

Fachhochschule Jena
Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie



**Charakterisierung eines automatisierten Bioreaktorsystems zur
osteogenen Differenzierung muriner embryonaler Stammzellen**

Diplomarbeit
zur Erlangung des akademischen
Grades Diplom Ingenieur (FH)

angefertigt am
Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie

vorgelegt dem
Fachbereich für Medizintechnik und Biotechnologie

von
Alexander Seeliger
geboren am 12. November 1985 in Greiz

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Michael Meyer
Dr. rer. nat. Nicole zur Nieden

Leipzig, 14. Oktober 2008

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Stammzelltest als Alternative zu Tierversuchen	5
1.2 Eigenschaften von Stammzellen	6
1.3 Vergleich adulte und embryonale Stammzellen	7
1.4 Aufbau des DASGIP-Reaktorsystems	8
1.5 Einsatz von Bioreaktoren für die Stammzelltechnik	9
1.6 Die Bedeutung des Rührens für den Bioprozess	10
1.7 Ablauf der Osteogenese	11
1.8 Zielstellung der Arbeit	12
2 Material	14
2.1 Zelllinie	14
2.2 Geräteverzeichnis	14
2.3 Chemikalien & Kits	14
2.4 Kulturmedien & Lösungen	16
2.5 Primer	17
3 Methoden	18
3.1 Zellkultur	18
3.1.1 Passagieren von embryonalen Stammzellen	18
3.1.2 Bestimmung der Zellzahl	18
3.1.3 Auftauen von Zellen	18
3.1.4 Einfrieren von Zellen	19
3.1.5 Bestimmung der Wachstumsparameter μ und t_d in statischer Differenzierung	19
3.1.6 Differenzierung der ES D3-Zellen zu Osteoblasten in hängenden Tropfen	20
3.1.7 Differenzierung von ES D3-Zellen im Suspensionsbioreaktor	21
3.1.7.1 Beschichten der Reaktoren	21
3.1.7.2 Zusammenbau und Befüllen der Reaktoren mit Medium	22
3.1.7.3 Kalibrierung von Temperatur-, pH- und pO_2 -Sonde	22
3.1.7.4 Inokulation und Differenzierung im Suspensionsbioreaktor	23
3.1.7.5 Beenden eines Reaktorlaufs, Probenahme	23
3.1.7.6 Reinigen und Autoklavieren der Reaktoren	24
3.2 Analytik und Technische Analysen	24
3.2.1 Ca^{2+} -Bestimmung	24
3.2.2 Glukose und Laktatmessung	25

3.2.3 Strömungsanalyse mithilfe von Aluminiumflitter	25
3.2.4 Verweilzeitverhalten	25
3.3 Isolation, Quantifizierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren.....	26
3.3.1 RNA-Isolation.....	26
3.3.2 Quantifizierung der RNA	26
3.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	27
3.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	27
3.4 Histochemische Methoden	28
3.4.1 Fixieren von Zellen mit Formaldehyd.....	28
3.4.2 Alizarinrot S Färbung von Osteoblasten.....	28
4 Ergebnisse	29
4.1 Abhängigkeit des Zellwachstums von dem pH-Wert.....	29
4.1.1 Ermittlung der Wachstumsparameter μ und t_d	29
4.1.2 Entwicklung der Überlebensrate und des pH-Wertes.....	30
4.1.3 Glukose- und Laktatbestimmung.....	31
4.2 Suspendierungseigenschaften von Propellerrührer und Blattrührer.....	32
4.3 Verweilzeitverfahren von CaCl_2 im Bioreaktor zur Totzonenanalyse.....	34
4.3.1 Kalibrierkurve.....	34
4.3.2 Tracer-Massenbilanz.....	35
4.4 Einfluss von Propellerrührer und Blattrührer auf die Zelldifferenzierung.....	39
4.5 Einfluss der Drehzahl auf die EB-Formierung.....	40
4.5.1 Abhängigkeit der EB-Größe von der Drehzahl.....	41
4.5.2 Drehzahlabhängige Genexpression	42
4.6 Osteoblastendifferenzierung bis Tag 28	43
4.6.1 Entwicklung der Zellen.....	43
4.6.2 Kalzifizierung der Matrix.....	45
4.6.3 Alizarinrot S Färbung der Kalziummatrix.....	47
5 Diskussion	48
5.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Wachstumsparameter μ und t_d	48
5.2 Der Verlauf des Zellwachstums in Phasen.....	49
5.3 Vergleich zwischen Propeller und Blattrührer	50
5.4 Totzonenbestimmung für die Reaktoren.....	51
5.5 Einfluss von Propeller und Blattrührer auf die Zelldifferenzierung.....	52
5.6 Drehzahlabhängige Entwicklung der Embryoid Bodys	53
5.7 Differenzierung embryonaler Stammzellen bis Tag 28	53

5.8 Einfluss von Rührertyp und Drehzahl auf die Genexpression	54
6 Zusammenfassung und Ausblick.....	56
7 Literaturverzeichnis.....	58
8 Anhang	62
Abkürzungsverzeichnis	62
Abbildungsverzeichnis	64
DASGIP Minispinner	65

1 Einleitung

1.1 Stammzelltest als Alternative zu Tierversuchen

Tierversuche werden laut OECD-(*Organisation for Economic Cooperation and Development*) Richtlinien bei präklinischen Prüfungen neuer Wirkstoffpräparate gefordert, um diese auf ihre unerwünschten Nebenwirkungen zu untersuchen. Dabei wird besonders die Toxizität und Teratogenität (Embryotoxizität) dieser Wirkstoffkandidaten untersucht. Der 2007 veröffentlichte EU-Bericht zum Thema Tierversuche besagt, dass im Jahr 2005 europaweit insgesamt 12.117.583 Tiere in Tierversuchen starben [1]. Davon stellen Nager

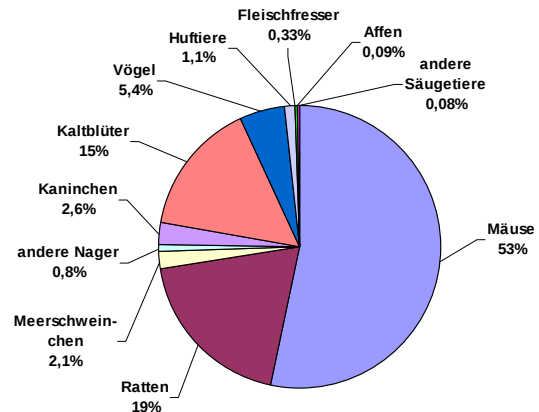


Abb. 1.1 Anteil der Tierarten die 2005 für Tierversuche in der EU genutzt wurden.

und Kaninchen mit 77,5% den größten Anteil (Abb. 1.1). Durch Entwicklung von in vitro Toxizitätstests ist es möglich, die Anzahl von Tierversuchen stark zu verringern. Zwar existieren bereits erste in vitro Embryotoxizitätstests, wie der klassische Embryonale-Stammzell-Test (EST) [2], der *Micromass* (MM)-Test und der *Whole Embryo Culture* (WEC)-Test, doch sind diese sehr teuer oder die Resultate teilweise nicht prädiktiv. Für den MM-Test werden Zellen aus der Extremitätenknospe 14 Tage alter Rattenembryonen isoliert und in vitro kultiviert. Zum Entwicklungsendpunkt wird die Differenzierung zu Chondrozyten mittels Alcian-Blau-Färbung gemessen. Der WEC-Test benötigt einen gesamten Rattenembryo. Dieser wird am Tag 10 der Embryonalentwicklung präpariert und in vitro kultiviert. Verschiedene morphologische, funktionelle und entwicklungsspezifische Parameter werden nach einem Punktesystem bewertet und die resultierende Punktzahl nach der Behandlung mit der Kontrolle verglichen. Beim EST werden nach der Behandlung mit Testsubstanzen die Anzahl kontrahierender Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen) zum Endpunkt der Differenzierung bestimmt. Nur der EST ist ein echter in vitro Test, da er Zelllinien nutzt, während bei MM- und WEC-Tests auf trächtige Tiere zurückgegriffen wird. Laut der neuen EU-Rechtsprechung sind WEC und MM keine Tierversuche, sondern lediglich tierverbrauchende Experimente, sie kommen damit in der offiziellen EU-Statistik nicht vor. Obwohl der EST bereits in der Industrie Anwendung findet, ist er wie die beiden anderen genannten Tests subjektiv und nicht objektiv quantifizierbar, sehr arbeitsintensiv und verursacht somit einen hohen personellen Aufwand. Ein idealer in vitro Test

müsste sowohl kostengünstig, als auch zeitsparend sein und würde eine quantitative Analyse ermöglichen. Vorteilhaft wäre der Einsatz von Affenzellen statt Nagerzellen da das eine hohe Prädikktivität zum Menschen zulässt.

1.2 Eigenschaften von Stammzellen

Die Definition der Stammzellen erfolgt über ihre Fähigkeit a) sich selbst zu erneuern, um neue Stammzellen hervorzubringen und b) in verschiedene spezialisierte Zelltypen zu differenzieren. Dabei können Stammzellen nach ihrem Differenzierungspotenzial in totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen unterschieden werden. Als totipotent bezeichnet man Stammzellen, welche die Fähigkeit besitzen, alle Zelltypen eines Organismus bilden zu können bzw. sich zu einem kompletten, lebensfähigen Organismus zu entwickeln. Die Zellen der Zygote sind bis zum Achtzellstadium totipotent. Pluripotente Stammzellen, zu denen die embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) zählen, werden wie in Abbildung 1.2 dargestellt, aus der Blastozyste generiert. Dazu zählen Zellen des Ektoderms, des Endoderms, des Mesoderms sowie Keimbahnzellen. Sie sind aber nicht in der Lage Nabelschnur und Plazenta zu bilden und können somit keinen komplett neuen Organismus generieren. Multipotente Stammzellen sind bereits vorgeprägt, sie haben im Gegensatz zu

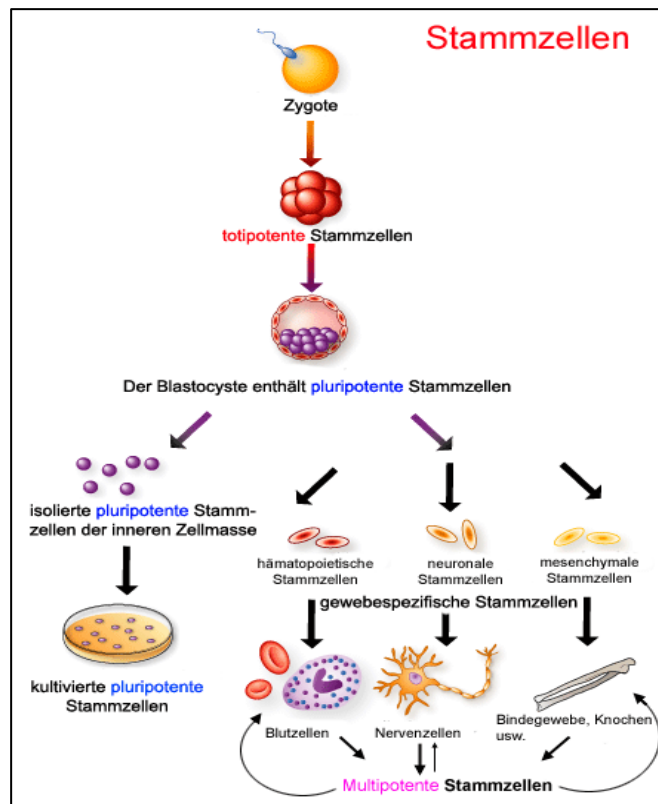


Abb. 1.2 Überblick über die Einteilung der Stammzellen. [3]

den pluripotenten Stammzellen ein restriktives Entwicklungspotential. Zu den multipotenten Stammzellen zählen die organbildenden adulten Stammzellen. Dazu gehören Gewebestammzellen wie die hämatopoetischen Stammzellen. Anfänglich wurde angenommen, dass multipotente Stammzellen nur Zellen einer Keimbahnlinie bilden können. Neuen Erkenntnissen zufolge ist eine Transdifferenzierung adulter Stammzellen möglich, wobei sie entgegen ihrer Prägung differenziert werden [4]. Es konnten beispielsweise Blutzellen zu Muskelzellen [5] und zu Leberzellen [6] entwickelt werden. Noch weiter vorgeprägte Stammzellen

bezeichnet man als unipotent. Diese sind im Allgemeinen nur noch in der Lage, einen Zelltyp auszubilden. Nach der Mitose differenzieren beide Tochterzellen der unipotenten Stammzelle aus. Im Vergleich dazu teilen sich multipotente Stammzellen asymmetrisch [7], wobei eine Tochterzelle differenziert und die andere den Stammzellpool erneuert. Wenn pluripotente Stammzellen sich teilen, entstehen zwei pluripotente Tochterzellen (symmetrische Teilung). Es besteht aber auch die Möglichkeit somatische Zellen durch Rückprogrammierung in Stammzellen umzuwandeln [8]. Dazu werden die Pluripotenzgene Oct4, Sox2, Klf4 und c-myc durch virale Transduktion in die Zellen eingeschleust.

1.3 Vergleich adulte und embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste gewonnen. Dies gelang 1986 zum ersten Mal bei Mausblastozysten [9]. Einmal isoliert, können sie wegen ihres unbegrenzten Selbsterneuerungsvermögens über Monate in Kultur gehalten werden. Die Genexpression von Oct-4, nanog oder Sox-2 sind charakteristisch für den pluripotenten Zustand der Zellen. Um ES-Zellen in vitro in ihrem pluripotenten Stadium zu halten, fügt man für murine ES-Zellen LIF (*leukemia inhibitory factor*) [10] und für humane Zellen Activin A [11] sowie bFGF (*basic fibroblast growth factor*) [12] dem Medium hinzu. Ohne diese Mediumzusätze beginnen die Zellen zu differenzieren.

Im Gegensatz dazu haben die adulten Stammzellen, auch somatische Stammzellen genannt, ein eingeschränktes Proliferationsvermögen. Eine Ursache dafür ist die fehlende Telomeraseaktivität. Sie konnte bis jetzt nur für embryonale Stammzellen nachgewiesen werden. Somit teilen sich adulte Stammzellen lediglich 25- bis 40-mal außerhalb des Körpers. Telomerase regeneriert nach jeder Zellteilung die Chromosomenenden. Fehlt dieses Enzym, verkürzen sich die Chromosomenenden solange, bis eine Replikation nicht mehr möglich ist. Adulte Stammzellen können aus den meisten Geweben wie Knochenmark, Nabelschnur, Haut und Blut des erwachsenen Körpers isoliert werden. Allerdings besitzen sie aufgrund ihrer Multipotenz ein eingeschränkteres Differenzierungspotenzial als die embryonalen Stammzellen. Dafür können sie einfach autolog (Spender entspricht Empfänger) transplantiert werden. Mesenchymale Stammzellen sind die adulten Stammzellen, welche Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten generieren können. Wobei die Osteoblasten und Adipozyten sich später von dieser Linie abtrennen als die Chondrozyten.

1.4 Aufbau des DASGIP-Reaktorsystems

Das von der DASGIP AG produzierte Reaktorsystem setzt sich modular zusammen, damit ist es sehr flexibel und kann leicht erweitert werden. Das hier beschriebene System besteht aus einer Gasmischstation, je zwei Begasungsmodulen, zwei kombinierten Drehzahl- und Temperaturmodulen, einem Sensormodule für pH und pO_2 -Wert sowie zwei Pumpstationen mit insgesamt 16 Peristaltikpumpen. Jedem Modul sind vier Reaktoren zugeordnet. Damit ist es möglich acht Reaktoren parallel zu betreiben. Für die Versuche wurden acht Reaktoren des Typs „Minispinner“ (Abb. 1.3) mit einem maximalen Reaktorvolumen von 60 ml verwendet. Vor den Versuchen wurden die Reaktoren und die jeweiligen Anbauteile und Sonden nummeriert.



Abb. 1.3 Der vollständig zusammengebaute DASGIP Minispinner.

Die Reaktoren bestehen aus einem handgefertigten Glaskörper mit Zugängen für einen Probenahmeanschluss sowie pH-, pO_2 -, und Temperatursonde. Die Anschlüsse für Zu- und Abluft befinden sich im Deckel. Die Luft wird über 0,2 μm Porenfilter gereinigt. Des Weiteren wird an dem Deckel über ein Zwischenstück (Zedex) die Rührerwelle befestigt. Das Zedex-Zwischenstück besteht aus einem Teflon-Keramik-Komposit und soll die Haftreibung der Rührerwelle reduzieren. An der Rührerwelle ist der Rührer befestigt. Für den Propeller und den Blattrührer werden zwei verschiedene Rührerwellen verwendet (Skizze des Reaktors im Anhang).

Der Propellerrührer wird samt Rühranker von unten an die Welle geschraubt, der Blattrührer hingegen wird lediglich in die Welle gesteckt und mit einem Rühranker fixiert. Der Blattrührer wurde im Verlauf der Arbeit handgefertigt. Die Rührer werden mithilfe der Rühranker über eine induzierende Magnetplatte angetrieben. Sie befindet sich unter dem Reaktor. Zwischen dem Reaktor und der Magnetührplatte liegt eine Heizmatte, über die das Erwärmen des Reaktorkinhaltes erfolgt.

Alle Rührplatten, Heizmatten und Sonden sind über die jeweiligen Module mit dem Zentralrechner verbunden. Die Regelung der einzelnen Komponenten ist sowohl über die Module, als auch über den Rechner möglich. Erfolgt der Zugriff vom Rechner, werden alle Einstellungen und Prozessdaten gespeichert. Damit ist eine ideale Prozessüberwachung und Versuchsauswertung möglich.

1.5 Einsatz von Bioreaktoren für die Stammzelltechnik

Die Kultivierung und Differenzierung embryonaler Stammzellen in statischer Kultur ist etabliert und sehr gut beschrieben. Im Laufe der letzten Jahre ist es Gruppen gelungen, Verfahren zu entwickeln, die es ermöglichen, aus embryonalen Stammzellen Zelltypen wie Kardiomyozyten, Adipozyten, Nervenzellen, Chondrozyten, Osteoblasten, Hepatozyten [13-19] und einige andere mehr in statischer Kultur zu differenzieren. Das Ziel dieser Differenzierungen ist es, Gewebe für die regenerative Medizin heranzuziehen, damit zerstörte oder geschädigte Gewebe wieder hergestellt werden können. Ein weiterer Fortschritt in diese Richtung ist die 3-dimensionale Expansion und Differenzierung von Stammzellen im Bioreaktor. Der Einsatz von Bioreaktoren bietet einige Vorteile: zum einen können Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffgehalt für die Zellen durch die Prozesskontrolle aufgezeichnet und konstant gehalten werden. Durch das gleichmäßige Durchmischen wird der Stoff- und Gasaustausch für alle Zellen sichergestellt. Darüber hinaus kann mithilfe von Bioreaktoren eine große Zellmasse erzeugt werden, die mit anderen Methoden nur durch größeren experimentellen Aufwand möglich wäre. So wurden beispielsweise ES-Zellen in 2 Liter-Reaktoren zu Kardiomyozyten differenziert [20]. Dabei können aus einem Reaktor mehr als 1 Mrd. Zellen gewonnen werden. Damit eröffnen sich neue Möglichkeiten hinsichtlich der Zellzüchtung, denn häufig stellt bereits die benötigte Zellmenge für Versuche und Therapien ein großes Hindernis dar. Des Weiteren können neue Ansätze in Zellbehandlung und Differenzierung verfolgt werden. Dabei stand zunächst die Expansion von ES-Zellen im Vordergrund. Um diese zu realisieren, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Einige Gruppen arbeiten mit Glasträgern, auf denen die Zellen fixiert und in den Bioreaktor inokuliert werden [21]. Neuere Ergebnisse zeigen, dass eine Expansion ohne

Trägermaterial möglich ist [22,23]. Dabei formten die ES-Zellen ähnliche *Embryoid Bodys* aus wie während einer Hängenden- Tropfen-Kultur. Die auf diese Weise im Reaktor kultivierten Zellen, zeigten nach 30 Tagen Expansion im Suspensionsbioreaktor immer noch die selben Pluripotenzigenschaften wie vergleichbare Zellen aus einer Adhärenzkultur. Im nächsten Schritt folgte die Differenzierung von ES-Zellen zu spezialisierten Zelltypen. Auch hierfür wurden Trägermaterialien eingesetzt. So ist es beispielsweise gelungen, murine und humane ES-Zellen in Agarose-Hydrogel-Kapseln zu hämatopoetischen Progenitorzellen [24] zu differenzieren. Auch für die Differenzierung zu Osteoblasten mit Trägern gibt es erste Ergebnisse. So ist es innerhalb von 29 Differenzierungs-tagen gelungen in Alginat-Gelatine-Kapseln integrierte murine ES-Zellen im Bioreaktor zu reifen Osteoblasten zu differenzieren [25]. Daten für eine trägerfrei Differenzierung von ES-Zellen zu Osteoblasten im Suspensionsbioreaktor liegen zurzeit noch nicht vor.

