



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg  
Fakultät Life Sciences

# Optimierung der Konditionen für Primärzellkulturen aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie

Vorgelegt von

**René Büsch**

Matrikelnummer [REDACTED]

Hamburg

am 01.06.2022

**Gutachter:** Prof. Dr. Julien Béthune (HAW Hamburg)

**Gutachter:** Dr. Marina Gebert (Fraunhofer-Einrichtung für Individualisierte und Zellbasierte Medizintechnik)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor des Fraunhofer-Einrichtung für Individualisierte und Zellbasierte Medizintechnik (IMTE) in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer IMTE.



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Julien Béthune und Dr. Marina Gebert für die Betreuung der Arbeit seitens der HAW Hamburg und des Fraunhofer IMTE bedanken.

Weiterhin gilt mein Dank den technischen Assistentinnen der AG Fischgesundheit. Ohne die zahlreichen Praxistipps bei der Durchführung meiner Versuche und die freundliche Arbeitsatmosphäre sähen die Ergebnisse dieser Arbeit sicherlich anders aus.

Zudem gilt mein Dank Isa und Målin. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen, Ideen und Diskussionsbeiträge während meiner Zeit am Fraunhofer IMTE.

Insbesondere möchte ich mich bei Sarah Graff bedanken. Ohne sie wäre die Arbeit in dieser Form sicherlich nicht zu Stande gekommen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Verlobten Annika für die finanzielle und moralische Unterstützung bedanken.

## Zusammenfassung

Die Regenbogenforelle ist ein weltweit stark gefragter Speisefisch, der global in Aquakulturanlagen gezüchtet wird. Aquakultur stellt eine Form der Massentierhaltung da, in der die Verbreitung von Krankheiten unter den Tieren ein häufiges Problem ist. Impfstoffeinsatz bietet eine Möglichkeit Krankheitsverbreitung und Verluste einzudämmen und gleichzeitig den Einsatz von Antibiotika zu verringern. Fischzellkulturen aus der Regenbogenforelle können als Modellorganismus bei der Entwicklung von Impfstoffen dienen und die Anzahl der Versuchstiere verringern. Im Bereich der Toxikologie können Kiemen- oder Hautzellen dazu verwendet werden Wasserproben aus der Umwelt schnell das Gefährdungspotenzial von Kontaminanten einzustufen. Zurzeit werden lebende Tiere den Substanzen ausgesetzt, sodass Zellkulturen an dieser Stelle weitere Tierversuche ersetzen könnten. Zusätzlich können Fischmuskelzellen aus der Regenbogenforelle einen Beitrag zur Ernährung der Welt im Bereich *in vitro*-Fleisch leisten, wo Muskelzellen industriell für den Nahrungsmittelmarkt vermehrt werden und so weniger Tiere geschlachtet werden müssen. Für all diese Anwendungen stellen Primärzellkulturen den ersten Schritt dar, die dann in Langzeitzellkulturen oder Zelllinien überführt werden müssen. Verfahrensverbesserungen bei der Etablierung neuer Zellkulturen schaffen hier Grundlagen für neue Anwendungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht die Konditionen zum Anlegen von Primärzellkulturen aus Haut-, Kiemen-, Herz- und Muskelgewebe aus der Regenbogenforelle zu verbessern. Dabei wurden die Bereiche Zellisolation, Nährmedienauswahl und Nährmedienzusätze betrachtet. Im Bereich der Zellisolation wurden Versuche mit Explantaten und enzymatischen Aufschlüssen durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass enzymatische Aufschlüsse das Anwachsen von Zellen auf der Wachstumsoberfläche beschleunigt, wobei der Einfluss verschiedener Enzymkombinationen nicht genau quantifiziert werden konnte. Weiterhin wurde versucht die Einflüsse von den unterschiedlichen Kulturmedien DMEM und ADF-12 in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an fötalem Kälberserum auf das Wachstum von Primärzellkulturen zu erfassen. Hier wurde zwischen ADF-12 und DMEM keine wesentlichen Unterschiede erfasst, jedoch wurde mit höheren Serumkonzentrationen ein schnelleres Wachstum beobachtet als mit niedrigen. Darüber hinaus wurde versucht den Einfluss des epidermalen und fibroblastischen Wachstumsfaktor sowie Insulin, Dexamethason und Regenbogenforellenserum auf das Wachstum von Haut- und Muskelzellkulturen zu erfassen. In beiden Fällen konnte ein positiver Effekt auf das Wachstum der Kulturen beobachtet werden, jedoch nicht quantifiziert werden, da keine signifikanten Unterschiede erkennbar waren. Primäre Muskelzellen wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung auf die Anwesenheit von Tropomyosin untersucht und es konnte gezeigt werden, dass Muskelzellen in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung aus Muskelgewebe isoliert wurden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern grundlegende Beobachtungen zu Auswirkungen verschiedener

Konditionen beim Anlegen von Primärzellkulturen aus der Regenbogenforelle, sodass diese Arbeit als Fundament für weitere spezifischere Arbeiten dienen kann.

# Inhalt

1. Einleitung .....	1
1.1 Definition von Primärzellen .....	1
1.2 Definition von Zelllinien .....	1
1.3 Einflussfaktoren auf das Wachstum von Zellkulturen.....	1
1.3.1 Basalmedium .....	2
1.3.2 Medienzusätze .....	2
1.3.3 Beschichtung der Wachstumsoberfläche.....	3
1.3.4 Inkubation .....	4
1.3.5 Enzymatische Dissoziation.....	4
1.4 Anwendungen von Fischzellkulturen .....	5
1.4.1 Virologie .....	5
1.4.2 Toxikologie.....	6
1.4.3 Ernährung .....	7
1.5 Zielsetzung der Arbeit .....	8
2. Material und Methoden.....	10
2.1 Materialien .....	10
2.2 Tierhaltung .....	12
2.3 Nährmedien.....	13
2.4 Anlegen von Primärzellkulturen.....	14
2.4.1 Entnahme der Gewebeprobe .....	14
2.4.2 Ausbringen von Explantaten.....	15
2.4.3 Enzymatische Dissoziation von Gewebe .....	15
2.4.4 Beschichtung der Wachstumsoberfläche.....	17
2.5 Pflege der Zellkulturen .....	18
2.5.1 Mikroskopie und Bewertung .....	18
2.5.2 Medienwechsel .....	18
2.5.3 Passagieren von Zellen .....	18
2.6 Charakterisierung von Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbung .....	19
3. Ergebnisse .....	21

3.1	Versuche mit Explantaten.....	21
3.1.1	Primärzellkulturen aus Hautexplantaten .....	22
3.1.2	Primärzellkulturen aus Kiemenexplantaten.....	26
3.1.3	Primärzellkulturen aus Herzexplantaten .....	27
3.2	Versuche mit enzymatisch dissoziiertem Gewebe .....	28
3.2.1	Versuche mit enzymatisch aufgeschlossener Haut .....	28
3.2.2	Versuche mit enzymatisch aufgeschlossenem Herzgewebe .....	32
3.3	Versuche mit Wachstumsfaktoren .....	34
3.3.1	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellen aus Haut .....	34
3.3.2	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellen aus Muskelgewebe .....	36
3.4	Charakterisierung von Zellen aus Muskelgewebe .....	39
3.4.1	Optische Unterschiede der Zellen .....	39
3.4.2	Tropomyosinfärbung .....	40
4.	Diskussion.....	42
4.1	Einfluss der Isolation auf das Wachstum von Primärzellkulturen .....	42
4.2	Einfluss des Basalmediums auf das Wachstum von Primärzellkulturen.....	44
4.3	Einfluss von Nährmedienzusätzen auf das Wachstum von Primärzellkulturen .....	45
4.4	Charakterisierung von Zellen aus Muskelgewebe .....	46
5.	Fazit und Ausblick .....	47
6.	Literatur.....	48
7.	Eidesstattliche Erklärung.....	56
8.	Anhang.....	57
8.1	Rohdaten der Zellen aus Hautexplantaten unter 3.1.1.....	57
8.2	Zellen aus Hautexplantaten des wiederholten Versuchs unter 3.1.1.....	58
8.3	Rohdaten der mittels Collagenase isolierten Hautzellen unter 3.2.1 .....	60
8.4	Rohdaten der mittels Collagenase isolierten Herzzellen unter 3.2.2 .....	60
8.5	Wachstumsverläufe der Zellen dem Versuch unter 3.3.1.....	61
8.6	Wachstumsverläufe der Zellen dem Versuch unter 3.3.2.....	63
8.7	Negativkontrolle der Färbung unter 3.4.2 .....	64
8.8	Zusammensetzung der verwendeten Basalmedien .....	65

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Medien, Reagenzien und Chemikalien. ....	10
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte. ....	11
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien. ....	11
Tabelle 4: Übersicht über verwendete Platten mit empfohlenem Volumen an Medium, PBS und Accutase. ....	12
Tabelle 5: Übersicht über die bei der Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper. ....	12
Tabelle 6: Ansatz der Nährmedien für 50 ml. ....	13
Tabelle 7: Auflistung der Zugabe weiterer Medienzusätze. ....	13
Tabelle 8: Ansatz des Collagenase II/IV-Lösung. ....	15
Tabelle 9: Ansatz des HEPES-Basalmediums. ....	16
Tabelle 10: Ansatz des Isolationsmediums aus dem HEPES-Basalmedium. ....	16
Tabelle 11: Bewertungssystem zur Bewertung des Wachstumsfortschritts von Zellkulturen. ....	18
Tabelle 12: Vergleich der Zusammensetzung der Basalmedien ADF-12 und DMEM mit Blutplasma von Salmoniden. ....	44
Tabelle 13: Rohdaten zu Abbildung 4. Wachstumsfortschritt der Zellen aus Hautexplantaten im 12-well-Format in DMEM mit 5 bis 20 % FKS. ....	57
Tabelle 14: Rohdaten zu Abbildung 5. Wachstumsfortschritt der aus den Explantaten migrierten Zellen im 12-well-Format in ADF-12 mit verschiedenen FKS-Konzentrationen. ....	57
Tabelle 15: Verlauf des Konfluenzgrades von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS. ....	58
Tabelle 16: Konfluenzgrad der isolierten Hautzellen in ADF-12 20 % FKS mit vier technischen Replikaten. ....	60
Tabelle 17: Verlauf des Konfluenzgrades der isolierten Hautzellen in DMEM 15 % FKS mit vier technischen Replikaten. ....	60
Tabelle 18: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in DMEM mit 5 bis 20 % FKS. ....	60
Tabelle 19: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS. ....	61
Tabelle 20: Wachstums von Zellen der Passage 1 aus Herzgewebe in ADF-12 20 % FKS und DMEM 15 und 20 % FKS. ....	61
Tabelle 21: Verläufe des Wachstums von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 20 % FKS mit den Wachstums hEGF und hFGF sowie mit zusätzlichen Regenbogenforellenserum. ....	61

