion und Funktionsweise nur unzureichend bis gar nicht verstanden, vor allem weil sie sehr stark untereinander interagieren. In dieser Arbeit soll auf die vier Transkriptionsfaktoren Nanog, Oct-1 (*Octamer transcription factor 1*) und Rex1 eingegangen werden, die sehr wesentlich sind und über welche relativ viel bekannt ist.

Nanog ist benannt nach *Tír na nÓg*, einem Wortlauf aus dem Altirischen. Es bedeutet in etwa „Land der ewigen Jugend“. Nanog wird bei murinen Stammzellen ohne Stimulus bis zum Alter von zwei Tagen exprimiert. Die Abwesenheit von Nanog führt u.a. zur Differenzierung zu Endoderm (Mitsui et al. 2003). Nanog ist ein Schlüsselfaktor bei der Expression von Rex1. Erhöhte Expression von Nanog induziert erhöhte Expression von Rex1 (Shi et al. 2006). Bei menschlichen embryonalen Stammzellen führt das Fehlen von Rex1 zum Verlust des vollständigen Differenzierungspotentials, besonders des Potentials zur Differenzierung mesodermalen Gewebes (Son et al.).

Der dritte Transkriptionsfaktor ist Oct1. Die Funktion von Oct1 ist ebenfalls sehr komplex, da er in verschiedenen Varianten vorkommt. Oct1 kann sowohl beteiligt sein an der Erhaltung eines undifferenzierten Zustandes, als an der Differenzierung in sehr viele Zellarten. So ist Oct1 in der Lage lymphoide Progenitorzellen zu B-Zellen zu differenzieren (Ryan and Rosenfeld 1997). Besonders kontrovers ist der Einfluss von Oct2 auf die Differenzierung zu malignen Zellen. Außer Frage steht, dass es durchaus eine Rolle spielt in der Differenzierung zu Tumorzellen (Shakya et al. 2009).

2.5 Methoden der Kultivierung

Nach der Betrachtung von biologischen und zytologischen Aspekten pluripotenter Zellen und *embryoid bodies*, soll nun noch ganz praktisch auf Kultivierungsmöglichkeiten eingegangen werden, die sich etabliert haben (Abb.4)

Man kann grob fünf Kategorien unterscheiden: die Kultivierung in Petrischalen, die Methylzellulose-Kultur (MCC), die Kultur im hängenden Tropfen (hTr), eine Suspensionskultur in niedrig adhärennten Gefäßen und die Kultur in der Spinnerflasche (SF) oder im Bioreaktor. Bei der letztgenannten Methode wirken mechanische Kräfte auf die Zellen ein, währenddessen die vier anderen Verfahren statisch sind.

Die Kultur in hydrophoben Polystyrol-Schalen fand schon in der Pionierzeit Anwendung (Doetschman et al. 1985). Gewöhnlich wachsen die EBs nicht an. Trotz ihrer Einfachheit ermöglicht sie schon ein relativ breites Spektrum an Zellen, die sich differenzieren (Kurosawa 2007). Allerdings sind die Größe und die Anzahl der EBs sehr heterogen, da das Aufeinandertreffen von Zellen eher zufällig geschieht (Wartenberg et al. 1998).

Die MCC findet u.a. Anwendung in der Erforschung hämatopoetischer Zellen (Wiles and Keller 1991).

Mit Suspensionskulturen in niedrig adhärennten Gefäßen lassen sich besonders runde Zellformation induzieren, wie sphäroide Cluster aus neuronalen Stammzellen (Suslov *et al.* 2002). Einige Autoren beschreiben die Beschichtung von Petrischalen mit Proteoglykanen (Shinji *et al.* 1988); Andere erreichen die Adhärenz durch eine positive Ladung (Koide *et al.* 1990).

Ein größerer Fortschritt für die Bildung homogener EBs unter reproduzierbareren Bedingungen war die Einführung der SF. Das verbesserte Wachstum in einem durch Rühren erzeugten Strom kann auf die konstante Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zurückgeführt werden (Kurosawa 2007), wobei die Rührgeschwindigkeit Einfluss hat auf die Größe und Homogenität (Fok and Zandstra 2005).

Breite Anwendung zur Generierung von EBs aus embryonalen Stammzellen findet auch die Technik des hängenden Tropfens. Ihre Vorteile liegen in der optimalen Nähe der Zellen zu einander, die im Diskus des Tropfens durch die Erdgravitation gewährleistet wird. Außerdem kann die Zellzahl initial gut gesteuert werden. Nachteilig ist die Begrenzung des flüssigen Mediums auf 50 µm, aufgrund der ausgeschöpften Oberflächenspannung der Flüssigkeit (Ohnuki und Kurosawa).

Da diese beiden letztbeschriebenen Verfahren die Grundlage dieser Arbeit bilden, werden sie nachfolgend näher erläutert (4.2.1.2 und 4.2.1.3).

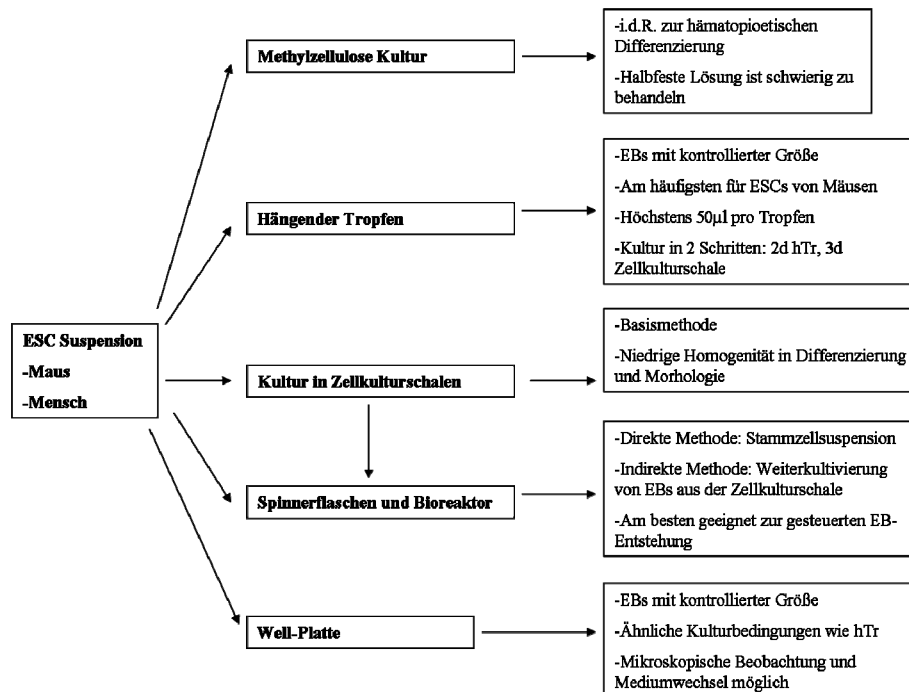


Abb. 4: Gängige Methoden zur Formierung von *embryoid bodies*

(modifiziert nach Kurosawa 2007)

2.6 Embryonale Stammzellen und *embryod bodies* in Anwendungen

Die zuvor beschriebenen Eigenschaften und ihre damit verbundene hohe Sensitivität lassen ESCs und EBs für praktische Anwendungen zur Testung der Wirkungen von Chemikalien und Materialien in Betracht kommen. Durch die Ähnlichkeit embryonaler Säugetierzellen in Zytologie und Embryogenese lassen sich Aussagen hinsichtlich Embryotoxizität, Teratogenität oder Toxizität auf menschliche Gewebe übertragen.

Dies wird bereits genutzt in Form des *embryonic stem cell test* (EST). Dieser Test nimmt die Differenzierung zu kontrahierenden Kardiomyozyten, sowie die Messung der Zytotoxizität auf D3 und 3T3-Zellen, ebenfalls murine Zelllinien, zum Parameter (Seiler *et al.* 2006). Er wurde bereits vom *European Center for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) validiert, zur Vorhersage von Embryotoxizität *in vivo* (Genschow *et al.* 2004). Dazu wurde mit 20 Referenzlösungen getestet, in den Kategorien nicht embryotoxisch, schwach embryotoxisch und stark embryotoxisch. In 78 % aller Fälle lieferte der Test eine korrekte Aussage. Bei den stark embryotoxischen Detergenzien war jedes Ergebnis richtig (Marx-Stoelting *et al.* 2009). Der Test unterliegt ständiger Verfeinerung um schnellere Assays auf Molekülbasis zu entwickeln, die auch quantitative Aussagen auf zellulärer Ebene treffen. In einem modifizierten Test wird neben der Vitalität auch die Expression des *sarcomeric myosin heavy chain* (α MHC) und α -Aktinin betrachtet um besonders auf Teratogenität schließen zu können (Buesen *et al.* 2009).

3 Zielstellung

In dieser Arbeit sollen im Wesentlichen drei Probleme bearbeitet werden:

- 1) Ist das Modell des *embryoid bodies* hinreichend praktikabel und sensitiv gegenüber Materialien?
- 2) Welche Parameter eignen sich am ehesten um die Reaktion des EB in Kontakt mit dem Material beschreiben zu können?
- 3) Eignet sich die Methode des hängenden Tropfens als Konfrontationskultur zur Biokompatibilitätsbestimmung, auch im Hinblick einer Möglichkeit als Assay Anwendung zu finden?

Das daraus abgeleitete weiterführende Ziel, zu dem u.a. meine Ergebnisse beitragen sollen, wäre die Anerkennung und Zertifizierung eines Tests zur Biokompatibilitätsbestimmung auf Basis des EB, ähnlich dem EST.

Sinn und Zweck der Erforschung von EBs in *in vitro* Testverfahren ist die Reduktion von Tierversuchen zur präklinischen Testung von Arzneimitteln und Medizinprodukten und damit die Erfüllung der 3R-Prinzipien, die in *refine*, *reduce* und *replace* bestehen. Diese Prinzipien gehen auf die gleichnamige schweizerische Stiftung zurück, deren Träger teilweise öffentlich und teilweise Pharmaunternehmen sind und die unter Aufsicht des Eidgenössischen Departements des Innern steht. Sie hat es sich zur Aufgabe gemacht, Tierversuche zu vermeiden und ihre Prinzipien sind weithin anerkannt, auch wenn sie selbst nicht unumstritten sind (Rusche 2003).

Zwar kann auch bei Verwendung des EB-Modells nicht darauf verzichtet werden, trächtige weibliche Mäuse zu benutzen um Stammzellen zu gewinnen, jedoch könnte die Kombination von Tests mit Zellkulturen und *in vivo* dazu beitragen, dass Implantationen an Versuchstieren insgesamt reduziert werden.

Gründe auf Tierversuche weitestgehend zu verzichten gibt es zu Genüge. Diese sollen hier nicht einzeln aufgeführt werden. Siehe dazu u.a. (Balls). Doch neben den enormen ethischen Problemen, die Versuche an Wirbeltieren mit sich bringen, dürfte vor allem die Industrie an Kostensenkungen interessiert sein, die der Ersatz von Tierversuchen bringen könnte.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage BP 221S	Sartorius AG, Deutschland
ApoTome	Carl Zeiss AG, Deutschland
Autoklav 23	MELAG oHG Medizintechnik, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Elektrophoresekammer Agagel Midi-Wide	Biometra GmbH, Deutschland
Geldokumentationsanlage G:BOX EF	Syngene, United Kingdom
Heizplatte Hot Plate 062	Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH, Deutschland
Inkubator NUAIRE DH Autoflow	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Kompaktschüttler KS 15 A mit Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler GmbH, Deutschland
Laser Scanning Mikroskop cLSM510Meta	Carl Zeiss AG, Deutschland
Lichtmikroskop Telaval 31	Carl Zeiss AG, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Deutschland
pH-Meter	WTW GmbH, Deutschland
Pipetboy acu	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Rotor-Gene Q	Qiagen GmbH, Deutschland
Spinnerflaschen IBS Cellspin	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Spinnerflaschen-Rührsystem Cellspin	INTEGRA Bioscience GmbH, Deutschland
Standard Power Pack P25 für Elektrophorese	Biometra GmbH, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Steuergerät HT 200 W für Heizsystem	Minitüb GmbH, Deutschland
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, Deutschland
UV/Vis-Spektralphotometer (Nanodrop)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Vortexer Vortex-Genie 2	VWR International GmbH, Deutschland
Wasserbad GFL 1092	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland
Zentrifuge 5417C	Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifuge Universal 30 RF	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
24-well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Bakterielle Petrischalen (6, 10 cm)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Descosept	AF Dr. Schumacher GmbH, Deutschland
Einfrierröhrchen (2 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
FACS-Röhrchen Falcon™ (5 ml)	VWR International GmbH, Deutschland

-Material und Methoden-

Filtertips (10, 100, 200, 1000 µl)	Nerbe Plus GmbH, Deutschland
Filtrationseinheit Stericup	Millipore Corporation, USA
Glasplättchen (1,2 cm)	Menzel GmbH & Co. KG, Deutschland
Latex Handschuhe Sensiclean Micro-Touch	Ansell GmbH, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (200, 500 µl)	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland
Petriperm-Schalen lumox DISH 50	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)	BRAND GmbH & Co. KG, Deutschland
QIAshredder Mini Spin Column	Qiagen GmbH, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 0,5 ml)	Sarstedt AG & Co., Deutschland
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland
Zellkulturschale, wachstumsfördernd behandelt	TPP AG, Schweiz
Zellsieb BD Falcon Cell Strainer	Omnilab GmbH & Co. KG, Deutschland
Zentrifugationsröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Anbieter
0,25% Trypsin/EDTA-Lösung	Invitrogen GmbH, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Agarose	Amresco Inc., USA
Basal ISCOVE Medium	Biochrom AG, Deutschland
Blei(II)azetat-Trihydrat	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
DNase I Reaction Buffer (10x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
DNase I, Amplification Grade (100 U)	Invitrogen GmbH, Deutschland
dNTP Mix (10 mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
DTT (0,1 M)	Invitrogen GmbH, Deutschland
EDTA (25 mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Ethidiumhomodimer-2 (1 mM)	Invitrogen GmbH, Deutschland
FBS	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
First-strand Puffer (5x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Glucose	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
GMEM (Glasgow Minimal Essential Medium)	Invitrogen GmbH, Deutschland
HyperLadder IV	Bioline, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG, Deutschland
LIF (ESGRO) (107 U/ml)	Millipore GmbH, Deutschland
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland

-Material und Methoden-

Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Natrium-L-laktat	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	PAA Laboratories GmbH, Österreich
Nuklease-freies Wasser	Promega GmbH, Deutschland
Paraformaldehyd-Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
Quanti Fast SYBR Green PCR Master Mix	Qiagen GmbH, Deutschland
Randomprimer (250 ng)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Red Load Taq Master	Jena Bioscience, Deutschlandland
RNase freies Wasser	Invitrogen GmbH, Deutschland
TBE-Puffer (10x)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
0,25% Trypsin/EDTA	Invitrogen GmbH, Deutschland

4.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1% PBS-T	1% Triton X-100 in PBS
0,01% PBS-T	1 ml 1% PBS-T auf 100 ml PBS
10% Milchlösung	10% Milchpulver in 0,01% PBS-T
1xTBE-Puffer	10 ml 10xTBE-Puffer auf 100 ml Aqua dest.
4% PFA-Lösung	4% PFA-Lösung (37%) in PBS
EthD-2-Lösung	2 μ l EthD-2 auf 1 ml CGR8-Differenzierungsmedium
FACS-Puffer	200 μ l FBS auf 10 ml PBS
Gelatine-Lösung	0,1% Gelatine in PBS
Methanol/Aceton-Lösung	Methanol:Aceton-Gemisch 7:3
PBS	0,8 g Natriumchlorid 0,02 g Kaliumchlorid 0,144 g Natriumhydrogenphosphat 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat ad 100 ml Aqua dest. pH 7,4

4.1.5 Medien

Medium	Bestandteile
CGR8-Proliferationsmedium (LIF-Medium)	25 ml GMEM 2,5 ml hitzeinaktiviertes, steril-filtriertes FBS 250 μ l L-Glutamin 250 μ l LIF (105 U/ml) 12,5 μ l β -Mercaptoethanol-Arbeitslösung (Stock: 70,4 μ l β -Mercaptoethanol in 10 ml PBS)
CGR8-Einfriermedium	45 ml CGR8-Differenzierungsmedium 5 ml DMSO
CGR8-Differenzierungsmedium (Komplettmedium)	500 ml Basal ISCOVE Medium 100 ml FBS

-Material und Methoden-

	6,5 ml L-Glutamin 6,25 ml Nicht-essentielle Aminosäuren 0,5 ml β -Mercaptoethanol-Arbeitslösung (Stock: 70,4 μ l β -Mercaptoethanol in 10 ml PBS)
Bleihaltiges Komplettmedium 4 Konzentration	Blei(II)azetat-Trihydrat in CGR8-Differenzierungsmedium 0,25 μ M 1 μ M 10 μ M 50 μ M
Laktathaltiges Komplettmedium 5 Konzentration	Natrium-L-laktat in CGR8-Differenzierungsmedium 1 mM 5 mM 10 mM 50 mM 100 mM

4.1.6 Immunfluoreszenz

Primärer Antikörper	Hersteller
PECAM-1 Ratte anti-Maus	Chemicon International Inc., USA
CD68 Ratte anti-Maus	AbD Serotec, Deutschland

Sekundärer Antikörper	Hersteller
Cy3-gekoppelt Ziege anti-Ratte IgG	Chemicon International Inc., USA
Cy5-gekoppelt Ziege anti-Ratte IgG	Chemicon International Inc., USA

Konjugierter Farbstoff	Hersteller
Ethidium-homodimer-2	Invitrogen GmbH, Deutschland
Hoechst 33342	Invitrogen GmbH, Deutschland

4.1.7 Primer

Primer	Sequenz	Hersteller
<i>nanog</i>	for.: 5'-CAGCACCAGTGGAGTATCCC-3' rev.: 5'-CGAAGTTATGGAGCGGAGCA-3'	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
<i>oct-1</i>	for.: 5'-GGGAGGGTTTGGGATCAAGG-3' rev.: 5'-CACACAAGTGCTCCAAAGGC-3'	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
<i>rex1</i>	for.: 5'-GTGTGCAGAGTGTGGCAAAG-3' rev.: 5'-CGAAGTTATGGAGCGGAGCA-3'	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
<i>pol2a</i>	for.: 5'-GACAAAACCTGGCTCCTCTGC-3' rev.: 5'-GCTTGCCCTCTACATTCTGC-3'	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland

4.1.8 Software

Software	Hersteller
EndNote®	Thomson Reuters, USA
GeneSnap®	Synoptics, UK
GeneTools®	Synoptics, UK
GraphPad InStat® 3	GraphPad Software, USA
LSM510 Software	Carl Zeiss AG, Deutschland
Microsoft® Office	Microsoft Corporation
Nanodrop®	Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland

4.1.9 Biomaterialien

Bei den zu untersuchenden Biomaterialien handelte es sich um Polymerere, wie sie typischerweise bei der Herstellung von bioabbaubaren Produkten wie *scaffolds* verwendet werden. Sie wurden von der Firma Innovent e. V. Jena synthetisiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Grundlage sind das Polymer CLA58, sowie das Oligomer EP37. Beide bestehen zu 70 % aus L-Lactid und zu 30 % ϵ -Caprolacton. CLA58 wurde durch Ringöffnungspolymerisation unter Zinn(II)-2-ethylhexanoat-Katalyse synthetisiert und anschließend durch mehrmaliges Umfällen gereinigt. Bei EP37 wurden die Hydroxylgruppen nachträglich durch Zugabe von Methacrylsäurechlorid methacryliert.

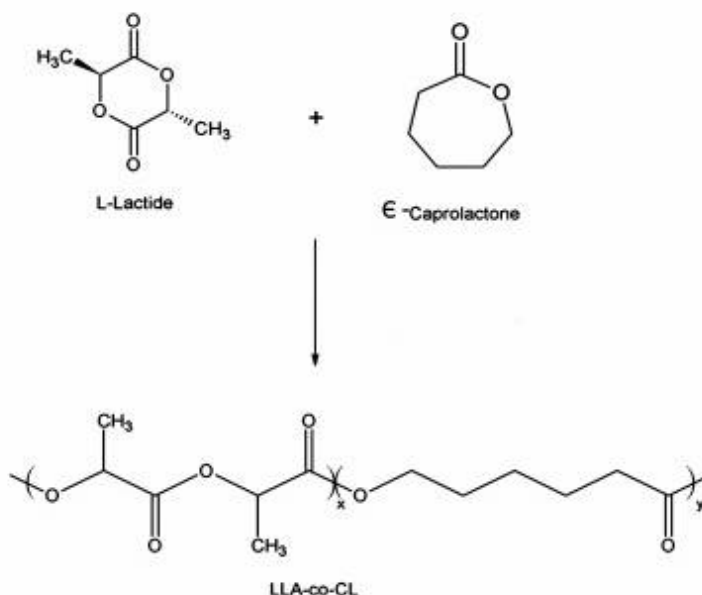


Abb.5 Strukturformeln Poly-(L)-Lactid- ϵ -Caprolacton-Copolymer und Monomere

CLA58 und EP37 werden gelöst und im Verhältnis 80:20 und 50:50 Gewichtsprozent CLA58:EP37 gemischt. Die drei zu untersuchenden Materialien sind abgekürzt 80/20, 50/50 und CLA58. Sie wurden unsteril geliefert und in steril filtrierter 70%-Ethanollösung desinfiziert und drei Mal in PBS gewaschen.

Gleiches gilt für das Referenzmaterial PVC-Blei, das keine Biokompatibilität oder Bioabbaubarkeit zeigen soll („*bad material*“). Es hat einen Bleianteil von 2,2 % und wurde ebenfalls von der Firma Innovent zur Verfügung gestellt.