1.6 Die Bedeutung des Rührens für den Bioprozess

Unter Rühren versteht man ein Verfahren, bei dem Flüssigkeiten miteinander vermischt werden oder gasförmige und feste Stoffe in Flüssigkeiten dispergiert oder gelöst werden. Nach Zlokarnik lassen sich fünf Aufgaben für Rührer beschreiben [26]:

1. Homogenisieren, d. h. Ausgleichen von Konzentrations- und Temperaturgradienten
2. Intensivieren des Wärmeaustausches zwischen Flüssigphase und der Wärmeübertragungsfläche
3. Aufwirbeln bzw. Suspendieren eines Feststoffes in der Flüssigkeit
4. Dispergieren, Emulgieren zweier nicht ineinander löslicher Flüssigkeiten
5. Dispergieren von Gas in Flüssigkeiten.

Die verwendeten Rührer müssen folgende drei Aufgaben erfüllen: Homogenisieren, Intensivieren des Wärmetransports und Suspendieren der Zellen in der Flüssigkeit. Die Homogenisierung ist wichtig um mögliche pH-, Sauerstoff- und Nährstoffgradienten im Medium auszugleichen. Die verwendeten Bioreaktoren besitzen nicht wie üblich einen Heizmantel, sondern stehen frei im Raum auf Heizplatten. Um keinen Temperaturgradienten im Medium zu erzeugen, muss das Medium stetig gerührt werden. Durch das Suspendieren mit dem Rührer sollen idealerweise gleichgroße Zellaggregate entstehen und Verklumpungen vermieden werden. Da die Begasung *emers* über den Kopfraum des Reaktors erfolgt und nicht *submers* eingeleitet wird, ist ein Dispergieren von Gasblasen nicht erforderlich. Für die Versuche soll ein Blatt- und ein

Propellerrührer verwendet werden. Diese Rührer lassen sich zwei Gruppen zuordnen den radial- und den axialfördernden Rührern (Abb. 1.4).

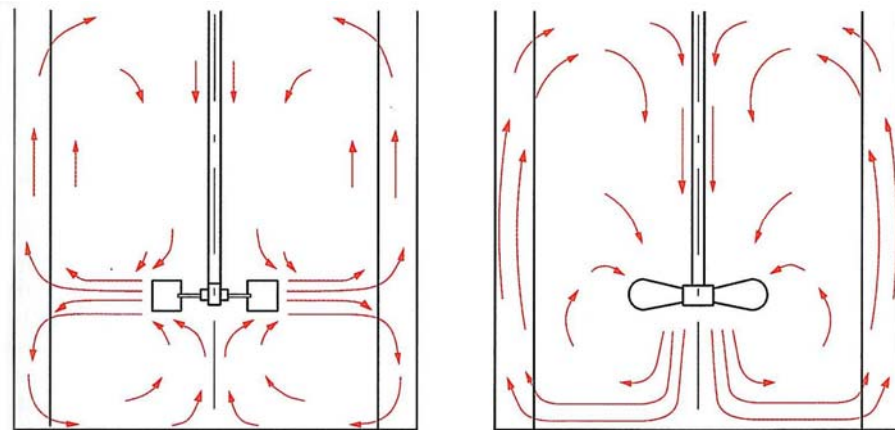


Abb. 1.4 Strömungsverhalten von Scheibenrührer (radial) und Propellerrührer (axial) mit Strombrechern. [27]

Der senkrecht zur Drehrichtung stehende Blattrührer ist ein Vertreter der radialfördernden Rührer [27]. An seinen Kanten entstehen hohe Scherkräfte die ihn vornehmlich für Dispergierprozesse auszeichnen, aber für eukaryotische Kultivierung eher ungünstig sind. Säugerzellen besitzen keine Zellwand, weshalb sie besonders empfindlich gegenüber äußeren Einflüssen reagieren. Für ihre Kultivierung existieren spezielle scherarme Rührer, die dennoch eine effektive Durchmischung ermöglichen. Der Propellerrührer zählt zu den axialfördernden Rührern. Er eignet sich gut zum Homogenisieren von niedrigviskosen Flüssigkeiten und zum Aufwirbeln von Festkörpern oder Zellen. Je nach Drehrichtung befördert er die Flüssigkeit primär nach unten oder nach oben. Vergleichbar ist das Prinzip mit dem einer Schiffsschraube, sie bewegt das Schiff je nach Drehrichtung vorwärts oder rückwärts.

1.7 Ablauf der Osteogenese

Die *in vitro* Differenzierung zu Osteoblasten ist der Knochenbildung während der Embryogenese sehr ähnlich. Man unterscheidet hier vier Phasen; Proliferationsphase (Phase I), Mesodermbildung (Phase II), Matrixablagerung (Phase III) und die Matrixmineralisierungsphase (Phase IV). *In vitro* wird die Differenzierung unter LIF-Entzug und in hängenden Tropfen initiiert. Durch Zugabe von Ascorbinsäure, β -Glycerophosphat, und $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 ab Tag 5 der Differenzierung werden die letzten beiden Phasen unterstützt [17,18]. Aus dem sich

während der Differenzierung bildenden mesenchymalen Bindegewebe gehen die Osteoblasten hervor. Sie bilden zunächst den Osteoid, die nicht kalzifizierte Knochengrundsubstanz. Die von den Osteoblasten sezernierten anorganischen Verbindungen bewirken eine Verknöcherung des Gewebes. Das entstehende Knochengewebe enthält zahlreiche Zellarten. Die wichtigsten Zelltypen für den Knochenmetabolismus sind die Osteoblasten und Osteoklasten, sie sind direkt am Knochenumbau beteiligt. Der Osteoblast produziert die Knochenmatrix, Cytokine und Aktivierungsfaktoren für die Osteoklasten, die wiederum ständig die Matrix umgestalten. In die Matrix eingeschlossene, verknöcherte Osteoblasten differenzieren zu Osteozyten aus. Sie stehen durch *Gap Junctions* untereinander in Verbindung.

Die Knochenmatrix setzt sich aus 10% Wasser, 20% organischen Bestandteilen und 70% anorganischen Stoffen zusammen. Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) bildet hier den Hauptbestandteil, aber auch Bicarbonat, Zitrat sowie Magnesium-, Kalium- und Natriumsalze kommen vor. Die organische Knochenmatrix wird zu 95% von Kollagen I gebildet, den Rest machen Proteoglykane und Glykoproteine (Osteocalcin, Bone Sialoprotein, Osteopontin) aus [28]. Diese Glykoproteine zeigen Affinitäten zu Ca^{2+} -Ionen. Damit geht eine Verstärkung der Matrixverkalkung einher. So ist beispielsweise Osteopontin aufgrund seiner aciden Oberfläche in der Lage organische und anorganische Matrixbestandteile miteinander zu verknüpfen [29].

1.8 Zielstellung der Arbeit

Die Diplomarbeit ist in ein Verbundforschungsprojekt des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) integriert. Koordinator des Projektes ist das Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie (FhG IZI) um Dr. Nicole zur Nieden. Verbundpartner sind die DASGIP AG (Drescher, Arnold & Schneider Aktiengesellschaft für Informations- und Prozesstechnologie) und das Bundesministerium für Risikobewertung, Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung zum Ersatz von Tierversuchen (ZEBET). Ziel der Projektpartner ist es, auf Grundlage automatisierter Bioreaktoren eine *in vitro* Methode für Osteo- und Entwicklungsosteotoxizitätstest zu entwickeln und damit Tierversuche zu ersetzen.

Dazu soll ein automatisierbares Bioreaktorsystem für die Expansion und Differenzierung von *Callithrix jacchus* ES-Zellen mit minimaler menschlicher Einflussnahme entwickelt werden. Für diesen Teilaspekt sind zunächst Versuche mit murinen ES-Zellen nötig. Murine ES-Zellen weisen eine stärkere Expansion als die oben genannten Zielzelltypen auf und ermöglichen damit eine schnellere Einstellung des Systems.

Ziel der Diplomarbeit ist es, die Differenzierung von murinen Stammzellen im DASGIP Bioreaktorsystem zu charakterisieren und durch Steuerung der Drehzahl den Mesodermanteil

und damit die Differenzierung zu Osteoblasten zu erhöhen. Sie ist als Charakterisierung des Systems zu verstehen und schafft damit die Grundlagen für alle weiterführenden Experimente mit der Reaktoranlage.

Diese Arbeit soll in vier Stufen erfolgen. Schritt eins bezieht sich auf den Vergleich des Wachstums in statischer Adhärenzskultur mit der Suspensionskultur. In Schritt zwei soll geklärt werden, ob ein Propeller- oder Blattrührer für die Zelldifferenzierung besser geeignet ist. Schritt drei behandelt die Erhöhung des Mesodermanteils bis Tag 4 durch Einstellung der Drehzahl. Der letzte Schritt umfasst die Differenzierung aus dem Reaktor gewonnen Zellen zu Osteoblasten.

2 Material

2.1 Zelllinie

Die murinen embryonalen Stammzellen der Linie D3 wurden kommerziell bei American Type Culture Collection (ATCC) erworben. Um sie von anderen im Labor benutzten ES-Zellen zu unterscheiden, wurde ihnen das Kürzel D3.5 zugeschrieben. Bei diesen, wie auch den anderen, ES-Zellen handelt es sich um Zellen, welche aus der Art *mus musculus*, der Hausmaus, dem Sv 129 Stamm mit dem Genotyp 129/Sv+c/+p gewonnen wurden.

2.2 Geräteverzeichnis

Gerät	Hersteller
Brutschrank: Hera Cell 240	Thermo
CASY Cellcounter	Schärfe System
Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Gel Logic 1500 Imaging System	Raytest
Multifuge 3S-R	Heraeus
Mikroskop DMIL	Leica
Nanodrop	peQLab
PCR Cycler T Professional	Biometra
Plattenphotometer infinite 200	Tecan
Reaktorsystem	DASGIP AG
Analysator 7100 MBS	YSI Incorporated

2.3 Chemikalien & Kits

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	peQLab
Alizarin Rot S	Sigma Aldrich
Arsenazoreagenz	DCL
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich
BSA	Fluka
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$)	Riedel-de Haën

Deoxyribonuclease I	Invitrogen
DMEM + L- Glutamin, 4,5 g Glukose	Invitrogen
dNTP Set	Fermentas
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich
Essigsäure	Normapure
1% Ethidiumbromidlösung	Th. Geyer
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Riedel-de Haën
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN
Formaldehyd	Roth
β -Glycerophosphat	Merck
KCl	J.T. Baker
KH_2PO_4	Roth
Leukemia Inhibitor Factor (LIF)	Millipore
β -Mercaptoethanol	Invitrogen
NaCl	Normapur
Natriumdeoxycholat	AppliChem
Na_2HPO_4	Fluka
NaOH	AppliChem
Nicht essentielle Aminosäuren (NAA)	Invitrogen
NP 40	Fluka
6x Orange Loading Dye Solution	Fermentas
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Puffer pH 4	Th. Geyer
Puffer pH 7	Th. Geyer
0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 50bp DNA Leiter	Fermentas
RNase OUT	Invitrogen
RNeasy MiniKit (250)	Quiagen
Sigmacoat	Sigma Aldrich
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Merck
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen
Tris-Base	Roth
Triton X-100	Fluka
0,25% Trypsin/ EDTA	Invitrogen
$1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D ₃	Sigma Aldrich

2.4 Kulturmedien & Lösungen

ES D3.5-Routinemedium

	DMEM + L- Glutamin, 4,5 g Glukose
15 %	FCS
1 %	NAA
0,1 mM	β -Mercaptoethanol
50 U/ml	Penicillin & Streptomycin
0,1 %	LIF

ES D3.5-Kontrolldifferenzierungsmedium

	DMEM + L- Glutamin, 4,5 g Glukose
15 %	FCS
1 %	NAA
0,1 mM	β -Mercaptoethanol
50 U/ml	Penicillin & Streptomycin

ES D3.5-Osteoblastendifferenzierungsmedium

	DMEM + L- Glutamin, 4,5 g Glukose
15 %	FCS
1 %	NAA
0,1 mM	β -Mercaptoethanol
30 U/ml	Penicillin & Streptomycin
10 mM	β -Glycerophosphat
25 μ g/ml	Ascorbinsäure
5×10^{-8} M	$1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D ₃

Einfrier-Medium

90%	FCS
10%	DMSO

Die fertig gestellten Kulturmedien wurden bei 4°C gelagert und bis zu 4 Wochen verwendet. Die Kulturmedien und Lösungen wurden vor der unmittelbaren Anwendung auf 37°C temperiert.

10x PBS (pH 7,4)

1,5 mM	KH ₂ PO ₄
8,5 mM	Na ₂ HPO ₄
120 mM	NaCl
2,7 mM	KCl

RIPA-Puffer

PBS mit	
1 %	NP 40
0,5 %	Natriumdeoxycholat
0,1 %	SDS

50x TAE

242 g	Tris-Base
57,1 ml	Essigsäure
100 ml	0,5 M EDTA
Auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen	

2.5 Primer

Die Primer wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Die Angabe der Primer erfolgt in 5' - 3' Richtung.

Eigenschaft	Bezeichnung	Forwärts - Sequenz	Rückwärts - Sequenz	T [°C]	[bp]
Standard	GAPDH	GCACAGTCAAGGCCGAGAAT	GCCTTCTCCATGGTGGTGAA	60	151
Apoptose	p53	CACAGCGTGGTGGTACCTTA	CTTCTGTACGGCGGTCTCTC	60	217
Differenzierung	5T4	AACTGCCGAGTCTCAGATACC	ATGATACCCCTCCATGTGATCC	55	506
Endoderm	AFP	AGCTGCGCTCTCTACCAGAC	GAGTTCACAGGGCTTGCTTC	60	242
Ektoderm	NF 68 kDa	AGTGGCTTTCTGGCTTGCTG	TCTGTGTGATTACATTGCCATAG	59	81
Mesoderm	Brachyury	CCCTGCACATTACACACCAC	GTCCACGAGGCTATGAGGAG	60	150
Pluripotenz	nanog	ATGCCTGCAGTTTTTCATCC	GAGGCAGGTCCTCAGAGGAA	60	109
	Oct4	GCCTTGCAGCTCAGCCTTAA	CTCATTGTTGTCGGCTTCCTC	61	81

Tab. 2.1 Auflistung der verwendeten Primer.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Passagieren von embryonalen Stammzellen

Das Heranziehen der ES D3.5-Zellen für die Reaktorversuche erfolgte routinemäßig in 75cm² Primaria-Zellkulturflaschen bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchte. Der Boden von Primaria-Flaschen ist durch Amin- und Amidgruppen positiv geladen. Diese proteinähnliche Struktur erleichtert den Zellen die Adhärenz und aktiviert das Wachstum. In eine 75 cm² Primaria-Zellkulturflasche wurden 8×10^5 Zellen in 24 ml Routinemedium ausgesät und nach zwei bis drei Tagen passagiert. Eine mikroskopische Kontrolle ist jedes mal notwendig, um das Splittverhältnis anzupassen. Dazu wurde das alte Medium dekantiert und die Zellen für ca. 5 min bei 37°C mit 3 ml vorgewärmter 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet, um die Zellen vom Boden zu lösen. Die Inhibierung der Trypsin/EDTA-Lösung erfolgte mit 6 ml Routinemedium. Für die Routinezellkultur genügte es meist, die Zellen 1:10 mit frischem Routinemedium zu splitten (1 Teil Zellsuspension in 9 Teilen frisches Medium aufnehmen). 24 µl LIF wurde nach dem Passagieren direkt in die Zellkulturflasche frisch zugegeben.

3.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen zunächst trypsiniert, vereinzelt, 5 min bei 800 rpm zentrifugiert und in 10 ml Medium aufgenommen. Alle für die Zellkultur nötigen Zentrifugationsschritte fanden mit der Multifuge 3S-R von Heraeus statt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels des CASY Cellcounter (Schärfe System) Zählautomaten. Neben der Zellzahl wurde auch die Überlebensrate der Kultur ermittelt. Hierzu wurden 10 µl Einzelzellsuspension 1:1000 mit CASY®ton verdünnt und über eine Kapillare in das Messsystem aufgenommen. Für Berechnungen wurde die Lebendzellzahl verwendet.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Die Aufbewahrung der ES D3-Zellen erfolgte in gasförmigen Stickstoff bei einer Temperatur von -130°C. Bei Bedarf wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und in das 10fache Volumen Routinemedium aufgenommen. Um das für die Zellen toxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der dekantierte Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Routinemedium resuspendiert. Um die Anhaftung der Zellen auf

dem Flaschenboden (75 cm² Zellkulturflaschen, Cellstar), zu erleichtern, wurden die Flaschen mit Gelatine überschichtet. Dies erfolgte durch die Zugabe von 5 ml 0,1 %-Gelatinelösung, die für 5 min bei 37°C in den Flaschen verblieb. Die überstehende Gelatinelösung wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt und die Flasche 10 min zum Trocknen offen stehen gelassen. Je Flasche wurden 1×10^6 Zellen in 25 ml Routinemedium ausgesät.

3.1.4 Einfrieren von Zellen

Es wurden trypsinisierte und zentrifugierte Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen und mittels eines Cryoboy um ca. 1°C/min bis auf -80°C eingefroren. Zur endgültigen Lagerung wurden die D3.5-Zellen in gasförmigen Stickstoff (T = -130°C) überführt.

3.1.5 Bestimmung der Wachstumsparameter μ und t_d in statischer Differenzierung

Die spezifische Wachstumsrate μ und die Verdopplungszeit t_d sind wichtige kinetische Parameter, mit denen man das Wachstum von Zellen beschreiben kann. Um sie zu ermitteln, wurde der Verlauf der Zellzahlzunahme in den ersten fünf Tagen der Differenzierung bestimmt. Für die Analysen wurden je Ansatz fünf Primaria beschichtete 6-Kavitätenplatten vorbereitet. Je Kavität wurden 100.000 Zellen ausgesät. Pro Tag wurden zwei Messungen durchgeführt. Die Ermittlung der Zellzahl nach 3.1.4 erfolgte im Triplikat. Dazu wurden zunächst drei Kavitäten mit 500 μ l 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet und 5 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Um Messfehler auszuschließen, wurde bei einer Zellzahl unter 10^6 Zellen/ml das Verhältnis Zellsuspension zu CASY®ton auf 1:100 erhöht.

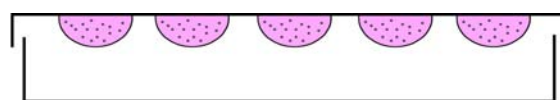
Bei dem Ansatz mit konstant zu haltendem pH wurde der pH-Wert des Überstandes für 2 ml bestimmt und mit 0,01 M NaOH bis auf den pH-Wert zu Versuchsbeginn gegentitriert. Die äquivalente Menge steriler 0,01 M NaOH wurde den verbliebenen Kavitäten zugesetzt. 1 ml Überstand wurde zur späteren Glukose-, Laktatanalyse bei -20°C eingefroren.

3.1.6 Differenzierung der ES D3-Zellen zu Osteoblasten in hängenden Tropfen

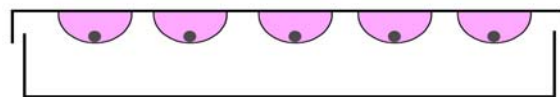
Die Differenzierung mittels hängenden Tropfen erfolgte nach dem Protokoll von Heuer et al. (1993) unter LIF-Entzug mit ES-Standardmedium.

Die ES D3-Zellen wurden wie unter 3.1.1 beschrieben trypsinisiert und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Kontrolldifferenzierungsmedium resuspendiert und die Zellen nach 3.1.2. gezählt. Die Zelldichte wurde auf $3,75 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt. Für die Hängende-Tropfen-Methode (Abb. 3.1) wurden auf die Innenseite der Deckel von bakteriologischen Schalen (Ø100mm) 70 – 100 Tropfen von jeweils 20 µl (750 Zellen/Tropfen) der Zellsuspension pipettiert. Der Deckel samt Tropfen wurde vorsichtig auf eine mit 10 ml 1x PBS gefüllte Petrischale gesetzt.

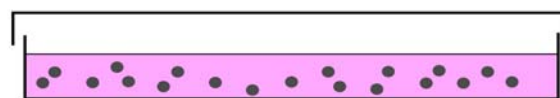
Die hängenden Tropfen wurden für drei Tage bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Am tiefsten Punkt der Tropfen kommt es aufgrund der wirkenden Schwerkraft zur Ausbildung von dreidimensionalen Zellaggregaten, den sogenannten *Embryoid Bodys* (EBs).



