



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

**„Einfluss von Härte und Proteinbeschichtung auf die
Adhäsion und Differenzierung von Zellen auf
Polyacrylamidsubstraten“**

Verfasserin

Michaela Olga Kubal

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt.
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.
Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor

Herzlichen Dank!

An dieser Stelle möchte ich mich bei
Herrn Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Franz Gabor
und
Herrn Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr. Michael Wirth
für die kompetente Betreuung, die Bereitstellung eines interessanten Themas und
die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Weiters möchte ich meinem Co-Betreuer Mag. Lukas Neutsch danken, der mir immer
mit Rat und Tat zur Seite stand und mich sowohl im praktischen Arbeiten als auch
beim Verfassen der Diplomarbeit mit mehr als 100 Prozent unterstützt hat.

Auch meinen Kolleginnen und Kollegen, von denen inzwischen einige sehr gute
Freunde geworden sind, möchte ich danken, dass sie nicht nur in guten, sondern
auch in schweren Zeiten immer für mich da waren und mir Kraft und Mut gegeben
haben.

Zu guter letzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Mutter und meinem
Vater, dem es leider nicht vergönnt war mich bis zum Ende meines Studiums zu
begleiten, bedanken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht, mir immer Mut in jeder
Situation gemacht haben und mir eine große Stütze während des gesamten
Studiums waren.

Nur wer sein **Ziel** deutlich sieht, kann den Weg bestimmen, der ihn dorthin führt.
(Wolfgang Zielke)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIALIEN UND GERÄTE	3
2.1.	Gewebekulturmedien	3
2.2.	Zellkultur	5
2.2.1.	Subkultivierung von Zellen	5
2.2.2.	Zelltypen	6
2.3.	Glas	10
2.3.1.	Glasmaterialien und Glasbehandlung	10
2.3.2.	Vorbehandlung	11
2.4.	Polyacrylamidgel	13
2.4.1.	Gelmaterialien	13
2.5.	Fluorimetrie	17
3.	METHODEN	18
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	22
4.1.	Gelmodifikationen	22
4.2.	Bestimmung der Proliferation und Adhäsion von Zellen mittels CyQuant [®] -Test	28
4.3.	Bestimmung der Differenzierung an Hand der Zellmembran- gebundenen Enzymaktivität	31
5.	ZUSAMMENFASSUNG	35
6.	LITERATURVERZEICHNIS	37
7.	LEBENS LAUF	38

1. Einleitung

Bereits 1959 wurden von Reymond und Weintraub Polyacrylamidgele als Matrices für die Trennung in der Zonenelektrophorese eingeführt. Sie wurden aufgrund ihrer optischen Transparenz, elektrischen Neutralität und hohen Porosität als elektrophoretische Träger eingesetzt. [1] In den späten 90ern kombinierten Pelham und Wang die Verwendung von Polyacrylamid mit dem Einsatz von fluoreszierenden Mikropartikeln, die als Marker zur Bestimmung der Belastung der Matrix durch Zugkräfte eingesetzt wurden. Darüber hinaus wurden schon vor mehr als 30 Jahren Polyacrylamide auch als Substrat zur Zellkultivierung verwendet. [2]

Polyacrylamidgele haben sich auch in Studien über die Interaktion zwischen Zellen und der Oberfläche als hilfreich erwiesen. Dabei hat man erkannt, dass ein idealer Untergrund für die Anheftung von Zellen ökonomisch, inert, linear elastisch, leicht herstellbar und leicht zu charakterisieren sein sollte und auch eine einstellbare Festigkeit aufweisen sollte, die wiederum einen starken Effekt auf Zelladhäsion und Proteinexpression ausübt. Dieser Effekt kann je nach Zelltyp variieren. Da Polyacrylamidgele die meisten dieser Eigenschaften besitzen, werden sie bevorzugt für Untersuchungen von Zell-Substrat Interaktionen verwendet. [3]

In diesen Studien wurden auch verschiedene Zelltypen, wie Fibroblasten eingesetzt, die auf festem bzw. starrem Untergrund eine andere Morphologie entwickelt haben als auf weichem, wo sie rundlich blieben. Der Grund dafür sind binäre Sensoren auf der Substrat-nahen Zellmembran, die nur dann Signale für eine höhere Kontraktilität aussenden, wenn der Untergrund härter oder genauso hart ist wie die Zelle selbst. Motorische Neuronen aus dem Rückenmark von Mäusen breiteten hingegen ihre Neuriten mit einem extensiven Geäst nur auf einer weichen und nicht auf einer harten Oberfläche aus. [4]

In einer Publikation von Florian Rehfeldt [5] wurde gezeigt, dass die Elastizität des Substrates Einfluss hat auf die Adhäsion und auf die Differenzierung von Stammzellen und somit auch auf die Wirkung von Arzneistoffen. So gelang die Kultivierung von Gehirnzellen auf einem weicherem Untergrund, jene von Knochenzellen hingegen auf einem härteren. Daher bestimmt die Festigkeit des Untergrundes die Anheftung, aber auch das Wachstum und die Morphologie von Zellen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden grundlegende Untersuchungen zur Herstellung und Quantifizierung modifizierter Oberflächen durchgeführt, die sich für eine gezielte Beeinflussung des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung eignen sollen.

Als Oberflächen wurden Polyacrylamidgele gewählt, die eine geeignete Unterlage für das Zellwachstum darstellen. Zusätzliche Modifikationen dieses Substrates sollten den Zellen die Möglichkeit bieten, infolge der Wechselwirkung mit der Unterlage ihr Verhalten zu ändern.

Da Zellen sowohl auf weichen als auch auf harten Gelen kultiviert wurden, wurden verschiedene Zelltypen ausgewählt, die im Körper in Regionen unterschiedlicher Härte vorkommen. Neben den Caco-2-Zellen, die eine weichere Umgebung gewohnt und als Zellkulturmodell für den menschlichen Dünndarm international anerkannt sind, wurden auch andere Zelltypen verwendet, wie D1- (Knochenmarksstroma), die aus einer harten Umgebung stammen, N2a- (Neuroblastom), die eine weichere Umgebung bevorzugen, PSLC- (pankreatische Stammzellen), die eine mittelharte Umgebung gewohnt sind und 5637- (Harnblasenkarzinom) sowie SV-HUC1- (Uroepithel) Zellen, die aus Geweben stammen, die unterschiedlich starken Stimuli unterliegen.

Insgesamt wird demnach die Differenzierung von Zellen durch die Substratunterlage beeinflusst und gesteuert. Zusätzlich ist auch der Kontakt zur Basalmembran, einem zweidimensionalen Netzwerk aus zwei Protein-Polymeren, ein weiterer Parameter, der das Zellwachstum beeinflusst. Die Basalmembran bestimmt die Polarität der Zellen und determiniert den Stoffwechsel, die Zelldifferenzierung und –wanderung. Geht der Kontakt mit der Basalmembran jedoch verloren, dann tritt die Zelle zumeist in die Apoptose ein.

Folglich teilen sich adhärente Zellen nur dann, wenn sie sich an eine Unterlage (Oberfläche) anheften können. Die beim Züchten der Zellen verwendete Substratunterlage (Kulturgefäß, Polyacrylamidgel) fungiert quasi als Basalmembran, die eine Anheftung der Zellen und damit ein Wachstum ermöglicht.

Viele Materialien können in der Zellkultivierung nicht eingesetzt werden, da sie nur eine unzureichende Wechselwirkung mit den Zellen ermöglichen. Deshalb werden Kulturflaschen meist von den Firmen speziell vorbehandelt, um eine bessere Zellanheftung und somit eine erfolgreiche Züchtung zu gewährleisten. Betrachtet man die allgemeinen Anforderungen an Zellkulturflaschen, dann spielt auch die

Ladung der Oberfläche eine wichtige Rolle. Die Zelloberfläche ist unter physiologischen Bedingungen zwar zumeist negativ geladen, trotzdem ist eine Züchtung sowohl an positiv als auch an negativ geladenen Oberflächen möglich. [6] Eine bessere Anheftung kann auch durch Beschichtung mit Anheftungsproteinen der extrazellulären Matrix wie Laminin, Kollagen oder Fibronectin erzielt werden. Diese Beschichtung ist jedoch sehr teuer und wird deshalb aus Kostengründen in der Routine nicht eingesetzt.

Bisher wurden in pharmazeutischen Untersuchungen meist nur harte Substrate verwendet, die nicht der physiologischen Umgebung von Zellen entsprechen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte der Einfluss unterschiedlicher und verschieden modifizierter Substrate auf die Proliferation und Differenzierung pharmazeutisch-technologischer Zelllinien untersucht werden. Die Ergebnisse sollten die tägliche Arbeit in der Zellkultivierung erleichtern, um bevorzugt die Differenzierung zu einem Zelltyp zu unterstützen.

2. Materialien und Geräte

2.1. Gewebekulturmedien

2.1.1. DMEM-Gewebekulturmedium

Zusammensetzung: 1000 ml DMEM-Medium (4,5 g/L Glucose)
5,5 ml Penicillin/Streptomycin
50 ml FBS

2.1.2. RPMI-1640-Gewebekulturmedium

Zusammensetzung: 1000 ml RPMI-1640-Medium
10 % FCS
4mM L-Glutamin
150 µg/ml Gentamycin

2.1.3. HF-12 HAM Gewebekulturmedium

Zusammensetzung: 500 ml GIBCO-F-12 (HAM)
50 ml FCS
5 ml Penicillin/Streptomycin
0,073 g 1mM L-Glutamin

2.1.4. Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin ist eine Endopeptidase, die als 0,25%ige Lösung zur Subkultivierung von adhärennten Zellen verwendet wird. Durch diese werden proteinartige und ionisch-vermittelte Zell/Zell- bzw. Zell/Matrix-Verbindungen innerhalb kurzer Zeit dissoziiert. Um irreversible Zellschäden zu vermeiden, sollte die Inkubation nicht länger als nötig dauern.

2.1.5. verdünnte Trypsin/EDTA Lösung

Es wird eine 0,025%ige Lösung durch Verdünnung der 0,25%igen Trypsin/EDTA-Lösung mit einer 10fach konzentrierten PBS-Stammlösung im Verhältnis 1:10 hergestellt.

2.1.6. TrypLE[®] Select

TrypLE[®] Select (Gibco Life Technologies Ltd., Invitrogen Corp., Karlsbad, USA) ist ein rekombinantes Enzym, das animalisches Trypsin ersetzt und aus mikrobieller Fermentation stammt. Es wird zur Abspaltung von auf Kunststoffwaren anheftenden Säugetierzellen verwendet.

2.1.7. FCS (fetales Kälberserum)

FCS (PAA Laboratories GmbH, No.A11-151, Austria) wird aus dem Blut von Kuhfeten gewonnen und ist in vielen Nährmedien enthalten, die zur Anzucht und Kultivierung von Zellen in der Zellkultur verwendet werden.

Bevor man es dem Medium zusetzt wird es 30 Minuten lang bei 56°C hitzeinaktiviert, um das Komplementsystem zu zerstören.

FCS wird portionsweise bei -20°C gelagert und muss daher vor Gebrauch aufgetaut werden.