Als Referenzmaterial mit sehr hoher Biokompatibilität wurde Petriperm (PP) verwendet (4.1.2). Es besteht aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und gilt als inert, aufgrund der sehr starken Bindung zwischen Kohlenstoff und Fluor. Es findet daher absolut keine chemische Interaktion statt. Die 25 µm dicke Folie enthält Poren, die eine Gasdiffusion ermöglicht, was die Versorgung mit Sauerstoff verbessert. Petriperm ist steril verpackt.

Alle Materialien wurden als kreisförmige Scheiben mit 2 mm Durchmesser verwendet. Diese Scheiben wurden mit einer handelsüblichen Lochstanze ausgestanzt, deren Stanzring nachträglich mit Edelstahl gehärtet worden ist, da die Stanzaufgabe ebenfalls aus Edelstahl besteht. So soll verhindert werden, dass aufgrund von unterschiedlichen Härten, Metallpartikel während des Stanzens in die Biomaterialien gelangen.

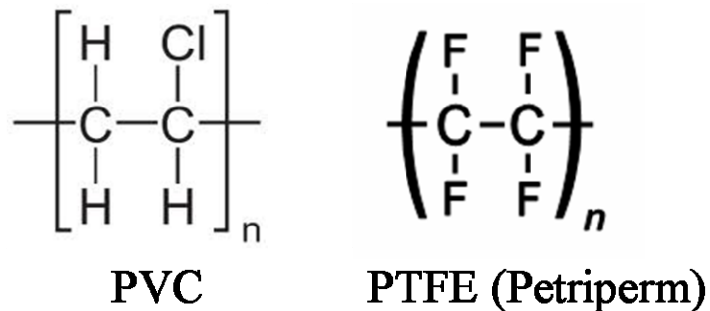


Abb.6 Strukturformeln PVC und PTFE

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Kultivierung undifferenzierter muriner embryonaler Stammzellen

In allen Versuchen wurde mit der embryonalen murinen CGR8-Zelllinie gearbeitet. Die Zellen lagen in gefrorener Form vor und mussten zunächst aufgetaut werden. Dies musste schnell geschehen, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO bei RT zelltoxisch ist.

Dafür wurden 10 ml warmes CGR8-Komplettmedium (4.1.5) in ein 15 ml Reaktionsgefäß (4.1.2) vorgelegt.

In, mit 0,1 % Gelatine-beschichteten Zellkulturflaschen (4.1.2) wurden mit 4 ml *leukemia inhibitory factor* (LIF)-Medium (4.1.5) befüllt und erwärmt. Der LIF verhindert eine Differenzierung.

Die gefrorenen Zellen wurden schnell durch Titrieren mit Komplettmedium aufgetaut und in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 4 min bei 640 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 1 ml Komplettmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in die vorbereitete Zellkulturflasche überführt. Die Kultivierung fand bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit statt. Das Medium musste täglich durch 5 ml frisches LIF-Medium ausgewechselt werden.

Bei einer Konfluenz von ca. 80 % musste die Zellkultur passagiert werden. Dazu wurde zunächst das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt, diese mit 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA-Lösung (37°C) (4.1.2) gewaschen. Anschließend wurde mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert bis die Zellen vom Boden dissoziierten. Zur weiteren Vereinzelung wird die Suspension mit der Pipette mindesten acht Mal titriert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 2 ml CGR8-Komplettmedium gestoppt. Der Prozess der Zentrifugation und Überführung lief wie zuvor beschrieben ab.

4.2.1.2 Kultivierung von EBs in der SF

Entsprechend dem Passagiervorgang wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 % aus einer Zellkulturflasche abdissoziiert, wobei ca. 10 Mio. Zellen in eine, mit 125 ml CGR8-Differenzierungsmedium gefüllte, SF überführt wurden. Diese SF wurde 24 h später auf 250 ml Komplettmedium aufgefüllt. Es fand ein täglicher Mediumwechsel von 100 ml statt. Die SF war mit dem Rührsystem (4.1.1) bei 22,5 RPM, 1440° Drehungswinkel, 5 % CO₂, wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C in einem Inkubator (4.1.1) zu kultivieren. Die EBs wuchsen 8 Tage lang in der SF.

4.2.1.3 Kultur im hängenden Tropfen (hTr) mit Bioabbaubaren Materialien

Die Konfrontation im hTr erfolgte nach acht Tagen Kultivierung der EBs in der SF.

Auf die Innenseite des Deckels einer bakteriologischen Zellkulturschale (10 cm) (4.1.1) wurden 20 bis 40 Tropfen à 30 µl CGR8-Differenzierungsmedium mittels Pipette gegeben. In jeden Tropfen wurde mittels Pinzette eine Materialscheibe (4.1.9) gesetzt, anschließend wurden mittels abgeschnittener Pipettenspitze in jeden Tropfen 1 bis 3 EBs mit möglichst wenig Medium pipettiert. In den Boden der Zellkulturschale wurden 5 ml PBS (4.1.4) gegeben. Anschließend wurde der Deckel mit den Tropfen schnell gewendet, sodass die Tropfen durch Fliehkräfte nicht verlaufen, und auf den Boden gesetzt. Dieser gesamte Vorgang wurde unter der Sterilbank auf der Heizplatte (4.1.1) durchgeführt. Die hTr wurden nach 48 h mittels abgeschnittener Pipettenspitze abpipettiert und mit dem gesamten Inhalt (Material mit angewachsenem EB) in eine Zellkulturschale (6 cm) mit 5 ml Komplettmedium überführt, da im hTr ein Mediumwechsel die Konfrontation massiv beeinträchtigt. Bei täglichem Mediumwechsel wurde die Kokultur ein bzw. drei Tage weitergeführt. Die Kulturbedingungen entsprechen denen der SF-Kultur.

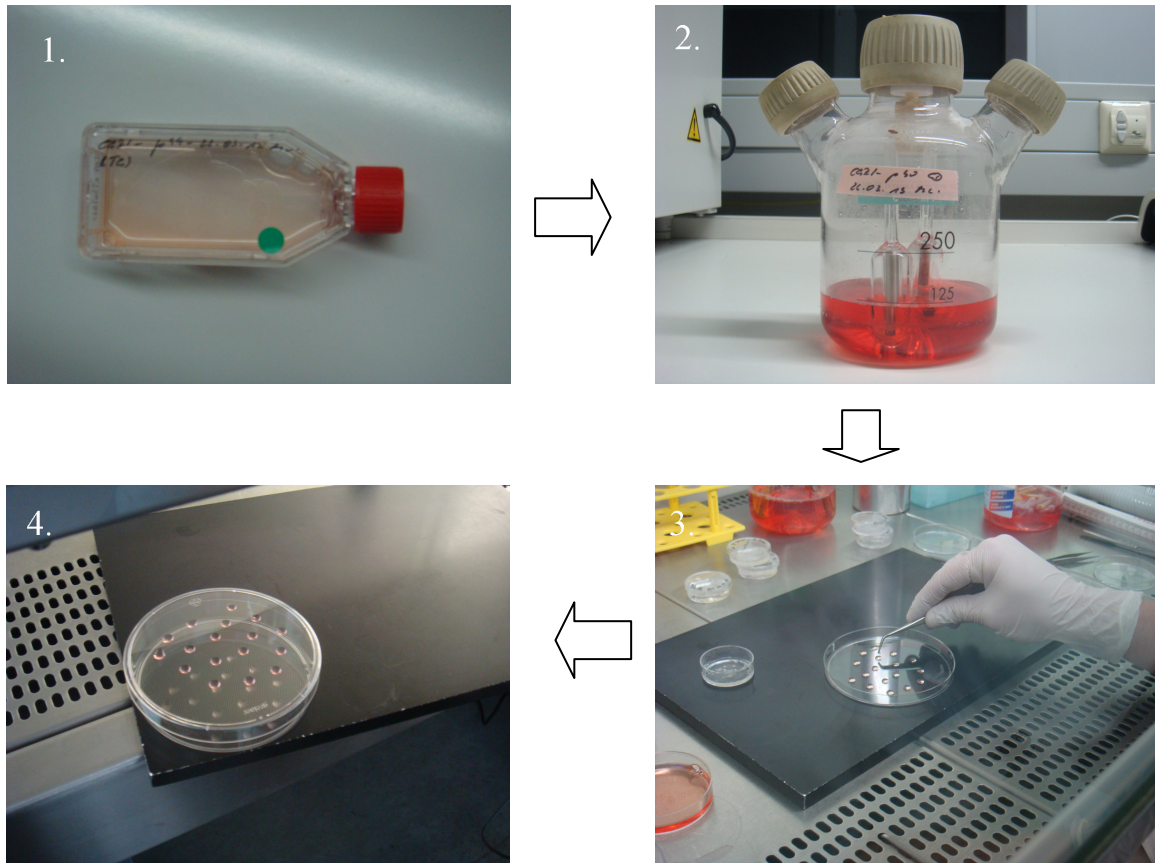


Abb. 7 Abfolge der Generierung von Konfrontationskulturen im hTr

Nach Kultivierung undifferenzierter muriner ES-Zellen in einer 0,1 % Gelatine-beschichteten Zellkulturflasche (1.) entstehen nach achttägiger Kultur in der Spinnerflasche (2.) EBs, die sich ungerichtet differenzieren. Diese werden in einen Tropfen (30 μ l) injiziert und eine Materialscheibe hinzugefügt (3.). Die Tropfen werden hängend für 5 Tage kultiviert (4.).

4.2.1.4 Behandlung des hängenden Tropfens mit Blei- und Laktatlösungen

Die Kultivierung lief ab wie in 3.2.1.3 erläutert. Die EBs wurden nicht mit Biomaterialien kultiviert, sondern mit CGR8-Differenzierungsmedium welches verschiedene Konzentrationen an Natriumlaktat bzw. Blei(II)azetat (4.1.3) enthielt. Als Material wurde in jeden Tropfen Petriperm eingebracht (4.1.9) um den Einfluss von Blei- und Laktationen auf adhärenzte EBs zu simulieren. Für dieses Experiment wurde jeweils kristallines Natriumlaktat bzw. Bleiazetat in Kompletmedium gelöst und dieses so weit verdünnt, dass eine Bleilösung von 0,25 μ M, 1 μ M, 10 μ M und 50 μ M, analog eine Laktatlösung von 1 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM und 100 mM entstand.

4.2.2 Immunofluoreszenz

Die Methode der Immunofluoreszenz wurde in dieser Arbeit gewählt um die Gefäßentwicklung über eine Antikörperfärbung gegen PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), auch CD31 (*cluster of differentiation*) und die Entwicklung von Makrophagen und Monozyten gegen CD68 darzustellen. Die Schrittfolge der Immunofluoreszenzfärbungen gegen CD31 und CD68 ist gleich. Zunächst wurden die, auf Materialscheiben angewachsen EBs, drei Mal mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol/Aceton (7:3) (4.1.2) bei -20°C für 1 h fixiert. Nach erneuter dreimaliger Waschung erfolgt eine Blockung mit 10 % Magermilchlösung (Milchpulver gelöst in PBS-T, 4.1.4) für 1 h. Der primäre Antikörper wurde in der Milchlösung 1:100 verdünnt. In ein 0,5 ml-Reaktionsgefäß (4.1.2), das höchstens 5 Materialscheiben mit EBs enthalten sollte, wurden mind. 200 µl Antikörperlösung gegeben und über eine Nacht bei 4°C unter leichtem Rütteln inkubiert. Die EBs wurden anschließend drei Mal mit 0,1 % PBS-T gewaschen. Der sekundäre AK (4.1.6) wurde 1:100 mit 10 % Milchlösung verdünnt und ca. 90 Min bei RT inkubiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde mit Hoechst 33342 in einer Verdünnung von 1:1000 gefärbt. Hoechst 33342 interkaliert mit Nukleinsäuren. Nach weiteren Waschungen mit 0,1 % PBS-T wurden die Proben mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning Mikroskops cLSM510meta® in Kombination mit einem inversen Mikroskop untersucht (4.1.1). Die Parameter sind nachfolgend aufgelistet.

	CD31	CD68 (Biomaterialien)	CD68 (Pb und Laktat)
sekundärer Antikörper	Cy5	Cy5	Cy2
Anregung	bei 633 nm	bei 633 nm	488 nm
Transmission	50 %	50,4 %	50,4 %
Detektion	Langpassfilter LP650	Langpassfilter LP650	Langpassfilter LP650
Objektiv	10x, numerische Apertur 0,30	5x, numerische Apertur 0,30	10x, numerische Apertur 0,30
Lochblende (max. Halbwertsbreite)	5 µm	5 µm	5 µm
Auflösung	4 Schnitte à 35 µm, 512x512	4 Schnitte à 25 µm, 1024x1024	4 Schnitte à 35 µm, 512x512

Zusätzliche Färbung mit Hoechst 33342 bei 405 nm; Bandpassfilter BP420-480, 10x, numerische Apertur 0,50; die Auflösung ist entsprechend der Antikörperfärbung

4.2.3 Letalitätsmessung

Um eine Aussage hinsichtlich der Quantifizierung avitaler Zellen im EB treffen zu können wurde Ethidium-Homodimer-2 (EthD-2) verwendet. Es ist ein Farbstoff mit hoher Affinität zu Nukleinsäuren. Diese Bindung bewirkt eine ca. 40-fache Fluoreszenzsteigerung (excitation/emission maxima ~535/624). EthD-2 ist impermeabel gegenüber intakten Membranen; somit kann es in den Zellkern nur bei gestörter Membranintegrität gelangen, was charakteristisch für avitale Zellen ist.

Die EB-bewachsenen Materialscheiben wurden in ein, mit warmen CGR8-Differenzierungsmedium gefüllten, 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die 1 mM EthD-2 Lösung (in DMSO) wurde hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine 30 Min. Inkubation bei 37°C. Danach wurde das Medium verworfen und durch 0,1 % PBS-T ersetzt. Zur positiv-Kontrolle dienten 13 Tage alte EBs, die mit Methanol/Aceton (7:3) (3.1.2) bei -20°C für 1h fixiert wurden. Dies permeabilisiert die Zellmembranen. Dann wurde analog gefärbt. Die Messung erfolgt am cLSM510meta®. Die entstandenen Schnittbilder wurden mit der Software LSM Image Examiner® ausgewertet.

Parameter	Einstellung
Anregung	bei 543 nm mit Helium-Neon-Laser
Transmission	19,8 %
Detektion	Langpassfilter LP650
Objektiv	10x
Lochblende (max. Halbwertsbreite)	5 µm
Z-Stapel	4 Schnitte à 25 µm, 512x512

4.2.4 Anwachsrate

Ein weiterer Ansatz zur Beurteilung der Biokompatibilität ist die Betrachtung der Kontaktfläche zwischen EB und Materialscheibe. Da die Methode des hängenden Tropfens optimale Konfrontationsbedingungen bietet, wird die Kontaktfläche zwischen Material und EB in drei Kategorien eingeteilt. Die Beurteilung unter dem Lichtmikroskop (4.1.1) fand bei 5facher Vergrößerung statt, nach der zweitägigen Konfrontation im hTr.

Kategorie I	Kategorie II	Kategorie III
Kein Kontakt zwischen EB und Materialscheibe	Punktuelles oder tangenciales Anwachsen zwischen EB und Materialscheibe	Flächiges Anwachsen zwischen EB und Materialscheibe

4.2.5 Adhärenz

Ausgehend von den Anwachsrate (4.2.4) wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ApoTome (4.1.1) ermittelt, wie sich ein EB, der nach der Konfrontationskultur einer Materialscheibe anhaftet, auf dieser Scheibe ausdehnt (adheriert). Der Kontakt induziert sowohl die zelluläre Differenzierung, als auch die Bildung einer faserreichen ECM mit zentrifugaler Migration von Zellen. Zu beobachten war ein abgegrenztes zellreiches Aggregat mit vitalen Bereichen und apoptotischen Kavernen, der eigentliche EB und ein faserreicher, zellärmerer Hof, der sich nach allen Richtungen auf dem Material ausbreitet. Es wurde dieser Hof an seiner weitesten und kleinsten Ausdehnung gemessen, sowie der Durchmesser des adherierten EB.

Die Messung fand bei 10facher Vergrößerung unter Färbung mittels Hoechst 33342 zur Visualisierung der Zellkerne.

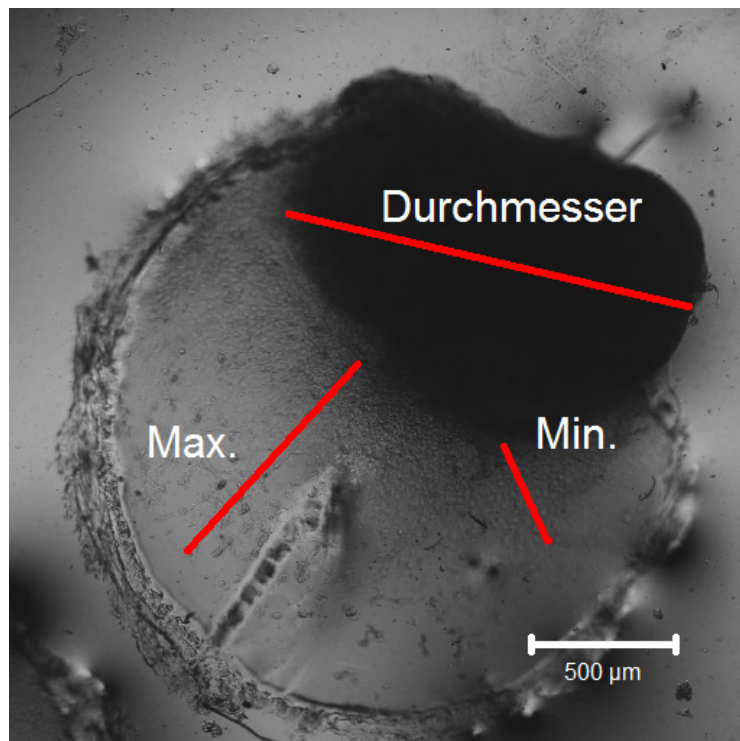


Abb. 8 Schematische Darstellung der Adhärenzmessung

Der EB bildet beim Anwachsen auf die Materialscheibe einen Hof aus. Dieser wird an den 3 weitesten und geringsten Ausdehnungen bestimmt und davon jeweils die weiteste und geringste Ausdehnung verwendet.

cLSM510meta®, 5fache Vergrößerung, numerische Aperatur, Maßstab 500µm

4.2.6 Genexpression

4.2.6.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurden in ein Reaktionsgefäß 13 d alte EBs, welche 5 d kokultiviert wurden, überführt. Ein Reaktionsgefäß enthielt Zellen aus fünf Kokulturen. Es folgte eine Waschung mit 1xPBS. Die Proben wurden in 0,5 ml Trizol gelöst, mehrmals titriert und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben 15 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Chloroform versetzt und mit gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die entstandene obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden 15 min bei 4°C und 10000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen. Es erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10000 g. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und 20 µl RNase freies Wasser gelöst. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren.

4.2.6.2 cDNA-Herstellung

Um aus der isolierten RNA cDNA herstellen zu können, wurde zunächst die in der Probe vorhandene RNA-Konzentration am UV/Vis-Spektralphotometer (Nanodrop, 4.1.1) ermittelt. Dies erfolgte bei einer Absorption von 260 nm. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, der Mittelwert bestimmt und dieser als Ausgangskonzentration zur Berechnung der für die cDNA-Synthese notwendigen Menge verwendet. Es wurde eine Konzentration von 1 µg/µl RNase freiem Wasser eingesetzt. Die Reverse Transkription wurde nach folgenden Schritten durchgeführt:

Zugegebene Reagenz	Inkubation
1 µl DNase I Reaction Buffer (10x) 1 µl DNase I	15 min bei Raumtemperatur
1 µl EDTA (25 mM) 1 µl Randomprimer (250 ng) 1 µl dNTP-Mix (10 mM)	5 min bei 65°C Kühlung bei 4°C
4 µl First-strand Puffer (5x) 2µl DTT (0,1 M) 1 µl RNase freies Wasser	2 min bei 37°C

-Material und Methoden-

1 µl M-MLV-RTase	10 min bei 25°C 50 min bei 37°C 15 min bei 70°C
------------------	---

4.2.6.3 PCR

Untersucht wurde die mRNA-Expression der embryonalen Gene *nanog*, *oct-1* und *rex1* mittels PCR. Dazu wurde der folgende Reaktionsmix hergestellt: 5 µl Red Load Taq Master, 2 µl Primermix (bestehend aus Rückwärts- und Vorwärts-Sequenz des jeweiligen Primer), 17 µl RNase freies Wasser und 1 µl cDNA (4.1.2). Als *housekeeping*-Gen wurde *polymerase2a* verwendet.

Schritt	Inkubation
Initiale Denaturierung	2 min bei 94°C
Denaturierung	30 s bei 94°C
Annealing	30 s bei 60,1°C (<i>nanog</i>) 61,2°C (<i>oct-1</i>) 57,9°C (<i>rex1</i>)
Elongation	30 s bei 72°C
Zyklenzahl	39

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 1,2%igem Agarosegel, dem Ethidiumbromid zugesetzt wurde, für 45-60 min bei einer Spannung von 100 V. Die Banden wurden bei UV-Licht an der Geldokumentationsanlage G:BOX EF® visualisiert und aufgenommen.

4.2.7 Software

Die Auswertung der, mittels des cLSM510meta® gewonnenen, Aufnahmen betrifft die Immunfluoreszenz und die Letalität. Dazu wurde die Software LSM Image Examiner® verwendet. Diese Software quantifiziert sowohl Farbstoff-positive Flächen, als auch den EB als Grundfläche. Diese Flächen wurden ins Verhältnis gesetzt. Weiterhin wurden der *body mass index* (BMI) bestimmt. Dazu wurde von 10 Gefäßen pro adherierter EB die größte Breite bestimmt, sowie die Länge Verzweigungspunkt zu Verzweigungspunkt (*crossing point*). Die Breite wurde zur Länge prozentual in Verhältnis gesetzt. Weiterhin wurde pro EB die Zahl der *crossing points* bestimmt.