Tag 0
Hängende Tropfen 750 Zellen je Tropfen



Tag 0-3
Bildung von *Embryoid Bodys*



Tag 3-4 bzw. 3-5
Embryoid Bodys in Suspensionskultur



Tag 4/5-28
50.000 Zellen/cm² Adhärenskultur

Abb. 3.1 Ablauf der Hängenden-Tropfen-Methode

Am dritten Tag der Differenzierung wurden die EBs von den Deckeln heruntergewaschen und die EBs zweier Schalen in eine mit 8 ml Kontrolldifferenzierungsmedium befüllte bakteriologische Schale überführt. Die Zellen wurden für weitere 24 h bis Tag 4 bzw. 48 h bis Tag 5 bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Am vierten bzw. fünften Tag wurden die EBs durch gleichmäßiges Schwenken der bakteriologischen Schalen im Zentrum gesammelt. Zellen die zur RNA-Isolation bestimmt waren, wurden wie in 3.3.1 beschrieben weiterverarbeitet. Zur weiterführenden Differenzierung der Zellen wurden diese zunächst mit einer Pipette aufgenommen und in eine Petrischale mit 3 ml 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung überführt. Nach 8-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch auf und ab pipettieren vereinzelt und in 6 ml Kontrolldifferenzierungsmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 800 rpm zentrifugiert und die Zellen in 1 ml Kontrolldifferenzierungsmedium resuspendiert und ausgezählt.

Für die weitere Differenzierung wurden 50.000 Zellen/cm² in Primaria beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und mit Osteoblastendifferenzierungsmedium induziert. Für die RNA-Isolation erfolgte die Aussaat in 24-Kavitätenplatten und für Färbungen sowie Proteinlysate in 96-Kavitätenplatten. Der Medienwechsel erfolgte ab dem 10. Differenzierungstag alle zwei Tage bis Differenzierungsende (Tag 28).

3.1.7 Differenzierung von ES D3-Zellen im Suspensionsbioreaktor

3.1.7.1 Beschichten der Reaktoren

Bevor die autoklavierten Bioreaktoren mit Medium befüllt und angeimpft werden konnten, war eine Beschichtung der Innenwandung mit Sigmacote nötig. Sigmacote enthält halogenisierte Silicone, die mit den Silanolgruppen des Glases reagieren und eine neutrale, hydrophobe Glasoberfläche schaffen. Somit wird eine Adhärenz der Zellen an dem Glas verhindert. Das vom Autoklavieren verbliebene Kondenswasser wurde aus den Reaktoren abgesaugt. Die Reaktoren trockneten für 2 h unter der Laminarbox vollständig ab. Dazu wurde der Deckel mit dem Rührwerk und der Probenahmestutzen entfernt. Im Anschluss wurde die pO₂-Sonde ausgebaut und die Reaktoren mit 60 ml Beschichtungslösung befüllt.

Sofort nach Zugabe der Sigmacote-Lösung war die Glasoberfläche versiegelt, die Lösung konnte abgenommen und in den nächsten Reaktor überführt werden. Nach 5 min Lufttrocknung der Beschichtungslösung wurden die Bioreaktoren zweimal mit sterilem Aqua dest. gespült. Anschließend wurden die Sonde, das Rührwerk und der Probenahmestutzen wieder eingebaut.

3.1.7.2 Zusammenbau und Befüllen der Reaktoren mit Medium

Die pH-Sonden sind sehr verschleißanfällig, wenn sie oft autoklaviert werden. Aus diesem Grund wurden sie nicht autoklaviert, sondern vor dem Einbau mit 70 %igen Ethanol desinfiziert und anschließend mit sterilem Aqua dest. abgespült. Die Kalibrierung der pH-Sonden (siehe 3.1.7.3) erfolgte vor dem Einbau. Die Reaktoren konnten nun mit 42 ml Kontrolldifferenzierungsmedium befüllt und verschlossen werden. Die Reaktoren wurden auf den Heiz- und Rührplatten platziert, die Sonden am System angeschlossen und die Prozessbedingungen per Hand an den Modulen für Temperatur, Drehzahl und Begasungsrate auf 37°C, 100 rpm und 1 l/h eingestellt. Begas wurde mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂, 21 % O₂ und 74 % N₂. Nach 2 h stellt sich ein Gasgleichgewicht ein, so dass die gelöste Sauerstoffkonzentration bei 100 % DO lag. Dieses Zeitfenster ist ebenfalls für die pO₂-Sonden nötig, damit diese das für eine korrekte Messung nötige Spannungsgefälle (Polarisierung) aufbauen können.

3.1.7.3 Kalibrierung von Temperatur-, pH- und pO₂- Sonde

Die Kalibration der Temperatursensoren erfolgte beim Aufbau der Anlage mit einem Referenzthermometer. Sie muss jährlich wiederholt werden. Die pH- und pO₂-Sonde wurde nach jedem Autoklavierzyklus neu kalibriert. Da sowohl der pH-Wert, als auch der pO₂-Wert temperaturabhängig sind, wurde jeweils die Temperatur mit gemessen.

Die pH-Kalibration erfolgte unsteril vor dem Einbau in den Reaktor mit Puffer pH 7 und Puffer pH 4 als Zweipunktkalibration. Die pH-Sonden und der Temperatursensor wurden in den pH 7 Puffer getaucht und nach der Einstellung stabiler Werte die Kalibration gestartet. Die Sonden wurden mit Aqua dest. abgespült und in Puffer pH 4 getaucht. Nach der Einstellung stabiler Messwerte erfolgte die Erfassung des zweiten Kalibrierpunktes. Nach dem Abschluss der Kalibration wurden die Sonden mit Aqua dest. abgespült und bis zur weiteren Verwendung in 3,6 M KCl-Lösung gelagert.

Die pO₂-Kalibration wurde ebenfalls als Zweipunktkalibration durchgeführt, allerdings steril 2 h nach dem Befüllen der Reaktoren mit Medium unter Prozessbedingungen bei 37°C, 100 % DO und eingeschaltetem Rührwerk. Die pO₂-Sonde ist eine Clark-Sonde, bei der an einer Grenzschicht ein Spannungsabfall gemessen wird. Exakte Messungen sind erst nach dem Aufbau des Membranpotentials möglich. Als Kalibrationspunkt eins wurde der 100 % DO Wert gewählt. Dieser Wert stellt sich im Medium bei Normaldruck und Umgebungsluft (21 % O₂) ein. Der zweite Punkt liegt bei 0 % DO. Zur Nullpunktkalibration wurde die pO₂-Sonde vom

Sensormodul abgekoppelt. Nach der pO_2 -Kalibration konnte die Inokulation der Zellen (3.1.7.4) erfolgen.

3.1.7.4 Inokulation und Differenzierung im Suspensionsbioreaktor

Um alle acht Bioreaktoren zu inokulieren, ist eine Zellzahl von mindestens 14 Mio. Zellen nötig. Bei einer Zelldichte im Reaktor von $3,75 \times 10^4$ Zellen/ml, die auch für die hängenden Tropfen verwendet wurde und einem Arbeitsvolumen von 45 ml entspricht das einer Zellmenge von $1,69 \times 10^6$ Zellen je Reaktor. Als Inokulum wurden deshalb 3 ml einer Zellsuspension mit $0,56 \times 10^6$ Zellen/ml hergestellt. Die verwendeten Zellen wurden wie in 3.1.1 beschrieben trypsiniert und nach 3.1.2 ausgezählt. Zum Animpfen der Reaktoren wurden diese vom System getrennt. Der Inokulationsschritt hatte schnell zu erfolgen, da innerhalb von 20 min die pO_2 -Sonden depolarisieren. Nach dem Trennen der Sensorverbindungen und dem Beenden der Temperatur- und Drehzahlsteuerung wurden der Probenahmestutzen unter der Laminarbox geöffnet und 3 ml der $0,56 \times 10^6$ Zellen/ml Inokulationssuspension mithilfe einer 5 ml Pipette in den Reaktor geimpft. Nach Verschließen des Probenahmestutzens wurden die Reaktoren wieder an das System angeschlossen und die Regelprozedur gestartet.

Die Temperatur wurde generell auf 37°C und die Begasung auf 1 l/h (21 % O_2 , 5 % CO_2) eingestellt. Je nach Versuch wurde die Drehzahl zwischen 70 rpm und 150 rpm variiert. Eine Regelung des pH-Wertes fand nicht statt.

3.1.7.5 Beenden eines Reaktorlaufs, Probenahme

Zum Beenden eines Versuches wurde zunächst die Regelung beendet. 15 min nach dem Abstellen der Drehzahl wurden die Reaktoren unter der Laminarbox geöffnet. Dort wurden die Reaktoren geöffnet und 20 ml überstehendes Medium abgenommen. Das verbliebene Medium wurde in eine bakteriologische Schale überführt. Von dieser Suspension wurde 1 ml Probe genommen und zur EB Größenvermessung am Fluoreszenzmikroskop in eine mit 2 ml PBS befüllten 6-Kavitäten Zellkulturplatte überführt. Die verbleibenden EBs wurden durch Schwenken im Zentrum gesammelt, fotografiert und wie in 3.3.1 beschrieben die RNA isoliert bzw. zur weiteren Differenzierung nach 3.1.6 ausgesät.

3.1.7.6 Reinigen und Autoklavieren der Reaktoren

Nach Beendigung einer Versuchsreihe wurden Probenahmeschlauch, Sonden, Reaktoren und Rührwerk mit Aqua dest. gereinigt. Um die Sigmacotebeschichtung zu entfernen, wurden die Reaktoren mit 70 ml 10 %iger NaOH-Lösung befüllt und über Nacht stehen gelassen. Am darauf folgenden Tag wurde die NaOH-Lösung entfernt und die Reaktoren mit VE-Wasser und mit Aqua dest. gespült.

Vor dem Autoklavieren wurde in die gereinigten Reaktoren die pO_2 -Sonde eingebaut. Die Öffnungen für den pH- und Temperatursensor wurden mit Aluminiumfolie verschlossen. Die Filter am Reaktordeckel wurden ebenfalls in Aluminiumfolie eingewickelt, um das Eindringen von Feuchtigkeit zu vermeiden. In den Reaktor wurden ca. 2 ml Aqua dest. gefüllt um für die empfindliche pO_2 -Sonde eine Wasserdampfatmosphäre zu erzeugen. Der Probenahmestutzen wurde zum Druckausgleich leicht angedreht. Die Autoklavierung erfolgte bei 121°C für 20 min.

3.2 Analytik und Technische Analysen

3.2.1 Ca^{2+} -Bestimmung

Um eine vollständige Menge an Kalzium von mineralisierten Zellen messen zu können, wurden zunächst 100 μ l RIPA-Protein-Lysate von den 96-Kavitätenplatten genommen. Im Anschluss wurden die verbliebenen Kalziumkristalle mit 100 μ l 1 M HCl aus den Kavitäten gelöst. Die Lysate von jeweils zwei Kavitäten wurden vereinigt. Aus 10 Kavitäten ergeben sich damit fünf Lysatproben je Ansatz.

Zur Messung der Ca^{2+} -Konzentration wurde das Plattenphotometer infinite 200 der Firma Tecan verwendet. Die Messungen erfolgten im Duplikat bei einer Wellenlänge von 650 nm in 96-Kavitätenplatten. 25 μ l des RIPA-Lysats wurden zu 75 μ l Arsenazoreagenz gegeben. Für die Messung des HCl-Lysats wurden 10 μ l Probe und 250 μ l Arsenazoreagenz verwendet. Sowohl für die RIPA- als auch für die HCl-Lysate wurde eine Kalibrierkurve erstellt.

Für den Versuch des Verweilzeitverhaltens (3.2.4) wurde ebenfalls eine Ca^{2+} -Bestimmung durchgeführt. Dazu wurden 25 μ l Probe (1 : 100 verdünnt) und 75 μ l Arsenazoreagenz verwendet. Jede Probe wurde dreifach gemessen.

3.2.2 Glukose und Laktatmessung

Die Glukose- und Laktatkonzentration wurde in den unverdünnten Medienproben mithilfe des Biochemischen Analysators (7100 MBS) der Firma YSI gemessen. Das Messverfahren beruht auf der oxidativen Umsetzung von Glukose zu D-Glucono- δ -Lacton und Wasserstoffperoxid sowie der Umsetzung von Laktat zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt anhand von Leitfähigkeitsveränderungen durch das gebildete Wasserstoffperoxid und wird anhand einer internen Kalibrierung mit einer Kalibrierungslösung der Firma Kreienbaum (1,8 g/l Glukose, 0,45 g/l Laktat) ermittelt.

3.2.3 Strömungsanalyse mithilfe von Aluminiumfitter

Die Strömungsanalyse dient dem optischen Vergleich der durch Propeller- und Blattrührer erzeugten Strömung. Der Reaktor wurde mit 45 ml destilliertem Wasser befüllt und mit 1 g Aluminiumfitter versetzt. Durch Zugabe einiger Tropfen Spülmittel konnte die Oberflächenspannung herabgesetzt werden, sodass der Alufitter auf den Boden sank. Sowohl die pH- als auch die pO_2 -Sonde wurden durch Kunststoffröhrchen ersetzt, um eine authentische Strömung im Reaktor zu simulieren. Die Versuche wurden bei der maximalen Systemdrehzahl von 150 rpm durchgeführt.

3.2.4 Verweilzeitverhalten

Das Ziel dieser Methode ist es festzustellen, ob und in welcher Größe Totzonen im Reaktor vorhanden sind. Dazu wurde der Reaktor mit 45 ml 1 g/l $CaCl_2$ -Lösung befüllt. Ein Zufluss mit Aqua dest. und Abfluss aus dem Reaktor wurde an den Probenahmestutzen angeschlossen. Durch den gleichzeitigen Zufluss von Aqua dest von 40 ml/h und einem Abfluss von 40 ml/h sollte das Volumen im Reaktor konstant gehalten werden und die $CaCl_2$ -Konzentration stetig verringert werden. Nach dem Start des Systems wurde alle 10 min eine Probe bis Minute 100 genommen. Der konstante Volumenstrom wurde mithilfe des DASGIP Computersystems über Peristaltikpumpen gesteuert.

Die Analyse der Ca^{2+} -Proben erfolgte mit 1 : 100 verdünnten Proben mithilfe der Ca^{2+} -Bestimmung (3.2.1).

3.3 Isolation, Quantifizierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

3.3.1 RNA-Isolation

Mithilfe der RNA-Isolation kann auf den Zustand der Zellen geschlossen und das aktuelle Transkriptom ermittelt werden. Die RNA-Isolation erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen. Je nach dem, ob die Zellen adhärent (Zellen Tag 28) oder in Suspension (Zellen Tag 4, Tag 5) vorliegen, müssen sie verschieden aufgeschlossen werden. Zellen, die in Suspension wuchsen, wurden zunächst zentrifugiert, der Überstand abgenommen und auf das Zellpellet 700 µl Lyse- Puffer (10 µl β- Mercaptoethanol/ 1 ml RLT- Puffer) gegeben. Der Puffer wirkte mindestens 30 s ein, anschließend wurden die Zellen mit einer Pipette homogenisiert. Bei adhärent wachsenden Zellen musste zunächst das Medium abgenommen werden, um anschließend direkt den Lyse-Puffer auf die Zellen zu geben (1 min Inkubation). Mithilfe einer umgedrehten Pipettenspitze wurden die Zellen von der Oberfläche gelöst. Das aufgenommene Lysat wurde für 30 s durch vortexen homogenisiert. Die Proben wurden für einen zusätzlichen Aufschluss bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen der Proben, wurden verbliebene RNA-Proteinkomplexe durch Ansaugen und Ausstoßen mit einer Spritze aufgelöst. Zur Fällung von DNA und Proteinen wurden die Proben im Verhältnis 1 : 1 mit 70 % Ethanol versetzt. Das Lysat wurde auf die Zentrifugationssäule geladen und 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die Isolation erfolgte durch die Adsorption der RNA an eine hydratisierte Silicagelmembran in einer Zentrifugationssäule (RNeasy spin column). Um Verunreinigungen wie DNA und Protein zu eliminieren, erfolgten nach dem Auftragen der Probe drei Waschschrte mit den Puffern RW1, RPE und anschließender Zentrifugation (15 s, 15 s, 2 min mit je 10.000 rpm) in einer Eppendorf Zentrifuge 5415R. Zur Elution der RNA wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und 1-mal mit 50 µl RNase-freiem Wasser für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Von dem erhaltenem RNA-Isolat wurde die RNA-Konzentration bestimmt und bei -80°C eingelagert.

3.3.2 Quantifizierung der RNA

Die RNA-Konzentration der Proben wurde mithilfe des NanoDrop®, einem Spektralphotometer der Firma PeqLab, bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dazu wurde das Spektrum von 220 nm bis 350 nm aufgenommen. Für die Messung genügt 1 µl RNA-Isolat.

Die Probe wurde auf den unteren Messkopf aufgetragen und anschließend der obere Messkopf aufgedrückt. Die Messung erfolgte gegen RNase-freies Wasser. Die Reinheit der RNA wurde über den Ratio der Absorption bei 260 nm zu 280 nm und 260 nm zu 230 nm bestimmt. Für RNA sollte der erste Wert bei ca. 2,0 und der zweite Wert zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Gibt es davon Abweichungen lässt das auf Verunreinigungen durch Proteine und Phenol (260/280) bzw. durch Salze und organische Lösungsmittel (260/230) schließen.

3.3.3 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die cDNA-Synthese und PCR-Reaktionen wurden mit dem Cyclor T Professional der Firma Biometra durchgeführt. Das Template (Ausgangssequenz) für die cDNA-Synthese ist die aufgereinigte RNA. Der Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese bestand aus 625 ng RNA, welche von 3,2 U Superscript II reverser Transkriptase zu komplementärer DNA synthetisiert wurde. Die Erststrangreaktion enthielt weiterhin 2 U Random Hexamere Primer, 2 U RNase out Inhibitor, 10 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs in FS Puffer bei einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Reaktion startete für 10 min bei 25°C mit dem Anlagern der Random Hexamer Primer an die RNA-Stränge, es folgten die Elongation bei 42°C für 50 min und die Inaktivierung der Rerversen Transkriptase bei 70°C für 15 min. Der Deckel des Cyclers war während der gesamten Synthese auf 80°C temperiert.

3.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die durch die reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mittels einer Drei-Schritt PCR vervielfältigt [30]. Die Reaktionsansätze für die PCR enthielten 2 µl Erststrangreaktion (50 ng cDNA), 2 U Taq- Polymerase, je 1,6 µM des vorwärts und rückwärts Primer, 100 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂ in PCR Puffer bei einem Gesamtvolumen von 25 µl.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen vollzogen: 5 min 94°C Denaturierung, 35 Zyklen mit je 45 Sekunden Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 60°C und Elongation bei 72°C. Die durch die PCR amplifizierten Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wurde ein 3 %iges Agarosegel in TAE-Puffer mit 0,003 % Ethidiumbromid hergestellt. Die Ergebnisse wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mithilfe des Gel Logic 1500 Imaging Systems der Firma Raytest (Kodak Kamera) dokumentiert.

3.4 Histochemische Methoden

3.4.1 Fixieren von Zellen mit Formaldehyd

Die Zellen wurden zunächst mit PBS-Lösung gewaschen. Durch Übersichten der Zellen zu gleichen Teilen mit 4% Formaldehydlösung und 1x PBS-Lösung für 30 min bei 4°C, wurden sie fixiert. Daran schloss sich ein dreimaliges Waschen mit PBS an. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei 4°C in PBS.

3.4.2 Alizarinrot S Färbung von Osteoblasten

Alizarinrot S bildet mit zweiwertigen Metallionen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+}) rot-orange Chelatverbindungen aus. Da neben Ca^{2+} keine anderen zweiwertigen Kationen in großer Menge im Körper (außer Blut) vorkommen, ist diese Färbung spezifisch für die von Osteoblasten synthetisierten Ca^{2+} -Minerale.

Die fixierten Zellen wurden zunächst mit Aqua dest. gewaschen und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur mit 0,5 %iger Alizarinrot S Lösung (pH 4) überschichtet. Die Färbelösung wurde durch dreimaliges Waschen mit Aqua dest. entfernt. Es schlossen sich vier Waschschrte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 100 %) zum Entfernen unspezifischer Färbungen an. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in 100 % Ethanol.

4 Ergebnisse

4.1 Abhängigkeit des Zellwachstums von dem pH-Wert

Da der pH-Wert eine einfach zu steuernde Stellgröße im Bioreaktor darstellt, sollte ein möglicher Einfluss des pH-Wertes auf die Zellteilung untersucht werden. Von Interesse war weiterhin, ob sich μ als spezifischer Zellparameter in Abhängigkeit vom pH-Wert ändert.