Tabelle 22: Verläufe des Wachstums von Zellen aus mit Collagenase und Trypsin behandelte Haut in ADF-12 20 % FKS mit den Wachstums hEGF und hFGF sowie mit zusätzlichem Regenbogenforellenserum..	62
Tabelle 23: Verläufe des Wachstums von Zellen aus zweifach mit Collagenase behandelte Haut in ADF-12 20 % FKS mit den Wachstums hEGF und hFGF sowie mit zusätzlichem Regenbogenforellenserum..	63
Tabelle 24: Bewertung des Wachstums der Zellen aus Muskelgewebe 13 Tage nach der Aussaat in den Medien DF-12 20 %, ADF-12 20 % FKS und ADF-12 <i>Growth</i> .....	63
Tabelle 25: Verlauf des Konfluenzgrades der subkultivierten Zellen aus Muskelgewebe in DF-12 20 % und ADF-12 <i>Growth</i> .....	64
Tabelle 26: Zusammensetzung der Basalmedien ADF-12, DMEM high Glucose, Leibovitz L-15 und DF-12. Konzentration sind in mg/l angegeben. L-Glutamin wurde in ADF-12 nachträglich hinzugegeben.....	65

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Differenzierungsverlauf von Muskelzellen. ....	8
Abbildung 2: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit angelegten Zellkulturen. ....	21
Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Versuche mit Explantatkulturen aus zwei 1-jährigen Regenbogenforellen. ....	22
Abbildung 4: Konfluenzverlauf der Hautzellen in DMEM mit 5 bis 20 % FKS. D .....	23
Abbildung 5: Konfluenzverlauf der Hautzellen in ADF-12. ....	23
Abbildung 6: Verlauf der Konfluenz von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS.....	24
Abbildung 7: Verlauf der Konfluenz von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS nach der Subkultivierung. ....	25
Abbildung 8: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 20 % in 5-facher Vergrößerung. ....	25
Abbildung 9: Aufnahme der Hautzellkultur in ADF-12 5 % FKS aus jungen Regenbogenforellen eine Woche nach der Aussaat in 10-facher Vergrößerung. ....	27
Abbildung 10: Schematischer Ablauf des Anlegens von Zellkulturen aus enzymatisch aufgeschlossener Haut.....	28
Abbildung 11: Mittelwerte des Verlaufs der Konfluenzgrade von aus der Haut isolierten Zellen in ADF-12 20 % FKS. ....	29
Abbildung 12: Aus Haut isolierte Zellen aus <i>Well</i> 1 drei Wochen nach der Aussaat in ADF-12 20 % in 5-facher Vergrößerung. ....	30

Abbildung 13: Mittelwerte des Verlaufs der Konfluenzgrade von aus der Haut isolierten Zellen in DMEM 15 % FKS. ....	30
Abbildung 14: Zellen aus <i>Well</i> 1 am Tag der Subkultivierung 4 Wochen nach der Aussaat aus Hautexplantaten in ADF-12 20 % FKS in 5-facher Vergrößerung. ....	31
Abbildung 15: Schematischer Ablauf des Anlegens von Zellkulturen aus enzymatisch aufgeschlossenem Herzgewebe. ....	32
Abbildung 16: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in DMEM mit 5 bis 20 % FKS. Die Zellen in DMEM 20 und 15 % FKS erreichten nach 5 Wochen einen Subkultivierbaren Zustand. ....	33
Abbildung 17: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS. Die Zellen in ADF-12 20 % FKS erreichten nach 5 Wochen einen subkultivierbaren Zustand. ....	33
Abbildung 18: Wachstums von Zellen der Passage 1 aus Herzgewebe in ADF-12 20 % FKS und DMEM 15 und 20 % FKS. ....	34
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Überprüfung des Einflusses von verschiedenen Aufarbeitungsmethoden und Wachstumsfaktoren im Medium auf Hautzellen. ....	35
Abbildung 20: Verlauf des mittleren Konfluenzgrades der Zellen aus mit Collagenase und Trypsin behandelte Haut mit Standardabweichung. ....	36
Abbildung 21: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Überprüfung des Einflusses von Wachstumsfaktoren im Medium auf das Wachstums von Zellen aus Muskelgewebe. ....	37
Abbildung 22: Bewertung des mittleren Wachstums der Zellen aus Muskelgewebe 13 Tage nach der Aussaat in den Medien DF-12 20 %, ADF-12 20 % FKS und ADF-12 <i>Growth</i> mit Standardabweichung. ....	38
Abbildung 23: Verlauf des Konfluenzgrades der subkultivierten Zellen aus Muskelgewebe in DF-12 20 % und ADF-12 <i>Growth</i> . ....	38
Abbildung 24: Vergleich der Morphologie von Zellen aus Muskelgewebe. ....	40
Abbildung 25: Aufnahmen der Tropomyosinfärbung 19 Tage nach der Aussaat. ....	41
Abbildung 26: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 15 % in 5-facher Vergrößerung. ....	58
Abbildung 27: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 10 % in 10-facher Vergrößerung. ....	59
Abbildung 28: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 5 % in 10-facher Vergrößerung. ....	59
Abbildung 29: Negativkontrolle der Tropomyosinfärbung. ....	64

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ADF-12	Advanced Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DF-12	Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fötales Kälberserum
FS	Regenbogenforellenserum
hEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor
hFGF	humaner fibroblastischer Wachstumsfaktor
IPNV	infektiöse Pankreasnekrosevirus
MEM	Minimum Essential Medium
P/S	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PRV	Piscine Orthoreovirus
TPST	Tris gepufferte Saline mit Tween20

## Glossar

Begriff	Erklärung
Cytotoxizität	Die Fähigkeit einer Substanz Zellen zu schädigen. <sup>1</sup>
Epithelisch	Bezeichnung für die Morphologie einer adhärent wachsenden Zelle mit polygonaler Form. <sup>1</sup>
Explantat	Mechanisch zerkleinertes Gewebe, welches zum Zweck der Zellgewinnung genutzt wird <sup>1</sup>
Extrazelluläre Matrix	Stützendes Gerüst an dem die Zellen eines Gewebes oder Organs haften. Die extrazelluläre Matrix besteht aus Wasser, Proteinen und Zucker und besitzt je nach Gewebe eine andere Zusammensetzung. <sup>2</sup>
Fibroblastisch	Bezeichnung für die Morphologie einer Zelle, die in etwa zweimal so lang wie breit ist. <sup>1</sup>
Glucocorticoid	Eine Klasse von Steroidhormonen, die u. a. auf den Glucosestoffwechsel wirkt. <sup>3</sup>
Immortale Zellen	Zellen, deren verbleibende Teilungen nicht durch das Hayflick-Limit begrenzt sind. <sup>4</sup>
<i>in vitro</i>	Bezeichnung für Prozesse, die unter kontrollierten, künstlichen Bedingungen außerhalb des lebendigen Organismus ablaufen. <sup>1</sup>
<i>in vivo</i>	Bezeichnung für Prozesse, die im lebendigen Organismus ablaufen. <sup>1</sup>
Konfluenz	Zustand einer Zellkultur bei der ein Monolayer aus Zelle die Oberfläche nahezu lückenlos bedeckt. <sup>1</sup>
Kontaktinhibierung	Phänomen bei der Regelung der Proliferationsrate von Zellen aufgrund der Zelldichte. Konfluente Zellen stellen das Wachstum ein. <sup>5</sup>
Letalität	Beschreibt, wie häufig die Auswirkungen einer Substanz oder Krankheit tödlich sind. Die letale Dosis beschreibt die Konzentration einer Substanz, die sich tödlich auf einen bestimmten Anteil der Population auswirkt. <sup>6,7</sup> Beispielsweise beschreibt LD <sub>50</sub> die Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben und wird in mg pro Kilogramm Körpergewicht angegeben.
Monolayer	Dicht gepackte Schicht aus Zellen auf einer Oberfläche, wobei die Dicke der Schicht nur eine Zelle beträgt. <sup>1</sup>
Wachstumsfaktor	Signalproteine und Steroidhormone, die eine regulierende Wirkung auf die Zellproliferation oder Zelldifferenzierung haben. <sup>8</sup>

# 1. Einleitung

Zellkulturen tierischen Ursprungs dienen als Teilmodell des ursprünglichen *in vivo* Organismus. Die Verwendung von Zellkulturen weist dabei eine höhere ökonomische Effizienz, sowie eine bessere ethische Vertretbarkeit als das Durchführen von Tierversuchen auf. In diesem Zusammenhang stellen Zellkulturen für die Umsetzung des 3R-Konzepts (*replace, reduce, refine*) für Tierversuche eine wichtige Erweiterung dar.<sup>9-11</sup>

## 1.1 Definition von Primärzellen

Bei Primärzellen handelt es sich um Zellen, welche direkt aus dem Organismus entnommen wurden und physiologischen *in vivo* Eigenschaften des Gewebes behalten.<sup>12</sup> Diese Zellen befinden sich in der sogenannten Passage 0. Die Passagennummer wird bei jeder Subkultivierung um eins erhöht. Eine unkomplizierte Methode zum Anlegen von Primärzellkulturen stellt das Ausbringen von Explantaten dar. Diese Methode wurde Anfang des 20. Jahrhunderts von Harrison, Carrel und weiteren entwickelt.<sup>1</sup> Hierbei wird auf eine enzymatische Behandlung der Gewebeprobe verzichtet, sodass mögliche Verluste an gesunden Zellen geringgehalten werden.<sup>1</sup> Daher wird diese Methode genutzt, wenn nur wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung steht. Da die Zellen bei dieser Methode aus dem Gewebe heraus migrieren müssen um auf die Wachstumsoberfläche zu gelangen, bevorzugt diese Methode Zellen die schnell migrieren.<sup>1</sup> Eine weitere Möglichkeit eine Primärzellkultur anzulegen, besteht darin das Gewebe mechanisch oder enzymatisch aufzuschließen. Auf der einen Seite erzielen diese Methoden oft höhere Zellausbeuten als das Explantieren von Gewebe. Auf der anderen Seite bevorzugen sie jedoch Zellen mit erhöhter Proteasen- und mechanischer Stressresistenz.<sup>1</sup>

## 1.2 Definition von Zelllinien

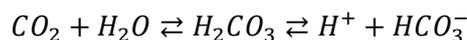
Die meisten Zellen aus einer Primärkultur besitzen eine Lebensdauer von etwa 20 bis 100 Generationen. Eine Zellkultur gilt als Zelllinie, wenn sie immortal ist. Dies kann durch gezielte Mutation oder zufällig geschehen. Rein technisch gelten bereits subkultivierte Zellen als Zelllinie, jedoch entspricht das selten dem allgemeinen Verständnis.<sup>1,13</sup>

## 1.3 Einflussfaktoren auf das Wachstum von Zellkulturen

Das Nährmedium und seine Zusätze bilden die wichtigsten Faktoren zur erfolgreichen Etablierung und Erhaltung einer Zellkultur, da sie direkten Einfluss auf das Überleben und die Proliferation der Zellen nehmen.<sup>14</sup> Jedoch haben die Parameter im Brutschrank, die Beschichtung der Wachstumsoberfläche und die Aufbereitung der ursprünglichen Gewebeprobe Anteil am Erfolg einer Zellkultur.