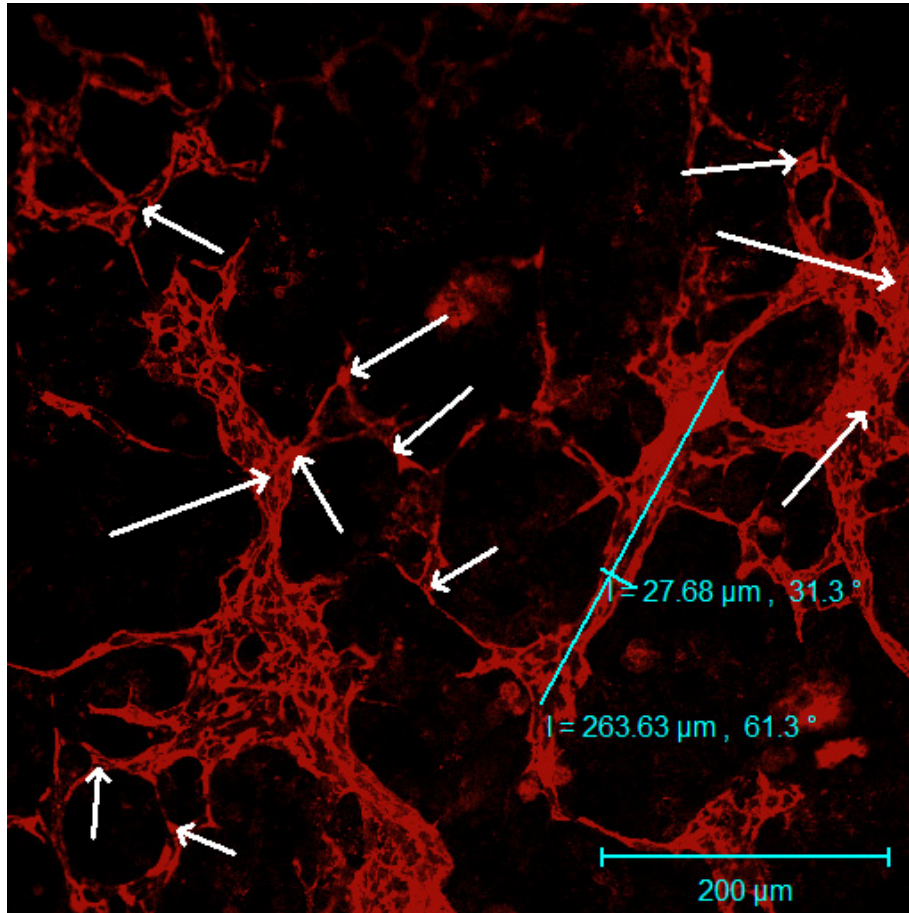


Abb. 9 Schematische Darstellung des BMI und Verzweigungsgrad

BMI (türkis): Von einem Gefäß wird die größte Breite und seine Länge zwischen zwei *crossing points* gemessen und diese zueinander ins Verhältnis gesetzt (Bsp.: 27,68 μm / 263.63 μm)

Verzweigungsgrad (weiße Pfeile): Zählung der *crossing points*

cLSM510meta®, 10fache Vergrößerung, numerische Aperatur, Maßstab 200μm

Die statistische und graphische Auswertung aller Daten erfolgte mit der Software SigmaPlot 12.0®.

Die Auswertung der RNA-Expression erfolgte nach der Geldokumentation mit der Software GeneSnap® und GeneTools®.

5 Ergebnisse

5.1 Experimente ohne bioabbaubare Materialien

5.1.1 EBs auf wachstumsfördernd behandelten Zellkulturschalen

Um das Anwachsverhalten von EBs im Laufe ihrer Entwicklung unter optimalen Bedingungen zu untersuchen wurden EBs in wachstumsfördernd behandelten Zellkulturschalen (4.1.2) kultiviert. Abb. 10 zeigt von Tag 7 bis Tag 11, dass die Adhärenz nahezu proportional zum Alter zunimmt. Dieser Zeitraum ist für alle nachfolgenden Versuch relevant. Ob die Expansion des EB mit zunehmendem Alter abnimmt, oder ob die begrenzte Fläche der Zellkulturschale zur kurvenartigen Abflachung führt, kann nicht beurteilt werden.

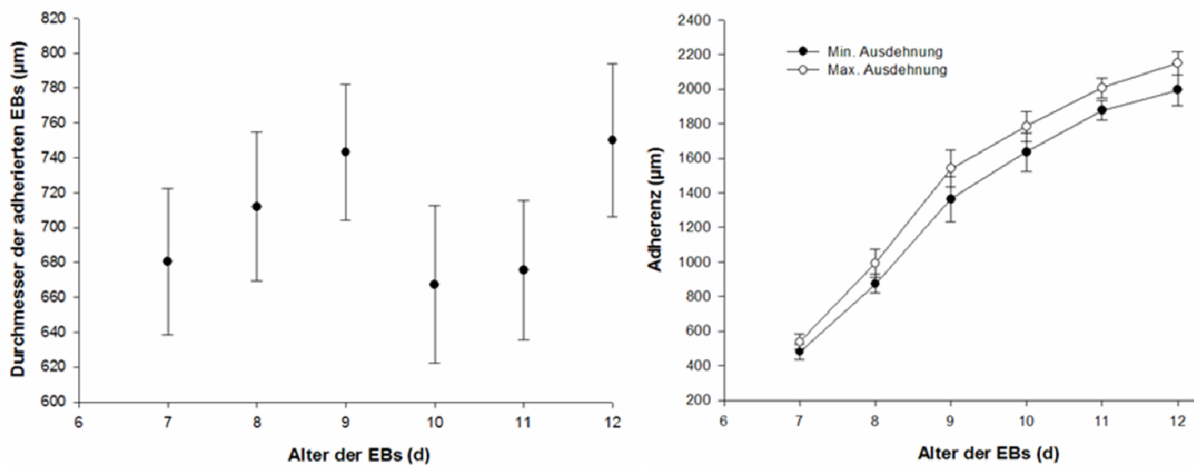


Abb. 10 Durchmesser und Adhärenz (μm) von EBs auf wachstumsfördernd behandelten Zellkulturschalen

6 Tage alte EBs wurden in die Schalen transferiert und täglich der Durchmesser und die maximale und minimale Expansion bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM) aus 4 unabhängigen Experimenten.

Der Durchmesser von 6 Tage alten EBs zeigte im Zeitraum von 5 Tagen sehr widersprüchliche Ergebnisse (Abb. 10). Es wird nicht klar, ob eine Vergrößerung der Zellformation EB stattfindet oder ob in Kontakt mit Flächen bei älteren EBs ausschließlich der Hof proliferiert. Außerdem wies die Größe der EBs innerhalb eines Alters eine hohe Streuung auf.

5.1.2 EBs in Konfrontation mit Blei und Laktat

Die Differenzierung zu Endothel und Makrophagen wird u.a. bestimmt durch gelöste Ionen und kleine Moleküle. Die Hypothese ist, dass sowohl die Metabolite, die beim Abbau von Biomaterialien entstehen, als auch Bleiionen aus dem PVC-Pb, die Differenzierung beeinflussen, indem ein konzentriertes Mikromilieu zwischen EB und Material entsteht (6.2). Da beim Abbau von Poly-(L)-Lactid Laktat entsteht, wurden acht Tage alte EBs im hTr an inerten PP-Scheiben mit Laktat und Bleilösungen kokultiviert. Das Medium wurde mit vier verschiedenen Konzentrationen Blei(II)azetat und fünf verschiedenen Konzentrationen Laktat versetzt. Mittels Immunfluoreszenz (siehe 4.2.2) wurde betrachtet wie sich erhöhte Konzentrationen an Laktat und Bleiionen auf die Differenzierung zu Endothel (CD31) und Monozyten / Makrophagen (CD68) auswirken.

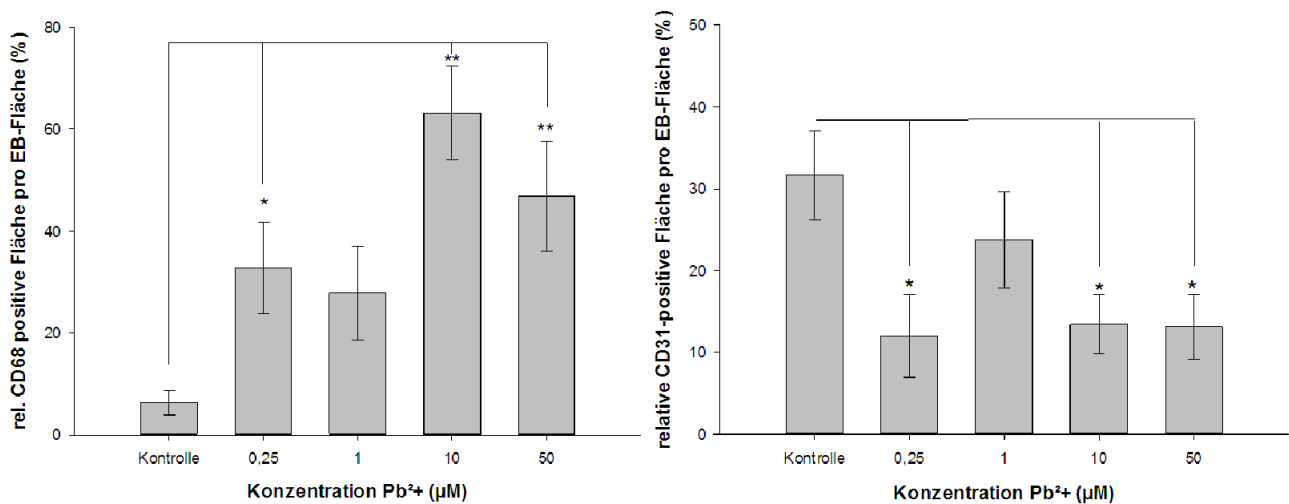


Abb. 11 Relative CD68 und CD31-positive Fläche pro EB-Fläche in Anwesenheit von Blei

Diagramm: 13d alte EBs nach 5d in Kokultur mit PP-Scheiben in Komplettmedium mit aufsteigenden Konzentrationen, unbehandeltes Komplettmedium als Kontrolle, dargestellt sind die Mittelwerte MW +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, Kontrolle 8 unabhängige Experimente.

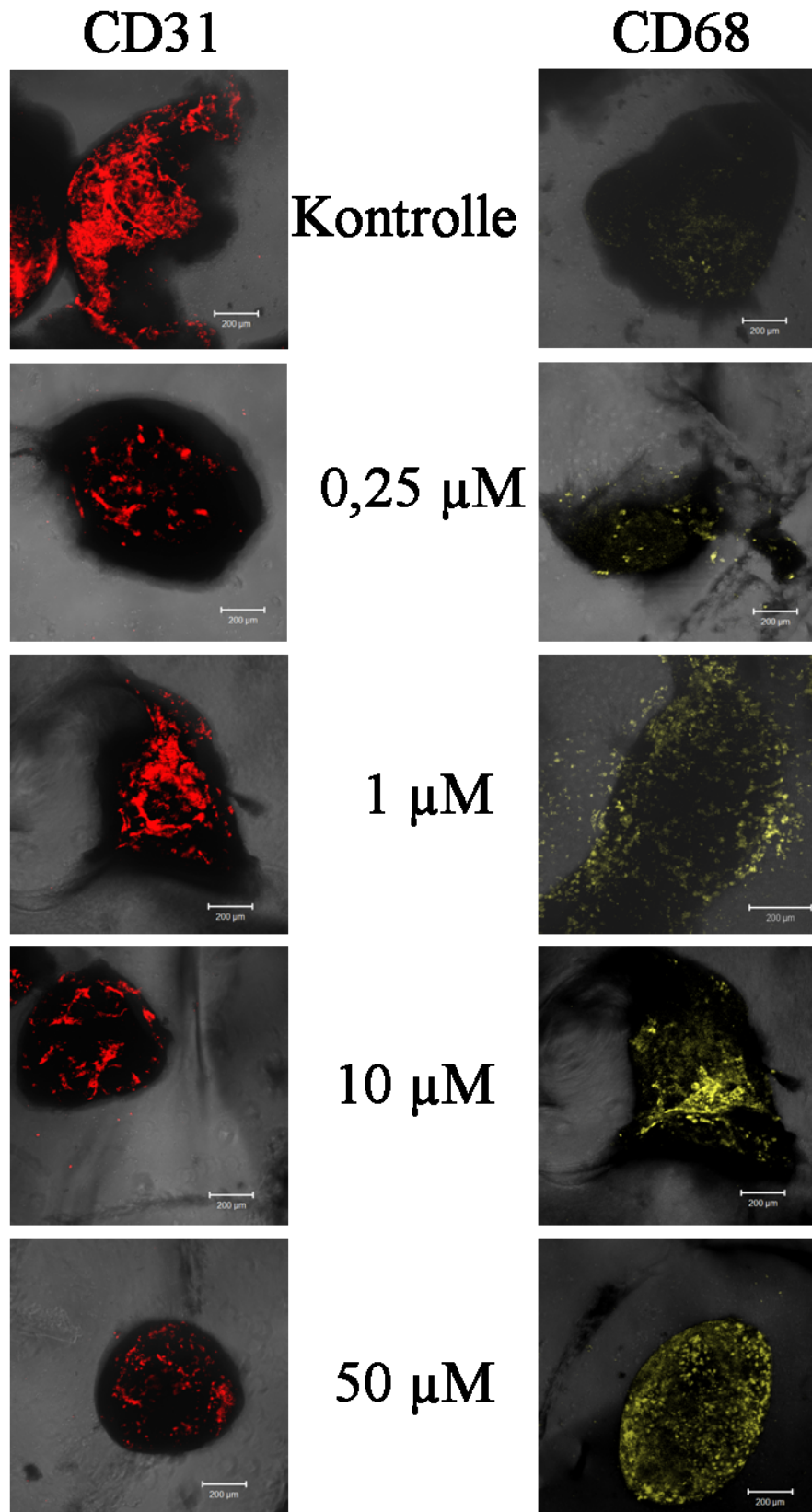


Abb. 12 Repräsentative Aufnahmen CD31 und CD68-Färbung

13d alte EBs nach 5d in Kokultur mit PP-Scheiben in Komplettmedium mit aufsteigenden Konzentrationen der Bleiionen, unbehandeltes Komplettmedium als Kontrolle, Aufnahmen vom cLSM510meta® bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 200

Abb. 11 zeigt, wie sich die Präsenz von Bleiionen in 4 Konzentrationen auf die Ausbildung von Endothel und Entzündungszellen auswirkte. Bei den untersuchten Konzentrationen von 0,25 μM , 10 μM und 50 μM ist die CD31+-Fläche, verglichen mit der Kontrolle, um ca. die Hälfte signifikant reduziert. Bei Blei-Konzentrationen von 0,25 und 1 μM ist die CD68+-Fläche ca. verfünffacht, bei 10 μM und 50 μM ca. verzehnfacht. Die 1 μM – konzentrierte Bleilösung weicht sowohl bei der Betrachtung von CD31, als auch CD68 von der Tendenz unerwartet ab, wenn auch nicht signifikant. Von allen Blei-Konzentrationen wurden bei 1 μM die größte CD31-positive Fläche und die geringste CD68-positive Fläche gemessen. Es ist nicht klar, ob es sich um einen Effekt handelt.

Sowohl die Kokultur mit Blei als auch mit Laktat zeigt einen erhöhten Anteil CD68+-Zellen mit zunehmender Konzentration. Laktat zeigt in wesentlich höheren Konzentrationen von 1 und 5 mM keine Auswirkung auf die CD68+-Fläche. Bei 10 mM, 50 mM und 100 mM ist CD68+-Fläche 4- bis 5-mal höher als in der Kontrolle, wobei nur in 10 mM und 100 mM – konzentrierter Lösung eine signifikante Zunahme auftrat (Abb. 13).

Laktat-Konzentrationen im Bereich von 5 mM und 10 mM führen zu einem signifikanten Anstieg der CD31+-Fläche um 20 bis 25 %. Konzentrationen von 1 mM, 50 mM und 100 mM führen zu keinen signifikanten Änderungen (Abb. 13).

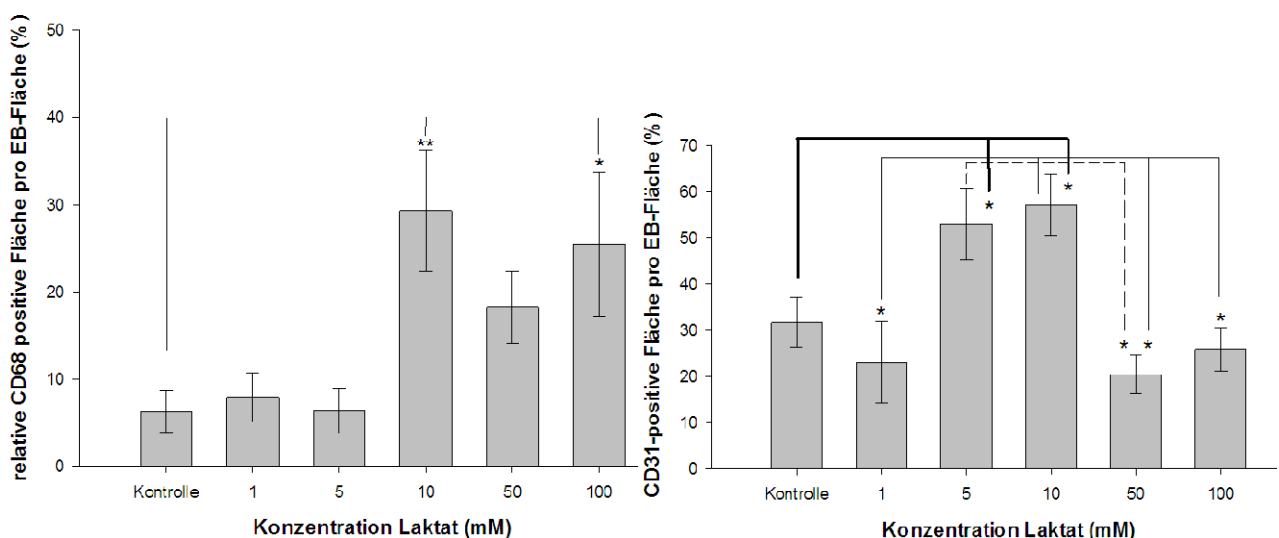


Abb. 13 Relative CD68 und CD31-positive Fläche pro EB-Fläche in Anwesenheit von Laktat

Diagramm: 13d alte EBs nach 5d in Kokultur mit PP-Scheiben in Komplettmedium mit aufsteigenden Konzentrationen, unbehandeltes Komplettmedium als Kontrolle, dargestellt sind die Mittelwerte MW +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, Kontrolle 8 unabhängige Experimente.

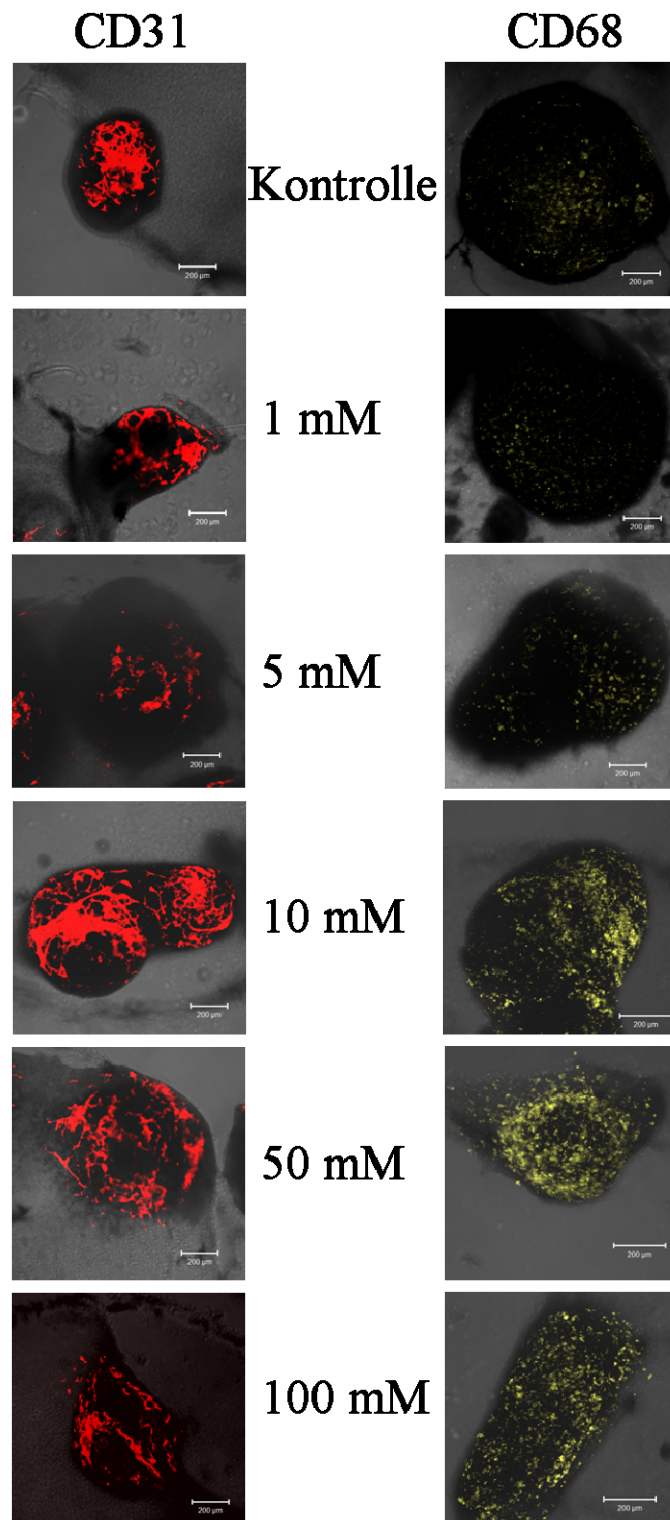


Abb. 14 Repräsentative Aufnahmen CD31 und CD68-Färbung

13d alte EBs nach 5d in Kokultur mit PP-Scheiben in Komplettmedium mit aufsteigenden Konzentrationen des Laktats, unbehandeltes Komplettmedium als Kontrolle, Aufnahmen vom cLSM510meta® bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 200 µm

5.2 Experimente mit bioabbaubaren Materialien

5.2.1 Anwachsverhalten von EBs auf bioabbaubaren Materialien

5.2.1.1 Anwachsrate

Nachdem die 10 d alten EBs 2 d im hTr kokultiviert wurden, erfolgte unter die Betrachtung des Anwachsverhaltens unter dem Lichtmikroskop. Dies geschah unmittelbar vor der Überführung in die Zellkulturschalen (siehe auch 4.2.4).