Mit diesem Versuchen sollten die spezifische Wachstumsrate und die Verdopplungszeit von ES D3.5-Zellen für die ersten fünf Differenzierungstage in statischer Kultur bestimmt werden. Dafür wurden sie unter LIF-Entzug in 6-Well Kavitätenplatten differenziert. Das Medium wurde während dieser Zeit nicht gewechselt. Dabei wurde zwischen zwei Ansätzen unterschieden. In dem ersten Ansatz sollte der pH-Wert konstant gehalten werden. Dies geschah durch Zugabe von NaOH. An dem zweiten Ansatz wurden keine pH-Manipulationen vorgenommen. Er wird als variabler pH-Ansatz bezeichnet.

4.1.1 Ermittlung der Wachstumsparameter μ und t_d

Die exponentielle Wachstumsrate μ ist ein Maß für die Geschwindigkeit, in der das Zellwachstums während der exponentiellen Wachstumsphase erfolgt. Je größer μ ist, desto schneller teilen sich die Zellen und desto kürzer ist die resultierende Verdopplungszeit.

Die exponentielle Wachstumsrate μ lässt sich mithilfe der Wachstumszeit $t - t_0$, der Anfangszellzahl x_0 und der Endzellzahl x_t berechnen.

$$\mu = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t - t_0} \quad (4.1)$$

Je größer μ ist, desto höher ist die Wachstumsgeschwindigkeit und desto geringer die Verdopplungszeit. Zur Berechnung der Verdopplungszeit wird die Biomasse x_t zum Zeitpunkt t der doppelten Anfangsbiomasse x_0 gleichgesetzt $x_t = 2x_0$. Damit entspricht die Verdopplungszeit t_d der Wachstumszeit $t - t_0$. Stellt man nach t_d um, ergibt sich:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (4.2)$$

Betrachtet man den Verlauf der Zellzahlzunahme nimmt sie in den fünf Versuchstagen um den Faktor 50 exponentiell zu (Abb. 4.1 A). Sie erhöht sich von 10^5 Zellen auf 5×10^6 Zellen je Kavität. Bei der halblogarithmischen Auftragung der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit sind die vier Phasen einer typischen Wachstumskurve gut zu erkennen, die lag-Phase (I), die exponentielle Phase (II), die stationäre Phase (III) und die Absterbephase [31] (Abb. 4.1 B).

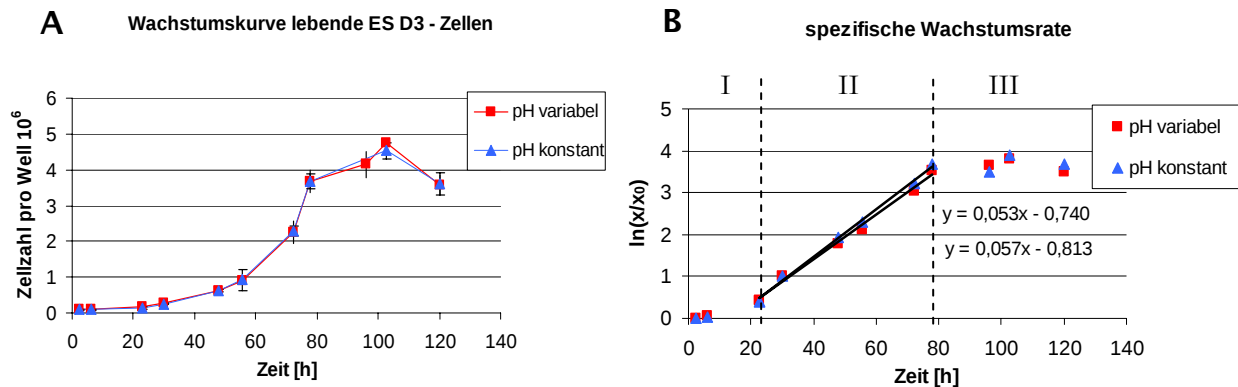


Abb. 4.1 Verlauf des Zellwachstums bei variablen und konstanten pH. Vergleich der Proliferation während einer Differenzierung bis Tag 5 im Medium mit variablen pH (rot) und konstant gehaltenen pH (blau). **A** zeigt die Zellzahlentwicklung in Abhängigkeit von der Zeit. Durch logarithmisches Auftragen (**B**) der Zellzahl kann man die spezifische Wachstumsrate μ für die exponentielle Phase ermitteln.

Die lag-Phase ist durch sehr geringes Wachstum gekennzeichnet, sie dauerte in beiden Ansätzen bis Stunde 23 an. In diesem Wachstumsabschnitt erfolgte die Anpassung an die neuen Bedingungen und an das Medium. Die exponentielle Phase, verlief von der 23. h bis zur 78. h. Während dieser Zeit wuchsen die Zellen mit höchster Geschwindigkeit. Der Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase gestaltet sich fließend. Sie beginnt ab der 78. h und ging bis zum Versuchsende nach 120 h. Die Dauer der vier Wachstumsabschnitte war für beide Ansätze gleich. Durch das halblogarithmische Auftragen der Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit, konnte die spezifische Wachstumsrate ermittelt werden. μ entspricht dabei dem Anstieg in der exponentiellen Phase. Für den Ansatz mit variablen pH bzw. konstanten pH wurde μ auf $0,054 \text{ h}^{-1}$, sowie auf $0,057 \text{ h}^{-1}$ in der exponentiellen Phase bestimmt. Somit errechnet sich die jeweilige Verdopplungszeit für den variablen pH-Ansatz auf 12,8 h und für den konstanten pH-Ansatz auf 12,2 h.

4.1.2 Entwicklung der Überlebensrate und des pH-Wertes

Die Überlebensrate (Abb. 4.2 A) stieg zu Beginn der lag-Phase in beiden Ansätzen von 82 % bis auf 90 % in der 23. h an. Auf diesem Niveau hielt sie sich bis zum Ende der exponentiellen Phase

bis Stunde 78. Von diesem Zeitpunkt an sankt die Überlebensrate bis zum Versuchsende ab, im konstanten Ansatz auf 71 % und im variablen Ansatz auf 73 %.

Der pH-Wert lag zu Beginn des Versuches bei beiden Ansätzen bei 8,3 (Abb. 4.2 B). Für den ersten Tag hielt er sich auf diesem Niveau. Am dritten Versuchstag, verfärbte sich das im Medium enthaltene Phenolrot in das Orange-gelbe. Nach 78 h wurde ein pH-Wert von 7,3 gemessen. Im variablen Ansatz fiel der pH zum Versuchsende bis auf 6,7, im konstanten Ansatz auf 7,1. Die pH-Korrektur wurde erst nach 48 h durchgeführt, da sich bis dahin der pH nicht merklich verändert hatte. Der pH-Verlauf des konstanten Ansatzes zeigte trotz der Korrektur mit NaOH einen ähnlich starken Abfall wie beim Ansatz mit unbeeinflussten pH-Wert.

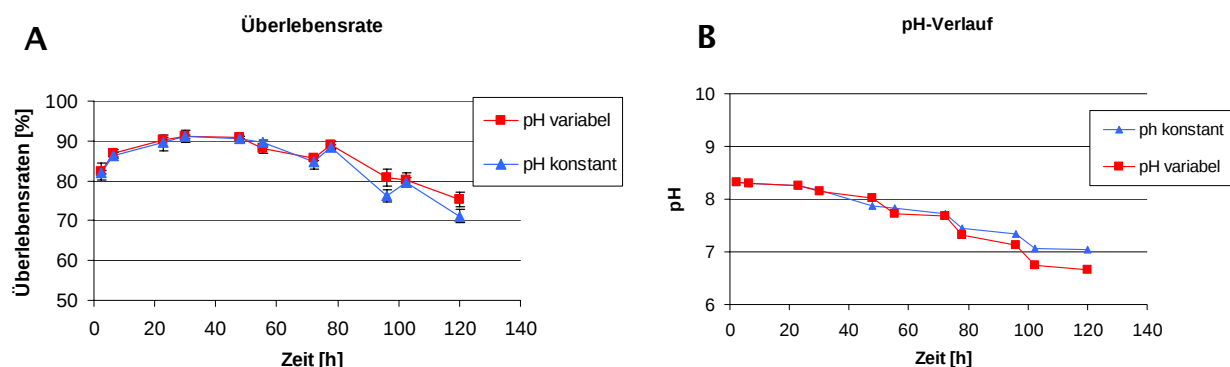


Abb. 4.2 Verlauf der Überlebensrate und des pH-Wertes im Laufe einer Differenzierung. Die Überlebensrate steigt bis Stunde 20 an, hält sich bis Stunde 78 auf dem Niveau und fällt bis zum Versuchsende weiter ab (A). Der pH-Wert verringert sich während des Versuches. Das Konstanthalten des pHs gelang nur bedingt (B).

4.1.3 Glukose- und Laktatbestimmung

Der Verlauf der Glukose- und Laktatkonzentration wurde exemplarisch für den variablen pH-Ansatz bestimmt, um Zusammenhänge zwischen dem Wachstumsverlauf und dem Zellstoffwechsel herstellen zu können. Das verwendete DMEM-Medium hat eine Glukosekonzentration von 4,5 g/l. Dem Differenzierungsmedium war unter anderem 15 % FCS zugesetzt. Zum Versuchsstart wurde die Glukosekonzentration auf 4,1 g/l bestimmt. Bis zur 30. h hielt sie dieses Niveau, dann sankt die Glukosemenge stetig ab. Nach 78 h begann der Übergang von der exponentiellen Phase in die stationäre Phase. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Glukosekonzentration 1,8 g/l. In der stationären Phase verringerte sich die Geschwindigkeit des Glukoseverbrauchs. Nach 120 h verblieb eine Glukosekonzentration von 1,3 g/l im Nährmedium. Die Laktatkonzentration betrug zum Versuchsstart 0,3 g/l. Bis zur 20. h stieg sie langsam auf 0,4 g/l an. Von da an nahm die Laktatbildung verstärkt bis auf 1,5 g/l nach 78 h zu. Während den letzten 42 h des Versuches erhöhte sich die Laktatkonzentration noch um 0,2 g/l.

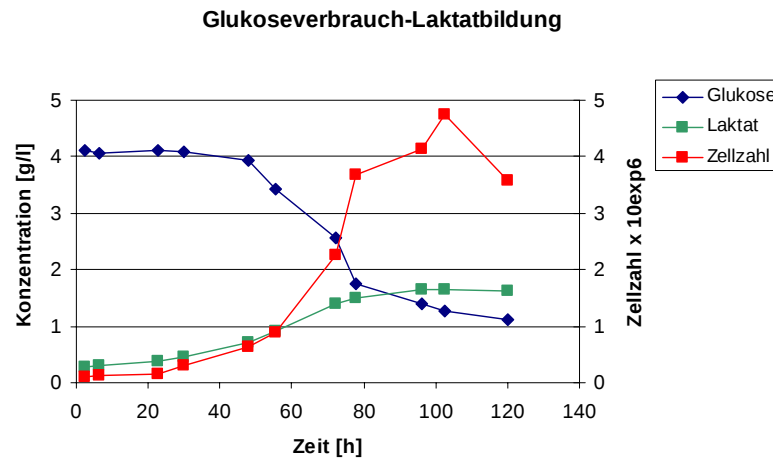


Abb. 4.3 Verlauf der Glukose-, Laktatkonzentration und der Zellzahl im Differenzierungsverlauf.

4.2 Suspendierungseigenschaften von Propellerrührer und Blattrührer

Propeller- und Blattrührer unterscheiden sich in ihren theoretischen Strömungseigenschaften grundlegend. Um die Suspendierungseigenschaften von dem industriell gefertigten Propellerrührer und dem handgefertigten Blattrührer zu vergleichen, wurden die Reaktoren bei 150 rpm mit 1 g roten Aluminiumteilchen (Flitter) befüllt. Je nach dem, wie stark die Durchmischung war, wurden unterschiedlich viele Flitterteilchen aufgewirbelt.

Die Suspendierungseigenschaften beider Rührertypen wurden bei vier verschiedenen Bedingungen getestet: zum einen wurde die Drehrichtung zwischen „mit“ und „gegen“ den Uhrzeigersinn gewechselt, zum anderen wurde der Abstand des Rührers zum Boden zwischen 5 mm und 7 mm variiert. Die Versuche wurden repräsentativ an Reaktor 2 und 5 durchgeführt.

Der Propellerrührer wirbelte bei einer Drehrichtung gegen den Uhrzeigersinn und einem Rührer-Bodenabstand von 5 mm im Vergleich zu den anderen Einstellvarianten die meisten Aluminiumteilchen auf (Abb. 4.4 A). Bei derselben Drehrichtung, aber einen vergrößerten Abstand zum Boden um 2 mm (Abb. 4.4 B), konnte der Propellerrührer nicht ganz so viel Flitter aufwirbeln. Nach dem Wechsel der Drehrichtung wurde nur noch vereinzelt Flitter aufgewirbelt. Auch hier konnte beobachtet werden, dass bei einem Abstand des Rührers zum Boden von 5 mm (Abb. 4.4 C) mehr Flitter aufgewirbelt wurde, als bei einem Abstand von 7 mm (Abb. 4.4 D). Der handgefertigte Blattrührer zeigte unabhängig von Drehrichtung und Bodenabstand eine konstant gute Durchmischung (Abb. 4.4 E-H). Jede der vier Einstellvarianten zeigte eine bessere Suspendierung als die beste Einstellung für den Propellerrührer.

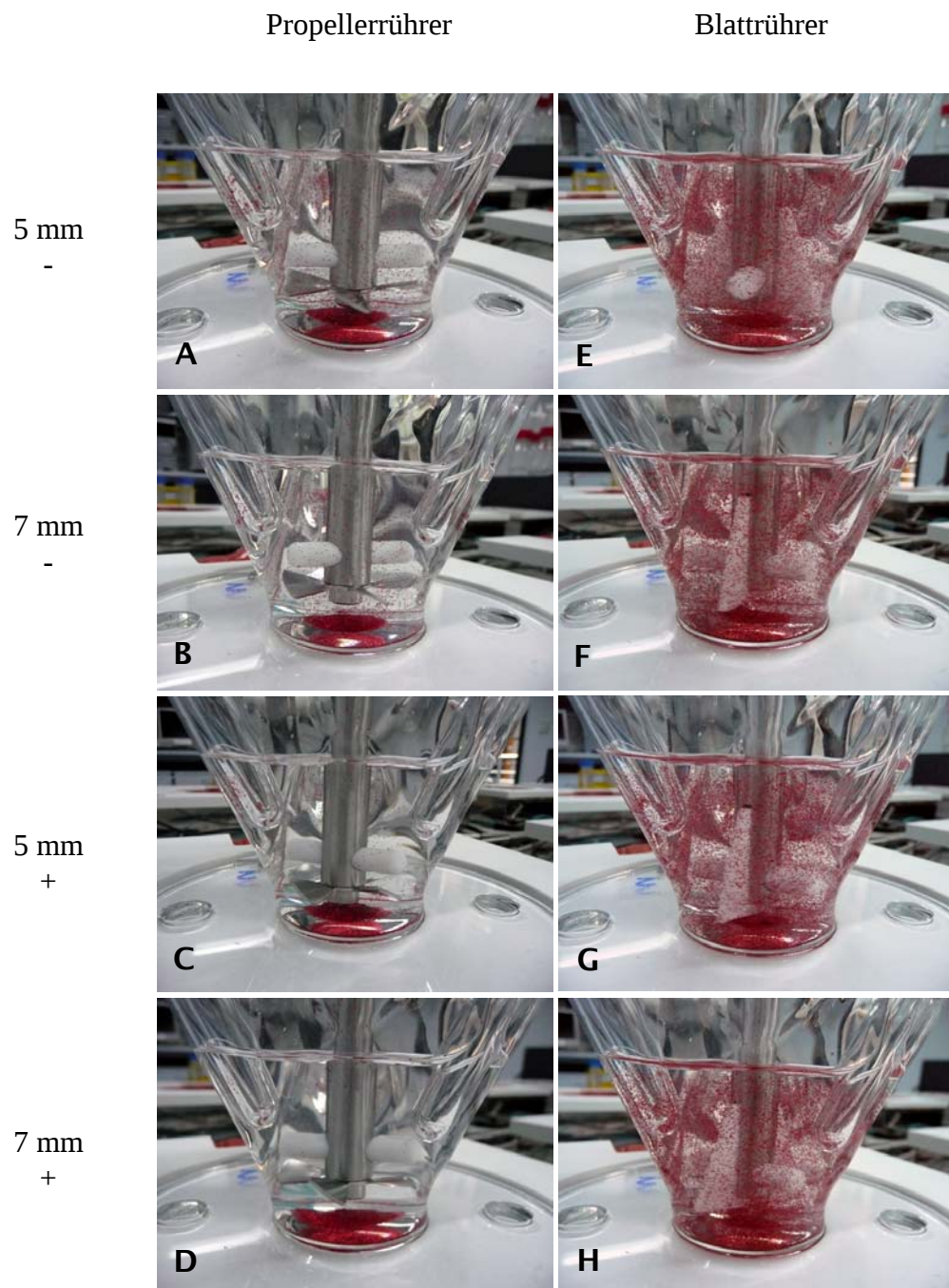


Abb. 4.4 Aufwirbeln von Flitterteilchen mit Propeller und Blattrührer. Die Drehrichtung wechselte zwischen „mit dem Uhrzeigersinn“ + und „gegen den Uhrzeigersinn“ -. Der Bodenabstand der Rührer variierte zwischen 5 mm und 7 mm. Der Blattrührer wirbelt deutlich mehr Flitter auf, als der Propellerrührer.

Am Boden beider Rührer waren kleine Flitterhäufchen zu erkennen. Die Aluminiumteilchen unter dem Blattrührer wurden wie in einem Strudel nach oben gesogen. Beim Propellerrührer jedoch verblieben die Teilchen unter dem Rührer und bildeten einen Art Kegel aus. Unabhängig vom Rührertyp waren hinter den Kunststoffröhrchen, welche anstatt der Sonden eingebaut

wurden, strömungsberuhigte Bereiche zu erkennen, in denen Aluminiumteilchen kaum bewegt wurden.

Für alle folgenden Versuche wurde die Drehrichtung gegen den Uhrzeigersinn gewählt und ein Rührer-Bodenabstand von 5 mm eingestellt.

4.3 Verweilzeitverfahren von CaCl_2 im Bioreaktor zur Totzonenanalyse

Das Verweilzeitverfahren sollte klären, ob sich Totzonen abhängig von Drehzahl oder vom Rührertyp im Reaktor ausbilden. Dafür wurde bei den Drehzahlen 70 rpm, 110 rpm und 150 rpm getestet. Als Analysesubstanz (Tracer) wurde CaCl_2 verwendet. Durch das Ausspülen eines Tracers aus dem Reaktor mit Aqua dest. kann über eine Massenbilanz auf vorhandene Totzonen geschlussfolgert werden. Dazu wurden kontinuierlich 40 ml/h Aqua dest. in den Reaktor hinein und die selbe Menge wieder aus dem Reaktor heraus gepumpt. Damit bleibt das Reaktorvolumen gleich, aber die Tracer-Konzentration wird stetig verringert.

4.3.1 Kalibrierkurve

Während eines Ausspülversuches wurde am Abfluss des Reaktors alle 10 min eine Probe genommen. Um die verbliebene Tracerkonzentration zu bestimmen, wurde eine Ca^{2+} -Bestimmung nach 3.2.1 durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung der Proben musste zunächst eine Kalibrierkurve erstellt werden. Zu diesem Zweck wurde die Extinktion von Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen 0,002 g/l und 0,04 g/l bei 650 nm bestimmt. Mithilfe der Geradengleichen konnte durch Messung der Extinktion der Proben die Ca^{2+} -Konzentration bestimmt werden. Der lineare Messbereich in dem das Lambert-Beersche Gesetz gilt, wurde in den Extinktionsgrenzen von 0 bis 0,3 ermittelt.

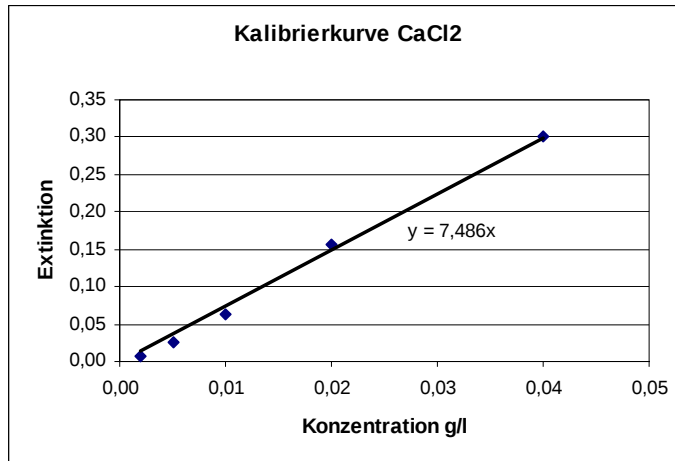


Abb. 4.5 CaCl₂-Kalibrierkurve für die Ca²⁺-Bestimmung.
Der lineare Bereich liegt zwischen einer Extinktion zwischen 0 und 0,3.