### 1.3.1 Basalmedium

Basalmedien bilden die Grundlage für Nährmedien in der Zellkultur und enthalten Salze, essenzielle Aminosäuren, Kohlenhydrate und Vitamine. Die Salze fügen dem Medium Ionen hinzu, welche den osmotischen Druck einstellen, an der pH-Pufferung beteiligt sind oder für die Zelladhäsion wichtig sind.<sup>1</sup> Als Kohlenhydratquelle wird häufig Glucose verwendet, welches als Energiequelle dient.<sup>1</sup> Es wurden jedoch auch Medien entwickelt, die auf Glucose verzichten und andere Zucker verwenden.<sup>14</sup> Vitamine bilden häufig die Vorstufe von Cofaktoren für Enzyme.<sup>14</sup> Für den spezifischen Anwendungsfall werden diese Medien häufig mit Serum, Proteinen oder Wachstumsfaktoren supplementiert.<sup>15</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit den Medien DMEM, DF-12 und ADF-12 durchgeführt. DMEM wurde von Dulbecco und Freeman aus dem Minimum MEM von Eagle weiterentwickelt. Sie verdoppelten die Konzentration an Aminosäuren und erhöhten die Glucosekonzentration im Vergleich zu MEM.<sup>14</sup> Weiterhin wurde die Konzentration an Natriumhydrogencarbonat erhöht, welches für die Pufferung des pH-Wertes zuständig ist. Das im Medium befindliche  $\text{NaHCO}_3$  stellt  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen zur Verfügung welche mit  $\text{H}^+$ -Ionen des Mediums zu Kohlensäure reagieren können. Die Konzentration von  $\text{NaHCO}_3$  und  $\text{CO}_2$  müssen dabei aufeinander abgestimmt werden und können je nach Medium variieren (Formel 1). Als pH-Indikator kommt im für diesen Versuch verwendeten Medium Phenolrot zum Einsatz, welcher zwischen pH 8 (Magenta) und pH 6 (Gelb) umschlägt.<sup>14</sup> Liegt der optimale pH-Wert für Fischzellen vor, zwischen 7,2 und 7,4, so erscheint das Medium rot.<sup>16</sup> Eine gelbe Färbung zeigt einen zu geringen pH-Wert des Mediums an.



Formel 1: Funktionsweise des Hydrogencarbonatpuffers.  $\text{CO}_2$  kann sich im Wasser des Mediums lösen und Kohlensäure entsteht, welche unter Protonenabgabe zu Hydrogencarbonationen dissoziieren kann. Weiterhin können Hydrogencarbonationen, welche durch Natriumhydrogencarbonat eingetragen werden, Protonen aufnehmen.

ADF-12 basiert auf DF-12, einer 1:1 Mischung aus DMEM und Ham's F-12, dem die Proteine Insulin, Transferrin und BSA, sowie einige Spurenelemente zugesetzt wurden.<sup>14,17</sup>

### 1.3.2 Medienzusätze

Medienzusätze können verschiedene Funktionen erfüllen. Gegen den Bewuchs mit Bakterien und Pilzen können Antibiotika und Fungizide zugesetzt werden. Häufig kommen Penicillin und Streptomycin als Antibiotika zum Einsatz.<sup>12,18</sup> Als Fungizid kann Normocin dienen. Es wirkt gegen Hefen und Pilze, blockiert jedoch auch die DNA und Proteinsynthese von Bakterien.<sup>19</sup>

Als Serum wird gerinnungsfaktorenbefreites Blut bezeichnet. Für die Gewinnung von FKS muss zunächst ein Kalbsfetus gewonnen und desinfiziert werden.<sup>20</sup> Das Blut des Fetus wird aus dem Herzen entnommen. Da der Fetus nicht betäubt wird, ist Gewinnung von FKS ethisch bedenklich.<sup>21</sup> Nach der Gerinnung wird das Serum per Zentrifugation abgetrennt. FKS enthält verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und weitere essenzielle Komponenten und kann verschiedene unvorteilhafte Enzyme inhibieren. Aufgrund von Variationen der Konzentrationen seiner Bestandteile, welche zum Teil noch nicht erforscht sind, stellt FKS ein komplexes Supplement dar, dass von Charge zu Charge variieren kann.<sup>22</sup> Diese Schwankungen können den Ausgang von Experimenten und die Reproduzierbarkeit beeinflussen. Beispielsweise kann FKS das Wachstum von fibroblastischen Zellen übermäßig stimulieren und zu deren Dominanz in gemischten Kulturen führen.<sup>20,22</sup>

L-Glutamin ist eine essentielle Aminosäure, die vor allem für die Proteinbiosynthese nötig ist. In Zellkulturmedien ist L-Glutamin oft in hohem Überschuss enthalten, oftmals das 3 bis 40-fache im Vergleich zu anderen Aminosäuren. Allerdings ist L-Glutamin instabil und zerfällt in Zellkulturmedien, sodass in Glutamin-haltigen Medien stabile Derivate verwendet werden.<sup>14,23</sup>

Wachstumsfaktoren beeinflussen die Proliferation und Differentiation von Zellen und werden in geringen Konzentrationen eingesetzt. Wurde das Medium mit Serum supplementiert, so enthält es bereits diverse Wachstumsfaktoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Wachstumsfaktoren hEGF, hFGF und das Glucocorticoid Dexamethason eingesetzt. Beim Einsatz von hEGF und hFGF wurden bereits positive Einflüsse auf die Zellproliferation in verschiedenen Fischzelllinien beobachtet.<sup>5,8</sup> Dexamethason beeinflusst die Proliferation und Differenzierung von Muskelzellen.<sup>5,13,24</sup> Hormone können Zellen ebenfalls zur Proliferation anregen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Insulin als Nährmediensupplement gearbeitet. Ein erhöhter Insulinspiegel steigert die Glucoseaufnahme von Zellen. Darüber hinaus wird die Proliferation angeregt, da Insulin die DNA-Synthese begünstigt.<sup>14,25</sup>

### 1.3.3 Beschichtung der Wachstumsoberfläche

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit adhärent wachsende Fischzellen, was bedeutet, dass sie eine geeignete Oberfläche zum Anheften benötigen. Nach dem Anheften wachsen sie im Wesentlichen als Monolayer und unterliegen der Kontaktinhibierung. Ist die gesamte Wachstumsoberfläche besiedelt, hat die Kultur die sogenannte Konfluenz erreicht. Die Kontaktinhibierung reguliert die Proliferation der Zellen auf Basis der Zelldichte, sodass bei Erreichen von Konfluenz die Zellen das Wachstum einstellen.<sup>26</sup> *In vivo* befinden sich die Zellen in der extrazellulären Matrix, einem Gerüst aus Proteinen an das sie mit Hilfe

von Rezeptoren anheften können.<sup>26</sup> *In vitro* sind die rauen Plastikoberflächen von Zellkulturgefäßen für die meisten Zellen ausreichend. Um den Prozess der Adhäsion zu beschleunigen oder bestimmte Zelltypen zu selektieren, kann das Beschichten der Wachstumsoberfläche jedoch nützlich sein.<sup>27</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lamininbeschichtungen bei Versuchen mit Zellen aus Muskelgewebe eingesetzt. Laminine sind Glycoproteine, welche in der extrazellulären Matrix von Muskelzellen enthalten sind, sodass sie deren Adhäsion begünstigen.<sup>28</sup> Ein weiterer Grund für den Einsatz von Lamininbeschichtungen bei Muskelzellkulturen besteht in der hohen Affinität für myogenen Satellitenzellen, sodass sie die Selektion begünstigt.<sup>28</sup>

#### 1.3.4 Inkubation

Fische sind poikilotherme Tiere. Ihre Körpertemperatur hängt damit von ihrer Umgebungstemperatur ab. Es ist daher möglich Fischzellen bei unterschiedlichen Temperaturen zu kultivieren. Nach der RGT-Regel nimmt die Temperatur Einfluss auf die Geschwindigkeit von chemischen Reaktionen in belebten und unbelebten Systemen und hat damit auch Einfluss auf die Verdopplungszeit der Zellen.<sup>29</sup> Als Beispiel dient die RTG-2 Zelllinie, welche aus Gonadenzellen der Regenbogenforelle angelegt wurde und bei 4 bis 26 °C kultiviert werden kann.<sup>30</sup> Es wurden Verdopplungszeiten von minimal 2 Tagen bei 20 °C berichtet.<sup>30</sup> Bei 4 °C betrug sie 13,2 Tage.<sup>30</sup> Daraus kann ein Richtwert für eine optimale Temperatur für Zellen aus der Regenbogenforelle von 20 °C abgeleitet werden.<sup>30</sup> Ein weiterer Einflussfaktor ist die CO<sub>2</sub> Konzentration im Brutschrank. Für viele Medien wird eine Konzentration von 5 bis 10 % bei 37 °C empfohlen.<sup>31</sup> Wird die Temperatur im Brutschrank gesenkt, steigt die Löslichkeit von CO<sub>2</sub> im Medium. Daher wurden die Zellen für diese Arbeit bei 20 °C und 2 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 1.3.5 Enzymatische Dissoziation

Eine Möglichkeit aus einer Gewebeprobe eine Primärzellkultur anzulegen, besteht darin, die Zellen aus dem Gewebe mit Hilfe eines enzymatischen Aufschlusses zu isolieren.<sup>1</sup> In der Literatur sind Trypsin, Collagenase, Elastase, Dispase und einige mehr bekannt. Sie können allein oder in Kombination eingesetzt werden.<sup>1</sup> Die enzymatischen Dissoziationen haben das Ziel Zellen oder Zellaggregate aus dem Gewebe zu lösen. Collagene sind die am häufigsten vorkommende Strukturproteine im menschlichen Körper und stellen einen wichtigen Bestandteil der EZM in vielen Lebewesen dar.<sup>32</sup> Zur Familie der Collagene zählen Proteine, die aus drei helikalen Polypeptidketten bestehen. Bisher wurden 26 Familienmitglieder identifiziert, wobei die Typen I bis IV am häufigsten in Wirbeltieren vorkommen.<sup>32</sup> Collagen Typ I ist hauptsächlich in Knochen, Sehnen und der Haut zu finden.<sup>32</sup> Collagen Typ II kommt am häufigsten in Knorpel vor.<sup>32</sup> Collagen Typ III bildet retikuläre Fasern, welche im Bindegewebe von Leber und Knochenmark vorkommen.<sup>32</sup> Das

häufigste Collagen in Basallamina, einer Schicht aus mehreren EZM, ist der Typ IV.<sup>32-34</sup> Die optimale Inkubationstemperatur beträgt 37 °C und ein wichtiger Cofaktor ist CaCl<sub>2</sub>.<sup>35</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Collagenase Klasse II, IV und NB8 gearbeitet. Bei NB8 handelt es sich um ein Gemisch aus Collagenase Klasse I und II.<sup>36</sup> Die Klasse einer Collagenase korreliert in der Regel nicht mit einem Collagen Typ. Weiterhin kann die Definition der Klassen zwischen Herstellern variieren.

Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet daher innerhalb der Polypeptidkette.<sup>37</sup> Weiterhin gehört das Enzym zu den Serinproteasen, sodass die katalytische Triade im aktiven Zentrum aus Histidin, Asparaginsäure und Serin gebildet wird. Die Protease spaltet Peptidbindungen nach Lysin oder Arginin.<sup>37</sup> Accutase ist eine Enzymmischung die Proteine und Collagene spalten kann.<sup>1</sup> Sie wird häufig beim Ablösen von empfindlichen Zellen von der Wachstumsfläche verwendet und gefährdet die Vitalität der Zellen nicht.<sup>1</sup>

#### **1.4 Anwendungen von Fischzellkulturen**

Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) ist eine weltweit kommerziell genutzte Salmonidenart und spielt eine große Rolle als Nahrungsmittel.<sup>38</sup> Weiterhin gewinnen Aquakulturen für die Versorgung mit Fisch an Bedeutung. Die weltweite Produktion steigt seit 1990 kontinuierlich an. Darüber hinaus steigt ihr Anteil an der Fischproduktion. In 2000 betrug dieser 25,7 % und wuchs auf 46,0 % im Jahre 2018.<sup>39</sup> Die Regenbogenforelle ist besonders für den deutschen Aquakultursektor von Bedeutung. Beispielsweise entfiel im Jahre 2020 in Deutschland etwa ein Drittel der in Aquakulturen erzeugten Fischmasse auf die Regenbogenforelle.<sup>40</sup> Weiterhin kommen in der Aquakultur häufig prophylaktische Impfungen und Antibiotika zum Einsatz, sodass eine hohe Nachfrage für Impfstoffe gegen Krankheit von Regenbogenforellen in der Zucht besteht.<sup>41</sup> Zellkulturmodelle versuchen Eigenschaften eines lebenden Organismus in einer kontrollierten und isolierten Umgebung abzubilden. Sie eignen sich daher für die Erforschung von Virusinfektionen und helfen bei der Entwicklung von Impfstoffen.<sup>9</sup>

##### **1.4.1 Virologie**

Da Aquakultur eine Form der Massentierhaltung darstellt können sich hier Krankheiten unter den Tieren leicht verbreiten. Dies führt zu einem prophylaktischen Einsatz von Antibiotika und Impfungen um Ausbrüche von Krankheiten und damit verbundenen ökonomischen Schäden zu vermeiden.<sup>41</sup> Der häufige Einsatz von Antibiotika führt jedoch zu Umweltproblemen, da die Ausscheidung der Tiere Rückstände der Antibiotika enthalten. Bakterien, die ständig Antibiotika ausgesetzt sind, können Resistenzen gegen diese entwickeln.<sup>41</sup> Per horizontalem Gentransfer können die Resistenzen unter Bakterien ausgetauscht werden.<sup>42</sup> Daraus ergeben sich auch Risiken für den Menschen, da pathogene

Erreger möglicherweise nicht mehr mit gewöhnlichen Antibiotika bekämpft werden können. Eine Lösung dieses Problems stellt der vermehrte Einsatz von Impfstoffen, bei gleichzeitiger Verminderung von Antibiotika, in der Aquakultur dar.<sup>42</sup> Daher ist die Nachfrage nach Vakzinen gegen Viruserkrankungen bei Fischen hoch.<sup>43</sup> Da Viren stets eine Wirtszelle zur Vermehrung benötigen, stellen Zellkulturen eine praktikable Möglichkeit zur Untersuchung von viralen Krankheiten dar. So wurde 1962 die erste Fischzelllinie aus Regenbogenforellen gewonnen. Wolf und Quimby setzten die RTG-2 Linie ein, um das infektiöse Pankreasnekrosevirus (IPNV) zu isolieren.<sup>16</sup> Das Virus bricht hauptsächlich bei Salmonidenjungfischen aus und zieht Mortalitätsraten von 10 bis 90 % nach sich. Ausbrüche dieser Krankheit sind in der Schweiz bekämpfungspflichtig und in Deutschland meldepflichtig.<sup>16,44</sup> Impfstoffe wurden bereits von verschiedenen Firmen entwickelt. Beispielsweise ALPHA JECT® IPNV-Flavo von Pharmaq.<sup>45</sup> Zurzeit gibt es noch Unterschiede zwischen der Wirksamkeit im Labor und der Praxis, sodass bisher kein Impfstoff gegen IPNV in Deutschland zugelassen ist.<sup>46</sup> Jedoch stehen multivalente Vakzine in der EU zur Verfügung.<sup>47,48</sup> Als Beispiel für ein Virus, für das noch kein Zellkulturmodell vorhanden ist, kann das Piscine Orthoreovirus (PRV) angeführt werden.<sup>49</sup> Dieses Virus breitet sich unter Salmoniden aus und löst bei hoher Viruslast Herz- und Muskelentzündungen aus.<sup>50</sup> Die Sterblichkeit bei Ausbrüchen in Fischfarmen kann bis zu 20 % betragen.<sup>50</sup> Zurzeit ist kein Zellkulturmodell verfügbar, indem das Virus vermehrt werden kann. Dadurch kann dieser Prozess nicht erforscht werden und kein Impfstoff entwickelt werden.<sup>49</sup>

#### 1.4.2 Toxikologie

Die Analyse von Abwässern auf toxische Inhaltstoffe leistet einen wichtigen Beitrag zum Umwelt- und Gewässerschutz. Mit Hilfe von chemischen Analysen lassen sich Kontaminanten nachweisen und quantifizieren. Informationen über die Letalität oder Toxizität dieser Kontaminanten lassen sich aus diesen Analysen jedoch nicht gewinnen, sodass standardisierte Tierversuche nötig sind um letale Dosen zu ermitteln.<sup>51</sup> Mit dem OECD 203 Test wird beispielsweise die akute Toxizität von Substanzen ermittelt. Im Rahmen dieses Tests werden die Tiere verschiedenen Konzentrationen der Substanz ausgesetzt und die Anzahl der Todesfälle nach festgelegten Zeitintervallen protokolliert. Je untersuchter Konzentration sollen dabei mindestens sieben Tiere eingesetzt werden.<sup>52</sup> An dieser Stelle bieten Zellkulturen eine Möglichkeit Tierversuche zu ersetzen.<sup>53</sup> Die Kiemen von Fischen dienen der Atmung und sind ständig mit dem Wasser in Kontakt, daher stellen sie einen der wichtigsten Aufnahmeorte von Umweltgiften dar.<sup>54</sup> Aus diesem Grund eignen sich Kiemenzellkulturen für die Analyse von kontaminierten Wasserproben und können *in vivo* Experimente ersetzen.<sup>54,55</sup> Dies ist einerseits mit Zelllinien möglich, welche vermehrt werden können und vergleichsweise kostengünstig zu unterhalten sind, andererseits eignen sich

hierfür auch Primärzellkulturen.<sup>55</sup> Nachteilig am Einsatz von Zelllinien ist der potenzielle Verlust der physiologischen Eigenschaften aus dem Originalgewebe im Laufe der Subkultivierung.<sup>55</sup> Auf der anderen Seite erhalten Primärzellkulturen die Eigenschaften des Gewebes, aus dem sie isoliert wurden. Nachteilig ist jedoch die begrenzte Kultivierungsdauer und der erhöhte Aufwand bei der Isolation von Primärzellen, sowie der erhöhte Bedarf an Tieren.<sup>12,56</sup> Beim Einsatz von Primärzellen kommt nach der Isolation häufig eine doppelte Einsaat in ein permeables Filterinsert zum Einsatz, welche zuerst von Fletcher *et al.* im Jahre 2000 publiziert wurde.<sup>57</sup> Im ersten Saatvorgang werden die isolierten Zellen direkt in das Insert gesät und bilden die unterstützende Schicht für die zweite Aussaat.<sup>57</sup> Sie erfolgte am Tag danach mit frisch isolierten Zellen.<sup>57</sup> Mit dieser Technik lässt sich ein dichtes Epithel erzeugen, welches Wasserproben direkt ausgesetzt werden kann.<sup>57,58</sup> Der Einfluss von Kontaminanten auf die Zellgesundheit kann elektrisch gemessen werden, wobei eine dichte Monolayer einen hohen elektrischen Widerstand aufweist und ein Absterben der Zellen zum Absinken des Widerstands führt.<sup>59-61</sup> Mit dieser Technik wurden 2007 die Toxizität von Metallen für Fische erforscht.<sup>62</sup> Wird eine Zelllinie für den Assay verwendet, so wird häufig mit RTgill-W1 Zelllinie gearbeitet. Sie wurde von Bols *et al.* 1994 etabliert und in Toxizitätsassays für Metalle und organische Komponenten wie polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe verwendet.<sup>55,63</sup> Im Gegensatz zu Primärzellen wird die Probe häufig mit Medium verdünnt, da die Zellen dem Wasser nicht direkt ausgesetzt werden können. Ein weiteres *in vitro* Modell für Toxizitätsassays stellen Hautzellkulturen dar. Die Haut ist die erste Verteidigungslinie von Fischen gegen toxische Stoffe, Infektionserreger und anorganische Substanzen. Experimente mit Primärzellkulturen der Regenbogenforelle wurden zum Beispiel von Dowling *et al.* im Jahr 2001 durchgeführt. Die Primärkultur wurde aus Hautexplantaten gewonnen und das Fungizid Prochloraz sowie Kupfer wurden als Chemikalien für die Assays verwendet. Die aus den Explantaten ausgewachsenen Epithelzellen wurden den Chemikalien in serumfreiem und serumhaltigem Medium ausgesetzt und Aussagen über die Toxizität und die Art des Zelltodes getätigt. Jedoch wurden bisher keine Versuche mit Zelllinien aus der Haut unternommen.<sup>64,65</sup>

### 1.4.3 Ernährung

Muskelgewebe bildet die Grundlage für tierische Lebensmittel. Derzeit wird Massentierhaltung angewendet, um die steigende Nachfrage zu decken. Diese bringt jedoch erheblich ökologische und ethische Nachteile mit sich. Beispiele sind der Flächenverbrauch für den Futteranbau, Verbreitung von Krankheiten in den engen Stallungen sowie das Tierwohl während der Schlachtung. „Cultured Meat“ stellt eine Alternative zur herkömmlichen Fleisch- und Fischproduktion dar. Wenige Stammzellen reichen aus, um Lebensmittel aus kultivierten Zellen herzustellen. Dabei durchlaufen die Stammzellen verschiedenen

Differenzierungsstadien und bilden zum Schluss Muskelfasern aus mehreren Muskelzellen.<sup>66</sup> Der Verlauf der Differenzierung von Muskelzellen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Stammzellen teilen sich und differenzieren sich zu Myoblasten, welche sich in folgenden Schritten zu Myotuben zusammen lagern.<sup>66</sup> Mehrere Myotuben formieren sich im letzten Schritt zur Muskelfaser.<sup>66-69</sup>

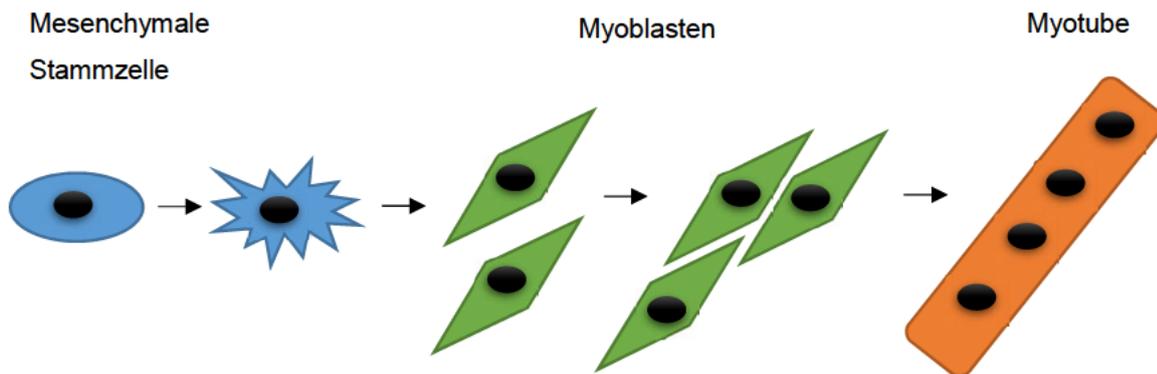


Abbildung 1: Differenzierungsverlauf von Muskelzellen. Darstellt ist die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Myoblasten und deren Fusion zu Myotuben. Adaptiert aus Zammit *et al.* 2006.