2.1.8. PBS-Puffer (10-fach konzentriert)

80 g NaCl, 2 g KCl, 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ sowie 2,4 g KH_2PO_4 werden in 800 ml dest. Wasser gelöst. Anschließend wird der pH-Wert mit 1M HCl auf 7,4 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

2.2. Zellkultur

Die Möglichkeit, lebende Zellen aus komplexen Organismen zu isolieren und in vitro unter definierten Bedingungen zu kultivieren, ist und war die Grundvoraussetzung, um wichtige Erkenntnisse über biochemische Vorgänge in der lebenden Zelle zu gewinnen. Fast alle Untersuchungen über intrazelluläre Transportvorgänge, Exo- und Endozytose, zelluläre Wachstumskontrolle, Tumorentstehung, Differenzierung und Apoptose sowie Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen und von Zellen mit der extrazellulären Matrix basieren meist auf Untersuchungen an Zellkulturen.

2.2.1. Subkultivierung von Zellen

Um eine Kontamination mit Bakterien, Pilzen oder Hefen zu vermeiden erfolgt das Arbeiten mit Zellen im laminar air flow, einer sterilen Werkbank, unter aseptischen Bedingungen.

Nicht sterile Materialien werden vor Beginn der Arbeit mit 70%igem Alkohol besprüht und abgewischt, und die Hände des Personals werden anschließend desinfiziert, um eine Übertragung von Keimen zu vermeiden.

Die Züchtung der Zellen erfolgt im Brutschrank unter folgenden Bedingungen:

- 37°C
- 95% Luftfeuchtigkeit
- 5% CO₂-Gehalt (um den pH-Wert im Medium einzustellen)

Die Zellkultivierung findet in einer Gewebekulturflasche unterschiedlicher Größe mit einem geeigneten Medium statt, dem verschiedene Supplemente wie Aminosäuren, Vitamine, Glucose, Serum, Glutamin, Phenolrot, NaHCO₃ und auch Antibiotika zugesetzt werden, um ein optimales Zellwachstum zu ermöglichen. Zur Erhaltung von Teilungsfähigkeit und Vitalität ist ein regelmäßiger Mediumwechsel notwendig, um Beeinträchtigungen der Zellen durch den gesteigerten Metabolismus von Glucose zu Lactat zu verhindern. Die Akkumulation von sauren Stoffwechselprodukten wird durch einen Farbwechsel von rot nach rötlich-gelb bis gelb sichtbar, da Phenolrot als Indikator im Medium enthalten ist.

Die Zellen wachsen und vermehren sich solange bis die gesamte Kulturfläche bedeckt ist, man spricht in diesem Fall von Konfluenz. Dies kann je nach Zelltyp unterschiedlich lang dauern.

Um ein Absterben der Zellen zu verhindern und ein ungehindertes Wachstum zu ermöglichen, sollten sie bei einer Konfluenz von 80-90% gespalten werden, weil bei geringerer Konfluenz die Wachstumsgeschwindigkeit abnehmen kann und bei vollständiger Konfluenz die Ablösung erschwert wird. Dies wird im Mikroskop regelmäßig kontrolliert.

2.2.2. Zelltypen

Bei den verwendeten Zelltypen handelt es sich um adhärente Kulturen, die sich am Boden der Gewebekulturflasche anheften und auf unterschiedliche Weise subkultiviert werden. Der Standard-Spaltvorgang wird folgendermaßen durchgeführt:

- Das verbrauchte DMEM-Medium wird aus der Gewebekulturflasche abgesaugt und die angehefteten Zellen werden mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen, um restliches Medium vollständig zu entfernen.

Die Pufferlösung wird anschließend abgesaugt und 2 ml Trypsin/EDTA werden zugesetzt. Die Zellkulturflasche wird verschlossen, so lange horizontal geschwenkt bis der Zellrasen völlig bedeckt ist und zehn Minuten im Brutschrank bei leicht geöffnetem Schraubverschluss inkubiert. Die Zellen werden somit abgelöst und Zell-Zell-Verbindungen reversibel geöffnet.

- Beim Herausnehmen der Kulturflasche wird diese wieder verschlossen und die Zellen werden durch seitliches Klopfen von der Gefäßwand gelöst. Danach werden 10 ml frisches Medium zugefügt und durch Schwenken der Flasche gut resuspendiert, damit Zellen, die noch aneinander heften, mechanisch zu Einzelzellen dissoziiert werden. Dabei ist auch darauf zu achten, dass alle noch anheftenden Zellen von der Gefäßwand abgespült werden.
- Diese Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen übergeführt und fünf Minuten lang bei 1000 UpM zentrifugiert.
- Nach dem Zentrifugieren wird die überstehende Lösung vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml frischem Medium gut resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension werden 2–5 Tropfen entnommen und in eine mit frischem Medium vorbereiteten Gewebekulturflasche eingebracht. Nach guter Durchmischung und Verteilung der Zellen durch horizontales Schwenken wird die Zellkulturflasche bei leicht geöffnetem Schraubverschluss in den Brutschrank gelegt und 24 Stunden lang nicht bewegt, um einen initialen Anheftungsprozess zu ermöglichen. Die restlichen Zellen können dann für Experimente weiter verwendet werden.

2.2.2.1. Zelllinie D1 (mouse bone marrow stroma cells)

Diese Zellen (ATCC - American Type Culture Collection, Amerika) wurden aus dem multipotenten Knochenmark der Maus geklont und können im geeigneten Milieu in Osteocyten, Chondrozyten oder Adipocyten differenzieren.

Die Spaltung der D1-Zellen wird wie in Punkt 2.2.2. beschrieben durchgeführt.

2.2.2.2. Zelllinie N2a (Neuro-2a oder Neuroblastoma)

Diese Zellen (ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) wurden durch ein Klonierungsverfahren von R.J. Klebe und F.H. Ruddle aus sich plötzlich bildenden Tumoren von Stamm A Albinomäusen etabliert. [7]

Neuro-2a-Zellen produzieren mikrotubuläre Proteine, die in einem kontrahierbaren System eine Rolle spielen, welches für den axoplasmatischen Strom in Nervenzellen verantwortlich ist.

Die Spaltung der N2a-Zellen wird wie in Punkt 2.2.2. beschrieben durchgeführt.

2.2.2.3. Zelllinie Caco-2 (Human colon adenocarcinoma)

Caco-2-Zellen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) wurden das erste Mal 1974 von J. Fogh aus dem Kolonkarzinom eines 72-jährigen männlichen Kaukasiers isoliert und sind heute über Zellbanken erhältlich. [8]

Die Spaltung der Caco-2-Zellen wird wie in Punkt 2.2.2. beschrieben durchgeführt und unterscheidet sich nur dadurch, dass an Stelle von DMEM-, RPMI-Medium und statt Trypsin/EDTA, TrypLE[®] Select verwendet wird. Weiters wird hier nicht nur zehn sondern 20 Minuten lang im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.4. Zelllinie PSLC (rat pancreatic stem cells)

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise im Rahmen eines EU-Projektes von C. Kruse (Fraunhofer-Institute of Biomedical Engineering Group of Cell Differentiation and Cell Technology at University of Lübeck, MFC Innovationscampus 1, Maria-Goeppert-Str. 1, 23538 Lübeck, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die Spaltung der PSLC-Zellen wird wie in Punkt 2.2.2. beschrieben durchgeführt.

2.2.2.5. Zelllinie 5637-Zellen (Human urinary bladder carcinoma)

Die Harnblasenkarzinomzellen wurden 1974 aus einem 68 jährigen Mann isoliert und sind heute über Zellbanken erhältlich. [8] Weiters ist dieses Karzinom nach Prostata-, Darm- und Lungenkrebs die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern.

Die Zellen, die hier zum Einsatz kamen wurden vom DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die Subkultivierung der 5637-Zellen wird wie in Punkt 2.2.2. beschrieben durchgeführt und unterscheidet sich darin, dass statt DMEM-, RPMI-Medium und für den Waschvorgang verdünntes Trypsin/EDTA statt PBS-Puffer verwendet wird. Weiters kommen statt 2 ml Trypsin/EDTA 4 ml verdünntes Trypsin/EDTA zum Einsatz und es wird nicht zehn sondern 25 Minuten inkubiert. Zusätzliche Unterschiede bestehen darin, dass das Zellpellet nach der Zentrifugation nicht in 2 ml sondern nur in 1200 µl Medium resuspendiert und dass statt 2-5 Tropfen 200 µl Zellsuspension zum Animpfen verwendet werden.

2.2.2.6. Zelllinie SV-HUC1 (uroepithelial cells)

Diese Zelllinie (ATCC - American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) wurde durch Immortalisation normalen Harnleitersgewebes durch SV40 Viren etabliert. [7]

Die Spaltung der SV-HUC1-Zellen wird wie in Punkt 2.2.2. beschrieben durchgeführt und unterscheidet sich darin, dass der Schritt des Absaugens des Mediums und der anschließende Waschvorgang mit dem Puffer entfallen. Weiters wird statt DMEM- das HAM F12-Medium verwendet und die Inkubation im Brutschrank sollte 10-15 Minuten lang erfolgen. Zusätzlich werden nicht 2-5 Tropfen der Zellsuspension zur neuerlichen Kultivierung verwendet, sondern ein Volumen, das mindestens vier Millionen Zellen enthält.

Zur Bestimmung der Zellzahl in der Suspension dient eine Zählkammer, auch Hämocytometer genannt. An Hand dieser Zellzahl kann die Anzahl der Zellen pro Milliliter und somit der benötigte Medienzusatz zum Erreichen der optimalen Zellkonzentration berechnet werden.

Generell kann eine Subkultivierung in derselben Gewebekulturflasche etwa zwei Monate lang erfolgen, bei manchen Zellen muss jedoch nach jeder Spaltung eine neue Flasche verwendet werden, da ansonsten keine vollständige Anheftung mehr gegeben ist.

2.3. Glas

Silikatglas ist eine unterkühlte Schmelze, die eine amorphe Struktur aufweist und als Hauptbestandteil Si-O-Si Brücken besitzt. Diese haben eine geringe, aber messbare Löslichkeit in Wasser, wodurch das Si-O-Si Netzwerk an der Oberfläche aufgebrochen wird und Silanolgruppen gebildet werden. Dies kann auch bei Raumtemperatur durch Adsorption von Wasser aus der Umgebung erfolgen (Abb.1).



Abb. 1: Die Siloxanbindung wird aufgebrochen und zwei Silanolgruppen werden gebildet.

Da die Hydroxylierung aus Platzgründen nicht vollständig stattfindet, können neben chemisorbierten OH-Gruppen auch Siloxangruppen auf der SiO₂-Oberfläche vorhanden sein. Die Packungsdichte der OH-Gruppen ist vom Verteilungszustand des SiO₂ abhängig.

2.3.1. Glasmaterialien und Glasbehandlung

2.3.1.1. Piranhalösung

Die Lösung, auch „Peroxomonoschwefelsäure“ genannt, ist eine hoch-reaktive Lösung, die stark oxidierend wirkt und als Reinigungs- und Bleichmittel verwendet wird. Hergestellt wird sie durch Mischung von 30%igem (v/v) H₂O₂ und konzentrierter H₂SO₄ in einem Verhältnis 7+3 (v/v).