4.3.2 Tracer-Massenbilanz

Um eine Referenz für Messungen der Totzonen in den Bioreaktoren zu schaffen, wurde zunächst das Ausspülverhalten für den idealen Bioreaktor ohne Totzonen berechnet. Dazu muss zunächst die Gleichung zur Bestimmung der Ca²⁺-Konzentration (4.8) hergeleitet werden.

Der Massenfluss an CaCl₂ aus dem Reaktor wird mit $-\dot{m}_{aus}$ bezeichnet.

$$\frac{dm}{dt} = -\dot{m}_{aus} \quad (4.3)$$

Die Masse kann auch als Produkt der Ca²⁺-Konzentration c und dem Reaktorvolumen V_R beschrieben werden. In (4.3) eingesetzt ergibt sich:

$$\frac{d(c \cdot V_R)}{dt} = V_R \frac{dc}{dt} \quad (4.4)$$

Der rechte Term kann als das negative Produkt der Ca²⁺-Konzentration c und dem Volumenfluss $\dot{V}$ ausgedrückt werden:

$$V_R \frac{dc}{dt} = -c\dot{V} \quad (4.5)$$

Durch Umstellen nach den Integrationsvariablen dc und dt kann in den Grenzen vom Versuchsbeginn t_0 bis zum Messzeitpunkt t integriert werden.

$$\int_{c(t_0)}^{c(t)} \frac{dc}{c} = -\frac{\dot{V}}{V_R} \int_{t_0}^t dt \quad (4.6)$$

$$\ln \frac{c(t)}{c(t_0)} = -\frac{\dot{V}}{V_R} t \quad (4.7)$$

Nach dem Lösen der beiden Integrale und dem Umstellen nach der Ca^{2+} -Konzentration $c(t)$ zum Messzeitpunkt erhält man eine Exponentialfunktion zur Berechnung der Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit von der Anfangs- Ca^{2+} -Konzentration $c(t_0)$, dem von den Pumpen erzeugten Volumenstrom $\dot{V}$, dem Reaktorvolumen V_R und der bis zur Probenahme verstrichenen Zeit t .

$$c(t) = c(t_0) \cdot e^{-\frac{\dot{V}}{V_R} t} \quad (4.8)$$

Das Reaktorvolumen war mit 45 ml, der Volumenfluss mit 40 ml/h und die Tracer-Anfangskonzentration mit 1 g/l vorgegeben. Somit konnte mithilfe der Formel (4.8) die im Reaktor verbliebene Ca^{2+} -Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten berechnet werden. Die Tracer-Konzentration wurde im Abstand von 10 min berechnet. Trägt man die theoretisch ermittelte Tracer-Konzentration zu den gewählten Zeitpunkten auf, erhält man eine exponentiell abfallende Kurve. In das selbe Diagramm wurden die Messwerte der einzelnen Reaktoren eingetragen. Durch Auftragen des Logarithmus der Konzentration gegen die Zeit, zeichnet sich eine Gerade ab (Abb. 4.6).

Die allgemeine Geradengleichung lautet.

$$y = mx + n \quad (4.9)$$

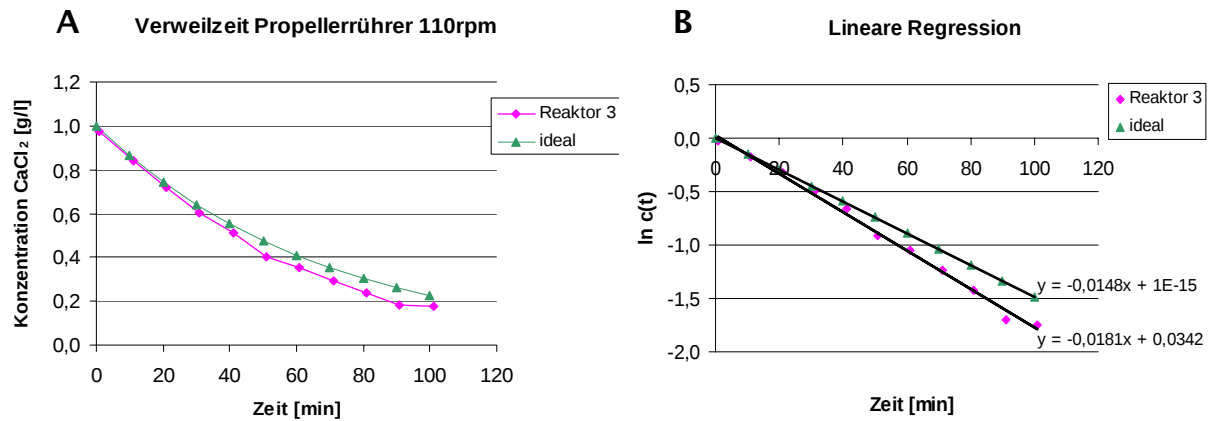


Abb. 4.6 Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration während des Ausspülens aus dem Reaktor. Das Ausspülen der CaCl_2 -Lösung aus dem Reaktor hat den Verlauf einer umgekehrten Exponentialfunktion (A). Durch Logarithmieren erhält man eine Geradengleichung (B). Je näher die Kurven an der grünen Ideallinee liegen, desto kleiner sind die Totzonen.

Das Diagramm B in Abbildung 4.6 gibt eine Geradengleichung für den Bioreaktor wieder. Der Anstieg m entspricht dem negativen Quotienten aus Volumenfluss $\dot{V}$ und Aktivvolumen V_A . Im allgemeinen Fall entspricht der Anstieg:

$$m = -\frac{\dot{V}}{V_A} \quad (4.10).$$

Durch das Umstellen der Gleichung nach dem Aktivvolumen entsteht:

$$V_A = -\frac{\dot{V}}{m} \quad (4.11)$$

Das Reaktorvolumen V_R setzt sich aus dem Aktivvolumen V_A und dem Totvolumen V_T zusammen. Damit errechnet sich das Totvolumen aus der Differenz von Reaktorvolumen und Aktivvolumen.

$$V_T = V_R - V_A \quad (4.12)$$

Der Anteil des Totvolumens A_T ist der Quotient aus dem Totvolumen und dem Reaktorvolumen.

$$A_T = \frac{V_T}{V_R} \quad (4.13)$$

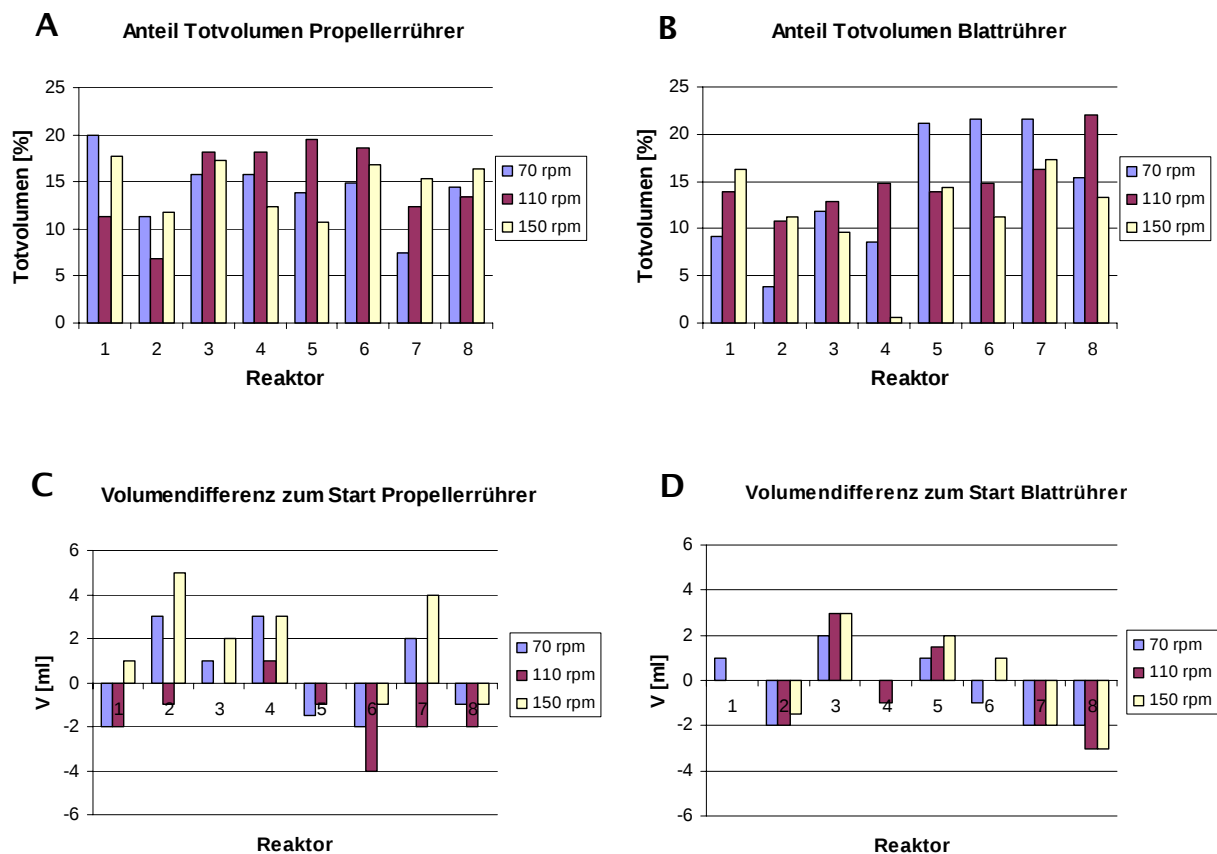


Abb. 4.7 Der Anteil des Totvolumens und die Volumendifferenz zum Startvolumen. In **A** wird der Anteil des Totvolumens in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl und dem jeweiligen Reaktor für den Propellerrührer dargestellt. **B** zeigt die entsprechenden Daten für den Blattrührer. In **C** zeigt die Volumendifferenz nach 100 min Durchfluss durch den Reaktor für den Propellerrührer. 0 ml entspricht dem Anfangsvolumen von 45 ml. **D** zeigt die entsprechenden Daten für den Blattrührer.

Die Berechnung der Totzonen wurde für jeden Reaktor für 70 rpm, 110 rpm und 150 rpm durchgeführt (Abb. 4.7 A, B). Nach jedem Lauf wurde das Volumen im Reaktor bestimmt, dabei sind Differenzen zum Startwert von 45 ml von bis zu 5 ml aufgetreten. (Abb. 4.7 C, D). Diese Differenzen sind in ungleichen Zufluss- oder Abflussmengen begründet. Wobei im Nachhinein nicht feststellbar war, ob bei einem gestiegenen Reaktorvolumen der Zufluss höher als 40 ml/h oder der Abfluss weniger als 40 ml/h war.

4.4 Einfluss von Propellerrührer und Blattrührer auf die Zelldifferenzierung

Um den Einfluss von Propeller- und Blattrührer auf die EB-Entwicklung bestimmen zu können, wurden zwei Experimente über vier Tage mit allen acht Reaktoren bei 110 rpm durchgeführt.

Der Propellerrührer zeigte erneut eine schlechtere Durchmischung als der Blattrührer. Zwar waren bereits nach zwei Tagen die ersten Zellaggregate mit bloßem Auge sichtbar, allerdings beschränkten sich diese auf den Raum unterhalb des Rührers. Ein Transport der Zellen nach oben konnte nur vereinzelt beobachtet werden. Die nach vier Tagen gebildeten Zellaggregate waren sehr groß und in ihrer Größenverteilung sehr inhomogen (Abb. 4.8).

Der Blattrührer hingegen erzeugte kleinere Aggregate. Er wirbelte die EBs auf, wodurch auch im oberen Reaktorraum EBs sichtbar waren.

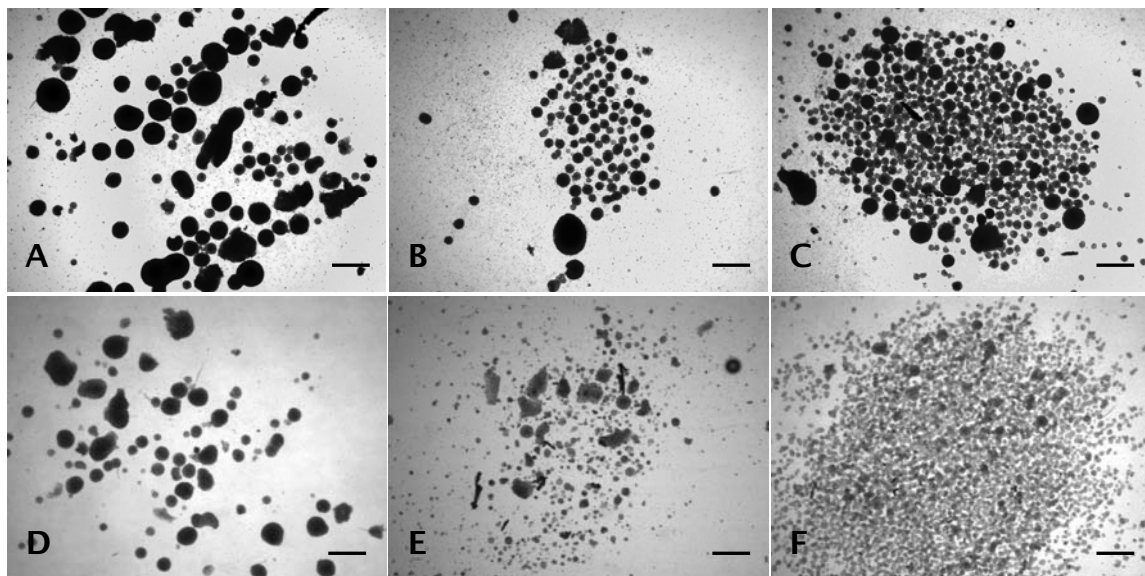


Abb. 4.8 EB-Formierung von Propeller und Blattrührer. Gezeigt sind die nach 4 Tagen Differenzierung im Reaktor entwickelten EB beim Propellerrührer (A-C) und Blattrührer (D-F). Die Bilder stammen von Reaktor Nr. 3 (A, D), Nr. 7 (B, E) und Nr. 8 (C, F). Beim Einsatz des Propellerrührers bewegten sich die EBs hauptsächlich unter dem Rührer. Der Blattrührer hingegen verteilte die EBs im gesamten Medium. Die Aufnahmen zeigen alle im Reaktor bei 110 rpm formierten EBs bei einer 12fachen Vergrößerung. Messbalken 1mm

Um das Ausmaß der eingeleiteten Differenzierung bestimmen zu können, wurden an Differenzierungstag 4 Proben zur RNA Isolation gewonnen. Über PCR wurde die Expression verschiedener Markergene untersucht und mit Werten verglichen, die aus Zellen einer Hängenden-Tropfen-Kultur ermittelt wurden (HD-Kontrolle) (Abb. 4.9). Die Pluripotenzmarker Oct 4 und nanog waren weitgehend unbeeinflusst von dem jeweiligen Rührertyp. Die Expression des 5T4, ein genereller Differenzierungsmarker, war beim Blattrührer im Vergleich zum Propellerrührer erhöht. Die Entwicklung in das Mesoderm, die durch Anstieg in der Brachyury-

(bra) Expression charakterisiert ist, war ebenfalls bei dem Blattrührer verstärkt. Der Endodermmarker AFP war nur in den PCR-Analysen der HD-Kontrollen sichtbar. Die Zellen aus dem Reaktor zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keine AFP-Expression. NF 68 ist ein Marker für ektodermale Zellen. Beim Propellerrührer war die NF 68-Expression im Reaktor im Vergleich zum Blattrührer erniedrigt. Der Apoptosemarker p53 war beim Propellerrührer im Vergleich zur HD-Kontrolle leicht erhöht. Der Einsatz des Blattrührers zeigte keine Veränderung in der p53-Expression im Vergleich zur HD-Kontrolle. Der aus der Glykolyse stammende Hausmarker GAPDH war in allen Ansätzen gleich stark exprimiert.

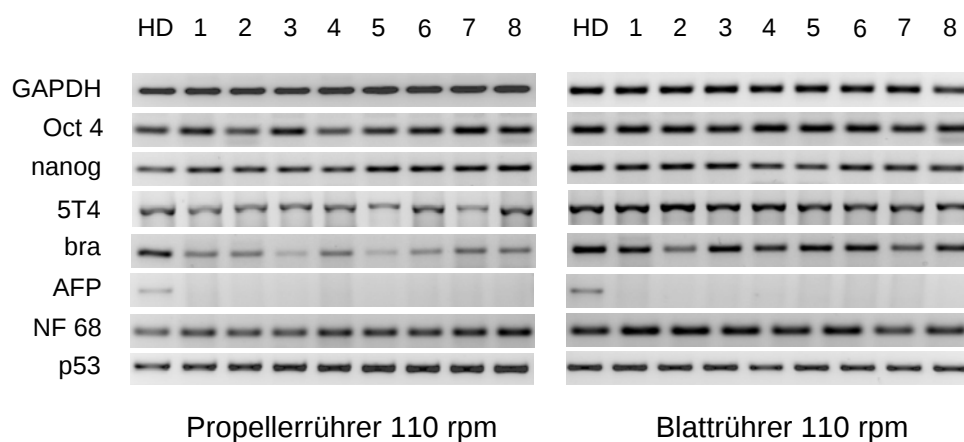


Abb. 4.9 Expressionsvergleich von Propellerrührer und Blattrührer. Gezeigt ist die Expressionsstärke verschiedener Markergene an Tag 4 bei einer Differenzierung im Bioreaktor. Getestet wurde die Zellentwicklung bei 110 rpm mit Propeller-, bzw. Blattrührer. Die Proben wurden von allen acht Reaktoren genommen und mit der HD-Kontrolle verglichen.

4.5 Einfluss der Drehzahl auf die EB-Formierung

Der Blattrührer zeichnete sich in den vorangegangenen Analysen durch seine guten Durchmischungseigenschaften aus, weshalb alle weiteren Zellversuche mit diesem Rührertyp durchgeführt wurden. Um eine ideale Drehzahl für die Differenzierung zu erreichen, wurden die EB-Formierungen und die Zellentwicklungen bei gleich bleibender Inokulationsdichte für die Drehzahlen 90 rpm, 110 rpm und 130 rpm bis Tag 4 getestet. Die Daten für den 110 rpm Ansatz wurden bereits für den Vergleich mit dem Propellerrührer herangezogen. Für jeden Ansatz wurden alle acht zur Verfügung stehenden Reaktoren verwendet. Die Differenzierung im Reaktor dauerte vier Tage.

4.5.1 Abhängigkeit der EB-Größe von der Drehzahl

Die entstandenen Zellaggregate unterschieden sich je nach Drehzahl in ihren Größen. Bei einer Drehzahl von 90 rpm entstanden sehr unterschiedliche EBs, deren Größe von 60 μm bis 400 μm reichte. Doch nicht ausschließlich die Drehzahl hatte Einfluss auf die EB-Formierung. Trotz identischer Drehzahl ergaben sich teilweise große Unterschiede zwischen den einzelnen Reaktoren. Einige zeigten sehr gleichmäßige EBs. In anderen Reaktoren hefteten sich die Zellen an der Glasoberfläche an, wodurch nur wenige EBs gebildet wurden. Um die EB-Größen in einer Verteilung darzustellen, wurden die vermessenen EBs einzelnen Klassen zugeordnet. Die Klassen laufen in 10 μm Schritten von 50 μm bis 300 μm . So zählen beispielsweise EBs $> 95 \mu\text{m}$ und $\leq 105 \mu\text{m}$ zur Klasse 100 μm (Abb. 4.10).