Abb. 15 zeigt, dass bei PVC-Pb und CLA58 ist ca. jeder dritte, bei 50/50 und PP ca. jeder fünfte und bei 80/20 nur ca. jeder achte EB gar nicht adheriert. In Kokultur mit den Biomaterialien ist ca. jeder Dritte EB randständig adheriert, bei PP jeder Fünfte, bei PVC-Pb mehr als die Hälfte.

Bei PVC-Pb ist ca. jeder Achte EB flächenhaft angewachsen, beim Biomaterial CLA58 ca. jeder Dritte, bei den Biomaterialien ca. die Hälfte und bei PP fast zwei Drittel. In Kokultur mit PP wachsen EBs flächenhaft signifikant besser an, als in Kokultur mit PVC-Pb.

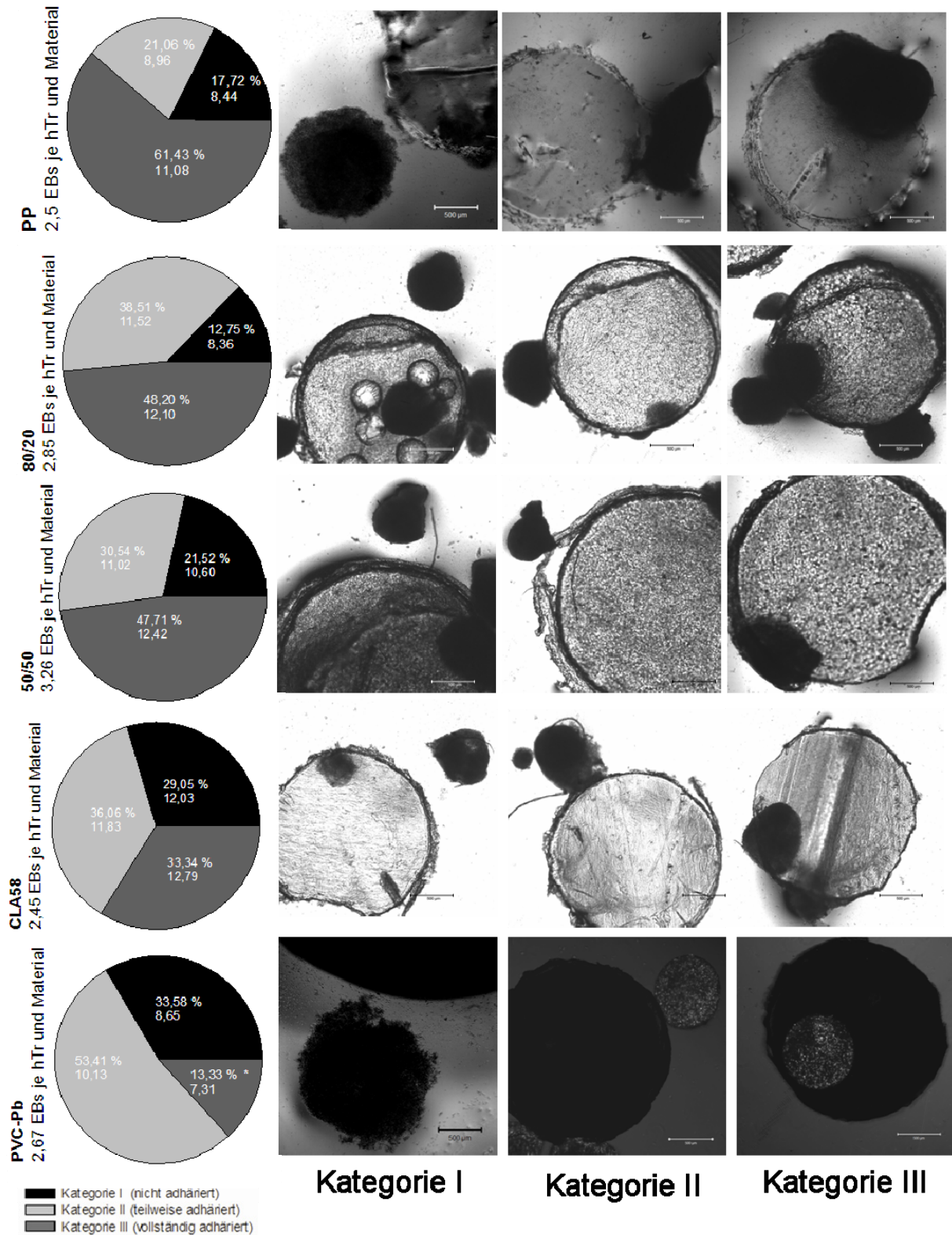


Abb. 15 Anwachsraten der EBs in 3 Kategorien auf unterschiedlichen Materialien

10d alte EBs nach 2d im hTr mit Material-Scheiben in Kompletmedium; angegeben ist je Material die durchschnittliche Anzahl von EBs im hTr und ihre prozentuale Aufteilung in 3 Kategorien und Standardfehler sowie pro Kategorie ein repräsentatives Bild in 5facher Vergrößerung; beim PVC-Pb mit Hoechst 3342 zur Visualisierung gefärbt; dargestellt sind die Mittelwerte MW +/- SEM aus 10 unabhängigen Experimenten, PP und PVC-Pb als Kontrolle; Maßstab 500 µm

5.2.1.2 Adhärenz

Die Adhärenz gibt an wie sich ein angewachsener EB auf einer Materialscheibe ausdehnt, indem er einen Hof bildet (siehe 4.2.5).

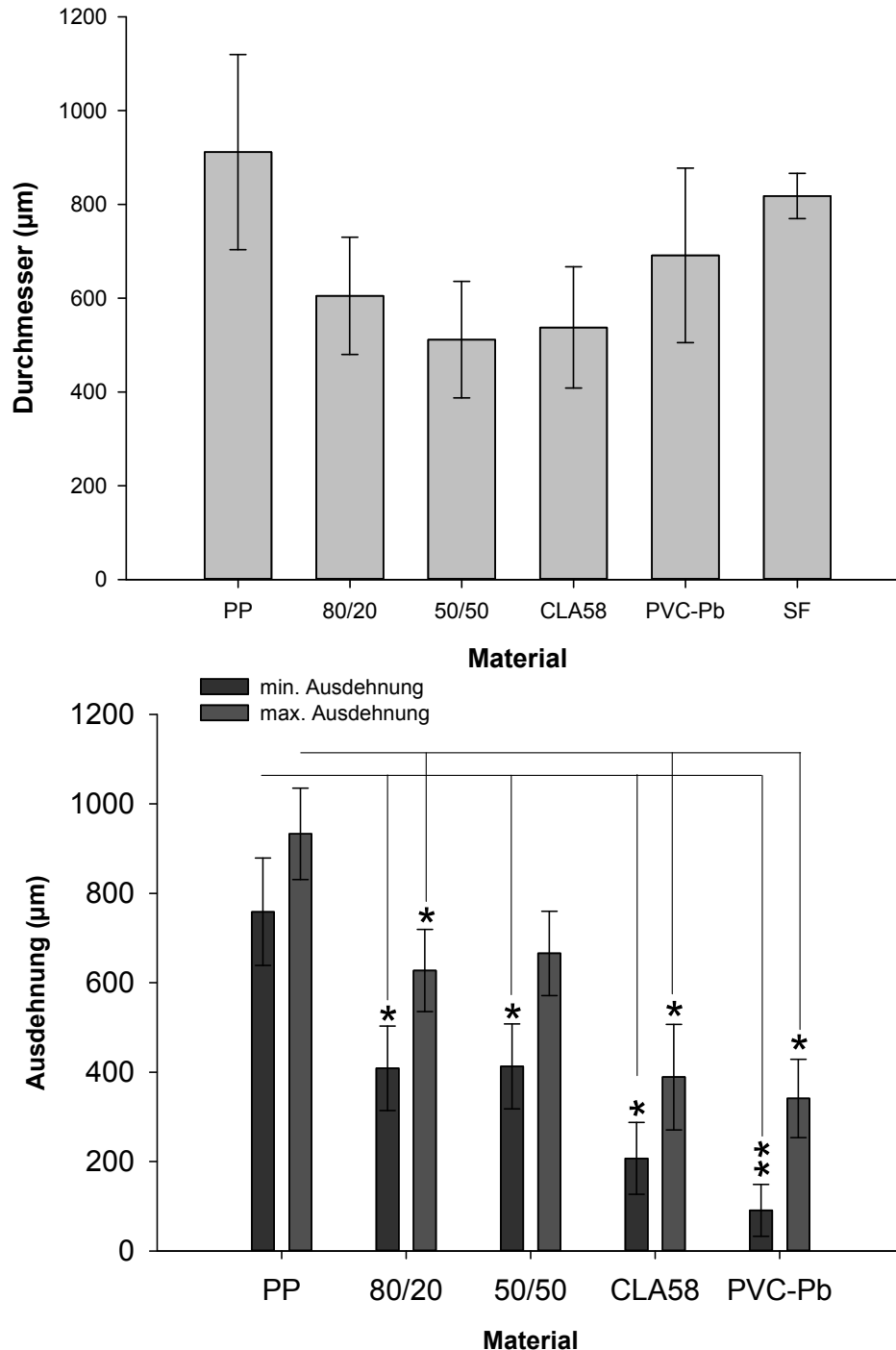


Abb. 16 Adhärenz

Oben: Durchmesser der EBs auf den Materialscheiben

Unten: Minimale und Maximale Ausdehnung von EBs auf Materialien

dargestellt sind die Mittelwerte MW \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten, Kontrolle 8 unabhängige Experimente.

EBs aus der SF und nach 5tägiger Kokultur im hTr und Zellkulturschale zeigen im selben Alter (d13) keine signifikanten Unterschiede im Durchmesser des adhierten EBs (Abb. 16 oben)

Abb. 16 unten zeigt, dass EBs auf dem inerten Kontrollmaterial PP im Vergleich zu den Biomaterialien und PVC-Pb signifikant am weitesten expandieren. Die Biomaterialien 80/20 und 50/50 weisen ähnlich hohe Adhärenzen auf, während die Adhärenz vom Biomaterial CLA58 mit der des PVC-Pb vergleichbar ist.

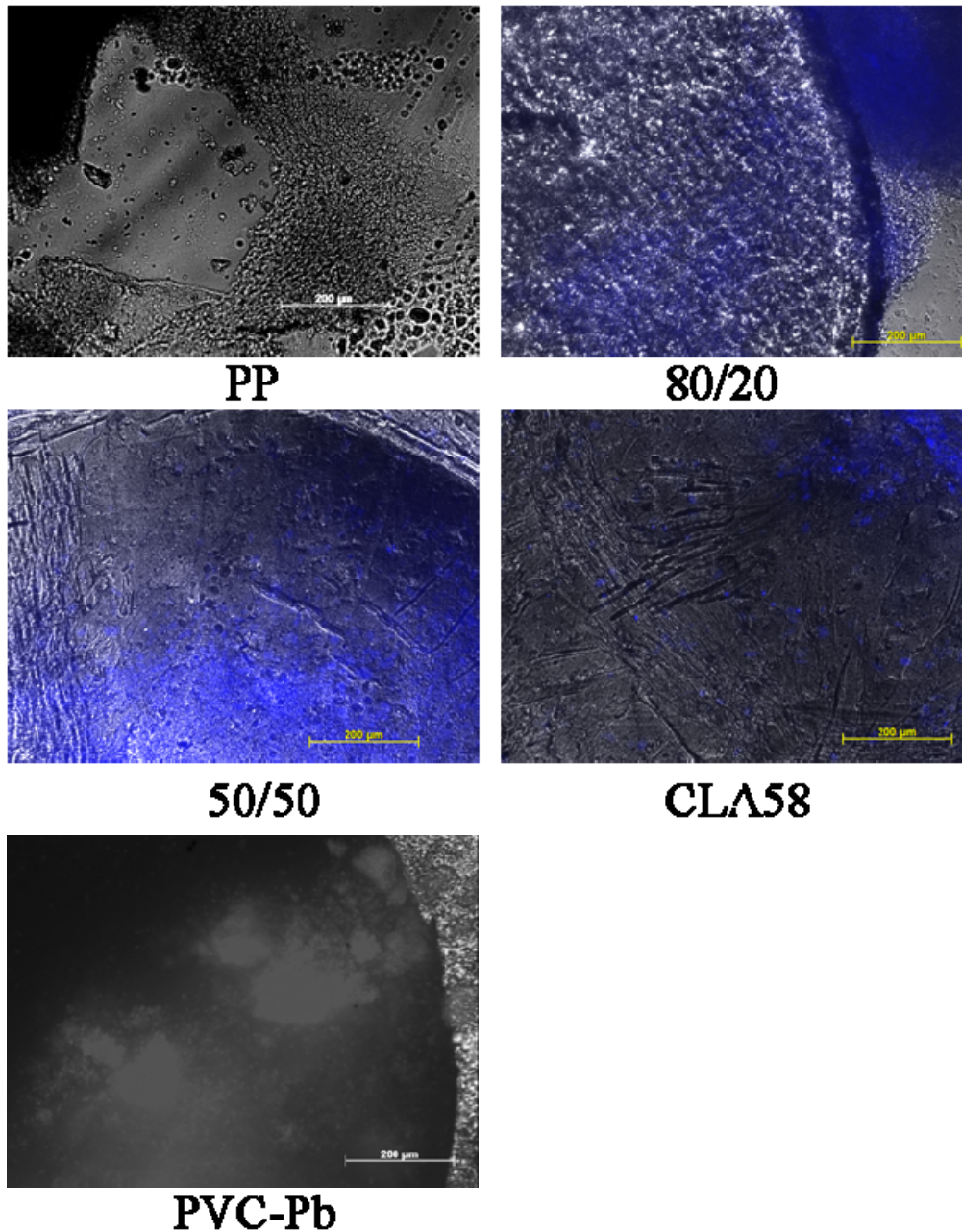


Abb. 17 Adhärenz

Repräsentative Aufnahmen vom ApoTome bei 10facher Vergrößerung; bei 80/20, 50/50 und CLA58 Färbung mit Hoechst 33342 zur Visualisierung der Zellkerne, Maßstab 200 µm

5.2.2 Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz

Mit Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Genese von Gefäßen und Entzündungszellen (Monozyten/Makrophagen) untersucht (4.2.2). Acht Tage alte EBs wurden zwei Tage an den Materialscheiben im hTr kultiviert und anschließend drei Tage in Zellkulturschalen.

5.2.2.1 Differenzierung zu Endothel (CD31)

Betrachtet man, wie viel CD31+-Fläche pro EB-Fläche auftritt, zeigen sich unter den Biomaterialien 80/20, 50/50 und CLA58 sowie dem *bad material* PVC-Pb keine wesentlichen Unterschiede. Zwischen 10 % und 17 % der Fläche ist angefärbt. Beim positiven Referenzmaterial PP ist ca. 30 % der Fläche angefärbt. Es ist signifikant mehr CD31+- Fläche als beim Biomaterial CLA58 und dem *bad material* PVC-Pb vorhanden (Abb.18 unten).

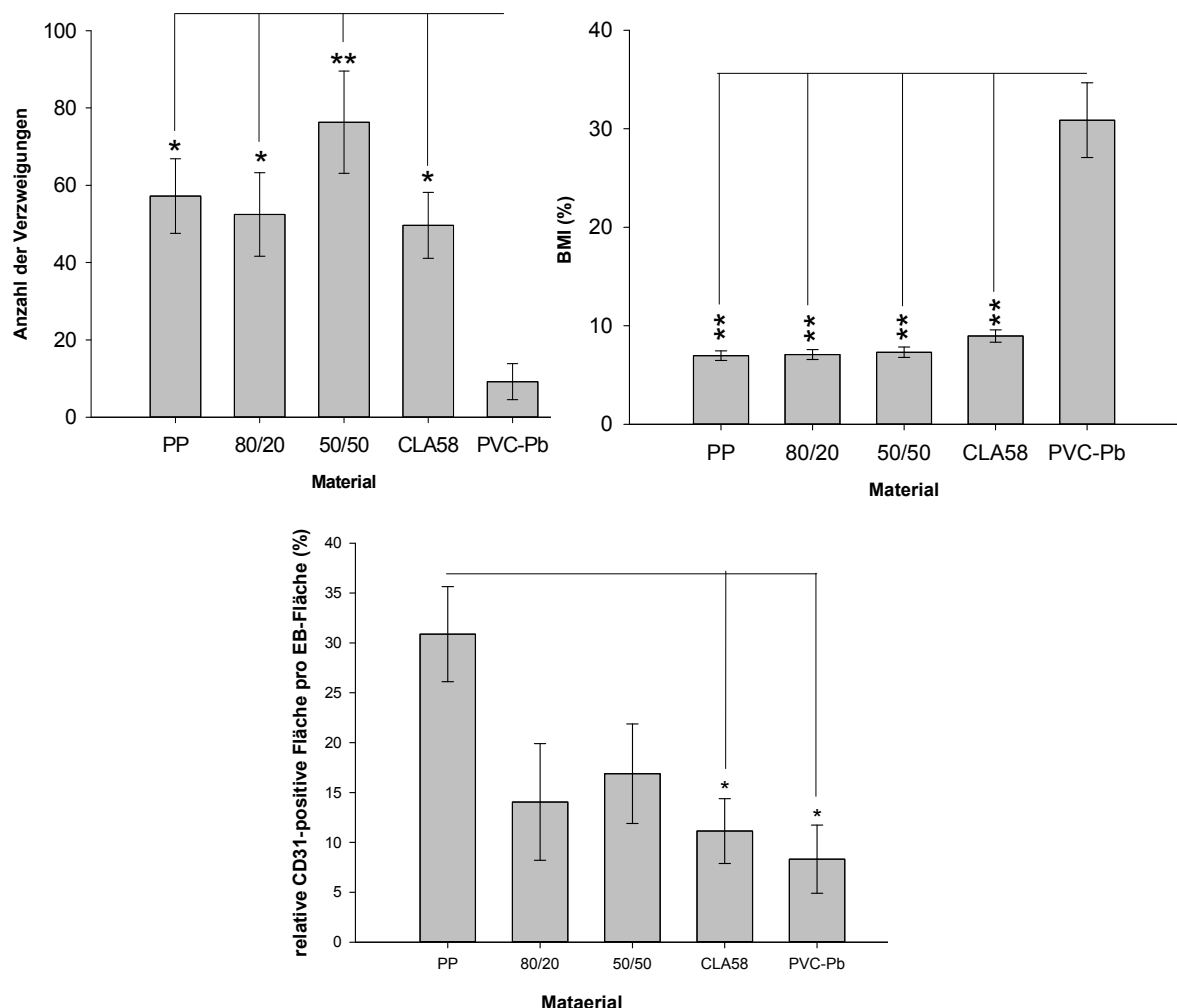


Abb. 18 Endotheliale Differenzierung

Links: Anzahl der Kreuzungen von Gefäßen pro adherierten EB

Rechts: BMI (Gefäßbreite/Gefäßlänge*100) von 10 Gefäßen pro adherierter EB

Unten: Relative CD31+- Fläche pro EB-Fläche

13 d alte EBs nach 5 d in Kokultur mit Material-Scheiben, dargestellt sind die Mittelwerte MW +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten

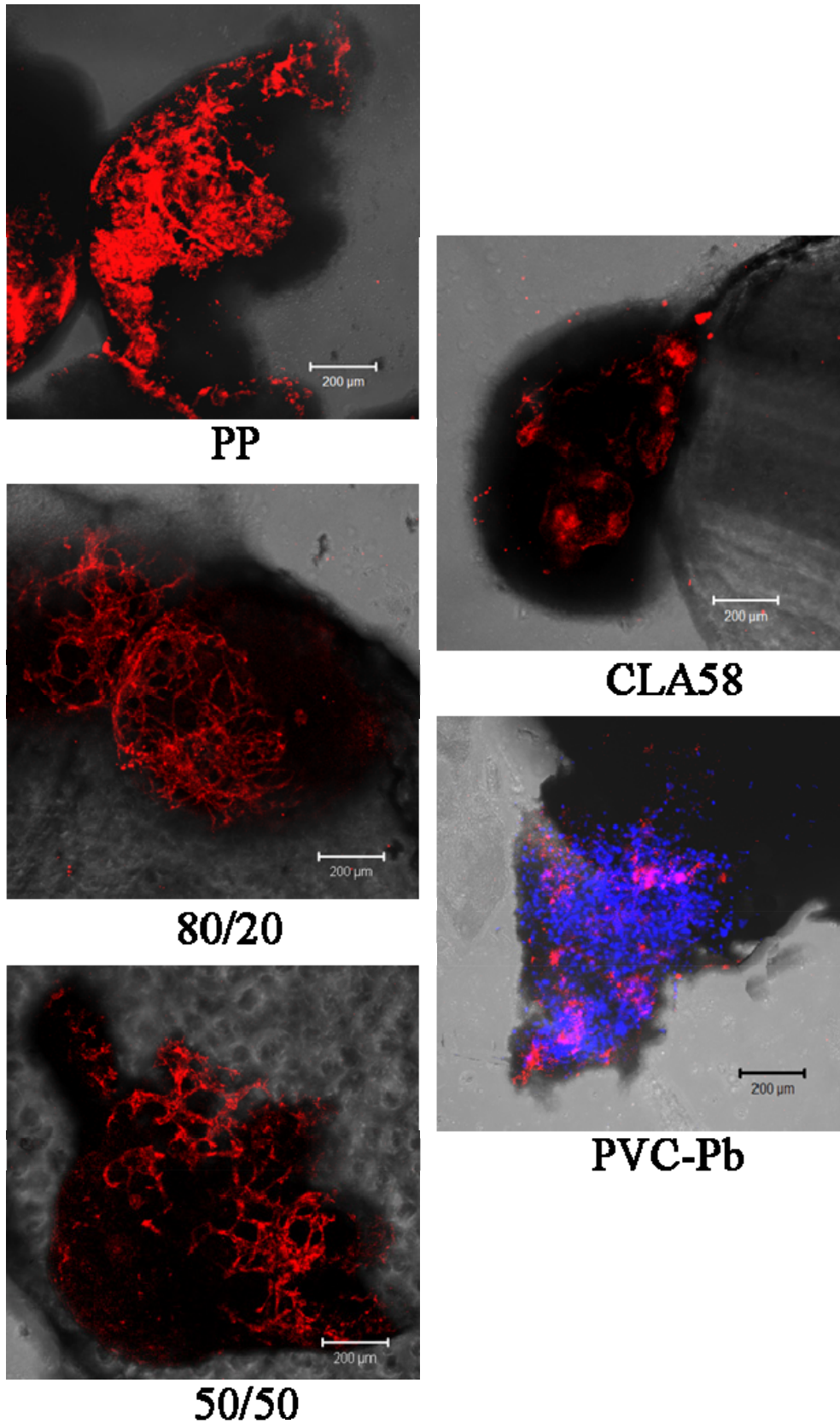


Abb. 19 CD31-+Fläche

13 d alte EBs nach 5 d in Kokultur mit den bioabbaubaren Materialien 80/20, 50/50 und CLA58, PP und PVC-Pb als Kontrolle, Aufnahmen vom cLSM510meta® bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 200 µm

Die durch das Fluoreszenzmikroskop erzeugten Bilder wurden hinsichtlich der Ausprägung des *sproutings*, der Gefäßsprossung und Anzahl der Verzweigungen, den *crossing point*, untersucht.