2.3.1.2. 3-Aminopropyl-methyl-diethoxysilan (APMDES)

Es handelt sich um eine bifunktionelle organische Verbindung, in der die funktionelle Silangruppe in Anwesenheit von Wasser hydrolysiert wird, um das entsprechende reaktive Silanol zu bilden, welches an einen anorganischen Träger, wie z.B. Glas, gebunden werden kann. APMDES wurde von der Firma Sigma-Aldrich (No.371890, St. Louis, MO) bezogen.

2.3.1.3. Glutaraldehyd

Dieses Reagenz, auch als 1,5-Pentandial bezeichnet, wird als Crosslinker bei der Beschichtung von Glasplatten verwendet.

Es wird eine 0,5%ige (v/v) Lösung eingesetzt, die aus einer 70%igen Stammlösung (Sigma-Aldrich, No.G7776, St. Louis) durch Verdünnen mit dest. Wasser hergestellt wurde.

2.3.1.4. Sigma-Cote[®]/Heptan-Lösung

Hierbei handelt es sich um eine Silikonlösung in Heptan im Verhältnis 1+1, die einen kovalenten, dünnen Film auf der Glasoberfläche bildet. Sigma-Cote[®] selbst wurde von der Firma Sigma-Aldrich (No.SL2-25ML, St. Louis, MO) bezogen.

2.3.2. Vorbehandlung

Es wurden zwei verschiedene Glasslides (Karl Hecht KG, Deutschland) verwendet, nämlich ein rundes (aus Borsilikat mit $\varnothing 22$ mm), das als oberes Deckglas fungiert und ein quadratisches (aus Borsilikat, 24 x 24 mm, 576 mm²) als unteres. Die Vorbehandlung ist zu Beginn für beide Gläser gleich und besteht im Einlegen der Glasslides für mindestens eine Stunde in Piranha-Lösung, um Verunreinigungen wie Kohlenwasserstoffe, die die Silanisierung der Silanolgruppen beeinträchtigen können, von der Oberfläche zu entfernen. Diese Säurebehandlung hat den Vorteil, dass vorhandene Alkalimetallionen wie Natriumionen an der Oberfläche gegen Protonen ausgetauscht werden und somit die Anzahl an zugänglichen Silanolgruppen steigt. Durch die Behandlung mit Piranha-Lösung wird die Oberfläche hydrophiler, weil polare und auch geladene Gruppen auf der Glasoberfläche offengelegt werden.

Anschließend werden die Gläser zunächst mit dest. Wasser, dann mit 70%igem Alkohol gespült und an der Luft getrocknet.

Die Weiterbehandlung der oberen und unteren Deckgläser erfolgte dann auf unterschiedliche Weise.

➤ **Oberes Deckglas:**

- **Silanisierung mit APMDES**

Die Silanisierung dient zur Modifizierung von organischen, Hydroxylgruppen-hältigen Oberflächen, wo Silanolgruppen von Silikatgläsern mit dem Silanisierungsreagenz umgesetzt werden. Zu den verwendeten Silanen gehören vor allem Chlor- und Alkoxysilane, die unter Abspaltung von Salzsäure bzw. der entsprechenden Alkohole mit den Hydroxylgruppen an der Oberfläche unter Ausbildung von Silylethern reagieren.

Um die Glasoberfläche mit Aminogruppen zu modifizieren werden die Glasslides zehn Minuten in einem Glastrog mit frisch hergestellter 10%iger APMDES-Lösung in Toluol eingelegt, danach durch Schwenken in reinem Toluol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend werden die Gläschen in Glas-Petrischalen vertikal positioniert und eine Stunde bei 100°C im Trockenschrank gelagert, um auch restliches, nur adsorptiv gebundenes Silan mit der Oberfläche und benachbarten APMDES Molekülen zu vernetzen.

- **Modifizierung mit Glutaraldehyd**

Um Proteine oder andere Aldehyd-reaktive organische Substanzen an die mit APMDES-modifizierte Glasslides zu konjugieren, müssen die Aminogruppen an der Glasoberfläche zunächst aktiviert werden, um eine Kopplung mit den bioaktiven Liganden zu ermöglichen. Dies ist zum Beispiel mit bifunktionellen Aldehyden wie Glutaraldehyd möglich, welche mit den oberflächengebundenen Aminogruppen unter Iminbildung reagieren und danach mit der noch freien Aldehydfunktion in der Lage sind, mit Aminogruppen des Proteins zu kondensieren. Weiters fungiert die Alkylkette des Aldehyds als flexibler Abstandhalter zwischen den Silanmolekülen an der Oberfläche und den Proteinen, wodurch die freie Beweglichkeit des Liganden gewährleistet wird.

Dazu werden die Deckgläser nach dem Abkühlen in 12-well-Platten dreimal mit dest. Wasser gewaschen und zur Modifikation jedem well 2,2 ml einer 0,5%igen Glutaraldehyd-Lösung in dest. Wasser zugesetzt. Nach 25 Minuten Inkubation werden sie wieder dreimal mit dest. Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

➤ **Unteres Deckglas:**

- **Hydrophobisierung mit Sigma-Cote®**

Hierzu werden die Glasslides zwei Sekunden in eine Sigma-Cote®/Heptan Lösung eingetaucht und getrocknet. Anschließend wird dreimal mit dest. Wasser gewaschen und trocken gelassen.

2.4. Polyacrylamidgel

2.4.1. Gelmaterialien

2.4.1.1. N,N'-Methylen-bis-acrylamid (BIS)

BIS (BIO-RAD Laboratories, No.161-0200, Großbritannien) wird als Vernetzer bei der Bildung von Polyacrylamidgelen verwendet. Die Porosität des Gels wird durch die Kettenlänge des Quervernetzers und den Grad der Vernetzung bestimmt. Je weniger BIS eingesetzt wird desto porenhaltiger ist das Gel.

2.4.1.2. Acrylamid (AA)-Stammlösung

Es wird eine 40%ige (m/v) Lösung hergestellt, indem Acrylamid (BIO-RAD Laboratories, No.161-0100, Großbritannien) in 50mM HEPES/NaOH-Puffer pH 8,2 gelöst wird.

2.4.1.3. 50mM HEPES/NaOH Puffer

HEPES ist eine zwitterionische Puffersubstanz, die für biochemische, molekularbiologische und mikrobiologische Zwecke, wie zum Beispiel für Zellkulturen, verwendet wird. Die größte Pufferkapazität ist bei einem pH-Bereich von 6,8-8,2 gegeben.

Herstellung: 5,958 mg HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure) werden in 500 ml dest. Wasser gelöst und mit 4M NaOH-Lösung auf pH 8,2 eingestellt.

2.4.1.4. Acrylsäure-N-hydroxy-succinimidester (AA-NHS)

Dieses Monomer (Sigma-Aldrich, No.A8060-1G, St. Louis, MO) wird als Ligandenbildende Komponente bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen verwendet und durch Reaktion von Acrylsäure mit N-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid hergestellt.

Bei der Gelherstellung wird eine wässrige Lösung von 1 mg/ml dest. Wasser eingesetzt.

2.4.1.5. Glycidyl-methacrylat

Glycidyl-methacrylat (Sigma-Aldrich, No.151238, St. Louis, MO, USA) ist eine Monomer-Komponente, die zwei Funktionalitäten bietet:

Die Methacrylat-Partialstruktur ermöglicht das Einpolymerisieren der Verbindung in ein Polyacrylamidgel, die Glycidyl-Teilstruktur enthält eine reaktive Epoxid-Funktion, die eine Kondensation mit primären Aminogruppen ermöglicht.

Durch teilweisen Ersatz von Acrylamid durch Glycidyl-methacrylat und nachfolgende Inkubation mit Proteinen könnte somit die Immobilisierung von funktionellen Proteinen an der Polyacrylamidoberfläche erfolgen.

2.4.1.6. N,N,N',N'-Tetra-methylethyldiamin (TEMED)

Tetramethylethyldiamin (BIO-RAD Laboratories, No.161-0800, Großbritannien) ist ein Polymerisationskatalysator, der nach Anstoß der Polymerisation durch Ammoniumperoxodisulfat zur Aufrechterhaltung der Polymerisation von Acrylamid bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen verwendet wird. Dabei wird die Bindung von freien Radikalen des Polymerisationsinitiators Ammoniumperoxodisulfat begünstigt.

Für die Gelherstellung wird TEMED 1:2 mit HEPES verdünnt.

2.4.1.7. Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Ammoniumperoxodisulfat (BIO-RAD Laboratories, No.161-0700, Großbritannien) besteht aus Ammonium- und Peroxodisulfationen und wird als Polymerisationsinitiator bei der Herstellung von Polyacrylamidgelen verwendet.

Kurz vor dem Gießen der Gele wird eine 5%ige Lösung durch Lösen von APS in dest. Wasser hergestellt.

2.4.1.8. Proteine

- **Kollagen Typ I**

Kollagen ist ein aus helikalen Peptidketten bestehendes Strukturprotein des Bindegewebes. Es ist das im menschlichen und tierischen Organismus meist verbreitete Eiweiß und der wichtigste Faserbestandteil von Knochen, Zähnen, Knorpel, Sehnen, Bändern und Haut.

Das verwendete Kollagen Typ I stammt aus der Ratte und wurde von der Firma Sigma-Aldrich (No.C7661, Großbritannien) bezogen.

Zur Gelherstellung werden 100 µl einer Stammlösung eingesetzt, die 5,2 mg Kollagen Typ I pro Milliliter 50mM HEPES enthält.

- **Matrigel®**

Es handelt sich hierbei um eine solubilisierte Basalmembran, die aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkom extrahiert wurde. Dieser Tumor ist reich an extrazellulären Matrixproteinen, wie Laminin, Kollagen I, Entaktin und Heparansulfat und enthält zusätzlich Wachstumsfaktoren, Matrixmetalloproteinasen und andere Proteinase. Dieses Matrigel® (BD Biosciences, No.356234, Bedford) polymerisiert bei Raumtemperatur und dient zur Adhäsion und Differenzierung von normalen und transformierten, verankerungs-abhängigen Epithelzellen, aber auch anderer Zelltypen.

Zur Gelherstellung wurde die Stammlösung von 10-12 mg Matrigel®/ml DMEM verwendet.

- **Gelatine**

Gelatine ist ein Polypeptid, das aus Knochen oder Schweineschwarte durch Hydrolyse gewonnen wird und zu 95% aus Aminosäuren besteht. Je nach Hydrolyseart (sauer oder basisch) unterscheidet man zwischen Gelatine A und B. Gelatine ist in Wasser quellbar und ab einer Temperatur von 50°C löslich.

Nach der Gelherstellung wurden die Gele jeweils mit einer 1%igen bovinen Gelatine-Lösung (Sigma-Aldrich, No.G9391, St. Louis, USA) in Aqua ad inject. 45 Minuten inkubiert.