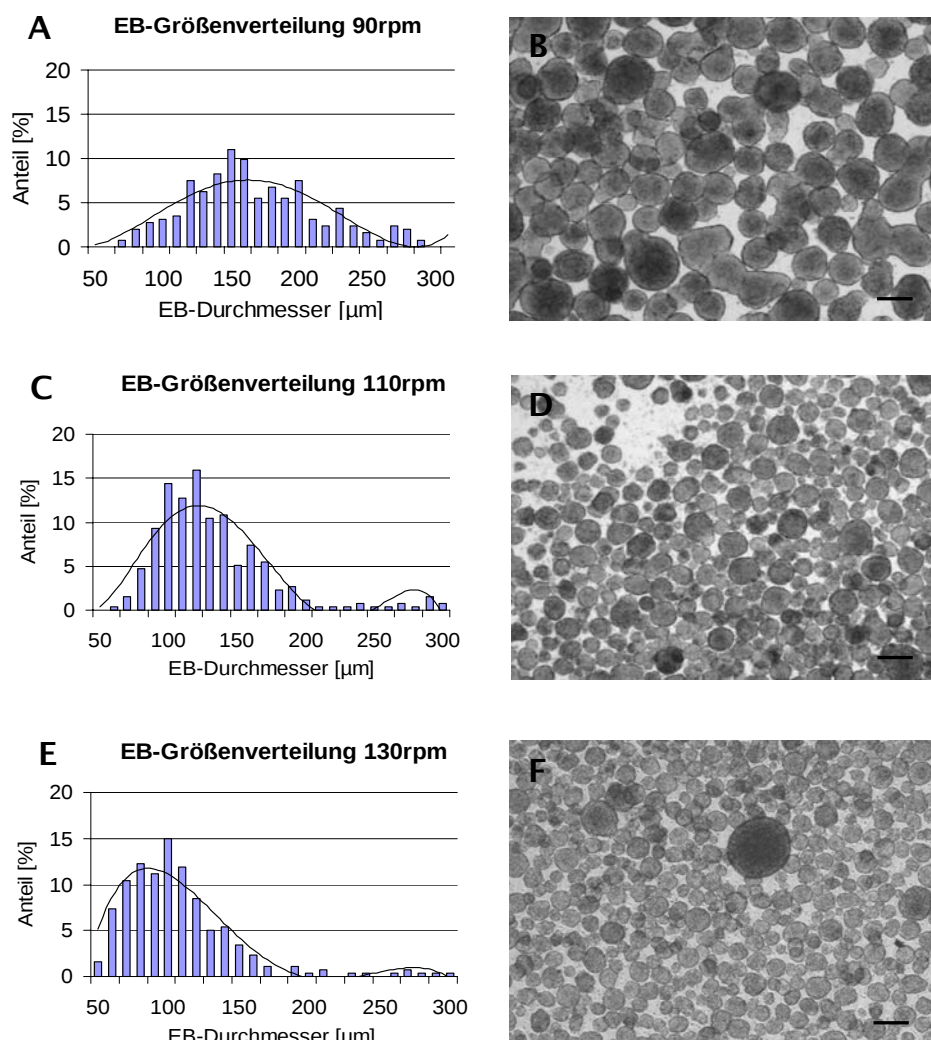


Abb. 4.10 Vergleich der EB-Formierung in Abhängigkeit von der Drehzahl. Je nach Drehzahl bilden sich nach vier Tagen Differenzierung im Reaktor unterschiedlich große EBs aus (Bilder Reaktor 8). **B:** 90 rpm Ø 165 μm , **D:** 110 rpm Ø 125 μm , **F:** 130 rpm Ø 100 μm . Vergrößerung 50x. Die EB-Größenverteilung ist bei 90 rpm (**A**) breiter gezogen. Bei 110 rpm (**C**) und 130 rpm (**E**) gibt es weniger ausgeprägte Größenunterschiede. Messbalken 200 μm .

Die Abbildung 4.10 (A, C, E) zeigt die Verteilung der EB von 50 μm bis 300 μm für die drei getesteten Drehzahlen. Jedes Diagramm besitzt einen Stichprobenumfang von 250 bis 280 Messwerten. Zur Bestimmung der mittleren EB-Größe, wurden die Werte von Beginn bei 50 μm bis zum ersten Minimum im Diagramm verwendet. Daraus ergibt sich eine mittlere EB-Größe von 165 μm für 90 rpm (50 μm – 270 μm), 145 μm für 110 rpm (50 μm – 210 μm) und 100 μm für 130 rpm (50 μm – 200 μm). Die meisten ausgezählten EBs waren für 90 rpm der Klasse 150 μm zugeordnet. Bei 110 rpm liegt das Maximum bei 120 μm und für 130 rpm bei 100 μm . An der flacheren und breiteren Verteilungskurve des 90 rpm Ansatzes ist zu erkennen, dass die EB-Formierung nicht so homogen wie bei 110 rpm und 130 rpm verlief. Die durchschnittliche EB-Größe von aus der Hängenden-Tropfen-Kultur stammenden EBs liegt zwischen 350 μm und 400 μm .

4.5.2 Drehzahlabhängige Genexpression

Um zu klären ob die Drehzahl einen Einfluss auf die frühe Differenzierung von ES-Zellen hat, wurden die folgenden Expressionsanalysen durchgeführt. Für 90 rpm zeigte sich der Pluripotenzmarker Oct 4 bei den Reaktoren etwas stärker ausgeprägt als bei der HD-Kontrolle. Nanog war hingegen nicht von der Drehzahl beeinflusst. Beide Pluripotenzmarker wiesen bei 110 rpm und 130 rpm keine Veränderungen auf und waren gleich stark exprimiert. Der Differenzierungsmarker 5T4 war bei 90 rpm deutlich geringer exprimiert als bei den beiden höheren Drehzahlen. Die bra-Expression blieb auf gleich hohem Niveau, sie war unabhängig von der Rührergeschwindigkeit. Die Endodermentwicklung, welche durch AFP beschrieben ist, zeigte sich in allen drei Ansätzen unterschiedlich. Bei 90 rpm und 110 rpm war AFP noch in der Kontrolle nachweisbar, für 130 rpm war sie es allerdings nicht mehr. Die Reaktoren 2 bis 4 im 90 rpm Versuch wiesen ebenfalls eine schwache AFP-Expression auf. Auch die NF 68-Expression variierte bei 90 rpm. Für die Ansätze mit 110 rpm und 130 rpm war das Expressionsniveau gleich hoch und etwas stärker ausgeprägt als bei 90 rpm. Der Apoptose Marker p53 lag in seiner Expression bei 90 rpm und 110 rpm auf gleichem Niveau. Der Einsatz des Blattrührers mit 130 rpm erzeugte allerdings im Vergleich zur HD-Kontrolle eine erhöhte p53-Expression in den Reaktoren.

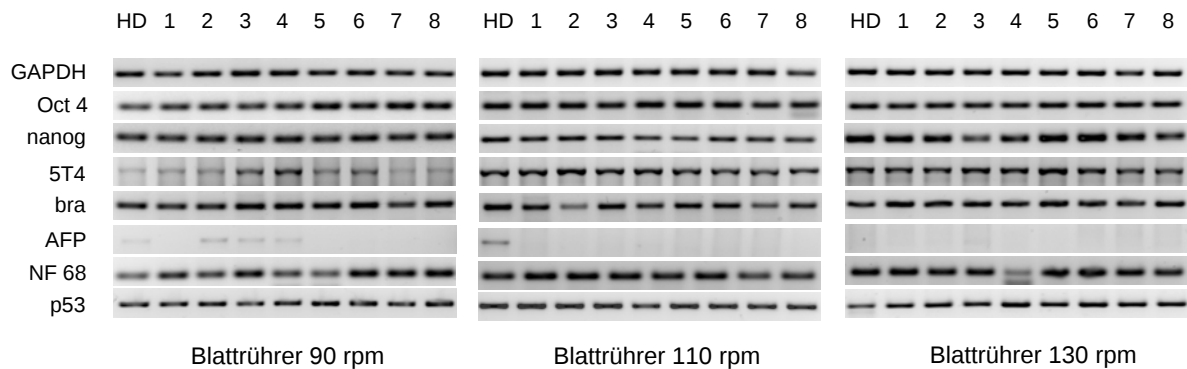


Abb. 4.11 Expressionsvergleich bei verschiedenen Drehzahlen für den Blattrührer. Gezeigt ist der Einfluss der Drehzahlen 90 rpm, 110 rpm und 130 rpm auf die Expressionsstärke verschiedener Markergene an Tag 4 bei einer Differenzierung im Bioreaktor. Verwendet wurde ein Blattrührer. Die Proben wurden von allen acht Reaktoren genommen (1-8) und mit einer hängenden Tropfenkontroller (HD) verglichen.

4.6 Osteoblastendifferenzierung bis Tag 28

Die an Tag 4 der Differenzierung durchgeführten Expressionsanalysen gaben Aufschluss über die frühe Prägung der embryonalen Stammzellen. Um die Genesis zu Osteoblasten bewerten zu können, musste eine Differenzierung bis zum Endpunkt an Tag 28 durchgeführt werden. Die ersten fünf Differenzierungstage verblieben die Zellen bei 110 rpm im Bioreaktor (im Weiteren als BR abgekürzt), anschließend wurden sie wie in 3.1.6 beschrieben in eine Adhärenzkultur mit Osteoblastendifferenzierungsmedium überführt.

4.6.1 Entwicklung der Zellen

Reaktor 6 heizte sich wegen eines Einstellungsfehlers zu Versuchsbeginn auf 50°C. Er wurde für den folgenden Versuch nicht berücksichtigt. Die EBs in den Reaktoren 2, 3, 5 und 8 waren nach fünf Tagen gleichmäßig ausgebildet und wurden zu einem Ansatz vereint. Sie werden vereinfachend mit einem + dargestellt. Die aus Reaktor 1, 4 und 7 stammenden EBs waren in ihrer Größe und in ihrem Aussehen sehr ungleich. Sie wurden ebenfalls nach fünf Tagen vereint und werden mit einem - dargestellt (Abb. 4.12). Diese Unterscheidung wurde getroffen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen EB-Formierung und Zelltypentwicklung aufzuklären. Als Kontrolle wurde parallel zum Reaktorstart eine Hängende-Tropfen-Differenzierung gestartet. Ab dem fünften Tag wurde ein Teil der Zellen in Kontrolldifferenzierungsmedium bzw. in Osteoblastendifferenzierungsmedium weiter differenziert. Die Zellen wurden dazu in statischen

24-Kavitäten- und 96-Kavitätenplatten ausgesät, allerdings lösten sich die Zellen in den 24-Kavitätenplatten ab Tag 15 ab. Aufgrund dessen stand kein Material für eine Expressionsanalyse zur Verfügung. Die Zellen in den 96-Kavitätenplatten blieben adhärent. Eine Ca^{2+} -Bestimmung und die Alizarinrot S Färbung wurden mit den verbliebenen Zellen durchgeführt.

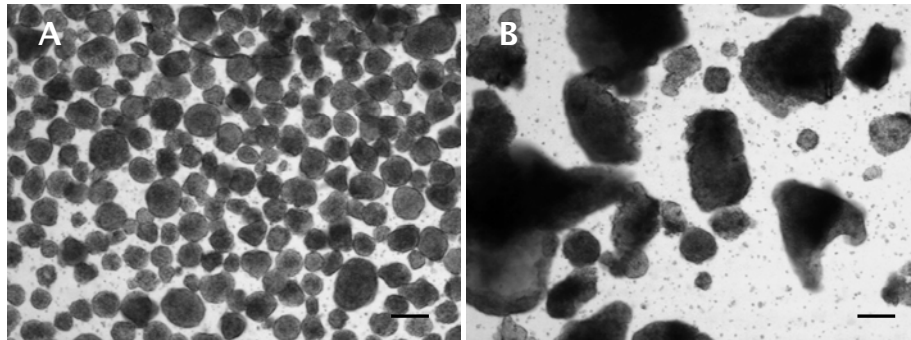


Abb. 4.12 Entwicklungsunterschiede bei der EB-Formierung. Gezeigt sind unterschiedlich gut formierte EBs an Tag 5 bei einer Drehzahl von 110 rpm. Für die Differenzierung bis Tag 28 wurde zwischen gleichmäßig formierten EBs (**A**: Reaktor 5) und ungleichmäßig formierten EBs (**B**: Reaktor 4) unterschieden. Vergrößerung 50x. Messbalken 200 μm .

Anfänglich konnten keine Unterschiede zwischen den Ansätzen ausgemacht werden. Ab Tag 14 waren die ersten Differenzen zwischen den Ansätzen sichtbar. Bei der Verwendung des Osteoblastendifferenzierungsmediums (abgekürzt Osteo.) zeigten sich erste schwarze Verfärbungen auf dem Zellrasen, welche auf eine beginnende Mineralisierung hindeuten. Diese waren besonders im Ansatz BR Osteo. + deutlich und liefen für HD Osteo. und BR Osteo. - etwas verzögert ab. Diese Tendenz setzte sich während der gesamten Zellentwicklung fort. Zum Differenzierungsende wies der Ansatz BR Osteo. + die stärkste Mineralisierung auf. Die jeweiligen mitgeführten Kontrollen zeigten vereinzelt dunklere Stellen, diese waren besonders im Ansatz BR Kontr. - aufgefallen (Abb. 4.13).

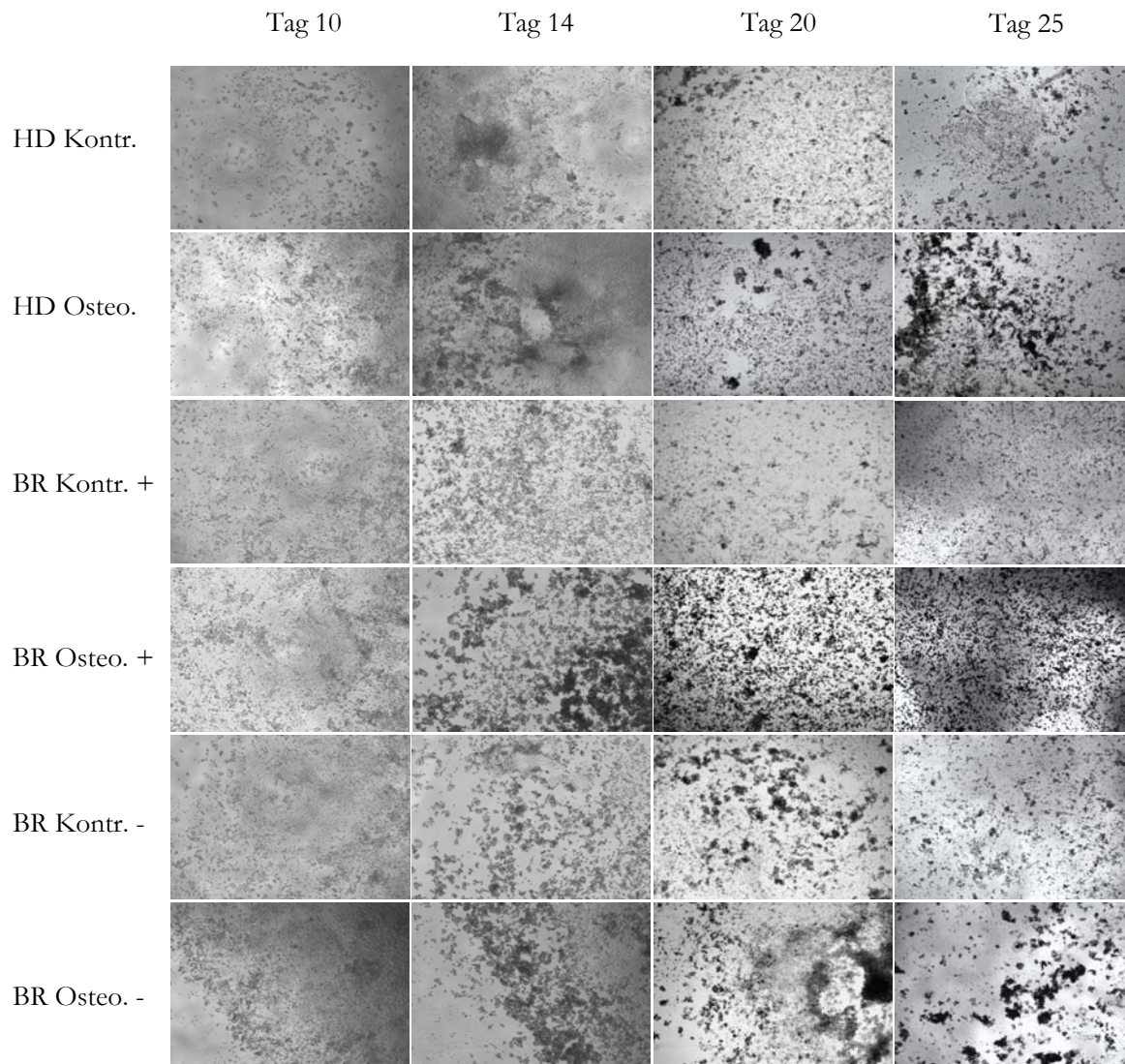


Abb. 4.13 Mineralisierung von ES-Zellen. Gezeigt sind Bilder im Verlauf einer Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Osteoblastenzellen. Verglichen wurden aus hängenden Tropfen stammende Zellen (HD) mit Zellen die sich für fünf Tage im Bioreaktor (BR) bei 110 rpm entwickeln konnten. Die aus dem Reaktor stammenden Zellen wurden in gut formierte (+) und schlecht formierte (-) *embryoid body* (EB) unterschieden. Die Bilder wurden zwischen dem 10 und 25 Differenzierungstag mit 50facher Vergrößerung aufgenommen.

4.6.2 Kalzifizierung der Matrix

Zum Differenzierungstag 28 wurden je Ansatz fünf RIPA-Lysate genommen. Insbesondere bei den stark mineralisierten Ansätzen fiel bereits mit bloßem Auge auf, dass Großteile der Matrix auf den Platten verblieben waren. Die restliche Ca^{2+} -Matrix wurde daher mit 1 M Salzsäure aufgelöst und die Ca^{2+} -Konzentration der HCl-Lysate ebenfalls bestimmt.

Die Kontrollansätze wiesen nur geringe Ca^{2+} -Mengen auf (Abb. 4.14). Auffällig war, dass im RIPA-Lysat aller drei Kontrollen mehr Kalzium messbar war als in dem HCl-Lysat. Im RIPA-

Lysat wurde die Ca^{2+} -Konzentration für HD Kontrolle auf 0,7 mg/l sowie für BR Kontrolle + und BR Kontrolle - auf 0,9 mg/l bestimmt. Im HCl-Lysat lag die Ca^{2+} -Konzentration für HD Kontrolle bei 0,2 mg/l, für BR Kontrolle + bei 0,5 mg/l und für BR Kontrolle - bei 0,6 mg/l. Für die Ansätze mit Osteoblastendifferenzierungsmedium verhielt es sich im umgekehrten Sinne. Hier wiesen die HCl-Lysate die größere Ca^{2+} -Menge auf. Für HD Osteo. lag die durchschnittliche Ca^{2+} -Konzentration bei 16,1 mg/l, für BR Osteo. + bei 48,8 mg/l und für BR Osteo. - bei 19,4 mg/l im HCl-Lysat. Für das RIPA-Lysat ergaben sich Werte von 6,6 mg/l für den Ansatz HD Osteo, 12,7 mg/l für BR Osteo + und 13,0 mg/l für BR Osteo -. Durch das Aufsummieren der gemessenen Konzentration von RIPA- und HCl-Lysat ergibt sich eine gesamte Ca^{2+} -Konzentration. Für BR Osteo. + liegt dieser Wert bei 61,5 mg/l. Die zweit höchste Ca^{2+} -Konzentration wurde mit 32,4 mg/l für den BR Osteo - bestimmt. Die niedrigste Ca^{2+} -Konzentration der Osteoblastendifferenzierungsansätze entstand aus den von der Hängenden-Tropfen-Kultur stammenden Zellen (HD Osteo) mit 22,7 mg/l.

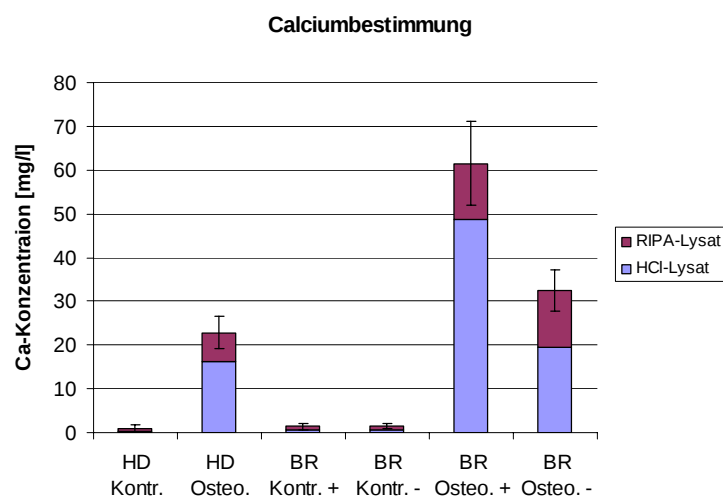


Abb. 4.14 Kalzifizierung der Matrix. Die analysierten Proben stammen von einer Osteoblasten-differenzierung von Tag 28. Die stärkste Kalzifizierung wurde im Ansatz BR Osteo. + (Zellen aus Reaktor, 110 rpm, gut formierte EBs) gefunden. Der angegebene Standardfehler beruht auf fünf Messwerten.