Ein Vorteil von *in vitro* Fleisch und Fisch wäre der Entfall von Nebenprodukten. Ein streng überwachter Prozess würde die Produktion ohne Antibiotika ermöglichen. Ein Vorteil von *in vitro* Fisch wäre die Minimierung von Schwermetall- und Mikroplastikbelastung. 1932 wurde die Idee erstmals durch Winston Churchill publiziert, jedoch stellte Massentierhaltung damals kein Problem dar. Der erste *in vitro* Burger wurde 2013 vorgestellt. Seit dem Arbeiten verschiedene Firmen an der marktreife von *in vitro* Fleisch und Fisch.<sup>70</sup> Vertreter der für Fleisch sind zum Beispiel Upside Foods, gegründet 2015. Mit der Produktion von *in vitro* Fisch beschäftigt sich zum Beispiel die Bluu Seafood GmbH.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Für die Anwendungen von Fischzellkulturen in der Virologie, Toxikologie oder der Produktion von Lebensmitteln stellen Primärzellkulturen den Ausgangspunkt dar. Weiterhin ist die Regenbogenforelle aufgrund ihrer weiten Verbreitung in der Aquakultur von großem Interesse für Forschungen in den Bereichen Virologie und Toxikologie. Daher schafft eine Verbesserung des Verfahrens zum Anlegen dieser Kulturen Grundlagen für die Entwicklung weiterer Anwendungen oder die Optimierung bestehender. Ziel der Arbeit war es, das Verfahren zum Anlegen von Zellkulturen aus der Regenbogenforelle so zu verbessern, dass aus verschiedenen Organen subkultivierbare Zellen erhalten werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Haut, Muskel, Kieme und Herz gearbeitet. Für diese

Arbeit waren sowohl die Vorgehensweise beim Isolieren der Zellen als auch die Auswahl und Zusammensetzung des Nährmediums für die Kultivierung von Bedeutung.

## 2. Material und Methoden

Am Anfang dieser Arbeit wurden Versuche mit Primärzellkulturen aus Explantaten der Regenbogenforelle unternommen. Im Verlauf wurde das Alter der Fische, Nährmedien, Wachstumsfaktoren, enzymatische Dissoziationen auf ihren Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Primärzellkulturen überprüft.

### 2.1 Materialien

Nachfolgend sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Medien, Reagenzien, Chemikalien (Tabelle 1), Geräte (Tabelle 2) und Verbrauchsmaterialien (Tabelle 3) aufgeführt. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Plattenformate, sowie die empfohlenen Volumina an Medium, PBS und Accutase für das jeweilige Format. Abschließend zeigt Tabelle 5 die für Immunfluoreszenz benötigten Antikörper.

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Medien, Reagenzien und Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller	Katalognummer
Accutase	PAN Biotech GmbH	P10-21500
Advanced DMEM/F12	Gibco	12634-010
BSA	PAN Biotech GmbH	P06-1391100
Collagenase Klasse 2	Worthington Biochemical Corporation	LS004188
Collagenase Klasse 4	Worthington Biochemical Corporation	LS004176
Collagenase NB8	SERVA Electrophoresis GmbH	17456.02
DAPI	Roche Diagnostics	10236276001
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	D2915
DMEM, high glucose	Gibco	41965-039
DMEM/F12	Gibco	11320-074
FKS	Gibco	10437-028
hEGF	Peptotech	AF-100-15
Heparin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	7692.1
HEPES	Carl Roth	9105.3
hFGF	Peptotech	100-18B
Insulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SLCC9248
Laminin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	L2020
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	G7513

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Normocin	InvivoGen Corporation	#ant-nr-2
PBS	Gibco	14190-094
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	P0781
PFA	EMD Millipore Corporation	1.04005.1000
Regenbogeforellenserum	Fraunhofer IMTE	-
Ringerlösung	Fresenius Kabi AG	2610811
Sucrose	Carl Roth	4661.1
Triton X-100	Fluka	93420
Trypsin-EDTA 10x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	SLCC7608
Tween	VWR	663684B
Ziegennormalserum	Vector Laboratories Inc.	S-1000

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschrank	BINDER GmbH
Fluoreszenzmikroskop Observer Z1	Carl Zeiss AG
Invertiertes Mikroskop Axio Vert.A1	Carl Zeiss AG
Kolbenhubpipetten, Eppendorf Research	Eppendorf AG
pH-Meter, SevenCompact	Mettler Toledo GmbH
Pipettierhilfe, peqMate	VWR International GmbH
Schüttler, GFL 3031	Hassa Laborbedarf GmbH
Sterile Werkbank, KB-130 BW	Kojair Tech OY
Vortexmischer	Scientific Industries Incorporated
Zentrifuge für Falcon Tubes	Eppendorf AG
Zentrifuge für Mikroreaktionsgefäße	Thermo Scientific

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Falcon Tubes (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. KG
Multiwell Zellkulturplatten	TPP Techno Plastic Product AG
Operationsbesteck	Aesculap AG
Pasteurpipetten, Glas	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG
Petrischalen, verschiedene Größen	TPP Techno Plastic Product AG

Bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen für Kolbenhubpipetten	Sarstedt AG & Co. KG
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG
Serologische Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Platten mit empfohlenem Volumen an Medium, PBS und Accutase. Weiterhin ist die Wachstumsfläche pro *Well* angegeben.

Multiwellplatte	Medium, ml	PBS, ml	Accutase, ml	Wachstumsfläche, cm <sup>2</sup>
24- <i>well</i> -Platte	0,5	0,5	0,1	1,9
12- <i>well</i> -Platte	1,0	1,0	0,2	3,8
6- <i>well</i> -Platte	2,5	1,0	0,3	9,5

Tabelle 5: Übersicht über die bei der Immunfluoreszenzfärbung verwendeten Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Wirt	Klonalität	Verdünnung
Tropomyosin	Sigma-Aldrich	T2780	Maus	Monoklonal	1:400
Cy3 Anti-Maus	Dianova	115-165-062	Ziege	Polyklonal	1:800

## 2.2 Tierhaltung

Die Regenbogenforellen wurden in rezirkulierenden Aquakulturanlagen bei 15 °C in Süßwasser gehalten. Die Rechtsgrundlage ist durch Tierschutzgesetz §11 Absatz 1 Satz 1 unter der Nummer 390.4-TI gegeben. Die Anlage verfügte über mechanische und biologische Filtersysteme zur Aufbereitung des rezirkulierenden Wassers. Zur täglichen Routine zählte das Messen von pH-Wert, Temperatur und gelöstem Sauerstoff sowie die Reinigung des mechanischen Filters und ein Teilwasserwechsel. Nitrat-, Nitrit- und Ammoniumkonzentration wurden dienstags und freitags gemessen. Die Tiere wurden mit Hilfe von Futterautomaten über den Tag hinweg mit Pelletfutter von Aller Aqua gefüttert.

### 2.3 Nährmedien

Der Ansatz der Medien ist nachfolgend in Tabelle 6 dokumentiert. DF-12 Medien wurde wie DMEM Medien angesetzt. Die L-Glutamin Stocklösung enthielt 200 mmol pro Liter, sodass die Endkonzentration im Medium 4 mmol/l betrug. Die P/S-Lösung enthielt 10.000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin pro Milliliter. Zugegebene Volumina der Zusätze für 50 ml Medium sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Ansatz der Nährmedien für 50 ml. Anteil an P/S und Normocin betrug stets 1 %, bzw. 0,2 %. L-Glutamin wurde nur bei ADF-12 mit einem Anteil von 2 % zugegeben.

Bezeichnung	Basalmedium, ml	FKS, ml	L-Glutamin, ml	P/S, µl	Normocin, µl
ADF-12 20 %	38,4	10	1	500	100
ADF-12 15 %	40,9	7,5	1	500	100
ADF-12 10 %	43,4	5	1	500	100
ADF-12 5 %	45,9	2,5	1	500	100
DMEM 20 %	39,4	10	0	500	100
DMEM 15 %	41,9	7,5	0	500	100
DMEM 10 %	44,4	5	0	500	100
DMEM 5 %	46,9	2,5	0	500	100

Die Zusätze wie hEGF, hFGF, Insulin, Dexamethason und Forellenserum wurden zu den aufgeführten Nährmedien zugeben. Die zugegebenen Volumina, sowie Konzentrationen der Zusätze sind in Tabelle 7 aufgeführt. Für Versuche mit Muskelgewebe wurden die Wachstumsfaktoren hEGF, hFGF und Dexamethason zu ADF-12 20 % FKS hinzugegeben. Dieses Medium wird nachfolgend als ADF-12 *Growth*, in Anlehnung an das *Skeletal Muscle Cell Growth Medium* von PromoCell, bezeichnet.<sup>71</sup> Die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren wurden von diesem Medium abgeleitet.

Tabelle 7: Auflistung der Zugabe weiterer Medienzusätze. Angegeben sind Stockkonzentration und Konzentration im Medium. Das angegebene Volumen bezieht sich auf 50 ml Medium

Komponente	Stockkonzentration	Sollkonzentration	Volumen, µl
Insulin	10,8 mg/ml	10 µg/ml	46
hEGF	0,5 mg/ml	0,01 µg/ml	1
hFGF	5 µg/ml	0,001 µg/ml	10
Dexamethason	1 mg/ml	0,4 µg/ml	20
Forellenserum	-	0,4 %	200

## 2.4 Anlegen von Primärzellkulturen

Das Gewebe wurden aus etwa 15 cm langen Regenbogenforellen und Regenbogenforellens-Larven gewonnen. Je nach Experiment wurden Explantate auf der Wachstumsfläche ausgebracht oder das Gewebe einer enzymatischen Dissoziation unterzogen. Die Versuche wurden je nach Gewebemenge im 24 oder 12-well-Format durchgeführt. Die Anzahl der Replikate und Anzahl der Fische, aus denen Gewebe entnommen wurde, variierte zwischen den Versuchen. Wie viele technische Replikate je Kondition ausgesät wurden wird daher beim Vorstellen der Ergebnisse des jeweiligen Versuchs beschrieben.

### 2.4.1 Entnahme der Gewebeproben

Die Forellen wurden per Kescher aus ihrem Becken geholt und durch einen Fischwirt mit einem Schlag auf den Kopf getötet. Larven wurden mit überdosiertem Nelkenöl betäubt. Anschließend wurden die verschiedenen Gewebe mittels Skalpell, Pinzette und Schere entnommen.