- **20mM isotoner HEPES Puffer pH 7,4**

20mMol HEPES werden in 1000 ml dest. Wasser gelöst und mit einer verdünnten NaOH-Lösung unter pH-Kontrolle auf pH 7,4 eingestellt. Zur Isotonisierung werden anschließend 6 g NaCl zugesetzt und gelöst.

2.5. Fluorimetrie

Das Spektralfluorimeter der Firma TECAN® Austria ermöglicht sowohl die Registrierung von Fluoreszenzspektren als auch die Ermittlung der Fluoreszenzintensität von geringsten Probenvolumina in Mikrotiterplatten. Dazu werden die Proben mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Dabei wird die Energie des eingestrahlten Lichts absorbiert, wodurch Elektronen auf höhere Energieniveaus gehoben werden, was als Exzitation bezeichnet wird. Um hohe Fluoreszenzintensitäten zu erhalten, muss die Exzitation im Absorptionsmaximum erfolgen.

Da diese Zustände instabil sind, kehren die Elektronen wieder in den ursprünglichen Energiezustand zurück und geben einen Teil ihrer aufgenommenen Energie in Form von Fluoreszenzlicht ab, was als Emission bezeichnet wird.

Diese Proben befinden sich in unterschiedlichen Well- oder Mikrotiterplatten von den Firmen Iwaki oder Greiner bio-one, in denen Emissionswerte von 6, 12, 24 oder 96 Proben gleichzeitig innerhalb von wenigen Sekunden bestimmt werden können.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit kann die Fluorimetrie auch für die Bestimmung von sehr kleinen Substanzmengen verwendet werden.



Abb. 2: TECAN® Infinite M200

3. Methoden

Der Schwerpunkt meiner Arbeit richtete sich nach der Publikation von Casey E. Kadow [2] und Karen A. Beningo [3] und lag in der Anheftung von Zellen auf Geloberflächen unterschiedlicher Härte. Um dies zu ermöglichen wurden die Gele folgendermaßen hergestellt:

Zuerst wurde eine Lösung aus Acrylamid (AA) und N,N'-Methylen-bis-acrylamid (BIS) in HEPES in einer Konzentration von 0,03%, 0,3% und 1% und damit zu erwartender unterschiedlicher Härte in jeweils einem Zentrifugenröhrchen hergestellt und anschließend 20 Minuten im Exsiccator entgast. Dies war notwendig, um den in der Suspension enthaltenen Sauerstoff zu entfernen, der die Polymerisation verlangsamt oder sogar verhindern kann.

Nach dem Entgasen wurden das zu immobilisierende Protein (siehe 2.4.1.4.), Acrylsäure-N-hydroxy-succinimidester (AA-NHS) zur Proteinkopplung und N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin (TEMED) zugesetzt. Zuletzt wurde Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Polymerisationsinitiator zugegeben, das mit TEMED zu unterschiedlichen Polymerisationszeiten und Gelhärtegraden führte.

Die unterschiedlichen Härten sind jedoch vorwiegend auf die BIS-Acrylamid-Konzentration zurückzuführen. Diese Komponente fungiert als Quervernetzer zwischen den Acrylamidmonomeren und determiniert somit die Porosität der Gele. Die Härte des Gels steigt mit der Konzentration an BIS-Acrylamid, gleichzeitig sinkt die Porosität und die Zeit bis zur Verfestigung des Gels. Somit besitzt das 0,03%-Gel eine Polymerisationsdauer von circa 40 Minuten, das 0,3%-Gel circa 30 Minuten und das 1%-Gel circa 13 Minuten.

Unmittelbar nach Zugabe von APS wurden aus der jeweiligen Gellösung je 35 µl entnommen und auf die vorbehandelten oberen Deckgläser (siehe 2.3.2.) pipettiert.

Durch Auflegen des unteren, hydrophobierten Deckglases auf den Geltröpfchen wird ein gleichmäßig dicker Flüssigkeitsfilm erzwungen, der zu einem dünnen, homogenen Gelfilm polymerisiert.

Danach wurde der „Sandwich“ in 10 ml PBS in einer 6-well-Platte eingelegt, um das untere Glasslide vom oberen zu trennen. Die oberen slides, auf denen das Gel haftet, wurden dann zwei Mal mit PBS gewaschen, um die überschüssigen Reaktanten zu entfernen.

Die Gele wurden vor Aussaat der Zellen in eine 12-well-Platte transferiert und bei 4°C entweder eine Stunde lang im jeweiligen Zellkulturmedium inkubiert oder mit einer 2M wässrigen Glycin-Lösung bedeckt, um noch freie Bindungsstellen abzusättigen und sie zusätzlich vor dem Austrocknen zu schützen.

Danach wurde das Medium abgesaugt und in derselben 6-well-Platte wurden dann pro well 2 ml einer Zellsuspension zugesetzt, die eine definierte Zahl an frisch gespaltenen Zellen im jeweiligen Medium (siehe 2.2.2.) enthielt. Demnach betrug die Zellzahl bei den Caco-2-Zellen 40.000, bei den PSLC-Zellen 50.000 und bei den N2a-Zellen 10.000-20.000 Zellen pro well.

Die Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank zur Adhäsion und Proliferation der Zellen inkubiert, die nach Gelhärte und Zelltyp unterschiedlich sein sollten. Dieser Vorgang kann je nach Zellart einige Tage bis zu einer Woche dauern und wurde unter dem Mikroskop regelmäßig kontrolliert.

Sobald eine ausreichend erscheinende Konfluenz erreicht wurde, die indirekt die Adhäsion und Proliferation widerspiegelt, wurden verschiedene Parameter zur Charakterisierung der Auswirkung der Gelhärte und Gelmodifikation auf die Eigenschaften der adhären Zellen bestimmt. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Gele drei Mal mit PBS gewaschen. Zur Charakterisierung der Zellen wurden folgende Methoden angewendet:

- **CyQuant[®] Cell Proliferation Assay**

Dieser Test ist ein einfaches, schnelles und empfindliches Verfahren, um die Zellzahl in Kulturen zu bestimmen und wurde von der Firma Molecular Probes (No.C-7026, Eugene, OR, U.S.A.) bezogen. Der Messbereich liegt zwischen 50 und 50.000 Zellen pro 200 µl Medium. Durch Erhöhung der Farbstoffkonzentration kann die Nachweisgrenze auf 250.000 Zellen erweitert werden. Da die Zahl der an den Gelen adhären Zellen sowohl mit der Adhäsion als auch mit der Zellteilung steigt, ist dieser Test für die Überprüfung der Adhäsion sowie der Proliferation geeignet. Er basiert auf der Bindung eines Fluoreszenz-Farbstoffes an die zellulären Nukleinsäuren, wobei Komponenten des speziellen Puffers die Zellen lysieren und dadurch die Nukleinsäuren der Zellen für den Farbstoff zugänglich werden.

Um die Bewuchsdichte auf den Gelplättchen bestimmen zu können, wurden die Zellen durch Zusatz von 500 µl CellLytic[®]-Puffer pro well, bestehend aus 250 µl 20mM iso-HEPES pH 7,4 und 250 µl CellLytic[®]-Reagenz, während einer 15 Minuten langen Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte 50 µl Lysat und 150 µl Farbstofflösung, die aus 0,5 µl CyQuant[®]-Cell Proliferation Assay Kit Fluoreszenzfarbstoff, 7,5 µl CyQuant[®]-Cell Proliferation Assay Kit Puffer und 142,5 µl Zellkulturwasser hergestellt wurde, vereinigt. Dieses Reagenz wurde immer frisch zubereitet. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten unter Lichtschutz wurde die Fluoreszenzintensität im Fluorimeter (Tecan) bei 485/535 nm bestimmt.

- **Alkalische Phosphatase-Aktivität**

Vor diesem Versuch wurden die Gele ein Mal mit 20mM iso-HEPES pH 7,4 gewaschen, um das restliche Medium zu entfernen. Pro well wurde dann eine Mixtur, bestehend aus 250 µl 1mM 4-Methyl-umbelliferryl-phosphat-Lösung (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) in 20mM iso-HEPES pH 7,4 und 250µl 1mM 4-Methyl-umbelliferryl-phosphat in 20mM iso-HEPES pH 9,0, zugesetzt und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte 3,8 µl Überstand und 71,2 µl iso-HEPES pH 7,4 gemischt und bei 360/440 nm analysiert.

- **Dipeptidylpeptidase IV (DPP)-Aktivität**

Bei diesem Enzym, auch CD 26 genannt, handelt es sich um eine Serinprotease, die Dipeptide vom N-terminalen Ende einer Peptidkette abspaltet.

Vor diesem Versuch wurden die Gele ein Mal mit 20mM iso-HEPES pH 7,4 gewaschen und pro well mit 500 µl einer Substratlösung, bestehend aus 0,5mM 7-Gly-pro-4-nitroanilid (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) in 20mM iso-HEPES pH 7,4, versetzt und zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde fünf Minuten in einer Mikrotiterplattenzentrifuge bei 1000 U/Min zentrifugiert und 34 µl Überstand wurden in einer 96-well-Mikroplatte mit 66 µl

20mM iso-HEPES pH 7,4 verdünnt. Die Absorption des umgesetzten Substrates wurde bei 405 nm bestimmt.

- **Aminopeptidase N (APN)-Aktivität**

APN, auch bekannt als CD13, ist an der Regulation der Adhäsion von Zellen und an Zell-Zell Interaktionen beteiligt.

Vor dem Versuch wurden die Gele ein Mal mit 20mM iso-HEPES pH 7,4 gewaschen und pro well wurden 500 µl einer Substratlösung, bestehend aus 1,5mM L-Alanin-4-nitroanilid-hydrochlorid (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) in 20mM iso-HEPES pH 7,4, zugesetzt und zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in einer 96-well-Mikrotiterplatte 1:3 verdünnt und die Absorption bei 405 nm bestimmt.

- **Mikroskopie**

Ein weiterer Versuch um zu überprüfen, wie Zellen auf unterschiedliche Gelhärten reagieren, war die Kultivierung von D1-Zellen in sogenannten „Gel-Sandwiches“. Dafür wurden jeweils zwei Gele pro Härtegrad (0,03%, 0,3% und 1%) hergestellt und eine Stunde in DMEM-Medium inkubiert. Je Härtegrad wurden auf einem der beiden Gele jeweils 10.000 D1-Zellen ausgesät und so lange im Brutschrank inkubiert bis sich einige Zellen angeheftet hatten, was unter dem Mikroskop regelmäßig kontrolliert wurde. Danach wurde das Medium mit den nicht angehefteten Zellen abgesaugt, das zweite Gelplättchen mit der Gelschicht nach unten aufgelegt und mit Hilfe eines 2,5 ml Glasvials beschwert. Dieser „Sandwich“ wurde nach Zusatz von 2 ml frischem Medium in einer 6-well-Platte im Brutschrank kultiviert. Bereits nach drei Tagen konnte bei mikroskopischer Evaluation ein Unterschied in der Zelldichte in Abhängigkeit von der Gelhärte beobachtet werden. Wie aus den mikroskopischen Bildern in den Abbildungen 3A-3C ersichtlich ist, nimmt die Bewuchsdichte der Zellen mit steigender BIS-Konzentration und damit Gelhärte zu.