4.6.3 Alizarinrot S Färbung der Kalziummatrix

Die Alizarinrot S Färbung wurde für die HD-Ansätze und die BR-Ansätze mit gleichmäßiger EB-Formierung (+) durchgeführt. Die Zellen des Reaktoransatzes mit schlecht formierten Zellen lösten sich trotz Fixierung ab. Zur klareren Auswertung wurden die Bilder an einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Im roten Kanal zeigt nur das Alizarinrot eine Fluoreszenz. In keinem der beiden Kontrollansätze ließ sich eine Färbung nachweisen. Abbildung 4.15 zeigt, dass im BR Ostro + Ansatz mehr und deutlich stärker mineralisierte Zellen vorhanden waren, als bei dem entsprechende HD Osteo. Ansatz

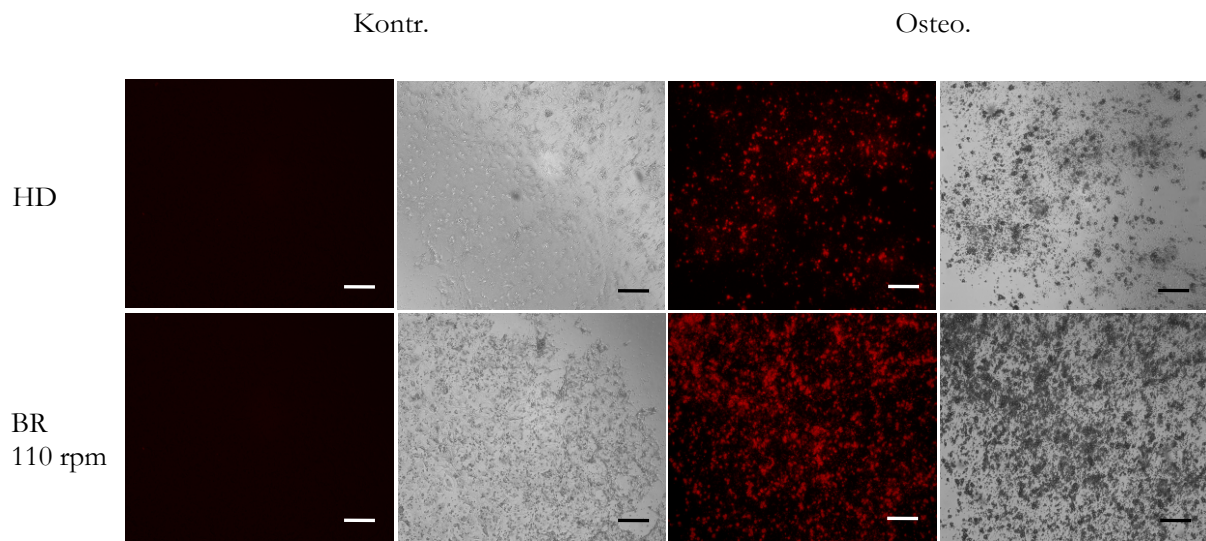


Abb. 4.15 Alizarinrot S Färbung der Kalziummatrix. Roter Kanal $\lambda = 650$ nm. Belichtung 450 ms. Vergrößerung 100x. Messbalken 100 μ m.

5 Diskussion

5.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Wachstumsparameter μ und t_d

Das Experiment diente dem Vergleich der Wachstumsraten der ES D3-Zellen in statischer Adhärenzkultur und Suspensionskultur und damit der Charakterisierung des Suspensionsbioreaktorsystems. Zusätzlich wurde der Einfluss des pH-Wertes des Mediums auf die Wachstumsrate der Zellen untersucht. Dazu wurde der pH-Wert über fünf Kulturtage konstant gehalten (konstanter Ansatz). In einem zweiten Ansatz wurde der pH-Wert der Kultur nicht reguliert (variabler Ansatz).

Die Ergebnisse der pH-Wert-Messung über fünf Kulturtage in statischer Kultur zeigten beim variablen Ansatz ein Absinken des pH-Wertes von 8,3 an Kulturtag 0 bis auf einen Wert von 6,7 am Kulturtag 5. Da während dem gesamten Kultivierungszeitraum kein Medienwechsel durchgeführt wurde, erklärt sich das starke Absinken durch eine Anhäufung von Stoffwechselprodukten und organischen Säuren. Laktat, das Endprodukt der Glykolyse, stellt ein solches Stoffwechselendprodukt dar. Diese Carbonsäure kann nur mit ausreichend Sauerstoff metabolisiert werden. Fehlt dieser, kommt es zur Übersäuerung. Messungen zeigten, dass sich die Laktatkonzentration innerhalb der fünf Versuchstage von 0,3 g/l auf 1,8 g/l versechsfachte. Das verwendete Medium verfügt zwar über ein Carbonat-Puffer-System, welches aber nur begrenzt gegenpuffern kann.

Um den pH-Wert des konstanten Ansatzes auf dem Ausgangsniveau von pH 8,3 zu halten, wurde etwa alle 12 Stunden mit Natronlauge gegentitriert. Da die pH-Korrektur nur phasenweise erfolgte, kann nicht von einem stetig konstanten pH-Wert gesprochen werden. Tatsächlich wurde die zugegebene Natronlauge schnell von den entstehenden Säuren neutralisiert, sodass im Mittel der pH-Wert des konstanten Ansatzes im Laufe der Kultivierung nur wenig über dem des variablen Ansatzes lag.

Die ermittelte spezifische Wachstumsrate des konstanten Ansatzes ist mit $0,057 \text{ h}^{-1}$ höher als die des variablen Ansatzes mit $0,054 \text{ h}^{-1}$. Daraus resultierte für die Zellen im konstanten Ansatz auch eine kürzere Verdopplungszeit von 12,2 h im Vergleich zu 12,8 h des variablen Ansatzes. Die Ergebnisse zeigen somit einen Einfluss des pH-Wertes des Mediums auf die Wachstumsrate der Zellen. Ein gleichmäßiger pH-Wert bedeutet auch ein konstanteres Milieu und somit bessere Wachstumsbedingungen für die Zellen. Es kann davon ausgegangen werden, dass ein kontinuierlich konstant gehaltener pH-Wert, wie es mit dem Bioreaktor möglich wäre, einen noch deutlicheren Effekt auf das Wachstum zeigt.

In einem zweiten Experiment sollte, vergleichend zur statischen Kultur, die Wachstumsrate und die Entwicklung des pH-Wertes im Suspensionsbioreaktor untersucht werden. Im Verlauf der Experimente wurden Unregelmäßigkeiten in der Baugleichheit der verwendeten Bioreaktoren sichtbar. Dies spiegelte sich in einer ungleichmäßigen Entwicklung der Zellaggregate und somit auch der Wachstumsrate der Zellen in den verschiedenen Bioreaktoren wider. Eine abschließende Bestimmung der Wachstumsrate der Zellen und die Auswertung der pH-Wert Entwicklung des Mediums in den Bioreaktoren konnte nicht erstellt werden. Cormier *et al.* ermittelte für proliferierende murine ES-Zellen im Suspensionsbioreaktor bei 100 rpm eine Wachstumsrate von $0,042 \text{ h}^{-1}$ und eine Verdopplungszeit von 16,4 h [22]. Den Ergebnissen von Fok *et al.* zufolge liegen die Verdopplungszeiten für murine ES-Zellen im Expansionsbioreaktor zwischen 24h und 39 h [21]. Durch die Verwendung von Glasträgern konnte die Verdopplungszeit auf 14 h - 17 h reduziert werden. Damit liegen die Wachstumsraten für den Bioprozess unter denen in der Adhärenzkultur. Allerdings wurden die Zellen in Adhärenzkultur differenziert und die Zellen im Bioreaktor expandiert, womit ein Vergleich der Wachstumsparameter schwierig ist.

5.2 Der Verlauf des Zellwachstums in Phasen

Anhand der Wachstumskurve konnte das Wachstum in die lag-Phase von 0 h bis 23 h, in die exponentielle Phase von 23 h bis 78 h und in die stationäre Phase von 78 h bis 120 h eingeteilt werden. Diese zeitliche Einteilung der Wachstumsphasen wurde auch durch den Verlauf der Überlebensrate, dem pH-Wert, der Glukose- und Laktatkonzentration bestätigt. In der lag-Phase erhöhte sich die Überlebensrate der Zellen, eine Abnahme der Glukosekonzentration oder des pH-Wertes war hingegen nicht oder nur schwach zu verzeichnen. Diese Phase zeichnet sich durch die Anpassung der Zellen an die neuen Bedingungen aus. In dieser Zeit befindet sich der Zellzyklus in der Ruhephase und die Zellen weisen nur eine geringe Stoffwechselaktivität auf, was der geringe Glukoseverbrauch und die geringe Laktatbildung zeigen. In der exponentiellen Phase erreichen die Zellen ihre höchste Wachstumsgeschwindigkeit. In dieser Zeit beginnen der pH-Wert und die Glukosekonzentration stark zu sinken. Die Laktatkonzentration nimmt hingegen sehr schnell zu. Der erhöhte Glukoseverbrauch lässt sich auf den angestiegenen Nährstoffbedarf infolge des Wachstums zurück führen. Mit einem steigenden Metabolismus erhöht sich auch die Laktatbildung, welche den pH weiter absenkt. Mit der ansteigenden Zellzahl werden die Nährstoffe weniger, Stoffwechselendprodukte häufen sich an und der Wachstumsraum begrenzt sich. Diese Punkte führen zum Übergang in die stationäre Phase. In ihr herrscht der Erhaltungsstoffwechsel vor, die Zellen teilen sich kaum mehr. Anhand des langsam verringerten

Glukoseverbrauchs und der verringerten Laktatbildung ist dieser Übergang ebenfalls zu beobachten. Während der stationären Phase nimmt der pH-Wert weiterhin stark ab. Das kann zum einen über den noch steigenden Laktatwert, zum anderen durch absterbende Zellen, die zusätzlich das Medium versäuern, erklärt werden. Die Absterbephase wurde in diesem Versuch nicht beobachtet. Sie setzt ein, sobald der Anteil an sterbenden Zellen den Anteil an sich noch teilenden Zellen übersteigt.

5.3 Vergleich zwischen Propeller und Blattrührer

Das von der Firma DASGIP AG bezogene Reaktorsystem befindet sich aktuell noch in der Entwicklungsphase. Die hier vorgestellten Rührertypen wurden von der DASGIP AG entworfen. Der getestete Blattrührer wurde in Eigenarbeit aus Teflon gefertigt. Der von der DASGIP AG gestellte Propellerrührer besteht wie die Rührerwelle aus Edelstahl. Für die zwei Rührertypen wurden jeweils verschiedene Rührerwellen verwendet.

Beide Materialien eignen sich grundsätzlich für den Einsatz im Bioreaktor. Das chemisch sehr widerstandsfähige Material Teflon bot sich an, weil es leicht zu bearbeiten ist und sich durch eine haftarme, biokompatible Oberfläche auszeichnet. Teflon ist auch unter dem Kurzzeichen PTFE (Polytetrafluorethylen) bekannt. In der Medizin wird Teflon dank seiner speziellen Eigenschaften seit einigen Jahren für Gefäßprothesen [32] und als Teil von Gelenkimplantaten [33] eingesetzt. Edelstahl besitzt neben seiner chemischen Beständigkeit auch eine hohe physikalische Belastbarkeit. Der Propellerrührer wird anders als der Blattrührer mit einer Schraube an der Rührerwelle befestigt. In das untere Ende der Blattrührerwelle ist eine Aussparung eingearbeitet, in die der Rührer geschoben wird. Er wird lediglich mit dem Rühranker fixiert. Diese Methode erwies sich in den Versuchen als ausreichend stabil.

Da sämtliche Experimente unter gleichen Voraussetzungen durchgeführt werden sollten, mussten zunächst beide Rührer in ihrem Mischverhalten und in ihrem Einfluss auf die Zellen verglichen werden. Mit dem Ziel für die folgenden Versuche einen der beiden Rührer auszuwählen. Dazu wurde zunächst das Strömungsverhalten mithilfe von Aluminiumflitterteilchen bewertet.

In dem Versuch wurde die Drehrichtung sowie der Abstand des Rührers zum Gefäßboden variiert. Aufgrund seiner Geometrie erzeugt der Propellerrührer eine tangentiale Strömung entlang der Rührerwelle, dabei unterscheidet man je nach Drehrichtung zwei Strömungsbilder. Bei einer Drehrichtung gegen den Uhrzeigersinn, sollte sich eine aufsteigende Strömung zum Reaktorkopf einstellen. Dieser Effekt konnte allerdings nicht beobachtet werden. Es wurden nur

sehr vereinzelt Flitterteilchen aufgewirbelt. Die Drehrichtung mit dem Uhrzeigersinn erzeugte eine Strömung gegen den Reaktorboden. Mit dieser Drehrichtung und einem verkürzten Abstand zum Reaktorboden (5 mm) wurde das beste Strömungsverhalten für diesen Rührertyp ausgemacht. Als zweiter Bodenabstand wurden 7 mm getestet. Ein größerer Abstand zum Boden bewirkte ein Abreißen der Strömung und somit eine geringere Durchmischung des Reaktorinhaltes.

Betrachtet man den verwendeten Propellerrührer, so fällt auf, dass die einzelnen Rührerblätter sich zur Mitte hin verjüngen und der Neigungswinkel gegen Null geht. Dadurch verringert sich der Leistungseintrag gegenüber einem gleichmäßig bis zur Rührermitte ausgeformten Rührer mit einem konstanten Neigungswinkel.

Der Blattrührer hingegen besitzt eine große Rührfläche, die einen größeren Leistungseintrag zulässt. Ein Blattrührer erzeugt radiale Strömungen, d.h. eine Strömung um die Rührerwelle herum. Verläuft die Drehrichtung im Uhrzeigersinn, so bewegt sich auch das Medium mit dem Uhrzeigersinn. Um das Mitrotieren des Reaktorinhaltes zu reduzieren, werden in größeren Reaktoren spezielle Strombrecher eingesetzt. In dem verwendeten Modell erfüllen die in den Reaktor eingebrachten Sonden diese Aufgabe und sorgen für zusätzliche Verwirbelungen. Unabhängig von Drehrichtung und Bodenabstand zeigte der Blattrührer eine gleichmäßige gute Durchmischung im Reaktorraum. Damit hat er gegenüber dem Propellerrührer die klar besseren Suspendierungseigenschaften. Sämtliche folgende Experimente wurde mit dem Blattrührer durchgeführt.

5.4 Totzonenbestimmung für die Reaktoren

Unter Totzonen versteht man strömungsarme oder strömungsberuhigte Bereiche. Solche Totzonen waren im Flitterversuch zwischen den Sonden und der Reaktorwandung, wie auch unter den Rührern am Boden zu beobachten. In diesem Experiment wurde die Ausprägung der Totzonen in den einzelnen Bioreaktoren untersucht. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Kultivierung von Zellen in verschiedenen Bioreaktoren sicher zu stellen, sollten die Totzonen in allen Reaktoren gleich groß sein. Das Verweilzeitverfahren sollte klären, ob sich Totzonen abhängig von Drehzahl oder Rührertyp ausbilden. Dafür wurde bei den Drehzahlen 70 rpm, 110 rpm und 150 rpm getestet. Für die verwendeten Reaktoren sollten die Totzonen bei $15 \% \pm 5 \%$ liegen.

Grundvoraussetzung der ausgewählten Analysemethode war ein konstantes Reaktorvolumen sowie ein konstant großer Zu- und Abfluss. Mit diesen Vorgaben konnte eine Massenbilanz aufgestellt werden [34]. Mithilfe der Tracerbilanz wurde zunächst das ideale Ausspülverhalten für

ein Reaktorvolumen von 45 ml und einem Zu- und Abfluss von 40 ml/h ermittelt. Aus den ermittelten Messwerten des Ausspülversuches konnte eine Geradengleichung abgeleitet werden, mit deren Hilfe das Totvolumen berechnet werden konnte. Wie sich nach den Versuchen herausstellte, blieb das Reaktorvolumen nicht konstant bei 45 ml. Es wurden Abweichungen nach oben und unten vom Ausgangsvolumen von bis zu 5 ml festgestellt. Diese Toleranzen lassen sich mit ungenauen Fördermengen erklären. Im Nachhinein konnte aber nicht geklärt werden, ob eine Erhöhung des Reaktorvolumens auf einem erhöhten Zufluss oder einem verminderten Abfluss beruhte. Wären sowohl Volumenzustrom als auch Abstrom reduziert, so bliebe zwar das Reaktorvolumen konstant, aber die Tracerlösung würde verzögert ausgespült. In der Auswertung würde das für diesen Fall eine größere Totzone bedeuten. Ein exakter Vergleich der Totzonen der einzelnen Bioreaktoren war somit nicht möglich. Als mögliche Ursache für die unterschiedlichen Fördermengen könnten die verwendeten Pumpschläuche gelten. Das Zu- und Abpumpen wurde mit kalibrierten Peristaltikpumpen realisiert. Das Fördervermögen dieser Pumpen ist maßgeblich mit dem verwendeten Schlauchdurchmesser verbunden. Je größer der Durchmesser, desto mehr Volumen kann bei einer Kolbenumdrehung gefördert werden. Die verwendeten Schläuche hatten einen Innendurchmesser von 0,25 mm und sind damit für Fördervolumen von 0,1 bis 40 ml/h geeignet. Da mit 40 ml/h das Maximum an Fördervolumen für die verwendeten Schläuche erreicht ist, könnten damit die ungenauen Fördermengen erklärt werden. Eine Verwendung von Schläuchen mit größerem Fördervolumen wird somit empfohlen.

5.5 Einfluss von Propeller und Blattrührer auf die Zelldifferenzierung

Zur weiteren Charakterisierung des Bioreaktorsystems wurde der Einfluss des Propellerrührers und des Blattrührers auf die EB-Formierung und die Differenzierung der Zellen untersucht. Die durch den Propellerrührer formierten EBs zeigten eine deutlich geringere Größe, als der Vergleichsansatz mit Blattrührer. Die durch den Propellerrührer formierten EBs zeigten des Weiteren stärkere Größenvarianzen im Vergleich zu EBs welche in Bioreaktoren mit dem Blattrührer generiert wurden. Aufgrund der schwachen und ungleichmäßigen Durchmischung mit dem Propellerrührer kamen die EBs seltener mit dem Rührer in Berührung, wodurch weniger Scherstress auf die Aggregate ausgeübt wurde und diese dadurch stärker verklumpten. Der Blattrührer entwickelt durch seine größere Rührfläche einen größeren Leistungseintrag und damit einen größeren Scherstress auf die Zellen und bildet dadurch kleinere und in ihrer Größe homogenere EBs aus.

5.6 Drehzahlabhängige Entwicklung der Embryoid Bodys

Der Blattrührer zeichnete sich in den vorangegangenen Analysen gegenüber dem Propellerrührer als bessere Wahl hinsichtlich Suspendierungseigenschaften und Zellentwicklung aus, weshalb alle weiteren Zellversuche mit dem Blattrührer durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen Rührgeschwindigkeit und der Größe der formierten EBs. Bei einer Drehzahl von 90 rpm ergaben sich mit durchschnittlich 165 μm Durchmesser die größten EBs. Bei einer Drehzahl von 110 rpm lag der mittlere EB-Durchmesser bei 120 μm , für 130 rpm bei 100 μm . Mit zunehmender Drehzahl nimmt der EB-Durchmesser ab. Das liegt darin begründet, dass mit steigender Rührgeschwindigkeit ein größerer Scherstress auf die Zellen und Aggregate ausgeübt wird [21]. Durch die einwirkenden Kräfte werden Zellen auf der Oberfläche der Aggregate abgespalten und können zu neuen Aggregaten auswachsen, weshalb kleinere aber dafür mehr EBs entstehen. Diese Kraft steigt mit der Drehzahl an. Die physikalische Größe des Scherstress ist die Schubspannung τ , sie beschreibt die pro Fläche wirkende Kraft [27]. Prinzipiell ist die Schubspannung berechenbar, allerdings sind dafür Kennzahlen wie Reynoldszahl und Newtonzahl, sowie die durch den Rührer eingetragene Leistung Voraussetzung. Da die entsprechenden Kennzahlen für das System nicht vorlagen, konnte die Schubspannung für die verschiedenen Rührertypen nicht berechnet werden.

Des Weiteren würde bei 90 rpm eine breitere Größenverteilung festgestellt, als bei 110 rpm und 130 rpm. Mit einer Verringerung der Drehzahl geht eine Verringerung der Suspendierung einher. Weiter sollte die Drehzahl nicht reduziert werden, da mit zunehmender EB-Größe das Nekroserisiko im Zentrum ansteigt. Ab einer Aggregatgröße von über 300 μm entstehen aufgrund einer Unterversorgung mit Nährstoffen nekrotische Zentren [35].

5.7 Differenzierung embryonaler Stammzellen bis Tag 28

Die Entwicklung der embryonalen Stammzelle zur reifen Knochenzelle lässt sich in vier Phasen unterteilen: Proliferationsphase (Phase I), Mesodermbildung (Phase II), Matrixablagerung durch Osteoblasten (Phase III) und die Matrixmineralisierungsphase (Phase IV) [36].