Für die Entnahme von Haut wurde ca. 2 mm breite Streifen in die Seite des Tieres geschnitten und mit einer Pinzette abgezogen. Im Idealfall ist die Musterung des Tiers danach noch zu erkennen. Danach wurden die Streifen in Ringerlösung geschwenkt und entschuppt. Hierzu eignet sich die Schutzkappe des Skalpells. Die Kappe wurde mehrmals mit und gegen den Strich der Schuppen über das Hautstück bewegt. Sollten sich noch Muskelreste am Hautstück befinden, wurden diese ebenfalls entfernt. Im letzten Schritt wurden die Streifen in Quadrate mit etwa 1-2 mm<sup>2</sup> Fläche geschnitten.

Für die Entnahme von Muskelgewebe wurde zunächst die Haut, wie oben beschrieben, entfernt. Anschließend wurde die Musterung mit einem Skalpell abgeschabt und das Gewebe von den Gräten geschnitten. Zur Säuberung wurde das Gewebe in Ringerlösung gewaschen und in Vorbereitung auf einen enzymatischen Aufschluss mit einer Schere zerkleinert.

Für die Entnahme der Kiemen wurde zunächst der Kiemendeckel entfernt. Anschließend wurden die Kiemenbögen mit einer Schere herausgeschnitten und in Heparinlösung geschwenkt. Die Heparinlösung bestand aus PBS, welches mit 10 U/ml Heparin und 100 U/ml P/S versetzt wurde.<sup>72</sup> Durch die Heparinlösung wurde Blut von Kiemen gewaschen und die Gerinnung verhindert. Anschließend wurden die Kiemenbögen in Ringerlösung gewaschen. Zur Vorbereitung für die Aussaat wurde die Kiemenblättchen von den Bögen mittels Skalpells getrennt, in etwa 1-2 mm breite Streifen geschnitten.

Zur Entnahme von Herzen wurde zunächst der Bauch des Tieres mit einem Schnitt von den Brustflossen bis zum After geöffnet. Das Herz liegt in der Herzhöhle hinter der Brustflosse und wurde mit Hilfe von Pinzette und Skalpell entnommen. Anschließend wurde das Herz mit Heparinlösung gespült, in Ringerlösung geschwenkt.

Falls das entnommene Gewebe enzymatisch behandelt werden sollte, wurde es in 2 ml Reaktionsgefäßen oder 50 ml Bechergläsern gesammelt und mit einer Schere zerkleinert. Wenn das Gewebe als Explantat ausgebracht werden sollte, wurde es in Ringerlösung auf Eis gelagert.

#### 2.4.2 Ausbringen von Explantaten

Bei der Ausbringung von Explantaten wurden die Gewebestücke von 1 bis 2 mm Kantenlänge so im *Well* platziert, dass der Boden nahezu bedeckt war. Anschließend wurden die Explantate mit einem Deckgläschen bedeckt und mit einer Rückseite einer Pipettenspitze angeedrückt. Die Größe des Deckgläschens war von der *well*-Größe abhängig. Im 12-*well*-Format wurde ein Durchmesser von 18 mm verwendet. Für 24-*well*-Platten betrug er 12 mm. Im Anschluss erfolgte eine Trocknungszeit von 30 bis 45 min. Nach der Trocknungszeit wurden die Explantate mit Medium überschichtet.

#### 2.4.3 Enzymatische Dissoziation von Gewebe

Wenn das Gewebe nicht als Explantat ausgesät wurde, so wurde eine enzymatische Behandlung durchgeführt, um die EZM aufzuschließen und so Zellen aus dem Gewebe zu isolieren. Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Protokolle verwendet.

##### 2.4.3.1 Dissoziation mit Collagenase

Diese Art des Aufschlusses ist an Sander *et al.* (2013) angelehnt. Das homogenisierte Gewebe wurde 1 ml Collagenase II/IV-Lösung versetzt und mit einem Vortexmischer vermischt. Als Basis des Perfusionspuffer diente PBS welcher mit 10 mM HEPES, 30 mM Taurin, 5,5 mM Glucose und 10 mM Diacetylmonoxim versetzt.<sup>72</sup> Der Ansatz der Collagenaselösung ist in Tabelle 8 aufgeschlüsselt.

Tabelle 8: Ansatz des Collagenase II/IV-Lösung.

Komponente	Menge
Collagenase II	200 mg
Collagenase IV	200 mg
Perfusionspuffer	39,5 ml
CaCl <sub>2</sub> (c = 1 mmol/l)	0,5 ml

Die Inkubationszeit betrug zwischen 30 und 120 Minuten bei 20 °C und 160 rpm. Alle halbe Stunde wurde das Gemisch erneut mit einer Schere zerkleinert und durch Auf- und Abpipetieren weiter homogenisiert. Nach der Dissoziation wurde die Suspension zentrifugiert und der Überstand abgenommen. In der unteren Phase befinden sich Gewebereste und herausgelöste Zellen. Bei der Aufarbeitung von Muskelgewebe war der Phasenübergang schwer

auszumachen. Hier wurde dem Reaktionsgemisch PBS zugegeben und so die obere Phase vergrößert, sodass sie sich leichter entfernen ließ.

#### 2.4.3.2 Zweifache Behandlung mit Collagenase

Weiterhin wurde ein Aufschlussprotokoll verwendet, welches auf einem Bericht von Kruse *et al.* (2004) basiert. Dieses Protokoll wurde im Rahmen dieser Arbeit auf Haut angewendet. Sie wurde wie oben beschrieben entnommen und homogenisiert. Kruse *et al.* verwendeten ein Digestions- und ein Isolationsmedium, welches aus einem mit HEPES versetzten Basalmedium hergestellt wurden (Tabelle 9).<sup>73</sup>

Tabelle 9: Ansatz des HEPES-Basalmediums.

Komponente	Volumen
Basalmedium	90 ml
HEPES-Stock, (c = 23,83 mg/ml)	10 ml
L-Glutamin-Stock, (c = 200 mmol/l)	900 µl

Aus dem HEPES-Basalmedium wurde das Isolationsmedium hergestellt (Tabelle 10). Vor der Verwendung wurde der pH-Wert auf 7,45 eingestellt und das Medium in ein 50 ml Tube steril filtriert.

Tabelle 10: Ansatz des Isolationsmediums aus dem HEPES-Basalmedium.

Komponente	Volumen
HEPES-Basalmedium	32 ml
BSA, (c = 50 mg/ml)	8 ml
Calciumchlorid (c = 0,1 mol/l)	200 µl

Das Digestionsmedium wurde aus dem Isolationsmedium hergestellt. Hierzu wurden 20 ml des Isolationsmedium mit 4 mg Collagenase NB8 versetzt. Vor Verwendung wurde der pH-Wert auf 7,45 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

Zunächst wurde das Gewebe mit 10 ml Digestionsmedium gemischt und mit Carbogen für etwa 15 Sekunden begast. Anschließend wurde das Becherglas mit Alufolie verschlossen und für 20 min auf den Schüttler bei 20 °C und 150 rpm gestellt. Nach der Inkubation wurde dem Gewebe eine kurze Sedimentationszeit gewährt und anschließend das Digestionsmedium abgesaugt. Vor dem nächsten Verdauungsschritt wurde das Gewebe mit Isolationsmedium gewaschen. Die zweite Dissoziation erfolgte ähnlich zum ersten, jedoch betrug die Inkubation nur 15 Minuten. Anschließend wurde der Inhalt des Becherglases durch einen 200 µm

Gazefilter in ein 50 ml Röhrchen gegeben und mit Isolationsmedium nachgespült. Die Gewebereste im Filter wurden als Explantate ausgesät und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach der Trocknungszeit wurde das aus dem Filtrat erhaltene Pellet in Medium resuspendiert und hinzu gesät.

#### 2.4.3.3 Enzymatische Dissoziation mit Collagenase und Trypsin

Hierzu wurde ein Protokoll, welches von Gabillard *et al.* (2010) zur Isolation Muskelzellen aus der Regenbogenforelle verwendet wurde.<sup>74</sup> Das präparierte Gewebe wurde in einem 50 ml Becherglas mit 10 ml einer Collagenase IV Lösung vermischt und für 45 min bei 20 °C und 150 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gemisch in einem 50 ml Röhrchen mit 10 ml PBS gewaschen. Für den zweiten Teil des Aufschlusses wurden 10 ml einer 0,01 % Trypsinlösung zu dem gewaschenen Gewebe gegeben. Die Inkubation erfolgte für 15 min auf dem Schüttler. Nach der Inkubation wurden die Enzyme mit 20 ml ADF-12 Medium mit 20 % FKS inhibiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und das Gewebe mit 10 ml ADF-12 20 % FKS versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Gewebepellet als Explantat ausgesät und mit einem Deckgläschen bedeckt.

#### 2.4.4 Beschichtung der Wachstumsoberfläche

Beschichtungen spielen eine zentrale Rolle bei der Anheftung der Zellen an die Wachstums-oberfläche. In vielen Fällen ist die unbeschichtete Oberfläche von Multiwellplatten ausreichend. Für den Zellen aus bestimmten Geweben wurde jedoch Beschichtungen eingesetzt. Lamininbeschichtungen wurden bei Versuchen mit Muskelgewebe verwendet. Die Beschichtung wurde stets am Tag vor dem Versuch vorbereitet. Hierzu wurde, je nach Format der Platte, zunächst PBS vorgelegt. Anschließend wurden 2 µg/cm<sup>2</sup> Laminin aus einer Stocklösung hinzugegeben und der Inhalt des *Wells* gemischt. Die Lagerung über Nacht erfolgt im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurde der Überstand kurz vor der Aussaat abgesaugt.

## 2.5 Pflege der Zellkulturen

Nach der Aussaat wurden der Kultur eine Ruhephase von etwa einer Woche gegeben. Danach wurde der Wachstumsfortschritt mittels Mikroskopie verfolgt. Das Medium nach Bedarf gewechselt.

### 2.5.1 Mikroskopie und Bewertung

Der Wachstumsfortschritt der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Hierbei wurde die Konfluenz der *Wells* in 25 % Schritten geschätzt und anhand dessen Punkte vergeben. Das Punktesystem ist in Tabelle 11 aufgeschlüsselt.

Tabelle 11: Bewertungssystem zur Bewertung des Wachstumsfortschritts von Zellkulturen

Punkte	Bedingung
0	Kein Wachstum
1	$0 < \text{Konfluenz} \leq 25 \%$
2	$25 \% < \text{Konfluenz} \leq 50 \%$
3	$50 \% < \text{Konfluenz} \leq 75 \%$
4	$75 \% < \text{Konfluenz} \leq 100 \%$

### 2.5.2 Medienwechsel

Das Medium wurde nach Bedarf getauscht. Der Bedarf wird durch Verfärbung des Mediums oder Trübung angezeigt. Verfärbungen des Mediums sind auf pH-Wertänderungen zurückzuführen. Die Trübung kann durch abgelöste, tote Zellen oder durch schwimmende Gewebereste ausgelöst werden. In beiden Fällen wurde das Medium getauscht. Medienwechsel wurden unter der *Clean Bench* wie folgt durchgeführt: Zunächst wurde das alte Medium mit einer Glaspipette abgesaugt. Hierbei wurde das Gefäß oft schräg gestellt und darauf geachtet den Boden des Gefäßes nicht zu berühren. Dies verhindert das versehentliche Absaugen von Explantaten oder der Beschichtung. Anschließend wurde das Gefäß mit PBS gespült, um tote Zellen oder anderen Schmutz zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS wurde frisches Medium hinzugegeben. PBS und Medium wurden nicht direkt auf die Wachstumsfläche gegeben, um das Ablösen von Zellen zu verhindern.