Zusätzlich konnten in diesen Sandwiches D1-Zellen dreidimensional proliferieren.

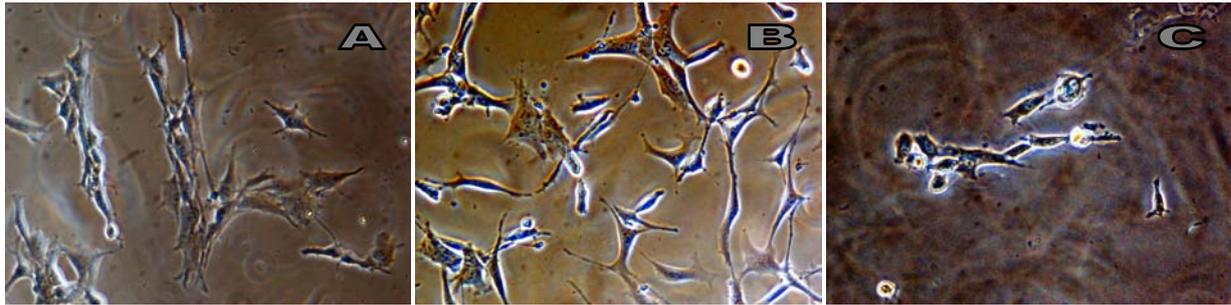


Abb. 3: D1-Zellen auf Gel-Sandwiches unterschiedlicher Härte (0.03%, A; 0.3%, B und 1%, C).

4. Ergebnisse und Diskussion

Da keinerlei praktische Erfahrung mit der Auswirkung unterschiedlich harter Unterlagen auf die Eigenschaften von darauf kultivierten Zellen vorhanden war, sollten im ersten Schritt Untersuchungen der Härte- und Oberflächenmodifikation bestimmenden Parameter grundlegende Erkenntnisse liefern. Als Messparameter dienten primär die Mikroskopie und die Bestimmung der Zellzahl.

4.1. Gelmodifikationen

Um einerseits geeignete Substanzmengen und –konzentrationen für die Gelherstellung zu ermitteln und gleichzeitig die Zelladhäsion optimieren zu können, wurden verschiedene Versuche durchgeführt:

- **Variation der Konzentration von AA-NHS**

Bei der Gelherstellung wurden verschiedene Konzentrationen (1 mg/ml, 2 mg/ml und 5 mg/ml) von AA-NHS eingesetzt und der Einfluss auf die Zellanheftung mikroskopisch untersucht. Da unterschiedliche AA-NHS Konzentrationen keinerlei optisch erkennbare Auswirkungen auf die Zahl adhärierter Zellen zeigten, wurde die AA-NHS Konzentration in den Polyacrylamidgelen auf den Minimalwert von 1 mg/ml für alle folgenden Versuche festgelegt.

- **Variation der Menge an Kollagen Typ I**

Für diesen Versuch wurden 0,3%ige Polyacrylamidgele mit 2,6 mg/ml, 1,0 mg/ml und 0,5 mg/ml Kollagen Typ I, ausgehend von einer Stammlösung mit 5,2 mg/ml Kollagen Typ I, hergestellt. Nach Aussaat von D1-Zellen (10.000 Zellen / well) auf den Gelen und regelmäßiger Kontrolle unter dem Mikroskop wurde beobachtet, dass die Zellanheftung mit steigender Kollagenmenge zunimmt (Abb. 4A–4C). Mit zunehmender Kollagenmenge auf der Wachstums Oberfläche, wie aus den Abb. 4A–4C ersichtlich ist, waren immer mehr Zellen angeheftet und haben begonnen sich zu vermehren. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden in allen folgenden Versuchen 2,6 mg/ml Kollagen Typ I zur Modifikation der Polyacrylamidgele verwendet.

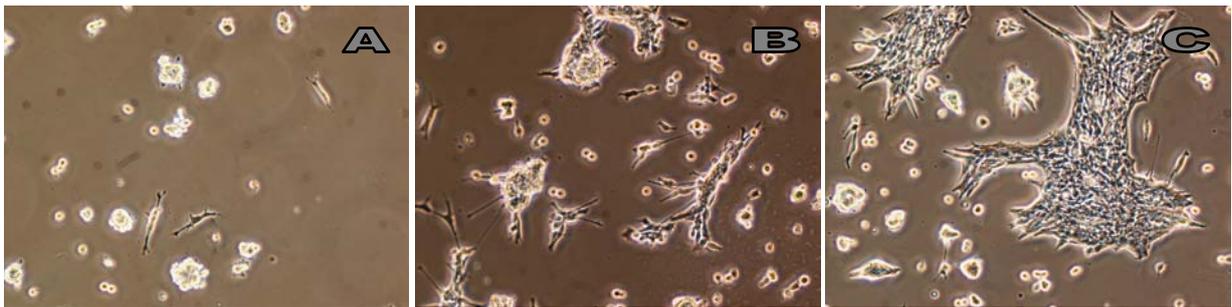


Abb. 4: Adhäsion von D1-Zellen an 0,3%igen Polyacrylamidgelen mit 2,6 mg/ml (A), 1,0 mg/ml (B) und 0,5 mg/ml (C) Kollagen Typ I.

- **Variation der Matrigel®-Verdünnung**

Weiters wurde untersucht, ob die Adhäsion und Proliferation von Zellen durch die Matrigel®-Konzentration beeinflusst wird. Dazu wurde eine Stammlösung (10-12 mg/ml, 1%), eine 1:2 Verdünnung (0,3%) und eine 1:4 Verdünnung (0,03%) und N2a-Zellen verwendet, weil sich diese bevorzugt auf Matrigel®, das als Protein statt Kollagen Typ I verwendet wurde, anheften und differenzieren. Neben N2a-Zellen differenzieren auch Caco-2-Zellen auf Matrigel®-Gelen.

Für jede Verdünnungsstufe wurden jeweils 20.000 Zellen auf einem 0,3%igen Gel ausgesät und einige Tage inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten

Bewuchsdichte wurde die Zellzahl mit dem CyQuant®-Test, wie in Punkt 4.2. beschrieben, bestimmt.

Matrigel®-Konzentration (%)	Zellzahl / well			MW	StABW
1,00	98760	98057	101170	99329	1633
0,30	101501	101769	98481	100584	1826
0,03	108728	102278	103207	104738	3487

Tab. 5: N2a-Zellanzahl / well auf 0,3%igen Gelen mit unterschiedlichen Matrigel®-Konzentrationen.

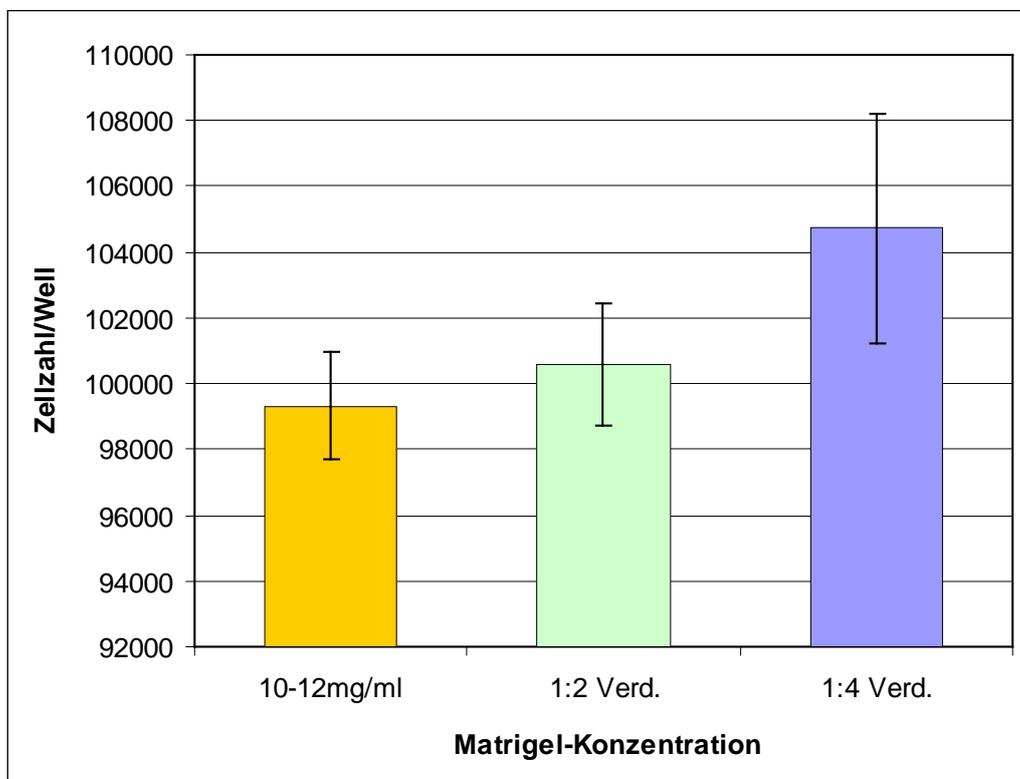


Abb. 6: Grafische Darstellung der Zahl adhärrierter N2a-Zellen auf Matrigel®-beschichteten Polyacrylamidgelen.

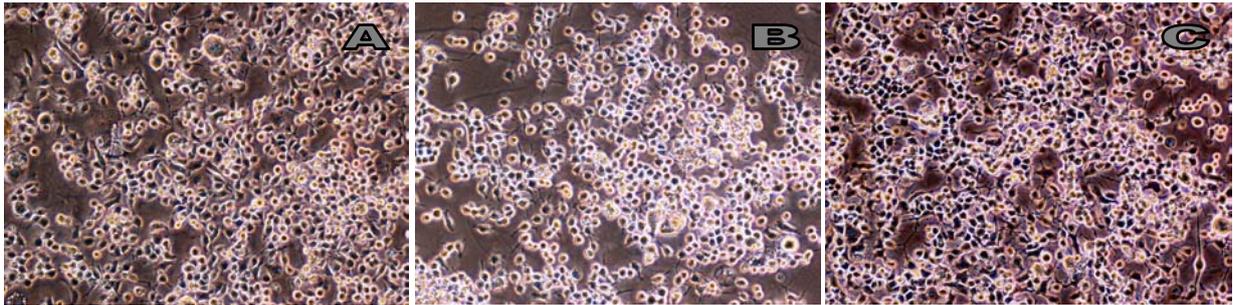


Abb. 7: N2a-Zellen auf 0.3% Gelen mit unterschiedlichen Matrigel[®]-Konzentrationen (1,0 %, A; 0,3%, B und 0,03%, C).

Wie die Ergebnisse des CyQuant[®]-Assays als auch die mikroskopische Auswertung der Wachstumsoberflächen ergaben, bestand kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen den unterschiedlichen Matrigel[®]-Verdünnungen. Daher wurde für die weitere Herstellung von Matrigel[®]-Gel Beschichtungen immer die 1:4 Verdünnung (0,03% Matrigel[®]) verwendet.