Das Ziel ist es, durch die Differenzierung der Zellen in Suspensionsbioreaktoren diese vier Phasen positiv zu beeinflussen und die Ausbeute an differenzierten Osteoblasten zu erhöhen. Die Mineralisierung (Phase IV), gekennzeichnet durch eine schwärzliche Färbung der Matrix, wurde ab Tag 14 beobachtet. Zwar besteht die Knochenmatrix aus dem weißen Mineral Hydroxylapatit, aber unter dem Lichtmikroskop erscheint diese mineralisierte Matrix schwarz [37]. Die stärkste Mineralisierung wurde für Zellen beobachtet, die die ersten fünf

Differenzierungstage bei 110 rpm im Bioreaktor verbrachten und dabei gleichmäßige EBs formierten (BR Osteo. +). Zum Vergleich wurden auch Zellen aus dem Reaktor weiter differenziert, die sich in sehr großen ungleichmäßigen EBs formierten (BR Osteo. -). Als Kontrolle wurden Zellen aus der Hängenden-Tropfen-Kultur verwendet (HD Osteo.). Die Ca^{2+} -Analyse ergab, dass die Mineralisierung im Ansatz BR Osteo. + mit 61,5 mg/l fast doppelt so stark war, wie die mit 32,4 mg/l bestimmte Ca^{2+} -Konzentration im BR Osteo. - Ansatz. Die Ca^{2+} -Konzentration betrug mit 22,7 mg/l im HD Osteo. Ansatz nochmals weniger. Diese analytischen Resultate wurden durch die aufgenommenen Bilder bestätigt. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass sich der Scherstress, der innerhalb der ersten fünf Differenzierungstage auf die Zellen einwirkte, eine Verstärkung der Mineralisierung im Vergleich zur klassischen Hängenden-Tropfen-Differenzierung zufolge hat. Bemerkenswert ist, dass die Mineralisierung besser abläuft, wenn die EBs zuvor gleichmäßig ausgebildet wurden. Erklären kann man diese Feststellung damit, dass die Zellentwicklung in großen, ungleichmäßigen EBs, aufgrund unterschiedlicher Bedingungen für die Zellen, sehr verschieden abläuft. So werden die zentral liegenden Zellen nur schlecht mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt [35]. Auf der anderen Seite ist der Einfluss des Schers begrenzt, da nur die außen liegenden Zellen starken Kräften ausgesetzt sind.

Damit muss das oberste Ziel sein, die EB-Formierung im Bioreaktor weiter zu stabilisieren, um eine gleichmäßige Differenzierung bis zum Endpunkt zu ermöglichen.

5.8 Einfluss von Rührertyp und Drehzahl auf die Genexpression

Ziel war es die Mesodermentwicklung bis Tag 4 zu erhöhen, da aus dieser Keimbahn die Osteoblasten hervorgehen. Der Propellerrührer wirkte sich bei 110 rpm nachteilig auf die Mesodermentwicklung aus. Der Mesodermmarker bra war im Vergleich zum Blattrührer geringer exprimiert. Zusätzlich zeigte der allgemeine Differenzierungsmarker 5T4 [38] ebenfalls eine geringere Expression bei dem Propellerrührer als bei dem Blattrührer. Aufgrund dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass die Differenzierung durch die Verwendung des Propellerrührers verzögert abläuft.

Die im Anschluss durchgeführten Versuche mit dem Blattrührer zeigten keine Änderung des Mesodermanteils in Abhängigkeit von der Drehzahl. Allerdings war die Expression von 5T4 bei 90 rpm im Vergleich zu 110 rpm und 130 rpm stark reduziert. Damit liegt die 5T4-Expression bei 90 rpm für den Blattrührer auf dem Niveau wie bei 110 rpm für den Propellerrührer. Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde, bewirkt der Propellerrührer eine geringere Suspendierung des Mediums und erzeugt damit weniger Scherstress für die Zellen.

Möglich ist, dass bei geringerem Scherstress, entweder durch Reduzierung der Drehzahl oder des Rührertypen verursacht, die Differenzierung der ES-Zellen verzögert abläuft. Ergebnisse anderer Gruppen an reifen Osteoblasten zeigten, dass Scherstress eine zunehmende Translokalisierung von β -Catenin in den Nucleus bewirkt [39]. Dort dient β -Catenin als Transkriptionsfaktor für Zellzyklusregulatorproteine und beeinflusst den Differenzierungsprozess.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass erhöhter Scherstress durch eine Steigerung der Drehzahl zu Zellschäden [40] und einer verstärkten Apoptose führt. Der Apoptose Marker p53 war bei 130 rpm gegenüber 90 rpm und 110 rpm erhöht.

6 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein DASGIP-Reaktorsystem mit dem Reaktortyp Minispinner für murine embryonale Stammzellen charakterisiert. Die Charakterisierung erfolgte in vier Punkten. Zunächst sollten die Wachstumsbedingungen für die statische Adhärenzkultur und die Suspensionskultur im Bioreaktor verglichen werden. Es stellte sich heraus, dass die Zellen in den Bioreaktoren aufgrund von Produktionstoleranzen des Reaktorherstellers unterschiedlich schnell wuchsen. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Zellen in statischer Kultur untersucht. Die Analysen zeigten, dass durch einen konstant gehalten pH-Wert während der Differenzierung, die spezifische Wachstumsrate ansteigt und somit die Verdopplungszeit der Zellen verkürzt wird.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden ein Propeller- und ein Blattrührer auf ihre Suspendierungseigenschaften untersucht. Der untersuchte Blattrührer wurde als ideale Lösung für das Reaktorsystem eingeschätzt, weshalb alle Folgeversuche mit ihm durchgeführt wurden. Im Vergleich zum Propellerrührer zeichnete er sich durch eine gute Durchmischung aus und erzeugte gleichmäßigere *Embryoid Bodies*.

Ein weiterer Punkt der Aufgabenstellung beinhaltete die Erhöhung des Mesodermanteils bis Tag 4 der Differenzierung. Dazu wurden die Drehzahlen 90 rpm, 110 rpm und 130 rpm verglichen. Es konnte eine Korrelation zwischen der Drehzahl und der entwickelten EB-Größe festgestellt werden. Mit zunehmender Drehzahl verringert sich der EB-Durchmesser. Aufgrund der gut gebildeten EBs und dem noch nicht zu hohen Zellstress durch Scherung wurden 110 rpm als bevorzugte Drehzahl für die ersten vier Differenzierungstage bestimmt.

Im letzten Teil der Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine Differenzierung von Zellen aus dem Bioreaktor zu Osteoblasten möglich ist. Die erfasste Kalzifizierung war sogar stärker ausgeprägt als bei über die Hängende-Tropfen-Methode differenzierten Zellen.

Das Reaktorsystem der Firma DASGIP eignet sich zur Differenzierung von murinen embryonalen Stammzellen. Aus der Summe der Ergebnisse wird aber deutlich, dass die EB-Formierung in jedem Reaktor etwas anders abläuft. Es wurden häufig Unregelmäßigkeiten bei der EB-Formierung beobachtet. Aus diesem Grund wird empfohlen für den zukünftigen parallelen Betrieb je Ansatz mindestens zwei Reaktoren gleich zu bestücken und einzustellen.

Die Charakterisierung des Reaktorsystems ist hinsichtlich Drehzahl mit dieser Arbeit erfolgt. Doch spielt auch die Inokulationsdichte eine wichtige Rolle für das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und den gesamten Bioprozess. Die zukünftig geplanten Experimente sollen diesen Aspekt mit abdecken. Des Weiteren sollen erste Kultivierungs- und

Differenzierungsversuche mit *Callithrix jacchus*-Zellen im Bioreaktor durchgeführt werden. Sie stellen die Zielzellen für den in der Einleitung beschriebenen Osteotoxizitätstest dar.

Um auf Unregelmäßigkeiten aufmerksam zu werden, wurden in der vorliegenden Arbeit für jeden Versuchsansatz alle Reaktoren verwendet. Aufgrund der gesammelten Systemerfahrung wird es in Zukunft möglich sein, Versuche parallel zu starten und damit zeiteffektiver zu arbeiten. Parallel zu den angesprochenen Versuchen soll mit der GFP-Reporterzelllinie ES D3.OT eine ausführliche Untersuchungen der Mesodermentwicklung im Bioreaktor anhand des Wnt-Signalweges stattfinden.

7 Literaturverzeichnis

1. Commission to the council and the europeanparliament
Fifth Report on the Statistics on the Number of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union. Brüssel 2007
2. Spielmann H.
Animal alternatives in Germany.
Science. 1997 Apr 4;276(5309):19.
3. <http://www.biokurs.de/skripten/13/bs13-11e.htm>
Letzter Zugriff: 12.10.08
4. Clarke D, Frisén J.
Differentiation potential of adult stem cells.
Curr Opin Genet Dev. 2001 Oct;11(5):575-80.
5. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.
Science. 1998 Mar 6;279(5356):1528-30.
6. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.
Science. 1999 May 14;284(5417):1168-70.
7. Stewart Sell edited.
Stem Cells Handbook,
Humana Pr; 1. Auflage, 2003, Englisch
8. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state.
Nature. 2007 Jul 19;448(7151):318-24. Epub 2007 Jun 6.
9. Evans MJ, Kaufman MH.
Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.
Nature. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
10. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D.
Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides.
Nature. 1988 Dec 15;336(6200):688-90.
11. Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ.
Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. Stem Cells. 2006 Jun;24(6):1476-86. Epub 2006 Feb 2.
12. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA.
Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. J Cell Sci. 2005 Oct 1;118(Pt 19):4495-509.

13. Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM.
Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev.* 1993 Nov;44(1):41-50.
14. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G.
Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci.* 1997 Jun;110 (Pt 11):1279-85.
15. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, McKay RD.
Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev.* 1996 Sep;59(1):89-102.
16. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Müller PK, Rohwedel J.
Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev.* 2000 Apr;92(2):193-205.
17. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, Episkopou V, Polak JM.
Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng.* 2001 Feb;7(1):89-99.
18. zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ.
In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation.* 2003 Jan;71(1):18-27.
19. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N.
Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett.* 2001 May 18;497(1):15-9.
20. Schroeder M, Niebruegge S, Werner A, Willbold E, Burg M, Ruediger M, Field LJ, Lehmann J, Zweigerdt R.
Differentiation and lineage selection of mouse embryonic stem cells in a stirred bench scale bioreactor with automated process control. *Biotechnol Bioeng.* 2005 Dec 30;92(7):920-33.
21. Fok EY, Zandstra PW.
Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem Cells.* 2005 Oct;23(9):1333-42. Epub 2005 Aug 4.
22. Cormier JT, zur Nieden NI, Rancourt DE, Kallos MS.
Expansion of undifferentiated murine embryonic stem cells as aggregates in suspension culture bioreactors. *Tissue Eng.* 2006 Nov;12(11):3233-45.
23. zur Nieden NI, Cormier JT, Rancourt DE, Kallos MS.
Embryonic stem cells remain highly pluripotent following long term expansion as aggregates in suspension bioreactors. *J Biotechnol.* 2007 May 1;129(3):421-32. Epub 2007 Jan 21.
24. Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW.
Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells.* 2004;22(3):275-82.

25. Randle WL, Cha JM, Hwang YS, Chan KL, Kazarian SG, Polak JM, Mantalaris A. Integrated 3-dimensional expansion and osteogenic differentiation of murine embryonic stem cells. *Tissue Eng.* 2007 Dec;13(12):2957-70.
26. Zlokarnik M
Rührtechnik Theorie und Praxis
Springer-Verlag, 1. Ausgabe, 1999.
27. Chmiel H
Bioprozesstechnik
Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage, 2006
28. Junqueira L, Carneiro J.
Histologie
Springer Verlag, 2. Auflage, 2002.
29. McKee MD, Nanci A.
Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connect Tissue Res.* 1996;35(1-4):197-205.
30. Mullis KB, Faloona FA.
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.
31. Hans G. Schlegel
Allgemeine Mikrobiologie
Georg Thieme Verlag, 7. überarbeitet Auflage, 1992.
32. Emre A, Kalayci G, Ozden I, Bilge O, Acarli K, Kaymakoglu S, Rozanes I, Okten A, Tekant Y, Alper A, Arioğlu O.
Mesoatrial shunt in Budd-Chiari syndrome. *Am J Surg.* 2000 Apr;179(4):304-8.
33. Rønold HJ, Ellingsen JE.
Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting--tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants. *Biomaterials.* 2002 Nov;23(21):4211-9.
34. Froment G, Bischoff K.
Chemical Reactor Analysis and Design.
John Wiley & Sons, 2. Auflage, 1990.
35. Freyer JP, Sutherland RM.
Proliferative and clonogenic heterogeneity of cells from EMT6/Ro multicellular spheroids induced by the glucose and oxygen supply. *Cancer Res.* 1986 Jul;46(7):3513-20.
36. Davis LA, Zur Nieden NI.
Mesodermal fate decisions of a stem cell: the Wnt switch. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Sep;65(17):2658-74.
37. zur Nieden NI, Kempka G, Rancourt DE, Ahr HJ.
Induction of chondro-, osteo- and adipogenesis in embryonic stem cells by bone morphogenetic protein-2: effect of cofactors on differentiating lineages. *BMC Dev Biol.* 2005 Jan 26;5:1.

-
38. Ward CM, Barrow K, Woods AM, Stern PL.
The 5T4 oncofoetal antigen is an early differentiation marker of mouse ES cells and its absence is a useful means to assess pluripotency.
J Cell Sci. 2003 Nov 15;116(Pt 22):4533-42.
 39. Norvell SM, Alvarez M, Bidwell JP, Pavalko FM.
Fluid shear stress induces beta-catenin signaling in osteoblasts.
Calcif Tissue Int. 2004 Nov;75(5):396-404. Epub 2004 Aug 12.
 40. Cherry RS, Kwon KY.
Transient shear stresses on a suspension cell in turbulence.
Biotechnol Bioeng. 1990 Sep;36(6):563-71.

8 Anhang

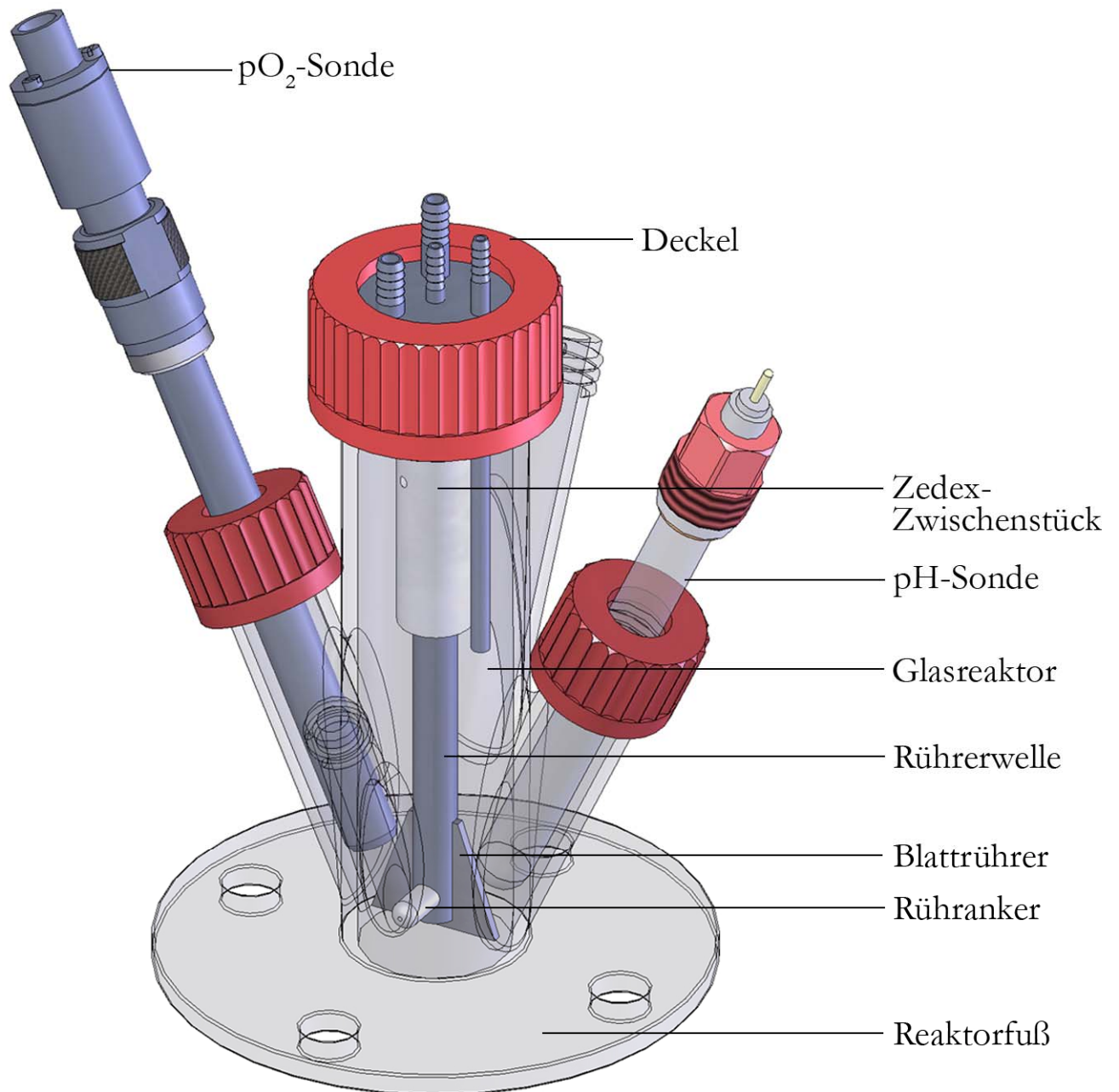
Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BR	Bioreaktor
Bra	Brachyury
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNS)
Kontr.	Kontrollmedium
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Deoxyribonuclease
DO	dissolved oxygen (Gelöstsauerstoff)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EB	<i>Embryoid Body</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	embryonale Stammzelle
EST	Embryonale-Stammzell-Test
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FA	Formaldehyd
FCS	fetales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HD	hängende Tropfen
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
Osteo.	Osteoblastendifferenzierungsmedium
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PTFE	Polytetrafluorethylen
RNA	Ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)

Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
U	<i>international Unit</i>
VE-Wasser	vorentsalztes Wasser
WEC	<i>Whole Embryo Culture</i>
ZEBET	Zentralstelle für die Erfassung und Bewertung zum Ersatz von Tierversuchen
μ	spezifische Wachstumsrate

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Anteil der Tierarten die 2005 für Tierversuche in der EU genutzt wurden
- Abb. 1.2 Überblick über die Einteilung der Stammzellen
- Abb. 1.3 Der vollständig zusammengebaut DASGIP Minispinner
- Abb. 1.4 Strömungsverhalten von Scheibenrührer (radial) und Propellerrührer (axial) mit Strombrechern
- Abb. 3.1 Ablauf der Hängenden-Tropfen-Methode
- Abb. 4.1 Verlauf des Zellwachstums bei variablen und konstanten pH
- Abb. 4.2 Verlauf der Überlebensrate und des pH-Wertes im Laufe einer Differenzierung
- Abb. 4.3 Verlauf der Glucose-, Lactatkonzentration und der Zellzahl im Differenzierungsverlauf
- Abb. 4.4 Aufwirbeln von Flitterteilchen mit Propeller und Blattrührer
- Abb. 4.5 CaCl_2 -Kalibrierkurve für die Ca^{2+} -Bestimmung
- Abb. 4.6 Verlauf der Ca^{2+} -Konzentration während des Ausspülens aus dem Reaktor
- Abb. 4.7 Der Anteil des Totvolumens und die Volumendifferenz zum Startvolumen
- Abb. 4.8 EB-Formierung von Propeller und Blattrührer
- Abb. 4.9 Expressionsvergleich von Propellerrührer und Blattrührer
- Abb. 4.10 Vergleich der EB-Formierung in Abhängigkeit von der Drehzahl
- Abb. 4.11 Ekpressionsvergleich bei verschiedenen Drehzahlen für den Blattrührer
- Abb. 4.12 Entwicklungsunterschiede bei der EB-Formierung
- Abb. 4.13 Mineralisierung von ES-Zellen
- Abb. 4.14 Kalzifizierung der Matrix.
- Abb. 4.15 Alizarinrot S Färbung der Kalziummatrix

DASGIP Minispinner

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Nicole zur Nieden und dem Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, die mir das Erstellen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Ich bedanke mich bei meiner gesamten Arbeitsgruppe für die schöne lehrreiche und interessante Zeit.

Besonderen Dank gilt Dr. Nicole zur Nieden, Susanne Trettner und Anke Dienelt, die mich in vielen Situationen und anregenden Gesprächen beraten haben.

Vielen Dank an das gesamte DASGIP-Team für die gute Kommunikation und die wertvollen Tipps.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Meyer, der stets ein offenes Ohr für Probleme hatte und mit Lösungen zur Seite stand.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern, die mich stets in allen Lebenslagen unterstützt haben und meinen Weg immer mit Zuversicht und Vertrauen begleiten.

Besonderer Dank gilt Stefanie Kuhn, für die freudige Zeit und die geduldigen Stunden während des Schreibens dieser Arbeit.

Vielen Dank auch den fleißigen Korrekturlesern, allen voran Dietrich Prietsch.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Leipzig, 14. Oktober 2008

Alexander Seeliger