### 2.5.3 Passagieren von Zellen

Sobald die Zellen einen Score von 2 und höher oder eine stationäre Phase erreicht hatten, wurde eine Subkultivierung durchgeführt. Hierzu wurde eine ähnliche Vorgehensweise wie beim Medienwechsel angewendet. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurde jedoch Accutase hinzugegeben. Accutase ist eine Enzymmischung, welche die Zellen von der

Wachstumsfläche löst und nicht cytotoxisch ist. Die Reaktionszeit betrug mindestens 5 Minuten. Bei Zellen, welche für mehrere Wochen im gleichen Gefäß angeheftet waren, kann der Vorgang bis zu 15 Minuten dauern. Der Erfolg des Ablöses wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Abgelöste Zellen erscheinen Rund, wohingegen anhaftende Zellen, je nach Zelltyp, eine längliche Form aufweisen. Nach dem Ablösen wurde die Reaktion durch die Zugabe von FKS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in der Lösung suspendiert. Um Stress für die Zellen zu vermeiden, wurde auf das Abzentrifugieren der Zellen verzichtet. Die Zellsuspension wurde direkt in das neue Gefäß pipettiert und bei Bedarf mit frischem Medium aufgefüllt. Da nicht alle überführten Zellen anwachsen, wurde am nächsten Tag ein Medienwechsel vollzogen.

## **2.6 Charakterisierung von Zellen mittels Immunfluoreszenz-Färbung**

Bei einer Immunfluoreszenzfärbung handelt es sich um eine Methode der Immunhistochemie.<sup>75</sup> Mit ihr werden spezielle Proteine einer Zelle mit Hilfe von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen sichtbar gemacht werden.<sup>75</sup> Bei einer indirekten Färbung kommen zwei Antikörper zum Einsatz. Der primäre Antikörper bindet spezifisch am Antigen. Der sekundäre Antikörper bindet am primären Antikörper und ist bei einer indirekten Färbung markiert, um die Interaktion des primären Antikörpers sichtbar zu machen.<sup>75</sup>

Der in dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper bindet an Tropomyosin. Tropomyosin ist an der Regulation der Muskelkontraktion beteiligt und bindet an Aktinfilamente und kommt daher in Muskelzellen vor.<sup>76,77</sup> Weiterhin wurde Tropomyosin auch in geringen Anteilen in anderen Zellen gefunden, sodass die Anwesenheit von Tropomyosin keine eindeutige Qualifikation für eine Muskelzelle darstellt.<sup>76</sup>

Die Färbung wurde an Zellen aus Muskelgewebe auf Deckgläschen im 24-well-Format vorgenommen. In Vorbereitung auf die Behandlung mit Antikörpern, wurden die Zellen mit Hilfe einer Lösung aus 4 % PFA und 10 % Sucrose in PBS fixiert. Es wurden 250 µl pro Well verwendet. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit 500 µl PBS gewaschen. Nach der Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert. Hierzu wurde Triton X-100 im Faktor 1000 in PBS verdünnt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit der Lösung behandelt. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit PBS. Im nächsten Schritt wurden unspezifische Bindungen mit Ziegennormalserum gesättigt. Hierzu wurden 100 µl Serum in 1 ml PBS gelöst und 250 µl je Well zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der primäre Antikörper gegen Tropomyosin in TPST-Puffer mit 0,1 % BSA verdünnt und 250 µl je Well zugegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C inkubiert. Es wurde eine Negativkontrolle ohne primären Antikörper mitgeführt. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper 115-165-062. Dieser wurde in TPST mit 0,1 % BSA verdünnt und für mindestens eine

Stunde auf den Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die *Wells* mit PBS gespült und eine Zellkernfärbung durchgeführt. Hierzu wurde die Zellen mit DAPI, um den Faktor 1000 in PBS verdünnt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DAPI-Lösung wurde anschließend in zwei Waschschritten mit PBS und einem Waschschrift mit VE-Wasser beseitigt. Anschließend wurde Vectashield auf einen Objektträger gegeben und das Deckgläschen aus dem *Well* umgekehrt auf den Träger gelegt. Von nun an wurden die Proben vor Licht geschützt und im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3. Ergebnisse

Zunächst wurde versucht Primärzellkulturen aus Explantaten anzulegen. Hierbei wurden Haut-, Kiemen- und Herzexplantaten in Verbindung mit den Medien ADF-12 und DMEM mit verschiedenen FKS-Konzentrationen getestet. Im nächsten Schritt wurde Haut-, Kiemen- und Herzgewebe enzymatisch aufgeschlossen, um daraus Primärzellkulturen anzulegen und das Wachstum in den Medien ADF-12 und DMEM mit verschiedenen FKS-Konzentrationen zu vergleichen. Anschließend wurden Versuche mit weiteren Medienzusätzen an Haut- und Muskelkulturen durchgeführt. Beim Anlegen der Kultur aus Hautgewebe wurden zusätzlich verschiedene Aufschlussmethoden verglichen. Abbildung 2 visualisiert die im Rahmen dieser Arbeit angelegten Zellkulturen. Zum Schluss wurden die aus dem vorherigen Versuch erhaltenen Zellen aus Muskelgewebe mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung charakterisiert.

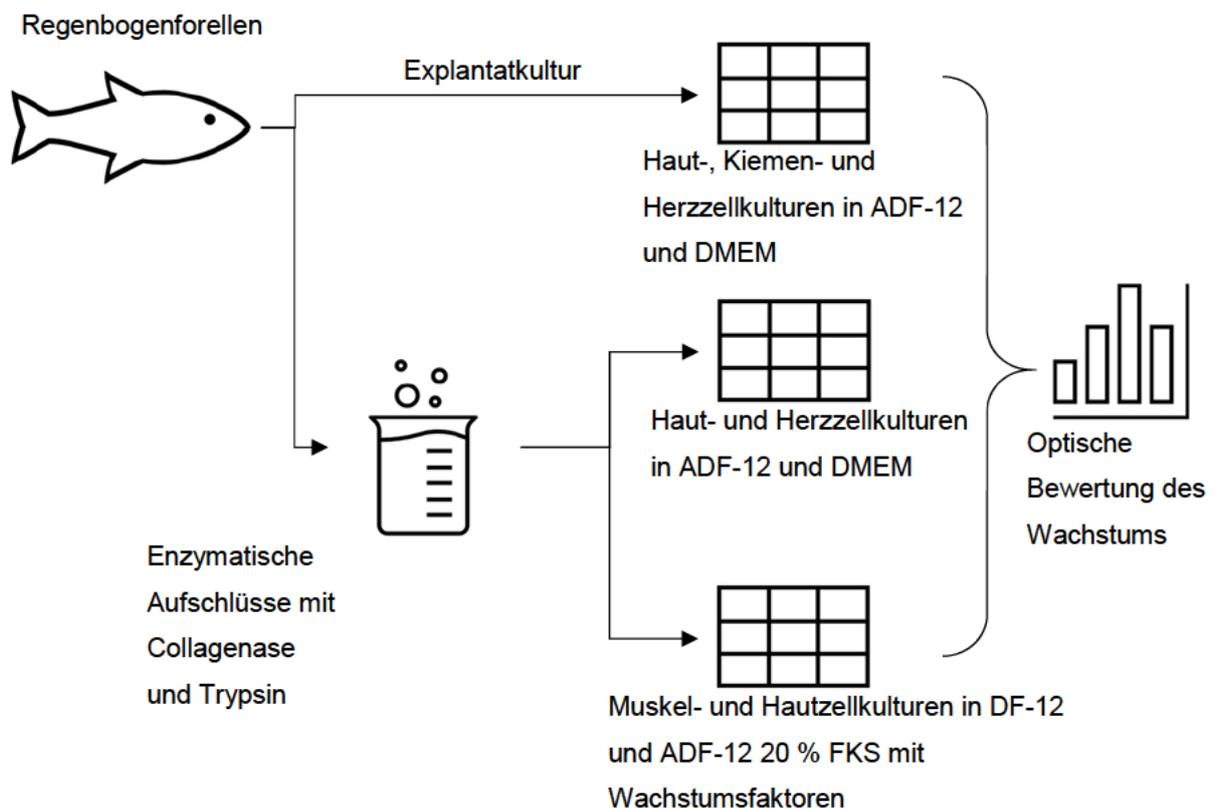


Abbildung 2: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit angelegten Zellkulturen.

#### 3.1 Versuche mit Explantaten

Das Explantieren ist eine einfache Methode um Primärzellkulturen aus Gewebe anzulegen.<sup>16</sup> Es wurde versucht aus Haut-, Kiemen- und Herzgewebe eine Primärzellkultur zu etablieren (Abbildung 3). Weiterhin wurde der Einfluss des Basalmediums und der FKS-Konzentration auf das Zellwachstums überprüft. Darüber hinaus wurden die Größe der Explantate, sowie das Verwenden von Deckgläschen als mögliche Einflussfaktor identifiziert.

Zwei 1-jährige Regenbogenforellen

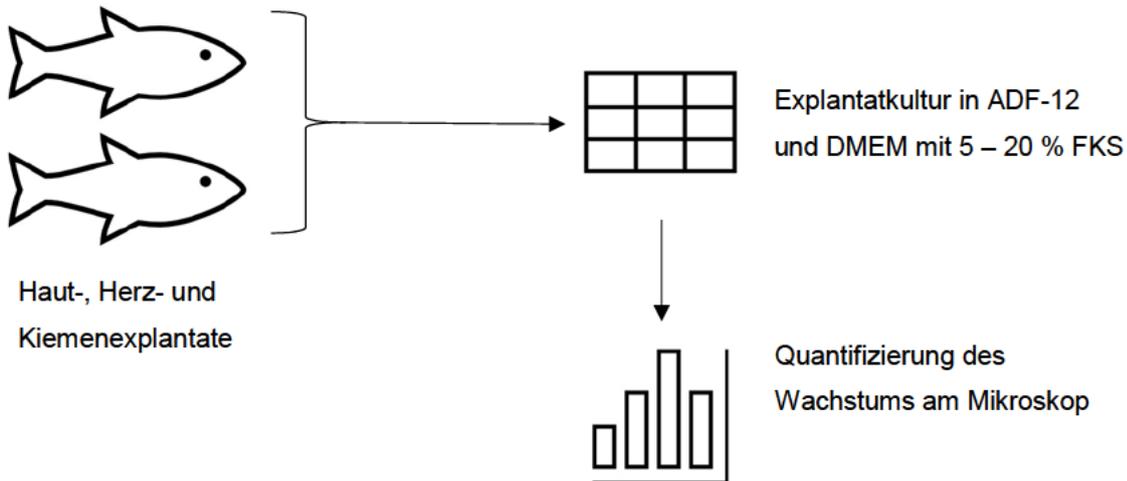


Abbildung 3: Schematischer Ablauf der Versuche mit Explantatkulturen aus zwei 1-jährigen Regenbogenforellen. Das Gewebe der Tiere wurde gesammelt und anschließend die Kulturen daraus angelegt. Als Medium wurden ADF-12 und DMEM mit jeweils 5 bis 20 % FKS eingesetzt. Das Wachstums der Kulturen wurde mittels Mikroskopie bewertet.