- **Einfluss der Proteinbeschichtung auf die Adhäsion unterschiedlicher Zelltypen**

Wie die mikroskopische Auswertung der Adhäsion von unterschiedlichen Zelltypen an Polyacrylamidgelen mit unterschiedlichen Proteinbeschichtungen gezeigt hat, heften sich PSLC- (siehe Abb. 8A–8C), D1- und Caco-2-Zellen sehr gut an Gele mit Kollagen Typ I-Beschichtungen an.

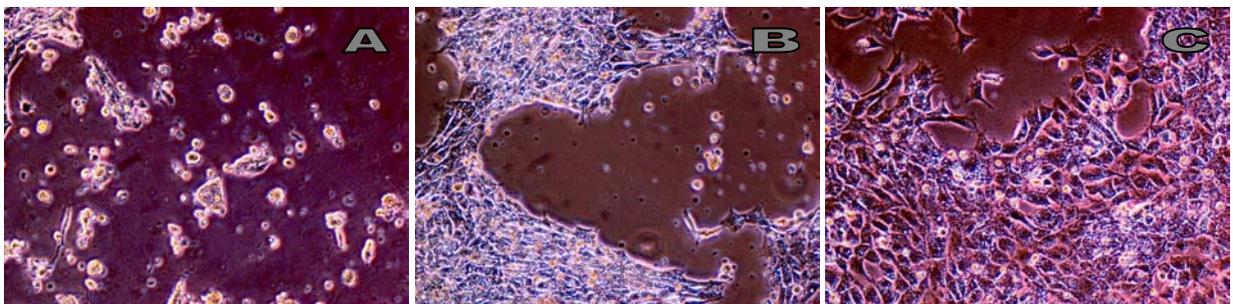


Abb. 8: PSLC-Zellen auf Kollagen Typ I Gelen unterschiedlicher Härte: 0.03% (A), 0.3% (B) und 1% (C).

Hingegen adhäreren N2a-Zellen bevorzugt an Matrigel[®]-beschichteten Trägern. Die Blasenepithel-Zelllinien 5637 und SV-HUC1 bevorzugten wiederum Gelatine-gecoatete Polyacrylamid-Träger, wobei sich SV-HUC1-Zellen bereits nach sieben Tagen wieder abzulösen beginnen und somit für weitere Versuche nicht geeignet waren. Im Vergleich dazu sind Caco-2-Zellen ein Zelltyp, der auf allen Proteinbeschichtungen adhärert.

Gemeinsam ist jedoch allen Zelltypen, dass ihre Anheftung und Proliferation mit der BIS-Konzentration im Polyacrylamidgel und damit mit der Gelhärte zunimmt.

- **Partieller Ersatz von AA-NHS durch Glycidyl-methacrylat**

In diesem Versuch wurden Polyacrylamidgele mit Epoxid statt mit AA-NHS hergestellt, um eine mögliche Verbesserung der Zelladhäsion durch Immobilisierung von Proteinen zu erzielen.

Dazu wurden zunächst proteinfreie Polyacrylamidgele mit zwei verschiedenen Epoxid-Konzentrationen (50 mg/ml und 5 mg/ml), aber auch ohne Epoxid als Leerwert hergestellt.

Um eventuell proteinbindende Eigenschaften des Epoxid-haltigen Geles sichtbar und messbar zu machen, wurden die Geloberflächen zusätzlich mit Fluorescein-markiertem-Rinderserumalbumin (FITC-BSA, 1 mg/ml in 50mM Carbonatpuffer pH 9,6) zwei Stunden unter Lichtschutz auf einem Schüttler inkubiert, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Anschließend wurde drei Mal mit PBS gewaschen, um das ungebundene FITC-BSA zu entfernen. Danach wurde die Fluoreszenzintensität des gebundenen Proteins bei 485/535 nm bestimmt.

Epoxid-Konzentration im Ansatz (mg/ml)	Floureszenzintensitäten		Mittlere relative Polyacrylamid-gebundene Fluoreszenz
0	4272	4578	0
5	8887	6854	3445
50	5072	5337	779

Tab. 9: Fluoreszenzintensität von Epoxid-haltigen, 0,3%igen Polyacrylamidgelen nach Immobilisierung von Fluoreszenz-markiertem Rinderserumalbumin.

Die Messergebnisse in Tab. 9 zeigen, dass bei hohen Epoxidkonzentrationen die Fluoreszenzintensitäten der Gele jenen des Leerwertes ohne Epoxidzusatz ähnlich sind, während bei geringen Epoxidmengen die Fluoreszenzintensitäten deutlich höher waren. Die hohe Variation der Einzelwerte sowie die inverse Konzentrations-Fluoreszenz-Relation lassen auf eine nicht zuverlässige Analytik schließen. Ob eine Dotierung der Acrylamidlösungen mit Epoxid die Immobilisierung von Proteinen ermöglicht, konnte aus diesem Versuch nicht eindeutig geklärt werden.

- **APS-Konzentration und -Menge**

Aufgrund der zu raschen Polymerisation der Gelsuspension nach Zugabe von APS wurde die Menge von 5 µl auf 2,5 µl und die Konzentration somit von 5% auf 2,5% reduziert.

- **Tropfengröße der Gelsuspension für den „Sandwich“**

Zunächst wurde ein Tropfen aus 25 µl Lösung auf das Deckglas aufgebracht. Nach Trennung des oberen vom unteren Deckglas hatte sich jedoch kein gleichmäßiges Gel ausgebildet, da das Volumen zu gering war. Um dies zu verbessern wurde das Tropfenvolumen von 25 µl auf 35 µl erhöht.

All diese Modifikationen der Polyacrylamidgel-Herstellung und Oberflächenmodifikation zur Verbesserung der Zellanheftung haben dazu geführt, dass die Gele schlussendlich mit den in Tab. 10 festgelegten Volumina hergestellt wurden.

Substanz	Relative Gelhärte		
	0,03	0,30	1,00
AA	187,5µl	187,5µl	375µl
BIS	15µl	150µl	500µl
HEPES	662,5µl	797,5µl	125µl
Protein	100µl	100µl	100µl
AA-NHS	5µl	5µl	5µl
TEMED	2µl	2µl	2µl
APS	2,5µl	2,5µl	2,5µl

Tab. 10: Bestandteile und Mengen zur Herstellung von Protein-modifizierten Polyacrylamidgelen mit unterschiedlicher Gelhärte.

4.2. Bestimmung der Proliferation und Adhäsion von Zellen mittels CyQuant®-Test

Der CyQuant®-Test wurde eingesetzt, um die Proliferation und Adhäsion von Zellen (Caco-2) auf der Geloberfläche beurteilen zu können. Dieser Test beruht auf der Bestimmung des DNA-Gehaltes, der zur Zellzahl direkt proportional ist. Dazu wurde ein grüner Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der erst bei Bindung an zelluläre Nukleinsäuren von lysierten Zellen einen fluoreszierenden DNA-Farbstoffkomplex bildet und somit eine Fluoreszenz als Messparameter hervorruft. Zunächst wurden die auf den Polyacrylamidgel-Plättchen vorhandenen Zellen lysiert, wofür pro well 500 µl CellLytic®-Puffer, bestehend aus 250 µl 20mM iso-HEPES pH 7,4 und 250 µl CellLytic®-Reagenz, zugesetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurden 50 µl Lysat in das well einer 96-well Mikrotiterplatte transferiert und 150 µl eines Fluoreszenzreagenzes zugegeben, das aus 0,5 µl CyQuant®-Cell Proliferation Assay Kit Fluoreszenzfarbstoff, 7,5 µl CyQuant®-Cell Proliferation Assay Kit Puffer und 142,5 µl Zellkulturwasser hergestellt wurde. Dieses Reagenz wurde vor dem Versuch immer frisch zubereitet. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten unter Lichtschutz wurde die Menge an DNA-gebundenem Farbstoff im SpectraFluor Fluorimeter (Tecan) bei 485/535 nm bestimmt.

Die Zellzahl wurde an Hand einer Eichgeraden mit einer Zellsuspension bekannter Zellzahl ermittelt. Dafür wurden unterschiedliche Caco-2 Zellsuspensionen mit

definierten Zellzahlen von 15.000 bis 100.000 / well in 20mM iso-HEPES Puffer pH 7,4 verwendet und wie oben beschrieben behandelt.

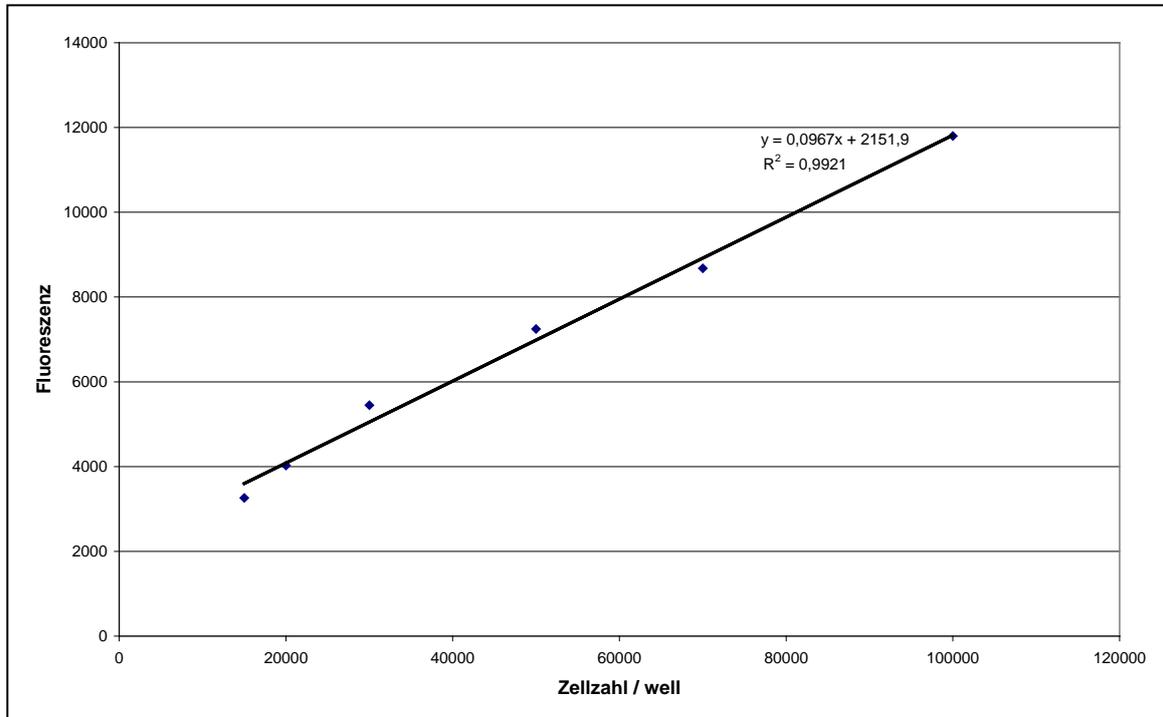


Abb. 11: CyQuant®-Assay Eichgerade.