Bei den untersuchten Parametern *body mass index* (BMI) und Anzahl der Verzweigungen (siehe 4.2.6) zeigen sich große Abweichungen des PVC-Pb. EBs an den Biomaterialien 80/20 und CLA58 sowie PP weisen 5 bis 6 mal mehr Verzweigungen auf als diejenigen an PVC-Pb. EBs am Biomaterial 50/50 zeigen ca. 8 mal mehr Verzweigungen. Beim BMI als Maß für Ausdifferenziertheit des Gefäßnetzwerkes haben adherierte EBs an PVC-Pb ein 3-4 fach höheren BMI als an allen anderen zu untersuchenden Materialien. Die Parameter BMI und Verzweigungsgrad unterscheiden sich im Vergleich zwischen den Biomaterialien und PVC-Pb signifikant, jedoch untereinander und mit PP nicht signifikant (Abb.18 oben).

5.2.2.2 Differenzierung zu Monozyten und Makrophagen (CD68)

Bei der Immunfluoreszenzfärbung gegen das Monozyten bzw. Makrophagen - Oberflächenmolekül CD68 weisen adherierte EBs am Biomaterial 80/20 eine CD68+-Fläche von ca. 9 % und an den Biomaterialien 50/50 und CLA58 ca. 12 %. EBs an den Kontrollmaterialien PP und PVC-Pb sind mit ca. 6 % bzw. 17 % gefärbt.

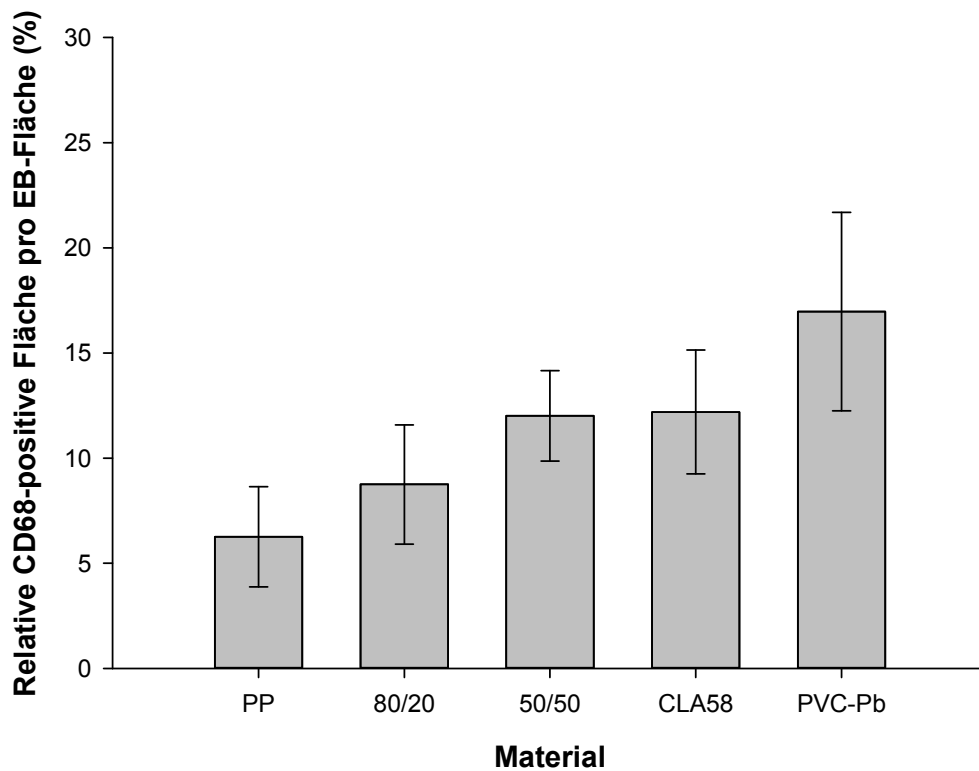
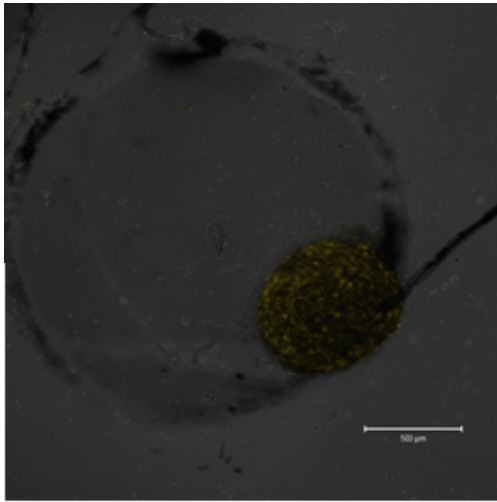
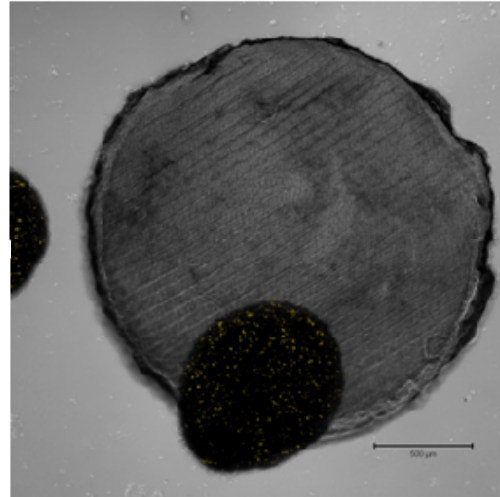


Abb. 20 Relative CD68-positive Fläche pro EB-Fläche

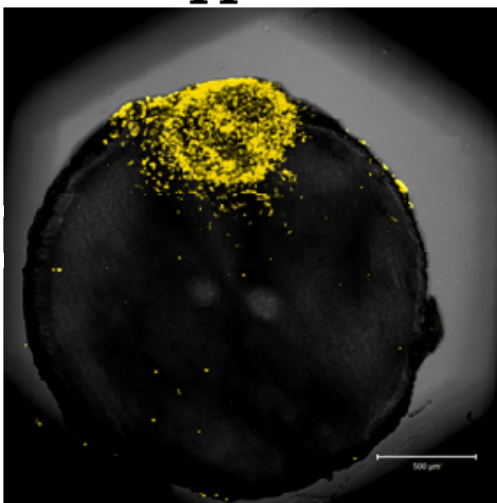
13 d alte EBs nach 5 d in Kokultur mit Material-Scheiben, dargestellt sind die Mittelwerte MW \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten



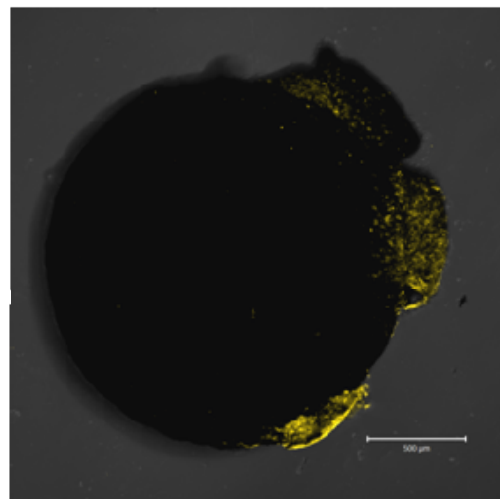
PP



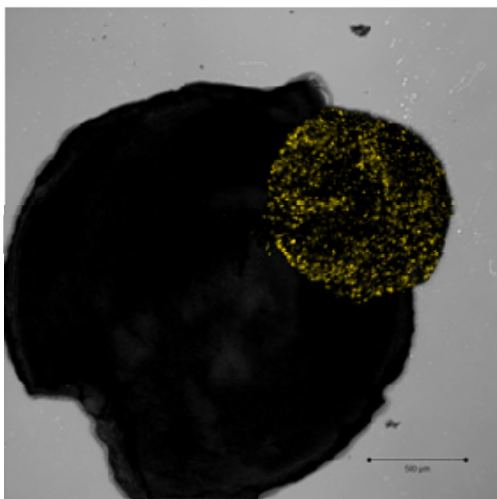
CLA58



80/20



PVC-Pb



50/50

Abb. 21 CD68+-Fläche

Repräsentative Bilder 13 d alte EBs nach 5d in Kokultur mit den bioabbaubaren Materialien 80/20, 50/50 und CLA58, PP und PVC-Pb als Kontrolle, Aufnahmen vom cLSM510meta® bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 200 µm.

5.2.3 Untersuchung der Letalität

Um zu betrachten wie sich Biomaterialien und die Bedingungen des hTr auf den Zelltod auswirken wurde mit EthD-2 eine Lebendfärbung durchgeführt (4.2.2) und durch das Fluoreszenzmikroskop detektiert. Im Gegensatz zu allen anderen Experimenten dieser Arbeit, wurde dieser Letalitätstest an 11 und 13 Tage alten EBs durchgeführt, nachdem 8 Tage alte EBs 2 Tage lang an Materialscheiben im hTr kultiviert wurden und anschließend für 1 bzw. 3 Tage in Zellkulturschalen. Außerdem wurden als Kontrolle fixierte EBs verwendet (4.2.2).

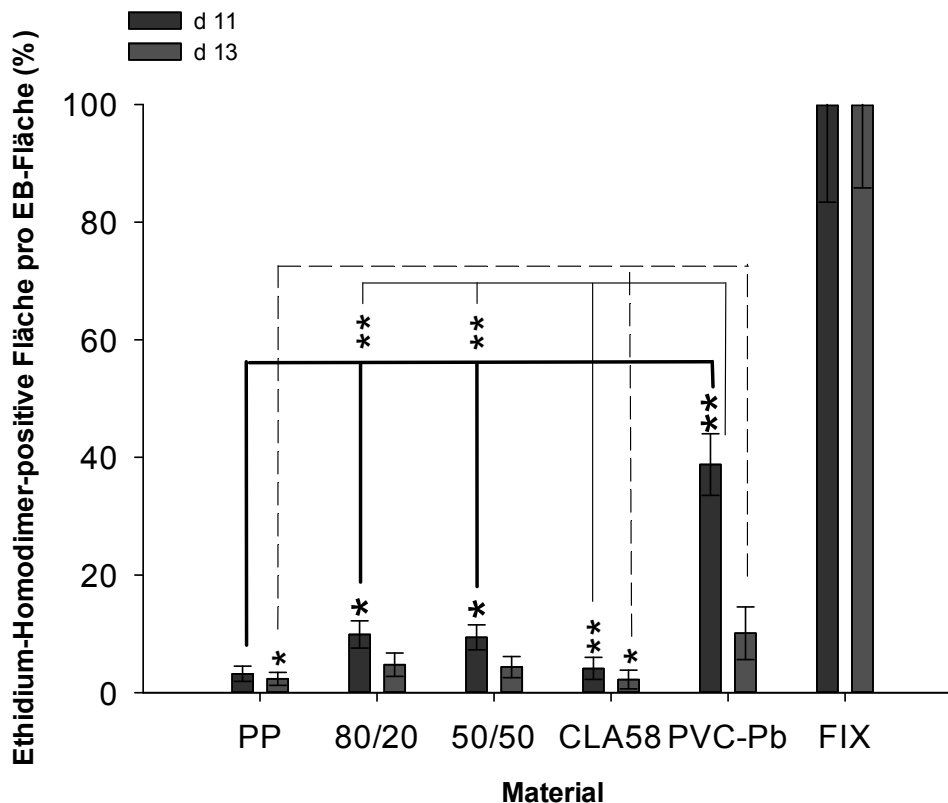


Abb. 22 Relative EthD-2+-Fläche pro EB-Fläche

Diagramm: 11 d alte EBs nach 3 d in Kokultur und 13 d alte EBs nach 5 d in Kokultur mit Material-Scheiben, PP und PVC-Pb als Kontrolle, Fixierte EBs (FIX) entsprechen 100%; alle Werte stehen dazu im Verhältnis, dargestellt sind die Mittelwerte MW +/- SEM aus 4 unabhängigen Experimenten

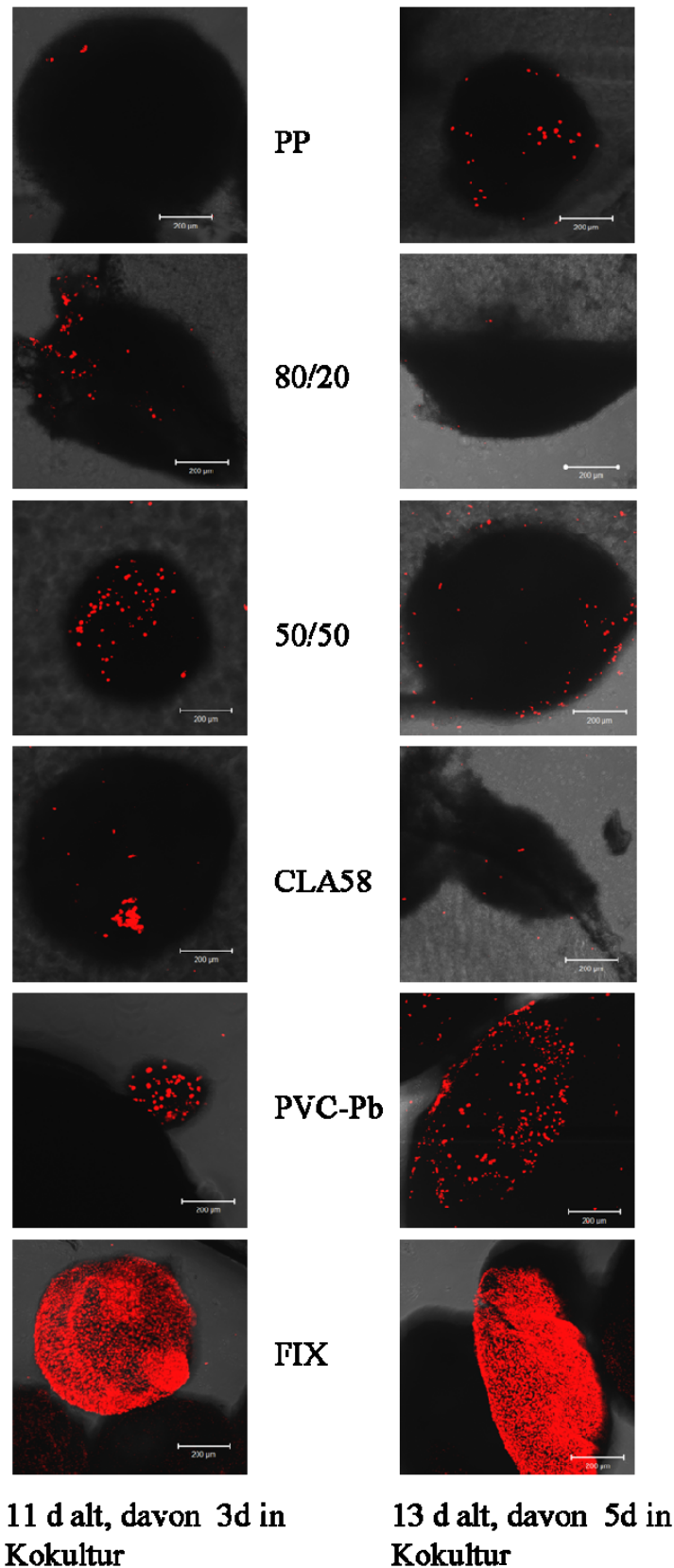


Abb. 23 EthD-2+-Fläche

Repräsentative Bilder 11 und 13 d alte EBs nach 3 bzw. 5 d in Kokultur mit den bioabbaubaren Materialien 80/20, 50/50 und CLA58, PP und PVC-Pb als Kontrolle, Aufnahmen vom cLSM510meta® bei 10-facher Vergrößerung, Maßstab 200 µm

-Ergebnisse-

EBs die 5 Tage lang mit PVC-Pb kokultiviert wurden, zeigen eine 10 fach geringere Fläche, während EBs die 3 Tage lang mit PVC-Pb kokultiviert wurden eine ca. 2,5 fach geringere Fläche zeigen. 11 Tage alte EBs am PP zeigen nach 3 Tagen in Kokultur eine signifikant kleinere EthD-2+-Fläche gegenüber EBs, die mit 80/20, 50/50 sowie PVC-Pb kultiviert wurden. Außerdem weisen EBs nach 3 Tagen in Kokultur an PVC-Pb signifikant mehr positive Fläche (4 bis 15mal) auf, als an allen Biomaterialien und PP.

5.2.4 Genexpression

Um Aussagen treffen zu können, inwieweit die Kokultur mit bioabbaubaren Materialien die Expression von embryonalen Transkriptionsfaktoren in EBs beeinflusst, wurde die mRNA-Expression der embryonalen Gene *nanog*, *oct-1* und *rex1* mittels PCR untersucht. Zur Vergleichbarkeit wurden die erhobenen Daten jedes dieser Gene jeweils gegen die entsprechenden Daten des *housekeeping*-Genes *polymerase2a* normalisiert. Die Expressionen in EBs aus Kokultur mit dem Kontrollmaterial Petriperm wurden auf 1 standardisiert. Dazu wurden die Expressionen in EBs aus Kokultur mit allen anderen Materialien ins Verhältnis gesetzt.