Um die Zellzahl / well bestimmen zu können, wurden die erhaltenen Fluoreszenzwerte in folgende Formel eingesetzt:

$$x = (y - 2151,9) / 0,0967$$

y = gemessene Fluoreszenz

x = Anzahl an Zellen / well

- **Einfluss der Gelhärte auf die Adhäsion von Caco-2-Zellen an Kollagen Typ I hältigen Polyacrylamidgelen**

Um den Einfluss der Gelhärte, die durch die Konzentration an BIS-Acrylamid-Konzentration erzielt wurde, auf die Adhäsion von humanen Dünndarmepithelzellen zu untersuchen, wurden pro Gelhärtegrad 20.000 Caco-2-Zellen ausgesät und die Gelplättchen mehrere Tage im Brutschrank inkubiert. Bereits

nach wenigen Tagen konnte unter dem Mikroskop ein Unterschied in der Bewuchsdichte beobachtet werden. Nach dem Waschen mit PBS wurde der CyQuant[®]-Test wie oben beschrieben durchgeführt.

Relative Gelhärtete	Zellzahl / well			MW	StABW
0,03	93031	119908	121139	111359	15885
0,30	194272	169287	196174	186578	15004
1,00	208915	204975	203342	205744	2865

Tab. 12: Zahl adhärenter Caco-2-Zellen an Kollagen Typ I-hältigen Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Härte.

Nicht nur an Hand der Mikroskopie sondern auch an Hand der Zahl an Oberflächen- gebundenen Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die Zelladhäsion mit steigender Gelhärtete zunimmt.

- **Einfluss der Gelhärtete auf die Adhäsion von 5637-Zellen an Kollagen Typ I-hältigen Polyacrylamidgelen**

Der CyQuant[®]-Test wurde auch zur Ermittlung der Zahl adhärenter 5637-Zellen eingesetzt, die auf Kollagen Typ I-hältigen Polyacrylamidgelen kaum adhäreren, sich jedoch auf Gelatine-gecoateten Gelen gut anheften. Dafür wurden jeweils 10.000 Zellen pro Gelhärtete grad eingesetzt und die Bewuchsdichte über mehrere Tage im Mikroskop kontrolliert. Nach einer Woche wurde der CyQuant[®]-Test, wie oben beschrieben, durchgeführt. Da keine CyQuant[®]-Assay Eichgerade für 5637-Zellen zur Verfügung stand, wurde die Anzahl dieser Zellen an Hand der Eichgerade für Caco-2-Zellen bestimmt.

Relative Gelhärtete	Zellzahl / well			MW	StABW
0,03	50456	52369	50559	51128	1076
0,30	71231	73972	73176	72793	1410
1,00	87851	85017	84882	85917	1677

Tab. 13: Zahl adhärenter 5637-Zellen an Gelatine-gecoateten Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Härte.

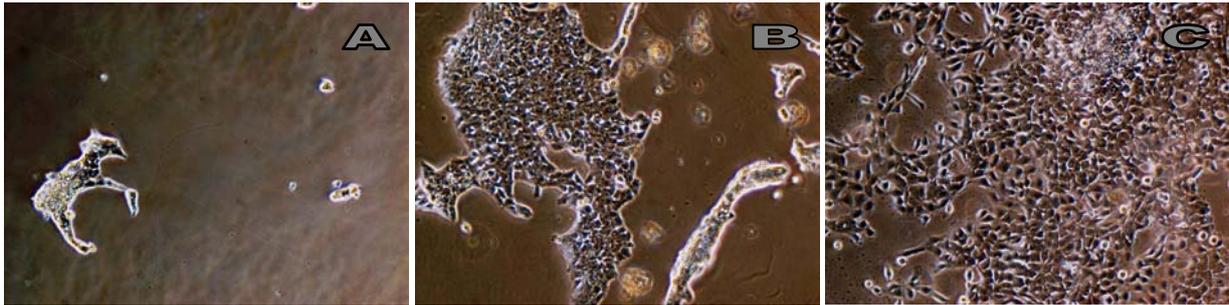


Abb. 14: 5637-Zellen auf Gelatine-gecoateten Gelen unterschiedlicher Härte (0.03% (A), 0.3% (B) und 1% (C)).

Wie die Mikroskopie (Abb. 14A–14C) als auch die Ergebnisse des CyQuant®-Tests zeigen, adhären 5637-Zellen wie Caco-2-Zellen an härteren Gelen besser als an weichen. Jedoch ist für 5637-Zellen eine Beschichtung mit Gelatine notwendig, während bei Caco-2-Zellen eine Beschichtung mit Kollagen Typ I Voraussetzung ist, um den Einfluss der Gelhärte beobachten zu können.

Die Adhäsion und Proliferation der Zellen ist somit nicht nur von der BIS-Konzentration, sondern auch von der Art des eingesetzten Proteins abhängig.

4.3. Bestimmung der Differenzierung an Hand der Zellmembran-gebundenen Enzymaktivität

Eine Methode um den Differenzierungsgrad von Caco-2-Zellen zu bestimmen, besteht in der Ermittlung der Menge an Zellmembran-ständigen Peptidasen wie Dipeptidylpeptidase (DPP IV) oder alkalischer Phosphatase (ALP). Bei der Differenzierung von Zellen werden diese vom Golgiapparat zur apikalen Domäne transportiert [9]. Somit kann die Funktionalität von Zellpopulationen charakterisiert und der Einfluss von verschiedenen Substraten auf den Differenzierungsgrad untersucht werden.

Um die enzymatische Aktivität der Zellen quantifizieren zu können wurden sowohl der Peptidase-Aktivitätstest als auch der CyQuant®-Test nacheinander an Zellen im gleichen well durchgeführt. Nach Aussaat von 10.000 Caco-2-Zellen auf Kollagen Typ I-beschichteten Polyacrylamidgelen mit unterschiedlicher Härte und Kultivierung im Brutschrank wurden für den ALP-Test die Gele einmal mit 20mM iso-HEPES pH

7,4 gewaschen, um das restliche Medium und ungebundene Zellen zu entfernen. Danach wurden zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität pro well eine Mischung, bestehend aus 250 µl 1mM 4-Methyl-umbelliferryl-phosphat in 20mM iso-HEPES pH 7,4 und 250 µl 1mM 4-Methyl-umbelliferryl-phosphat in 20mM iso-HEPES pH 9,0, zugesetzt und eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 3,8 µl Überstand und 71,2 µl iso-HEPES pH 7,4 in eine 96-well-Mikrotiterplatte transferiert und die Fluoreszenzintensität des umgesetzten Substrates bei 360/440 nm bestimmt.

Die Enzymmenge wurde über eine zuvor erstellte Eichgerade ermittelt, wozu 8, 5, 2 und 0,1 µg alkalische Phosphatase pro Milliliter 20mM iso-HEPES pH 7,4 mit 250 µl 1mM 4-Methyl-umbelliferryl-phosphat in 20mM iso-HEPES pH 9 gemischt und wie oben beschrieben behandelt wurde.

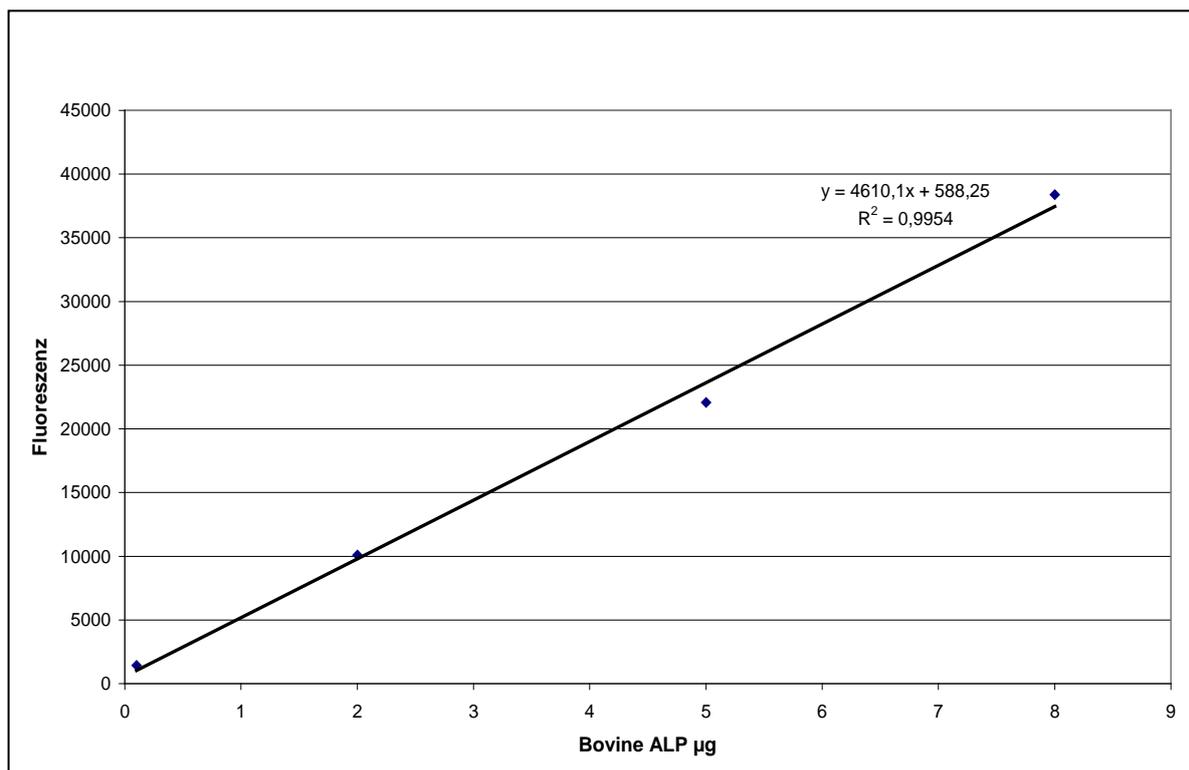


Abb. 15: Eichgerade zur Bestimmung der Menge an membrangebundener alkalischer Phosphatase.

Die aus der Messung erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden in folgende Formel eingesetzt, um die Enzymaktivität berechnen zu können:

$$x=(y-588,25)/4610,1$$

y= gemessene Fluoreszenz

x= Enzymgehalt/ well

Relative Gelhärte	Zellzahl / well			MW	StABW
0,03	121031	119908	121139	120693	682
0,30	187272	189287	196174	190911	4668
1,00	206915	190975	201342	199744	8089

Tab. 16: Anzahl von Caco-2-Zellen, die auf Kollagen Typ I-beschichteten Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Härte adhären.

Um den Differenzierungsgrad pro Caco-2-Zelle bestimmen zu können, wurde anschließend der CyQuant®-Test (siehe Punkt 4.2.) zur Bestimmung der Zellzahl in der gleichen Mikroplatte durchgeführt. Dafür wurde diese fünf Minuten in einer Mikrotiterplattenzentrifuge bei 1000 UpM zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig entfernt. In den wells der Mikroplatte wurde dann der CyQuant®-Test wie oben beschrieben durchgeführt.