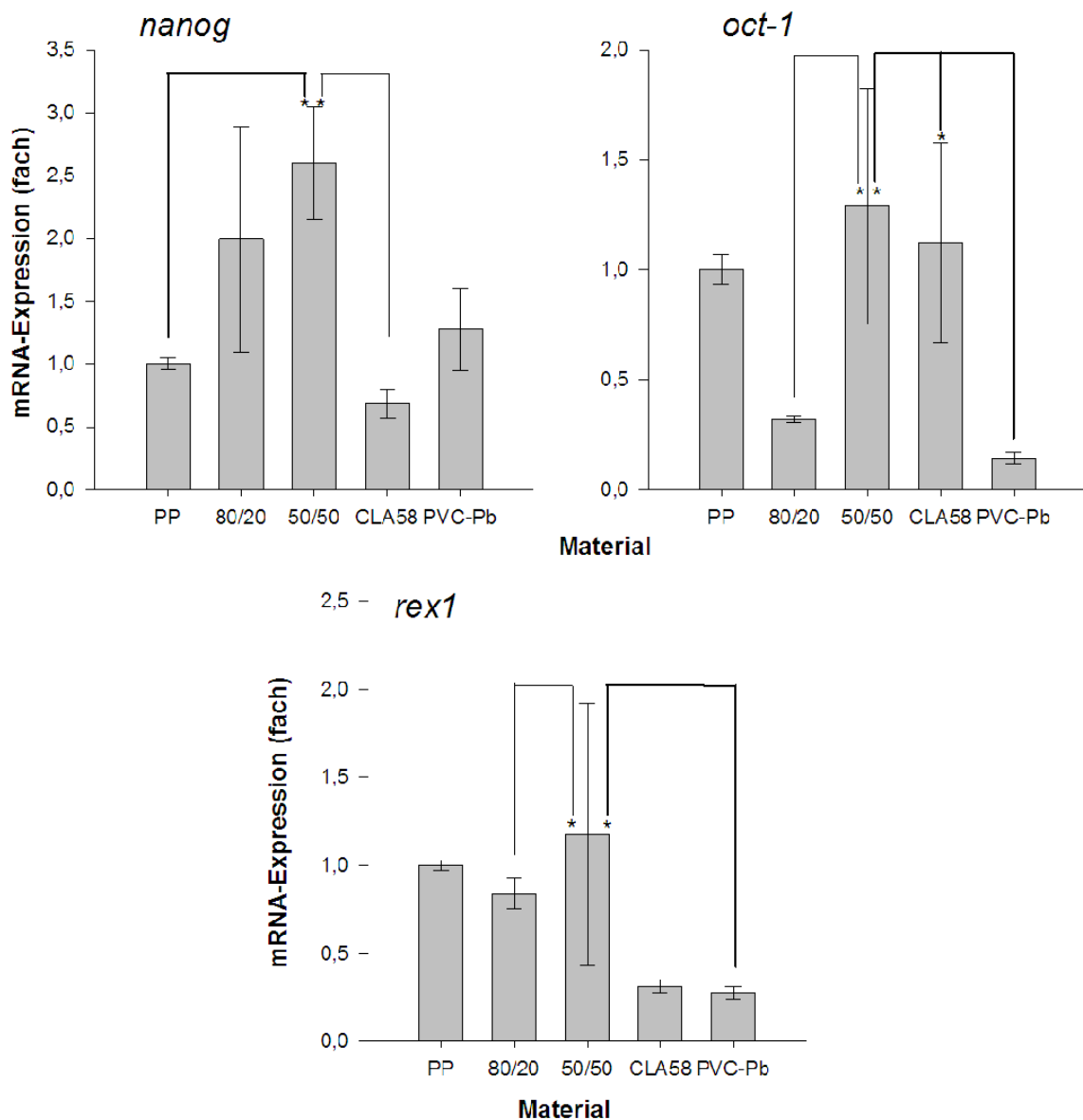


Abb. 24 mRNA Expression der embryonalen Gene *nanog*, *oct-1* und *rex1*

13 d alte EBs nach 5 d in Kokultur mit Material-Scheiben; Daten wurden mittels PCR erhoben und auf die Expression des *housekeeping*-Genes *polymerase2a* normalisiert; dargestellt sind die Mittelwerte MW +/- SEM aus 3 unabhängigen Experimenten

Die mRNA – Expression von *nanog* beträgt bei EBs aus Kokultur mit 80/20 ca. das 2-Fache, mit 50/50 ca. das 2,5-Fache, mit CLA58 ca. das 0,6Fache und mit PVC-Pb ca. das 1,3-Fache, im Verhältnis zu EBs aus Kokultur mit PP. Die mRNA – Expression von *nanog* ist bei EBs aus Kokultur mit 50/50 im Vergleich zu PP und CLA58 signifikant erhöht. Sie weist bei 80/20 – und CLA58 – kokultivierten EBs einen großen Standardfehler auf.

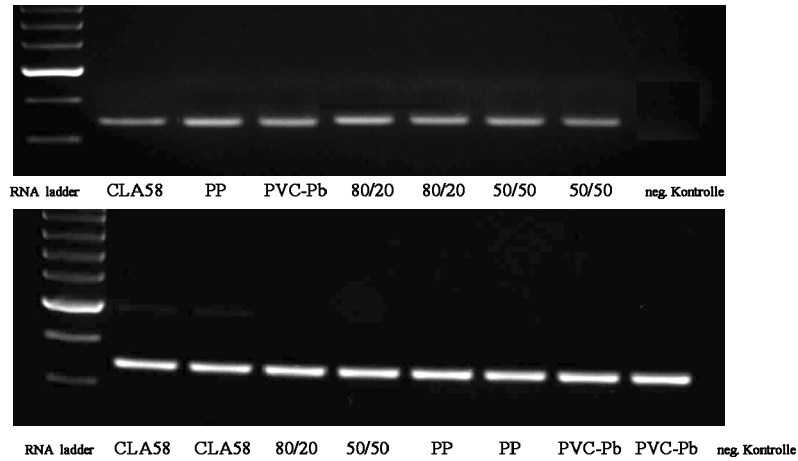
Die mRNA – Expression von *oct-1* beträgt bei EBs aus Kokultur mit 80/20 ca. das 0,4-Fache, mit 50/50 ca. das 1,2-Fache und mit PVC-Pb ca. das 0,3-Fache, im Verhältnis zu EBs aus Kokultur mit PP. Die Expression zwischen PP - und CLA58 – kokultivierten EBs ist annähernd gleich. Die mRNA – Expression von *oct-1* ist bei EBs aus Kokultur mit PVC-Pb im Vergleich zu 50/50 und CLA58 signifikant erniedrigt. Sie weist bei 50/50 – und CLA58 – kokultivierten EBs einen großen Standardfehler auf.

Die mRNA – Expression von *rex1* beträgt bei EBs aus Kokultur mit 80/20 ca. das 0,9-Fache, mit 50/50 ca. das 1,1-Fache, mit CLA58 ca. das 0,4-Fache und mit PVC-Pb ca. das 0,3-Fache, im Verhältnis zu EBs aus Kokultur mit PP. Die mRNA – Expression von *rex1* ist bei EBs aus Kokultur mit 50/50 im Vergleich zu PVC-Pb und 80/20 signifikant erhöht. Sie weist bei 50/50 – kokultivierten EBs einen großen Standardfehler auf.

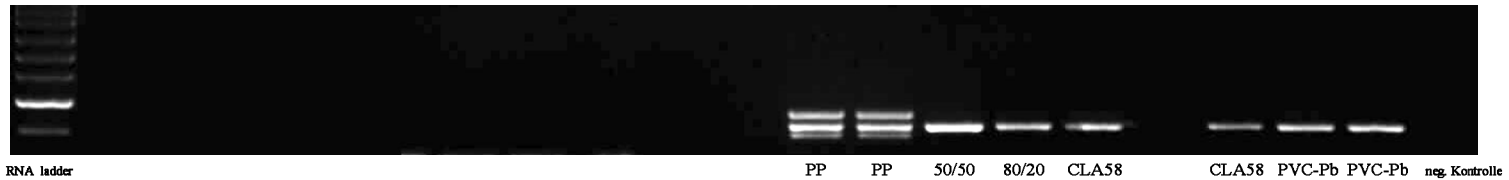
Bei 50/50 – kokultivierten EBs werden alle drei untersuchten Gene am stärksten exprimiert.

-Ergebnisse-

polymerase 2a (housekeeping-Gen)

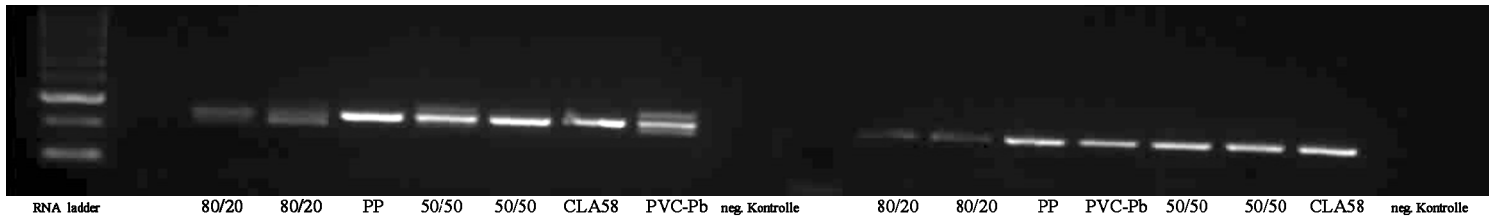


nanog



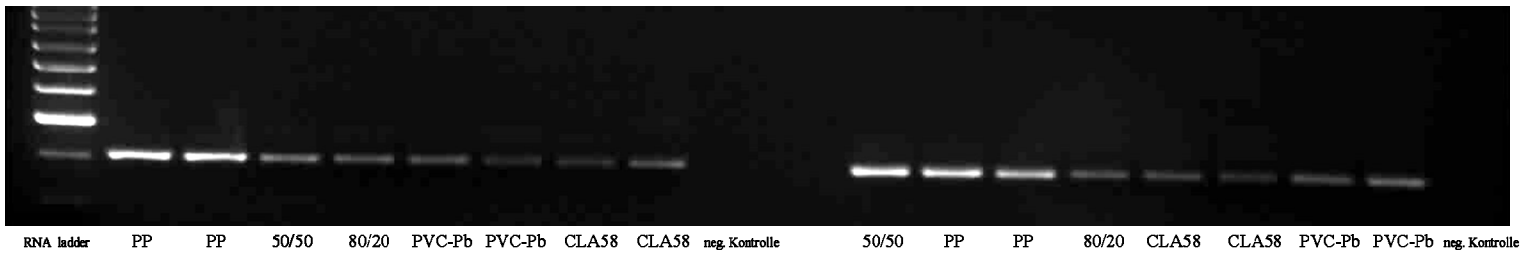
nanog

oct-1



oct-1

rex1



rex1

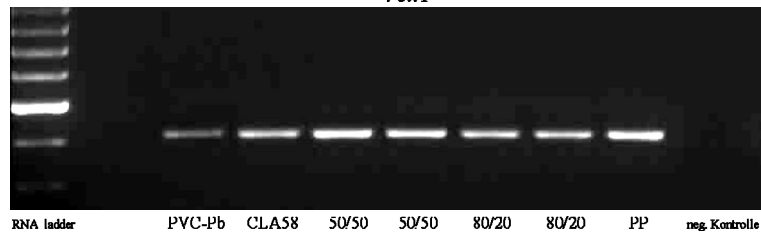


Abb. 25 Visualisierung der mRNA – Expression von *nanog*, *oct-1* und *rex1*

13 d alte EBs nach 5 d in Kokultur mit Material-Scheiben; PCR mit anschließender Elektrophorese und Geldektion mittels Geldokumentationsanlage G:BOX EF® ; 3 unabhängige Experimente

6 Diskussion

6.1 Kultur des hTr und Anwachsrate

Für eine Biokompatibilitätsanalyse mittels EBs kommen verschiedene Methoden der Kokultivierung in Betracht. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits die Konfrontationskultur in der SF und im hTr untersucht (Meyer 2011). Diese Arbeit kommt zu dem Schluss, dass die geeignetste Methode die SF – Kokultur mit genormten Materialscheiben ist. Weiterhin wird beschrieben, dass die Kultur des hTr geeignet ist, wobei durch den Diskus keine optimale Konfrontation möglich ist, wenn die Materialscheiben nicht korrekt positioniert sind. Allerdings kann durch exaktes Pipettieren und Positionieren der Materialscheiben mit Pinzette dieser Nachteil vermindert werden. Generell ist die hämatopoetische Differenzierung von EBs im hTr gegeben (Dang et al. 2004). Bei der vollständigen Kokultur von Materialscheiben in der SF erweist sich die unkontrollierbare Verklumpung von Zellen an Materialscheiben als problematisch, da Zellen, die unmittelbar in Kontakt mit dem Material stehen nur schwierig von periphereren Zellen abgrenzbar sind. Deshalb muss diese Methode trotz der hohen und konstanten Nährstoffversorgung in Frage gestellt werden. Optimale Kulturbedingungen bietet die Zellkulturschale, deren Boden mit einer Biomaterialscheibe bedeckt ist. Diese Methode erfordert größere Mengen an Biomaterialien, die für diese Arbeit nicht zur Verfügung standen. Außerdem ist die Mikroskopie an großen Materialflächen schwieriger. Ein weiterer Ansatz ist die Kokultur in einer Wells-Platte. In den Vertiefungen ist eine optimale Konfrontation möglich, sowie ein täglicher Nährmediumwechsel. Allerdings ist das Entfernen der bewachsenen Materialscheiben schwierig.

Die Wahl fiel auf EBs, die acht Tage lang in einer SF kultiviert wurden, bevor sie in die Kokultur gelangen, weil diese EBs schon groß genug sind, um ohne Mikroskop pipettiert werden zu können. Der EB enthält eine gewisse Zahl von Hämangioblasten. Aus diesen mesodermalen Progenitorzellen können sich sowohl Endothelzellen, als auch Monozyten differenzieren. Endothelzellen differenzieren sich ab dem fünften und sechsten Tag aus Stammzellen unter Expression der endothelialen Gene VE-Cadherin und PECAM-1. Die Ausbildung des Gefäßnetzwerkes nimmt ab diesem Zeitpunkt stetig zu. Ab dem achten Tag kann eine Expression des CD68+-Markers nachgewiesen werden (Hannig *et al.*).

Am zehnten und elften Tag der Fetalentwicklung können erstmals Monozyten im Dottersack nachgewiesen werden (Cline and Moore 1972). Die EBs sind bei der Kokultivierung insgesamt 11 bis 12 Tage alt, unter Berücksichtigung, dass die pluripotenten Stammzellen aus

der 3,5 Tage alten Blastozyste gewonnen wurden. In diesen Zeitraum fällt auch die Kokultivierung.

Es wurde gezeigt, dass es in EBs ab einem Alter von 7 Tagen keine Zunahme von Zellen mehr gibt und somit auch keine Größenzunahme (Dang *et al.* 2002). Dies entspricht den Messungen des Durchmessers von EBs auf wachstumsfördernden Zellkulturschalen (Abb. 8). Die Ausdehnung des Hofes des EBs an Flächen ist wenigstens bis zum zwölften Tag unbegrenzt (Abb. 10). Dies ermöglicht die Messung der Adhärenz, da der EB im Zeitraum der Kokultivierung expandiert.

6.2 Der Einfluss von Blei- und Laktationen auf den EB

In einem weiteren Vorversuch wurde betrachtet, inwiefern EBs im hTr auf Laktat und Bleiionen reagieren. Es erfolgte eine Kokultivierung im hTr an PP-Scheiben wie sie anschließend in den Versuchen mit den Biomaterialien als positive Kontrolle verwendet wurden.

Da als *bad material* PVC-Pb verwendet werden sollte, wurde das Nährmedium mit vier verschiedenen Konzentrationen Bleiazetat versetzt. Bei den untersuchten Konzentrationen ist die CD31+-Fläche konstant um ca. die Hälfte reduziert, mit Ausnahme von 1 μM . Bleiionen scheinen die Differenzierung zu Endothelzellen schon in sehr kleinen Konzentrationen zu hemmen. Eine zunehmende Hemmung konnte im untersuchten Konzentrationsbereich nicht festgestellt werden. Bleiionen wirken sich während der Embryogenese vor allem im Nervensystem aus (Huang and Schneider 2004). Bleiazetat beeinflusst außerdem die Zellfunktion von Endothelzellen im Mausgehirn über eine Hemmung der Stickstoffmonooxid – Synthase (Blazka *et al.* 1994).

Bleiionen können jedoch auch direkt die Vaskulogenese hemmen (Kaji *et al.* 1995).

Abb. 11 zeigt auch eine deutliche Zunahme von Monozyten unter dem Einfluss von Bleiionen in allen untersuchten Konzentrationen. Die Tendenz bei den höchsten untersuchten Konzentrationen ist weniger eindeutig. Die Differenzierung zu Monozyten nimmt in der 50 μM -Lösung wieder ab. Dies kann auch auf einem Fehler beruhen, da die Abnahme nicht signifikant ist. Interessanterweise ist bei einer Bleikonzentration von 1 μM der Anteil von CD31+-Zellen erhöht und der Anteil der CD68+-Zellen reduziert im Vergleich zu einer Bleikonzentration von 0,25 μM . Somit hätte diese Konzentration vor allem auf die Endotheldifferenzierung einen ungewöhnlich geringen Effekt. Hypothetisch hat Blei in diesem Konzentrationsbereich einen hemmenden und stimulierenden Effekt auf die Differenzierung zu Endothel und Monozyten.

Die untersuchten Biomaterialien bestehen aus den Polymeren Poly-(L)-Lactid und ϵ -Caprolacton. Bei der erwünschten Biodegradation im Gewebe entsteht vor allem aus Poly-(L)-Lactid Laktat als Metabolit. Poly-(L)-Lactid besteht ausschließlich aus polymerisiertem Laktat (Pitt *et al.* 1981). Der Abbauprozess lässt sich in mindestens zwei verschiedene Stadien unterteilen und ist für beide Polymerfamilien trotz Strukturunterschieden sehr ähnlich. Im ersten Schritt kommt es zur rein hydrolytischen Trennung von Esterbrücken. Dieser Vorgang ist zufällig und ohne Beteiligung von Enzymen. Er wird determiniert durch das Molekulargewicht des Polymers und die chemische Struktur. Die entstandenen Partikel bleiben nun über Wochen oder Monate unverändert. Der Prozess geht in die diffuse Induktionsphase über. Dabei phagozytieren, im Sinne einer Fremdkörperreaktion, besonders Fibrozyten, Makrohagen und Riesenzellen Materialpartikel (Abb. 26). Messbar ist ein Gewichts- und Substanzverlust. Mit diesem Ansatz könnte die enorme Zunahme der CD68+-Fläche ab Konzentrationen von 10 mM Laktat erklärt werden (Abb. 13). Bereits 80 μm große Partikel können aufgenommen werden. Intrazellulär beginnt eine vielfältige enzymatische Spaltung, deren Dauer vom intramolekularen Verzweigungsgrad der Polymere abhängt. Da die Polymere zum großen Teil aus Laktatgruppen bestehen, steigt die Laktatkonzentration konstant ab einem Zeitpunkt, der abhängig vom Poly-(L)-Lactid schwankt. Die Laktat – Dehydrogenase baut Laktat in den Mitochondrien ab. Die Biodegradation ist beendet mit der vollständigen Lyse der Partikel (Colin G. Pitt 1984; Suming Li 1990).

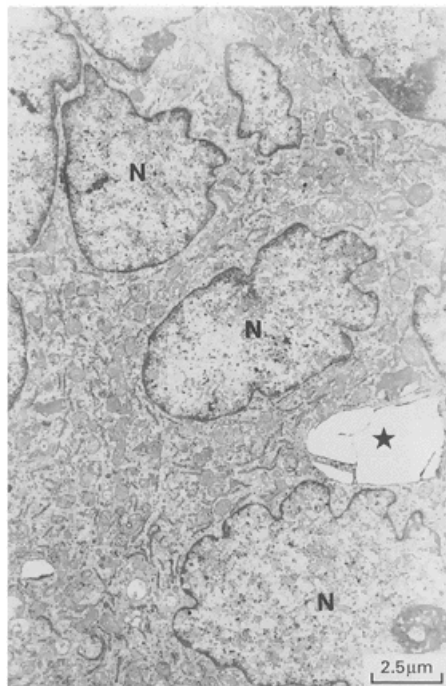


Abb. 26 Phagolyse von Partikeln

Aufnahme vom Elektronenmikroskop: Vielkernige Riesenzelle mit phagozytiertem Poly-(L)-Lactid- Partikel (Stern), Kern (N), Maßstab: 2,5 μm (F. R. Rozema 1994).

Die Laktatkonzentration liegt in Wund- und Tumorgewebe bei 7 bis 15 mM und ist damit um das Drei- bis Siebenfache erhöht. Laktat ist in der Lage vaskulogene Stammzellen zu stimulieren (Milovanova *et al.* 2008). Gegenüber der laktatfreien Kontrolle ist im untersuchten Konzentrationsbereich von 5 und 10 mM die Endothelfläche stark erhöht. Dieser würde dem Wund- oder Fremdkörpermilieu bei Implantationen entsprechen. Höhere Konzentrationen Laktat scheinen keine Zunahme des Endothels zu bewirken.

Es wird für diese Arbeit davon ausgegangen, dass sich im Grenzbereich zwischen EB und der Materialscheibe ein Mikromilieu entsteht, worin die untersuchten Konzentrationen von Blei und Laktat erreicht werden können. Allerdings wurde die tatsächliche Konzentration nicht bestimmt. Die Konzentrationen wurden entsprechend den Veröffentlichungen (Huang and Schneider 2004) gewählt. Allerdings zeigt sowohl Blei als auch Laktat deutliche Effekte sowohl auf die Differenzierung zu Monozyten / Makrophagen als auch zu Endothel.

6.3 Kokulturen mit bioabbaubaren Materialien

6.3.1 Anwachsrate und Adhärenz

Mit der Methode des hTr sollte in dieser Arbeit auch eine Aussage darüber getroffen werden, auf welchem Biomaterial EBs bevorzugt anwachsen (5.2.1.1 und Abb. 15). Es wird davon ausgegangen, dass auf den biokompatibelsten Materialien der höchste Anteil an vollständig adherierten EBs (Kategorie III) vorkommt. PP weist den höchsten Anteil der Kategorie III auf, gefolgt von 80/20, 50/50, CLA58 und PVC-Pb. Es ergibt sich daraus eine Tendenz. Allerdings ist der Standardfehler trotz der hohen Zahl von Experimenten nicht gering genug, um signifikante Unterschiede zwischen PP und einem Biomaterial oder den Biomaterialien untereinander festzustellen. Das manuelle Ansetzen der hTr und die ungleiche Anzahl der EBs im hTr stellen eine große Fehlerquelle dar.

Obwohl die Differenzierung der Stammzellen im EB ungerichtet verläuft, so unterliegt die Formation eines solchen Aggregates doch definierten Abläufen. Die Größe des EB hängt von der Anzahl der Stammzellen ab, die anfänglich über Zell-Zell-Kontakte mittels Cadherinen einen Verbund bilden (Larue *et al.* 1996; Dang *et al.* 2004). Dabei handelt es sich um Calcium-abhängige Transmembran - Rezeptoren, die primär der Adhäsion dienen. Erstes Anzeichen einer beginnenden Differenzierung der Zellen ist die Bildung einer Schicht primitiven Endoderms (PE) auf der Oberfläche des EB (Maurer *et al.* 2008). Dieser Prozess ist noch nicht vollständig verstanden, aber die Bildung der äußeren PE-Schicht scheint von einem *fibroblast growth factor* (FGF) abzuhängen der über eine PI 3-kinase-Kaskade den

Vorgang steuert (Chen et al. 2000). Diese PE-Schicht differenziert sich weiter in Zellen des viszeralen und parietalen Endoderms und bildet eine Basalmembran, die vor allem Kollagen IV und Laminin enthält (Li et al. 2001), welche schließlich die PE-Schicht von der übrigen EB – Masse trennt. Es wird angenommen, dass Zellen, die unmittelbar mit der Basalmembran in Kontakt sind, am Leben bleiben, während Zellen im Inneren des EB apoptotisch zugrunde gehen und sich somit zystenartige Kavitäten im Inneren der meisten EBs ausbilden (Coucouvani and Martin 1995; Smyth et al. 1999). Im Verlauf der Formation des EB bildet sich randständig eine ECM, die vornehmlich der Haftung und Verankerung, aber auch der Absonderung von Wachstumsfaktoren, dient. Sie besteht beim unbehandelten EB aus Glycosaminoglycanen und faserbildenden Proteinen. Sie wird gebildet durch Zellen, die aus dem EB migrieren (Bratt-Leal et al. 2009). Um den EB bildet sich ein Hof.

Um die Expansion von EBs auf unterschiedlichen Biomaterialien zu detektieren, wurde der Hof vermessen, den EBs ausbilden, wenn sie auf einer Fläche anhaften. Dazu wurde seine geringste und weiteste Ausdehnung gemessen, unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops ApoTome (Abb. 17). Es zeigt sich, dass der Hof auf allen Biomaterialien signifikant kleiner ist, als der auf dem positiven Kontrollmaterial PP. Diese Methode ist relativ aussagekräftig und mit einer einfachen Färbung (Hoechst 33342) zur Visualisierung der Zellkerne durchführbar. Ein Fehlerpotential ist vor allem gegeben wenn mehrere EBs auf einer Materialscheibe adherieren und diese so nah beieinander liegen, dass ihre Höfe nicht eindeutig abgrenzbar sind.

Die Toleranz einer ECM gegenüber einem bioabbaubaren Material ist ein wesentlicher Faktor, da gezeigt werden konnte, dass ESCs auf einem *scaffold* besser proliferieren, wenn der *scaffold* mit einer ECM beschichtet ist, die durch EBs erzeugt wurde, im Vergleich zum unbeschichteten *scaffold* (Goh et al.).

6.3.2 Verhältnis von bioabbaubaren Materialien zur Vaskulogenese

Bei Fremdkörperreaktionen, wie sie an implantierten bioabbaubaren Materialien *in vivo* stattfinden, kommt der Vaskularisierung eine wesentliche Bedeutung zu. Histologisch lassen sich während des Abbaus drei Schichten abgrenzen. Direkt an der Materialoberfläche adherieren Makrophagen. Es folgt eine ca. 100 µm dicke, gefäßarme, dichte Kollagenschicht, an welches sich ein lockeres hoch vaskularisiertes Gewebe anschließt (Sieminski and Gooch 2000). Um im Mikromilieu um den Fremdkörper einen ausreichenden Nährstoff und Gasaustausch zu gewährleisten sollte ein bioabbaubares Material die Vaskulogenese nicht hemmen. Es wird auch davon ausgegangen, dass Materialien, die schnell degradieren (l-actin-

glycolic acid co-polymer, PLGA) einen negativen Einfluss auf die Vaskulogenese haben, im Gegensatz zu den langsam Degradierenden (Poly ϵ -Caprolacton). Dies wird u. a. mit dem saureren Milieu bei der schnelleren Degradation erklärt. Außerdem steht eine hohe Vaskularisierung im Verhältnis zu einer stärkeren inflammatorischen Reaktion (Sung *et al.* 2004).

In vitro kann die endotheliale Fläche somit als Indikator der Gewebsverträglichkeit verstanden werden.

Die endotheliale Entwicklung der EBs in Konfrontationskultur wurde mit drei Methoden betrachtet (5.2.2.1). Analog zur CD68+-Bestimmung wurde die relative CD31+-Fläche bestimmt. Es zeigte sich, dass EBs in Kokultur mit den bioabbaubaren Materialien, sowie dem *bad material* 50 % weniger Gefäßfläche aufweisen, als EBs, die mit PP kultiviert wurden. Es gab allerdings keine Unterschiede zwischen EBs aus Kokultur mit den bioabbaubaren Materialien und dem *bad material* (Abb. 18 unten). Somit scheint PVC-Pb die Differenzierung zu Endothel, im Vergleich zu den bioabbaubaren Materialien, insgesamt nicht zu hemmen. Weiterhin wurden die *crossing points* pro EB gezählt (Abb. 18 links). EBs, die mit PVC-Pb kokultiviert wurden, weisen ein signifikant kleineres Gefäßnetzwerk auf als EBs aus den anderen Kokulturen. Dies weist auf ein vermindertes Potential des *sproutings* hin, das von PVC-Pb ausgeht. Dies korrespondiert mit dem BMI, der als dritter Parameter untersucht wurde (Abb. 18 rechts). Er ist der Quotient aus Gefäßbreite und -länge und bringt im Vergleich zum Verzweigungsgrad (Zahl der *crossing points*) keine zusätzliche Information. Der Verzweigungsgrad (*branching index*) ist ein etablierter Parameter zur Charakterisierung von Gefäßnetzwerken (Guidolin *et al.* 2004). Der BMI ist ein Parameter auf Basis der durchschnittlichen Gefäßlänge (*average vessel length*) und des Gefäßradius. Alle diese Parameter werden von Software angewendet (Niemisto *et al.* 2005), die nach einer digitalen Optimierung ein Gefäßskelett erstellt. Auf dessen zwei- oder dreidimensionaler Grundlage berechnen diese Programme Flächen, Längen und *crossing points*. Die Bestimmung der *crossing points* und des weitesten Radius erfolgte in dieser Arbeit visuell, die Längenmessungen wurden digital durchgeführt (LSM Image Examiner®). Die Ergebnisse hängen extrem von den Faktoren Bildauflösung und visueller Wahrnehmung ab, was zu großen zufälligen Fehlern führt. Deshalb sollte auf eine volldigitalisierte Bestimmung gesetzt werden. Allerdings weisen Softwareanwendungen einen großen systemischen Fehler auf, da immer Information verloren geht. Zudem sind viele von ihnen verwendete Parameter wenig aussagekräftig (Mancardi *et al.* 2008).

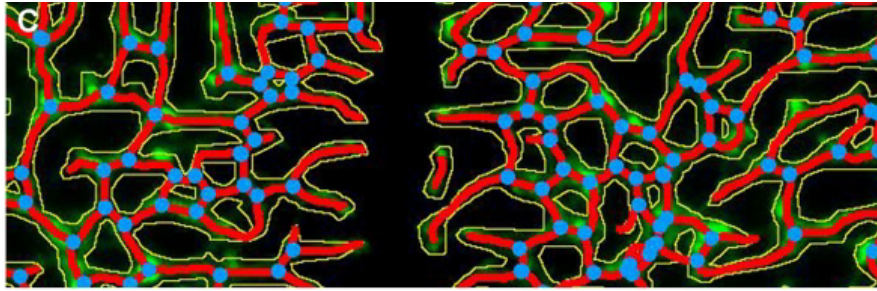


Abb. 27 Digitale Bestimmung von Gefäßparametern

Crossing points nachdem das Gefäßnetzwerk digital optimiert wurde mittels der Software AngioTool® (Zudaire *et al.*).

6.3.3 Verhältnis von bioabbaubaren Materialien zu Monozyten und Makrophagen

Die Bedeutung von Makrophagen und Monozyten hinsichtlich der Abbaubarkeit von Biomaterialien *in vivo* ist sehr komplex.

Bei der Implantation eines sterilen Fremdkörpers in den Organismus laufen folgende Reaktionen ab. Im ersten Schritt nach der Einbringung in den Organismus kommt es zur Adsorption von Proteinen. Diese entstehen aus Blutbestandteilen mit Thrombozytenaggregation, der Aktivierung des extrinsischen und intrinsischen Systems und somit der Anlagerung von Fibrinschichten. Diese dynamische Proteinmatrix, die auch durch abbauende Prozesse wie Fibrinolyse gekennzeichnet ist, bildet die Grundlage für alle folgenden Prozesse, was als Vroman-Effekt bezeichnet wird. Es handelt sich im weitesten Sinne um eine nicht heilende Wunde, die darüber hinaus noch modifizierte körpereigene Eiweiße enthält. Deshalb folgt eine klassische akute Entzündungsreaktion mit Einwanderung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PML) und vor allem einer Mastzelldegranulation mit Ausschüttung von Histamin und der Interleukine 4 und 13 (IL4, 13). Diese induzieren die Anlagerung von Phagozyten, sowie Monozyten und Makrophagen was gleichzeitig die chronische Entzündung einleitet. Die akute Entzündung dauert in der Regel eine Woche. Die chronische Entzündung ist histologisch weniger einheitlich und besonders durch einkernige Zellen charakterisiert (Monozyten, Lymphozyten). Besonders Monozyten bzw. Makrophagen sind für die Unterhaltung der Entzündung, sowie der Entstehung der Fremdkörperreaktion von Bedeutung. Ab dem Auftreten der chronischen Entzündung schreitet der Prozess in zwei Richtungen fort. Einerseits führen weitere Chemokinkaskaden zur Proliferation von Fibroblasten und Angioblasten und damit zur

Entstehung eines bindegewebigen, hochvaskularisierten Gewebes, dem Granulationsgewebe, dessen Gefäßdichte wieder abnimmt und schließlich eine fibrotische zellarme Kapsel entsteht. Andererseits kommt es zur Formation von Fremdkörper-Riesenzellen (foreign body giant cell). Für diesen sehr komplexen und noch nicht vollständig verstandenen Prozess sind die verschiedenen Formen von Integrinrezeptoren von Bedeutung. Sie spielen einerseits eine Rolle bei der Anheftung der Monozyten bzw. Makrophagen an die durch Blutproteine modifizierte Transplantatoberfläche. So induzieren sie u. a. die Expression von Proteinen für Podosomen, für Makrophagen charakteristische Strukturen, die die Adhärenz gewährleisten (Buccione *et al.* 2004). Andererseits sind sie ein Faktor in der Fusion der Makrophagen, eines äußerst komplexen Prozesses, der u. a. auch von IL4 abhängt. Weiterhin ist die Hemmung von spezifischen Mannose-Rezeptoren auf Makrophagen von Bedeutung. Die Fusion von einkernigen Makrophagen zu vielkernigen Riesenzellen hat mehrere Konsequenzen. Sie geht einher mit der Entstehung eines sauren Mikromilieus zwischen der Materialoberfläche und der Zellmembran, der privileged zone mit pH-Werten um 4 oder weniger. Zudem werden oxidative Mediatoren (ROI) und spaltende Enzyme frei. Diese oxidativen und hydrolytischen Strategien dienen einer Phagolyse. An diesem Punkt werden auch implantierte bioabbaubare Materialien enzymatisch in definierte Metabolite gespalten, die in Stoffwechselkreisläufen abgebaut werden können. Kann der Fremdkörper nicht durch diese Abwehrmechanismen eliminiert werden, bleibt eine chronische Entzündung bestehen, mit Potential zur Fibrosierung und Granulombildung (Tang and Eaton 1995).

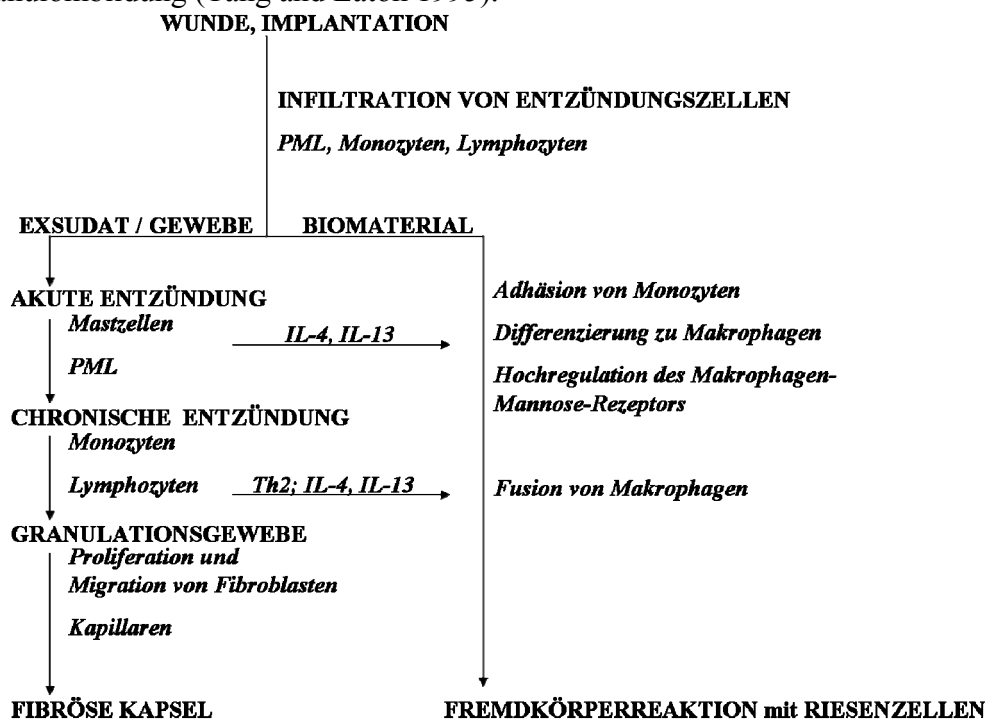


Abb. 28: Verlauf einer Fremdkörperreaktion (modifiziert nach Anderson *et al.* 2008)

Adhäsive Vorgänge an Oberflächen implantierter Biomaterialien

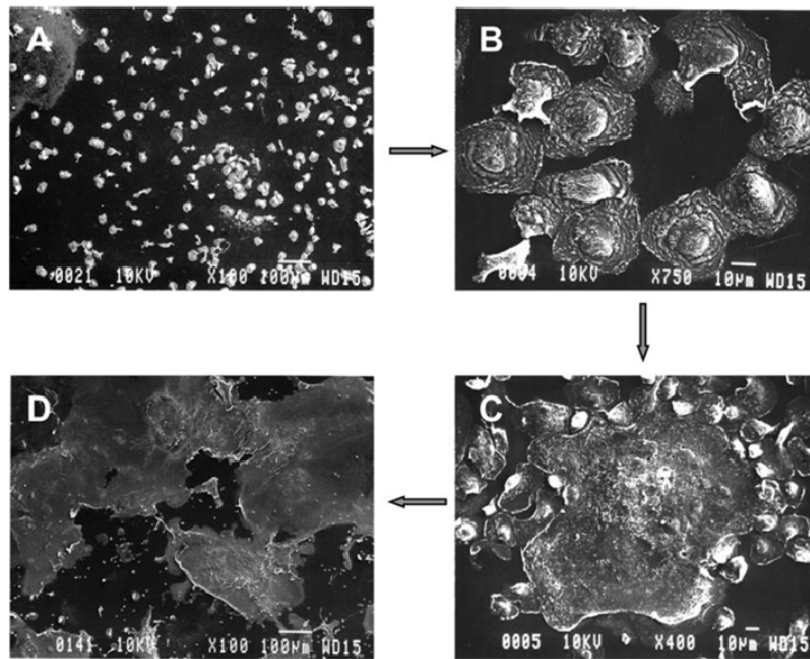


Abb. 29: Verlauf der Fremdkörperreaktion im Elektronenmikroskop

A d 0 Monozytenadhäsion, B d 3 Umwandlung der Monozyten in Makrophagen, C d 7 fortschreitende Fusion der Makrophagen, D d 14 Fremdkörper-Riesenzellen (Anderson *et al.* 2008)

Makrophagen sind somit zentraler Faktor in der Gewebsreaktion gegen implantierte bioabbaubare Materialien. Im letzten Stadium sind es Makrophagen, die sich zu Riesenzellen formieren um Partikel zu phagozytieren.

In einer *in vitro* Kokultur kann keine solche komplexe Reaktion ablaufen, vor allem da das Zeitfenster viel zu gering ist. Die Anwesenheit von Monozyten könnte jedoch Aussagen über das Verhalten von Materialien im Körper zulassen. Es zeigt sich in dieser Arbeit, dass die Differenzierung zu Monozyten und Makrophagen in Kokultur mit dem *bad material* im Vergleich zu dem Biomaterial 80/20 und PP um ca. 30 % erhöht ist (5.2.2.2).

Monozyten sind in der Lage über Chemokine die Chemotaxis zu beeinflussen, sie können somit die Stärke der Entzündung beeinflussen. Monozyten sezernieren auch Wachstumsfaktoren, die zur Bildung von Granulationsgewebe führen. Makrophagen können einerseits über Chemokine die Ausbildung bindegewebiger Strukturen zwischen Materialoberfläche und Körpergewebe hemmen. Andererseits ermöglicht ihre Enzymausstattung (Proteinasen, *plasminogen activator*, Elastasen) den direkten Abbau von Fasern, die von Fibroblasten und Myofibroblasten gebildet werden. Ob Makrophagen in der Nettobilanz die Fibrosierung oder die Degradation fördern, ist von vielen Faktoren, u.a. dem Material abhängig (Ziats *et al.* 1988). Allerdings führt PVC im Gewebe zu einer chronischen Entzündung mit Fibrosierung, da keine Biodegradation stattfindet (Marchant 1989). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine hohe Dichte von Makrophagen und Monozyten

besonders unmittelbar nach Kontakt zwischen Material und Gewebe eher zu einer chronischen Entzündung als zur Lyse führt.

6.3.4 Letalität in Kokultur mit bioabbaubaren Materialien

Mittels EthD-2 wurde eine Lebendfärbung an kokultivierten EBs durchgeführt (5.2.3). Bei diesem Experiment wurden EBs unmittelbar nach Konfrontation im hTr (d 11), sowie nach Weiterkultivierung (d 13) in der Zellkulturschale untersucht. EtD-2 ist ein etablierter Farbstoff zur Vitalitätsbestimmung. Durch seine sehr hohe Affinität gegenüber Nukleinsäuren ist die Färbung im Medium mit anschließender Mikroskopie schnell und unkompliziert möglich. Es ist zur Vitalitätsbestimmung an EBs geeignet (Karp *et al.* 2007). Es sollte auch untersucht werden, ob die extremen Bedingungen des hTr zu erhöhten Letalitätsraten führen. Es zeigte sich, dass EBs die ausschließlich im hTr kokultiviert wurden teilweise einen erhöhten Anteil avitaler Zellen zeigen. Dies trifft zu auf die Kokultur mit den Biomaterialien 80/20, 50/50 sowie besonders dem *bad material* PVC-Pb. Es kann allerdings nicht klar beurteilt werden, ob es sich um einen Effekt handelt, oder ob bei EBs, die weiter in der Zellkulturschale kokultiviert wurden, avitale Zellen herausgelöst wurden und somit die EthD-2+-Fläche geringer ist. EBs, die mit PVC-Pb kokultiviert wurden weisen, unabhängig von der Kultivierungsdauer, den signifikant größten Anteil letaler Zellen auf. EBs, die mit den Biomaterialien 80/20 und 50/50 kokultiviert wurden, zeigen signifikant mehr letale Zellen als EBs, die mit PP kokultiviert wurden. EBs, die mit CLA58 kokultiviert wurden zeigen ähnlich niedrige Letalitätsraten, wie EBs, die mit PP kokultiviert wurden. Somit weist bei diesem Letalitätstest unter den Biomaterialien CLA58 das geringste Potential zum Zelltod auf.

Es wurde gezeigt, dass bioabbaubare Materialien und Bleiionen die Differenzierung zu Endothel beeinflussen. Somit ist das Schicksal der Progenitorzellen, welche sich unter Einfluss der Kokultur nicht zu Endothelzellen differenzieren zu hinterfragen. Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten. Die Progenitorzellen könnten stattdessen im undifferenzierten Zustand verbleiben, sie könnten sich in andere Zellen differenzieren, oder sie könnten zugrunde gehen. Die Betrachtung der Letalität und der CD68+-Fläche lässt die Vermutung zu, dass sich Progenitorzellen besonders zu Monozyten differenzieren und in geringerem Maße der Zelltod eintritt. Allerdings sind beide Effekte messbar.

6.3.5 Expression der embryonalen Gene *nanog*, *oct-1* und *rex1*

Die Expression der embryonalen Gene *nanog*, *oct-1* und *rex1* wurde betrachtet um zu untersuchen, ob bioabbaubare Materialien Einfluss nehmen auf die Induktion embryonaler Transkriptionsfaktoren, die das Potential zur Differenzierung maßgeblich bestimmen. Die Ergebnisse zeigen allgemein, dass dies der Fall ist, da der Faktor Nanog in humanen und murinen ESs, ohne Stimuli, nur bis zum Tag 2 exprimiert wird (Mitsui et al. 2003).

Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Veröffentlichungen (Hoss et al.).

Die These war, dass eine Hochregulation der untersuchten Gene von Nachteil für die Biokompatibilität ist, da im Grenzbereich multipotente Zellen zu Endothel, Monozyten oder anderen Zellen differenzieren sollten, um eine gewisse, vom Gewebe tolerierte, Einheit zu bilden, die einen Stoffaustausch zulässt und schließlich Grundlage zur Abbaureaktion ist.