Relative Gelhärte	ALP-bovine Menge (µg)			MW	StABW
0,03	0,47	0,45	0,46	0,46	0,01
0,30	0,76	0,77	0,87	0,80	0,06
1,00	1,11	0,91	0,99	0,99	0,10

Tab. 17: Menge an Membran-ständiger alkalischer Phosphatase von Caco-2-Zellen, die auf Kollagen Typ I-beschichteten Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Härte kultiviert wurden.

Wie aus den in Tab.16 angeführten Messwerten hervorgeht, nimmt die Zahl adhärenter Zellen mit der Substrathärte zu, wobei die Zellzahl bei Erhöhung der relativen Härte von 0,03 auf 0,3 um 58% steigt, bei Zunahme der Härte von 0,3 auf 1,0 nur um weitere 5%.

Um schlussendlich eine Aussage über den Differenzierungsgrad treffen zu können, wurde die Menge Membran-ständiger alkalischer Phosphatase auf eine Zelle bezogen und mit dem Faktor 10^6 multipliziert, um vergleichbare Werte zu erhalten.

$$\text{Differenzierungsgrad} = \frac{\text{Enzymaktivität}}{\text{Zellzahl}} * 10^6$$

Relative Gelhärte	Differenzierungsgrad			MW	StABW
0,03	3,9	3,8	3,8	3,8	0,06
0,30	4,1	4,1	4,4	4,2	0,17
1,00	5,4	4,8	4,9	5,0	0,32

Tab. 18: Differenzierungsgrad von Caco-2-Zellen nach Kultivierung auf Kollagen Typ I-beschichteten Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Härte.

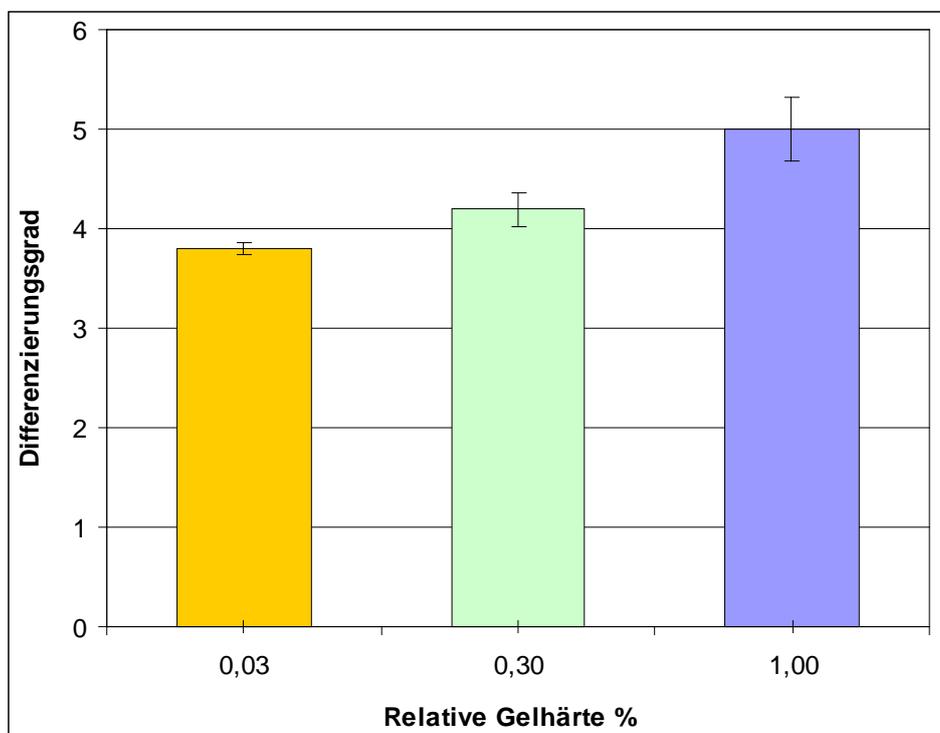


Abb. 19: Graphische Darstellung des Differenzierungsgrades von Caco-2-Zellen nach Kultivierung auf Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Härte.

Insgesamt bewies dieser Versuch, dass einerseits die Adhäsion und Proliferation von Caco-2-Zellen auf Kollagen Typ I-beschichteten Substraten mit deren Härte zunimmt wie die in Tab.18 angeführten Resultate belegen. Andererseits zeigt die Korrelation der Zellzahl mit der Menge an alkalischer Phosphatase, dass der Differenzierungsgrad von Caco-2-Zellen auf Kollagen Typ I-beschichteten Substraten

ebenfalls mit der relativen Härte steigt. Wie in Abb.19 dargestellt, sind die Unterschiede signifikant und bei einer Erhöhung der Gelhärte von 0,3 auf 1,0 deutlicher ausgeprägt als zwischen Gelen einer Härte von 0,03 und 0,3.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit sollte der Einfluss der Härte als auch der Proteinbeschichtung des Substrates, die auch in-vivo die Ansiedelung von Zellen bestimmt, untersucht werden. Als Modell-Substrat dienten Polyacrylamidgele, deren Härte durch die Menge an Quervernetzer einstellbar ist. Es wurde das Verhalten unterschiedlichster Zelltypen, wie Dünndarmepithelzellen, Blasenepithelzellen, Knochenmarkszellen, Nervenzellen und Pankreaszellen, die sich in-vivo auf Substraten unterschiedlicher Härte anheften, untersucht. Die mikroskopische Auswertung der Kultivate ergab, dass alle untersuchten Zelltypen auf weichen Substraten kaum, jedoch auf den härtesten untersuchten Substraten bevorzugt adhäreren.

Um die Proteinbeschichtung kovalent an der Polyacrylamidgel-Oberfläche zu immobilisieren, wurden reaktive Monomere wie Acrylamid-N-hydroxy-succinimidester und Glycidyl-acrylamid als Monomerkomponenten bei der Polymerisation der Gele zugesetzt. Die Kopplung der Proteine dürfte jedoch nur unzureichend erfolgen, da die mikroskopische Auswertung nach Kultivierung der Zellen auf diesen Oberflächen keine augenscheinliche Änderung der Adhäsion ergab. Hingegen zeigte sich, dass die adsorptive Immobilisierung von Proteinen eine stabile Beschichtung ergab. Nervenzellen und Dünndarmepithelzellen adhärten bevorzugt an Matrigel®-beschichteten Trägern, während Blasenepithelzellen an Gelatine-modifizierten Oberflächen anwuchsen. Kollagen Typ I stellte die optimale Beschichtung für die Adhäsion und Proliferation von Dünndarmepithelzellen dar.

Im zweiten Teil der Diplomarbeit wurde versucht, auch Informationen über die Differenzierung der Zellen auf unterschiedlich harten und Protein-modifizierten Oberflächen zu sammeln. Um die Differenzierung der Zellen messbar zu machen, wurde die Expression von Markerproteinen an der Zelloberfläche von Caco-2 Zellen herangezogen. Alkalische Phosphatase und Dipeptidylpeptidase IV sind derartige

Zellmembranbestandteile, die erst mit Differenzierung der Zellen zunehmen und die durch ihre enzymatische Aktivität quantifiziert werden können. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurde parallel die Zellzahl bestimmt. Dazu wurde die Bildung eines fluoreszierenden Komplexes mit der DNA lysierter Zellen als Testsystem etabliert. An Hand von Caco-2-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Adhäsion, Wachstum und Differenzierung auf Kollagen Typ I-beschichteten Polyacrylamidgelen mit deren Härte überproportional zunimmt.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass nicht nur die Härte der Wachstumsfläche sondern auch ihre Proteinbeschichtung einen wesentlichen Einfluss auf Bindung, Wachstum und Differenzierung ausübt. Eine genaue Kenntnis dieser optimalen Bedingungen für Zellwachstum und Zelldifferenzierung ist für das tissue engineering wertvoll, bietet aber auch in der Pharmazeutischen Technologie ein breites Anwendungsspektrum. Um Resorptionsvorgänge, insbesondere von Problemarzneistoffen, zu untersuchen und optimieren zu können sind Resorptionsmodelle notwendig, welche die natürlichen Barrieren möglichst nahe an in-vivo imitieren. Durch Kenntnis der optimalen, vom Zelltyp abhängigen Kultivierungsbedingungen könnten Resorptionsvorgänge und Optimierungen von Formulierungen in Zukunft unter Einschränkung von Tierversuchen erfolgreich durchgeführt werden.

6. Literaturverzeichnis

[1] www.patent-de.com/199990204/DE69225494T2.html

[2] Casey E. Kadow, Penelope C. Georges, Paul A. Janmey, Karen A. Beningo, 2007. Polyacrylamide Hydrogels for Cell Mechanics: Steps Toward Optimization and Alternative Uses. *Methods in Cell Biology* 83, 29-46

[3] Karen A. Beningo, Chun-Min Lo, Yu-Li Wang, 2002. Flexible Polyacrylamide Substrata for the Analysis of Mechanical Interactions at Cell-Substratum Adhesion. *Methods in Cell Biology* 69, 325-339

[4] Tony Yeung, Penelope C. Georges, Lisa A. Flanagan, Beatrice Marg, Miguelina Ortiz, Makoto Funaki, Nastaran Zahir, Wenyu Ming, Valerie Weaver, Paul A. Janmey, 2005. Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure and Adhesion. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 60, 24-34

[5] Florian Rehfeldt, Adam J. Engler, Adam Eckhardt, Fariyal Ahmed, Dennis E. Discher, 2007. Cell responses to the mechanochemical microenvironment – Implications for regenerative medicine and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1329-1339

[6] Barbora Komorová, 2006. Diplomarbeit, Immobilisierung und zellbiologische Charakterisierung von Biomolekülen an Glasobjektträgern; Universität Wien, Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

[7] www.atcc.org, 21.05.2012

[8] www.dsmz.de, 21.05.2012

[9] K. Matter, M. Brauchbar, K. Bucher, H.P. Hauri, 1990. Sorting of endogenous plasma membrane proteins occurs from two sites in cultured human intestinal epithelial cells (Caco-2). *Cell* 60, 429-437

7. Lebenslauf

Name: Michaela Olga Kubal

Geboren am: 13.03.1983

Geburtsort: Wien

Wohnort: Sonnwendg. 34/26, 1100 Wien

Staatsbürgerschaft: Österreich

Eltern: Andreas Kubal: leitendes Management

Olga Kubal: kaufmännische Angestellte



Ausbildung

1989 – 1993 Volksschule, Alxingergasse

1993 – 2002 Bundesrealgymnasium Wiedner Gürtel

2002 – 2012 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

Berufserfahrung

1996 – 1997 pro Jahr ein Monat Ferialpraxis bei der Firma Siemens

August 2009 Ferialpraxis bei Firma Kwizda

Juni 2010 Herba Chemosan

2011 – 2012 pro Jahr 2 Monate Ferialpraxis bei der Pfirma Pfizer

Universitäre Tätigkeiten

WS 07–SS 08 Tutorin der Lehrveranstaltung: Grundpraktikum aus Pharmazeutischer Technologie am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

WS 08–WS 09 Tutorium der Lehrveranstaltung: Industrielle Arzneimittelherstellung am Department für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie

SS 10–WS 11 Tutorium der Lehrveranstaltung: Arzneimittelanalytik und Wirkstoffentwicklung am Department für pharmazeutische Chemie