Die Analyse der embryonalen Gene erbrachte z.T. unerwartete Ergebnisse. Es zeigt sich, dass EBs, die mit PP kokultiviert wurden teils wesentlich höhere Expressionsniveaus haben, als EBs, die mit PVC-Pb kokultiviert wurden. Dies ist der Fall bei *oct-1* und *rex1*. Weiterhin exprimieren 80/20 – kokultivierte EBs im Verhältnis zu PP – kokultivierten EBs wesentlich mehr *nanog*, aber wesentlich weniger *oct-1*. Allerdings ist die Expression aller untersuchten Gene bei 50/50 – kokultivierten EBs übereinstimmend am höchsten (Abb. 24). Neben eventuellen Fehlern, gibt es allerdings Aspekte, die diese Beobachtungen begründen könnten. Eine Hypothese ist, dass Moleküle oder das Milieu zur Re-Expression von *nanog* führen könnten. Die könnten Bestandteile der Polymere oder Metabolite sein. Es gibt Hinweise, dass Ascorbinsäure die Expression von *nanog* an ESs induziert (Wu et al.). Ebenfalls kommt es nach Injektion von Milchsäurebakterien zur Expression von *nanog* in adulten Fibroblasten (Ohta et al.). Dies würde die schwächere Induktion bei PVC-Pb und PP erklären, da es keine derartigen Stimuli gibt. Der spezifische Einfluss von Laktat müsste hier in weiterführenden Arbeiten untersucht werden.

Weiterhin interagieren die Transkriptionsfaktoren sehr stark miteinander, was besonders zwischen Nanog und Rex1 ausgeprägt ist (Shi et al. 2006). Dies könnte die teils sehr großen und teils sehr kleinen Standardabweichungen erklären.

Insgesamt muss jedoch eine Expression dieser 3 embryonalen Gene als kritisch betrachtet werden, da eine Hyperexpression bei adulten Stammzellen unter Wiederherstellung der Multipotenz zur Entwicklung von Tumorzellen führen kann (Wang et al.). Das sehr ambivalente Oct-1 kann die Differenzierung sowohl induzieren, als auch inhibieren. *oct-1*

wird außerdem verstärkt exprimiert unter Zellstress und kann ebenfalls die Entstehung von Tumorzellen, über die Erhaltung der Multipotenz, begünstigen (Zhao).

Die Expression der embryonalen Gene bedarf unbedingt noch weiterer Untersuchung. Als Parameter zur Biokompatibilitätsanalyse könnte sie in Frage kommen, da im Gegensatz zu den anderen untersuchten Parametern sie signifikante Unterschiede auch zwischen den bioabbaubaren Materialien zeigte.

In anschließenden Arbeiten der Forschergruppe wird dieses Thema weiter verknüpft werden. Folgende Gene kommen zur Untersuchung in Betracht: u.a. *sox2*, *oct3/4*, *lin28*

7 Schlussfolgerung

Bevor Kompatibilitätsanalysen an bioabbaubaren Materialien durchgeführt wurden, wurden das Modell des hTr und das Verhalten von EBs gegenüber gelösten Stoffen betrachtet. Es zeigte sich, dass die Stammzellen gegenüber Laktat mit einer erhöhten Differenzierung zu Endothel reagieren. Eine Monozyten/Makrophagen – Zunahme war sowohl unter Einfluss von Blei- als auch Laktationen zu finden. Dies bestätigt, dass sich EBs unter Einfluss von gelösten Stoffen sehr gerichtet differenzieren können.

Die Verwendung von EBs diesen Alters stellt einen Kompromiss dar, da sie sowohl eine ausreichende Größe besitzen um einzeln und zählbar in den Tropfen überführt werden zu können, als auch noch Potenz zur Adhäsion und weitem Differenzierung besitzen. Diese Versuche bestätigen, dass der hTr als bewährtes Modell zur Generierung von EBs, sich ebenfalls für Konfrontationskulturen eignet und die Zellen, in der absoluten Mehrzahl der Fälle, die zweitägige Phase ohne Nährmediumwechsel und unter Anreicherung von Stoffwechselprodukten überstehen.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem Verhalten von EBs gegenüber drei bioabbaubaren Materialien im Vergleich zu den beiden nicht-abbaubaren Referenzmaterialien PP und PVC-Pb unter Betrachtung verschiedener Parameter.

Die Anwachsraten in drei Kategorien unter Betrachtung im Lichtmikroskop wiesen sehr hohe Standardfehler auf. Allerdings entsprach besonders die Kategorie III der Tendenz der nachfolgenden Experimente. Dieser Parameter ist besonders anfällig gegenüber manueller Pipettierung der Kokulturen. Dieser Versuch sollte deshalb in Verbindung mit einer automatisierten Positionierung von Materialscheibe und EBs wiederholt werden.

Die Untersuchung der Adhärenz von EBs auf Biomaterialien im Vergleich zu PP ist relativ aussagekräftig. Allerdings ist es wesentlich, dass die Höfe der EBs sich nicht überlappen.

Analog zu den Vorversuchen mit Blei- und Laktatlösungen wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen Endothel (CD31) und Monozyten/Makrophagen (CD68) an EBs aus Konfrontationskulturen mit Biomaterialien durchgeführt. Die Versuche lassen erkennen, dass die Biomaterialien Einfluss auf die Vaskulogenese haben. Bei Betrachtung der gesamten CD31+-Fläche zeigen EBs aus Kokultur mit PVC-Pb keine Unterschiede zu EBs aus Kokultur mit den Biomaterialien, im Gegensatz zum BMI und dem Verzweigungsgrad. Somit sollte die Untersuchung der Endotheldifferenzierung mittels Immunfluoreszenz aus der relativen CD31+-Fläche und Verzweigungsgrad oder BMI kombiniert werden. Für diese Anwendungen existiert diverse Software.

Es konnte ebenfalls eine Reaktion von EBs aus Kokulturen mit Biomaterialien bezüglich der CD68+-Fläche festgestellt werden. Es ist allerdings nicht klar, ob sich eine hohe Konzentration von Makrophagen auf *scaffolds* in den ersten Tagen nach Implantation positiv oder negativ auf die Einheilung auswirken. Für den erwünschten Abbau des Biomaterials im Gewebe ist die, durch Makrophagen unterhaltene, Fremdkörperreaktion wesentlich.

Der Parameter Letalität (EthD-2-Messung) ist zur Biokompatibilitätsbestimmung geeignet. Die Untersuchung von EBs direkt aus dem hTr (d11) ist ausreichend.

Die Expression der embryonalen Gene *nanog*, *oct-1* und *rex1* muss ambivalent betrachtet werden und erfordert noch ausgiebige Untersuchungen. Allerdings kann die Expression sensitiv sein gegenüber Abbauprodukten einiger Polymere sein. Es sollten hier unbedingt noch weitere embryonale Gene untersucht werden.

Abschließend können sowohl die Methode des hTr, als auch die untersuchten Parameter Anwendung in einem Test zur Biokompatibilitätsanalyse bioabbaubarer Materialien finden. Auf der Suche nach neuen Polymeren ist eine Kombination von verschiedenen Parametern nötig, um eine um umfassende Aussage treffen zu können. Die hier aufgezeigten Parameter sind in jedem Fall in der Lage, biokompatible Materialien von sehr wenig biokompatiblen Materialien zu unterscheiden. In dieser Arbeit ist CLA58 somit am wenigsten biokompatibel. Es zeigten sich jedoch relativ wenige signifikante Unterschiede zwischen den bioabbaubaren Materialien untereinander. Die Ursache könnte darin zu suchen sein, dass sich bei den verwendeten Materialien nur das Mischungsverhältnis ändert, wobei sich die Grundkomponenten als biokompatibel erwiesen haben. Die Untersuchung von embryonalen Genen kann durchaus etwaige Unterschiede detektieren, ist allerdings am wenigsten ausgereift und muss besonders mit allen Parametern zusammen betrachtet werden.

Es ist sicher, dass weitere Untersuchungen folgen müssen, jedoch besteht die Möglichkeit Experimente an Tieren einzusparen.

8 Literaturverzeichnis

- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008) Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20(2): 86-100.
- Ayares D (2012) Multi-transgenic pigs for xenotransplantation. *Reproduction, fertility, and development* 25(1): 320.
- Balls M The conflict over animal experimentation: is the field of battle changing? *Altern Lab Anim* 40(4): 189-191.
- Blazka ME, Harry GJ, Luster MI (1994) Effect of lead acetate on nitrite production by murine brain endothelial cell cultures. *Toxicology and applied pharmacology* 126(1): 191-194.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309(5965): 255-256.
- Bratt-Leal AM, Carpenedo RL, McDevitt TC (2009) Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnology progress* 25(1): 43-51.
- Buesen R, Genschow E, Slawik B, Visan A, Spielmann H et al. (2009) Embryonic stem cell test remastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. *Toxicol Sci* 108(2): 389-400.
- Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Jr., Bondoc CC, Jung WK (1981) Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Annals of surgery* 194(4): 413-428.
- Chai C, Leong KW (2007) Biomaterials approach to expand and direct differentiation of stem cells. *Mol Ther* 15(3): 467-480.
- Chardack WM, Brueske DA, Santomauro AP, Fazekas G (1962) Experimental studies on synthetic substitutes for skin and their use in the treatment of burns. *Annals of surgery* 155: 127-139.
- Chen Y, Li X, Eswarakumar VP, Seger R, Lonai P (2000) Fibroblast growth factor (FGF) signaling through PI 3-kinase and Akt/PKB is required for embryoid body differentiation. *Oncogene* 19(33): 3750-3756.
- Cline MJ, Moore MA (1972) Embryonic origin of the mouse macrophage. *Blood* 39(6): 842-849.
- Colin G. Pitt RWH, Anton Schindler, Stephen C. Woodward (1984) The enzymatic surface erosion of aliphatic polyesters. Volume 1(Issue 1): Pages 3–14.

- Coucouvani E, Martin GR (1995) Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 83(2): 279-287.
- Czyz J, Wobus A (2001) Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. *Differentiation; research in biological diversity* 68(4-5): 167-174.
- Dang SM, Kyba M, Perlingeiro R, Daley GQ, Zandstra PW (2002) Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnology and bioengineering* 78(4): 442-453.
- Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW (2004) Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22(3): 275-282.
- DeWall RA, Qasim N, Carr L (2000) Evolution of mechanical heart valves. *Ann Thorac Surg* 69(5): 1612-1621.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology* 87: 27-45.
- Eistetter HR (1988) A mouse pluripotent embryonal stem cell line stage-specifically regulates expression of homeo-box containing DNA sequences during differentiation in vitro. *European journal of cell biology* 45(2): 315-321.
- EUROTRANSPLANT (2011) Yearly Statistic 2011. EUTROTRANSPLANT.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819): 154-156.
- F. R. Rozema JEB, R. R. M. Bos, G. Boering, A. J. Nijenhuis, A. J. Pennings, W. C. de Bruijn (1994) Late degradation simulation of poly(I-Lactide). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(Issue 9-10): 575-581.
- Fok EY, Zandstra PW (2005) Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23(9): 1333-1342.
- Fu DM, Wang HQ, Zhang XL [Historical review of heart transplantation]. *Zhonghua Yi Shi Za Zhi* 42(2): 89-99.
- Gajovic S, St-Onge L, Yokota Y, Gruss P (1997) Retinoic acid mediates Pax6 expression during in vitro differentiation of embryonic stem cells. *Differentiation; research in biological diversity* 62(4): 187-192.
- Gardner RL, Brook FA (1997) Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *The International journal of developmental biology* 41(2): 235-243.
-

- Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Pohl I, Seiler A et al. (2004) Validation of the embryonic stem cell test in the international ECVAM validation study on three in vitro embryotoxicity tests. *Altern Lab Anim* 32(3): 209-244.
- Gluck T (2011) Report on the positive results obtained by the modern surgical experiment regarding the suture and replacement of defects of superior tissue, as well as the utilization of re-absorbable and living tamponade in surgery. 1891. *Clin Orthop Relat Res* 469(6): 1528-1535.
- Goh SK, Olsen P, Banerjee I Extracellular matrix aggregates from differentiating embryoid bodies as a scaffold to support ESC proliferation and differentiation. *PloS one* 8(4): e61856.
- Green H, Kehinde O, Thomas J (1979) Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76(11): 5665-5668.
- Guan K, Rohwedel J, Wobus AM (1999) Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. *Cytotechnology* 30(1-3): 211-226.
- Guasch G, Fuchs E (2005) Mice in the world of stem cell biology. *Nature genetics* 37(11): 1201-1206.
- Guidolin D, Nico B, Mazzocchi G, Vacca A, Nussdorfer GG et al. (2004) Order and disorder in the vascular network. *Leukemia* 18(11): 1745-1750.
- Gumbiner BM (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84(3): 345-357.
- Hannig M, Figulla HR, Sauer H, Wartenberg M Control of leucocyte differentiation from embryonic stem cells upon vasculogenesis and confrontation with tumour tissue. *Journal of cellular and molecular medicine* 14(1-2): 303-312.
- Hoss M, Saric T, Denecke B, Peinkofer G, Bovi M et al. Expansion and differentiation of germline-derived pluripotent stem cells on biomaterials. *Tissue Eng Part A* 19(9-10): 1067-1080.
- Huang F, Schneider JS (2004) Effects of lead exposure on proliferation and differentiation of neural stem cells derived from different regions of embryonic rat brain. *Neurotoxicology* 25(6): 1001-1012.
- Kaji T, Suzuki M, Yamamoto C, Mishima A, Sakamoto M et al. (1995) Severe damage of cultured vascular endothelial cell monolayer after simultaneous exposure to cadmium and lead. *Archives of environmental contamination and toxicology* 28(2): 168-172.

- Karp JM, Yeh J, Eng G, Fukuda J, Blumling J et al. (2007) Controlling size, shape and homogeneity of embryoid bodies using poly(ethylene glycol) microwells. *Lab on a chip* 7(6): 786-794.
- Kato Y, Shibata T, Takanashi S, Fukui T, Ito A et al. (2011) Results of long segmental reconstruction of left anterior descending artery using left internal thoracic artery. *Ann Thorac Surg* 93(4): 1195-1200.
- Koide N, Sakaguchi K, Koide Y, Asano K, Kawaguchi M et al. (1990) Formation of multicellular spheroids composed of adult rat hepatocytes in dishes with positively charged surfaces and under other nonadherent environments. *Experimental cell research* 186(2): 227-235.
- Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK et al. (2000) Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mechanisms of development* 92(2): 193-205.
- Kurosawa H (2007) Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *Journal of bioscience and bioengineering* 103(5): 389-398.
- Larue L, Antos C, Butz S, Huber O, Delmas V et al. (1996) A role for cadherins in tissue formation. *Development (Cambridge, England)* 122(10): 3185-3194.
- Li X, Chen Y, Scheele S, Arman E, Haffner-Krausz R et al. (2001) Fibroblast growth factor signaling and basement membrane assembly are connected during epithelial morphogenesis of the embryoid body. *The Journal of cell biology* 153(4): 811-822.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM (1993) Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mechanisms of development* 44(1): 41-50.
- Mancardi D, Varetto G, Bucci E, Maniero F, Guiot C (2008) Fractal parameters and vascular networks: facts & artifacts. *Theoretical biology & medical modelling* 5: 12.
- Marchant RE (1989) The cage implant system for determining in vivo biocompatibility of medical device materials. *Fundam Appl Toxicol* 13(2): 217-227.
- Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12): 7634-7638.
- Marx-Stoelting P, Adriaens E, Ahr HJ, Bremer S, Garthoff B et al. (2009) A review of the implementation of the embryonic stem cell test (EST). *The report and*

- recommendations of an ECVAM/ReProTect Workshop. *Altern Lab Anim* 37(3): 313-328.
- Maurer J, Nelson B, Cecena G, Bajpai R, Mercola M et al. (2008) Contrasting expression of keratins in mouse and human embryonic stem cells. *PloS one* 3(10): e3451.
- Meyer C (2011) Einfluss verschiedener Polymermaterialien auf die Angiogenese und Leukozytendifferenzierung in murinen embryoid bodies.
- Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina EM, Moore JS, Hunt TK et al. (2008) Lactate stimulates vasculogenic stem cells via the thioredoxin system and engages an autocrine activation loop involving hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* 28(20): 6248-6261.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M et al. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5): 631-642.
- Naito Y, Imai Y, Shin'oka T, Kashiwagi J, Aoki M et al. (2003) Successful clinical application of tissue-engineered graft for extracardiac Fontan operation. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 125(2): 419-420.
- Neuss S, Apel C, Buttler P, Denecke B, Dhanasingh A et al. (2008) Assessment of stem cell/biomaterial combinations for stem cell-based tissue engineering. *Biomaterials* 29(3): 302-313.
- Niemisto A, Dunmire V, Yli-Harja O, Zhang W, Shmulevich I (2005) Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis. *IEEE transactions on medical imaging* 24(4): 549-553.
- Ohnuki Y, Kurosawa H Effects of hanging drop culture conditions on embryoid body formation and neuronal cell differentiation using mouse embryonic stem cells: Optimization of culture conditions for the formation of well-controlled embryoid bodies. *Journal of bioscience and bioengineering*.
- Ohta K, Kawano R, Ito N Lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotent cells. *PloS one* 7(12): e51866.
- Pitt CG, Gratzl MM, Kimmel GL, Surles J, Schindler A (1981) Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly (epsilon-caprolactone), and their copolymers in vivo. *Biomaterials* 2(4): 215-220.
- Rusche B (2003) The 3Rs and animal welfare - conflict or the way forward? *Altex* 20(Suppl 1): 63-76.

- Ryan AK, Rosenfeld MG (1997) POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes & development* 11(10): 1207-1225.
- Segerberg EC, Grubb WG, Henderson AE (1992) The first successful parathyroid transplant from an identical twin for the cure of permanent postoperative hypoparathyroidism. *Surgery* 111(3): 357-358.
- Seiler AE, Buesen R, Visan A, Spielmann H (2006) Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 329): 371-395.
- Shakya A, Cooksey R, Cox JE, Wang V, McClain DA et al. (2009) Oct1 loss of function induces a coordinate metabolic shift that opposes tumorigenicity. *Nature cell biology* 11(3): 320-327.
- Shi W, Wang H, Pan G, Geng Y, Guo Y et al. (2006) Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *The Journal of biological chemistry* 281(33): 23319-23325.
- Shin'oka T, Matsumura G, Hibino N, Naito Y, Watanabe M et al. (2005) Midterm clinical result of tissue-engineered vascular autografts seeded with autologous bone marrow cells. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 129(6): 1330-1338.
- Shinji T, Koide N, Tsuji T (1988) Glycosaminoglycans partially substitute for proteoglycans in spheroid formation of adult rat hepatocytes in primary culture. *Cell structure and function* 13(2): 179-188.
- Sieminski AL, Gooch KJ (2000) Biomaterial-microvasculature interactions. *Biomaterials* 21(22): 2232-2241.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J et al. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336(6200): 688-690.
- Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C et al. (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *The Journal of cell biology* 144(1): 151-160.
- Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem cells* (Dayton, Ohio).
- Suming Li HG, M. Vert (1990) Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxyacids) in aqueous media Part 3. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*: 198-206.

- Sung HJ, Meredith C, Johnson C, Galis ZS (2004) The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials* 25(26): 5735-5742.
- Suslov ON, Kukekov VG, Ignatova TN, Steindler DA (2002) Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(22): 14506-14511.
- Takahashi T, Lord B, Schulze PC, Fryer RM, Sarang SS et al. (2003) Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation* 107(14): 1912-1916.
- Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A et al. (1988) Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *Journal of pediatric surgery* 23(1 Pt 2): 3-9.
- Wang ML, Chiou SH, Wu CW Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *OncoTargets and therapy* 6: 1207-1220.
- Wartenberg M, Gunther J, Hescheler J, Sauer H (1998) The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 78(10): 1301-1314.
- Webster JP (1944) Refrigerated Skin Grafts. *Annals of surgery* 120(4): 431-448.
- Wiles MV, Keller G (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development (Cambridge, England)* 111(2): 259-267.
- Willerth SM, Fixel TE, Gottlieb DI, Sakiyama-Elbert SE (2007) The effects of soluble growth factors on embryonic stem cell differentiation inside of fibrin scaffolds. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25(9): 2235-2244.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J (1984) Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Experimental cell research* 152(1): 212-219.
- Wu H, Wu Y, Ai Z, Yang L, Gao Y et al. Vitamin C enhances nanog expression via activation of the JAK/STAT signaling pathway. *Stem cells (Dayton, Ohio)*.
- Zhao FQ Octamer-binding transcription factors: genomics and functions. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 18: 1051-1071.
- Ziats NP, Miller KM, Anderson JM (1988) In vitro and in vivo interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials* 9(1): 5-13.
- Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, Vermeren S A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PloS one* 6(11): e27385.

9 Anhang

9.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum Unterschrift des Verfassers

9.2 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Frau Prof. M. Wartenberg, Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena, für die Überlassung des Themas und die stete Unterstützung während der gesamten Arbeit.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten der AG Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Jena für ihre Mitarbeit bei den planerischen und technischen Durchführungen der Versuche, sowie der moralischen Unterstützung, besonders Frau Dipl.-Biol. Constance Danzer, Frau Voigt und Safoura Mazrouei (Bachelor of Science), die in jeder Situation immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden, sowie meinen Eltern, die neben einem großen Maß an Verständnis mir stets die Motivation gaben, die vorliegende wissenschaftliche Arbeit erfolgreich zu beenden und mich in allen Belangen unterstützten.

9.3 Lebenslauf

Geburtsdatum: 18.12.1986 Sangerhausen

Eltern: Mutter Beate Reinhardt, geb. Dienemann
Vater Joachim Reinhardt

Werdegang

1993 – 1997	Grundschule Reinsdorf (b. Artern)
1997 – 2005	Kyffhäusergymnasium Bad Frankenhausen
Juni 2005	Erlangung der Hochschulreife
2005 – 2006	Zivildienst im Alten- und Pflegeheim des DRK in Artern
2006 - 2012	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Dezember 2012	Bestehen des Staatsexamens und Approbation zum Zahnarzt
seit Oktober 2013	Tätigkeit als Assistenz Zahnarzt