### 3.1.1 Primärzellkulturen aus Hautexplantaten

Die Hautexplantate wurden aus zwei Regenbogenforelle gewonnen, die etwa ein Jahr alt waren. Nach dem Entschuppen wurden diese in Stücke mit etwa 3-4 mm Kantenlänge geschnitten und 3-4 Hautstücke je *Well* im 12-*well*-Format ausgesät. Als Medien wurde ADF-12 und DMEM mit FKS Konzentrationen von 5 bis 20 % gewählt. Es wurde ein *Well* je Kondition ausgesät und die Konfluenz wöchentlich geschätzt. Die Ergebnisse sind nachfolgend in Abbildung 4 und Abbildung 5 visualisiert. Rohdaten in tabellarischer Form befinden sich im Anhang unter 8.1. Im Verlauf bildeten die Zellen zunehmend Vakuolen. Kurz vor dem Absterben, waren diese am größtem.

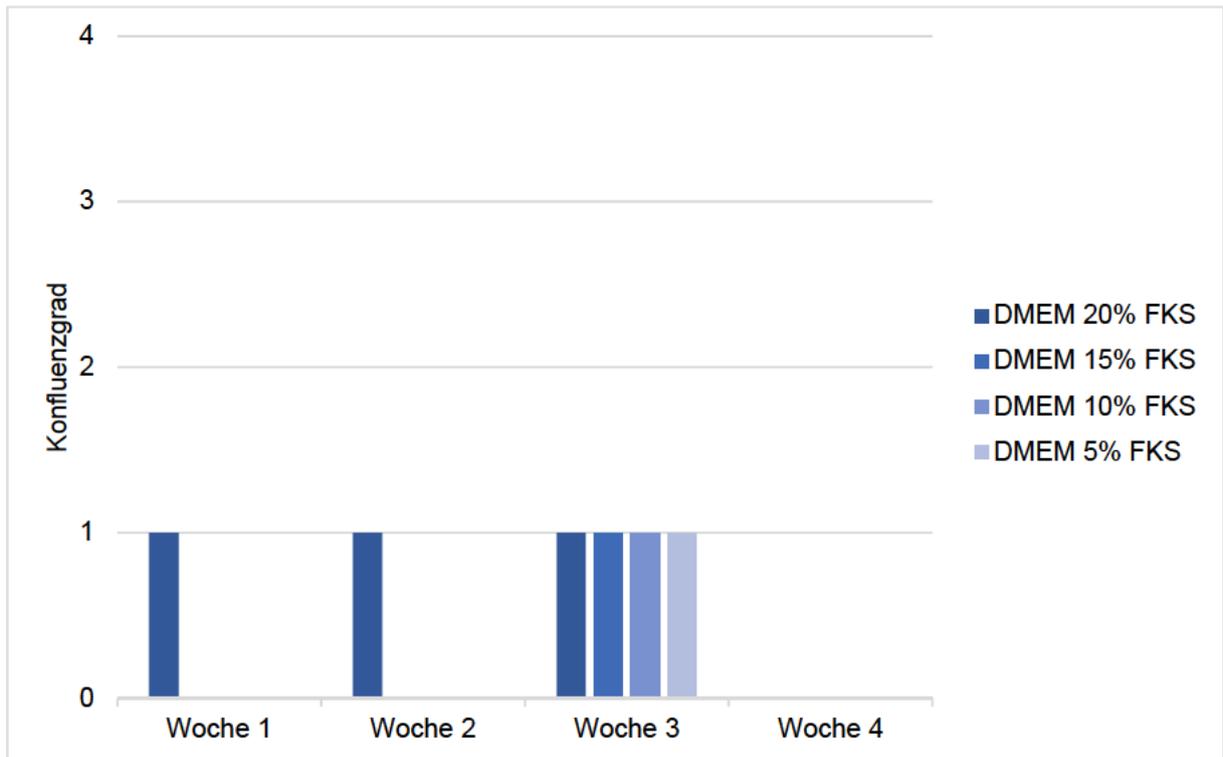


Abbildung 4: Konfluenzverlauf der Hautzellen in DMEM mit 5 bis 20 % FKS. Die Zellen konnten nicht subkultiviert werden und starben in der vierten Woche ab.

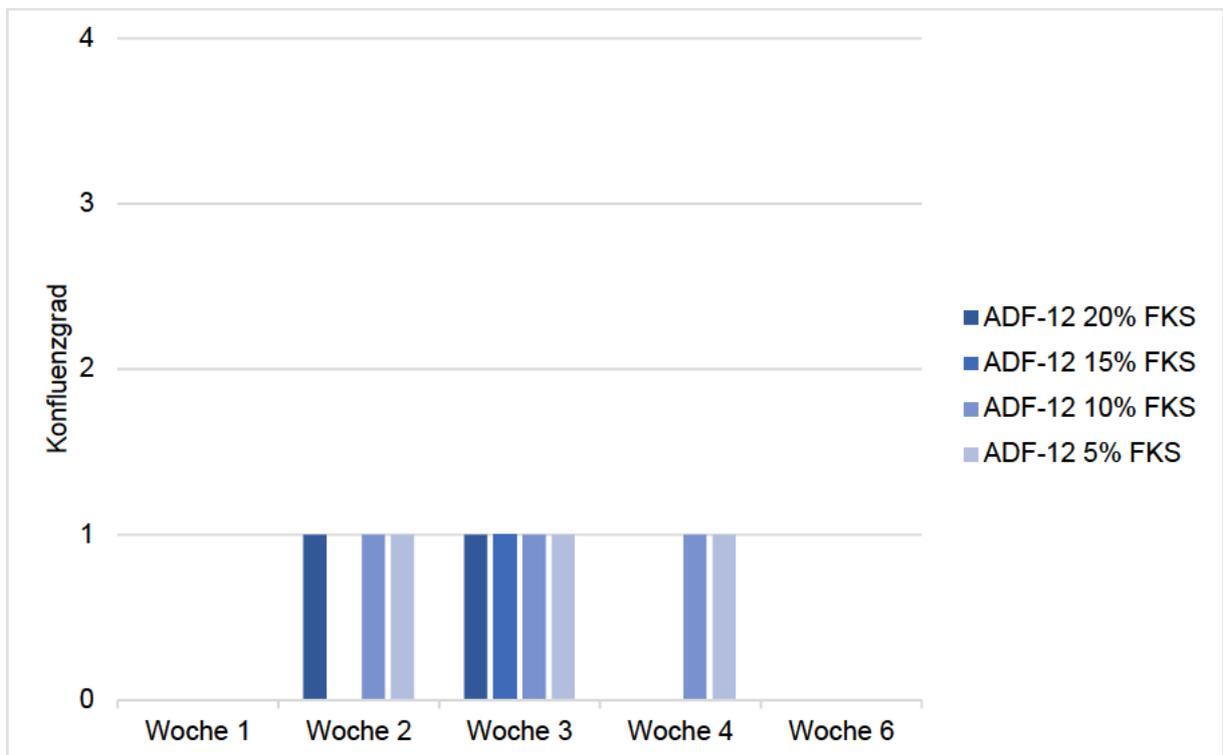


Abbildung 5: Konfluenzverlauf der Hautzellen in ADF-12. Die Zellen konnten nicht subkultiviert werden und starben nach der vierten Woche ab.

Die Zellen in ADF-12 Medien überlebten am längsten. Bei einer Wiederholung des Versuchs mit ADF-12 Medium wurden die Hautzellen bereits bei etwa 50 % Konfluenz subkultiviert, um teilungsfähige Zellen zu selektieren. Es wurde beobachtet, dass die Zellen schneller anwuchsen und nach 4 Wochen etwa 50 % Konfluenz erreicht hatten (Abbildung 6). Nach drei Wochen wurden bei allen Konditionen fibroblastisch aussehende Zellen beobachtet (Abbildung 8). Die Zellen überlebten die Passage, starben jedoch nach 2 Wochen ab (Abbildung 7).

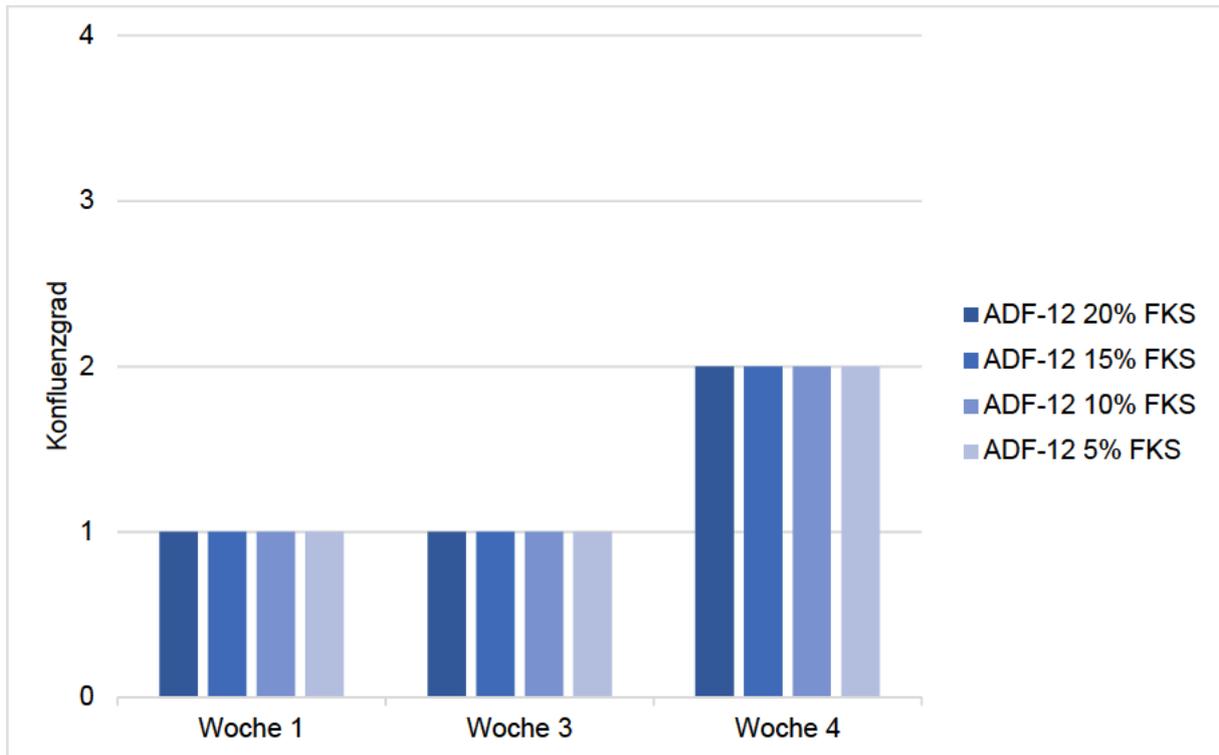


Abbildung 6: Verlauf der Konfluenz von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS. Nach Woche 4 wurde bei Semikonfluenz passagiert.

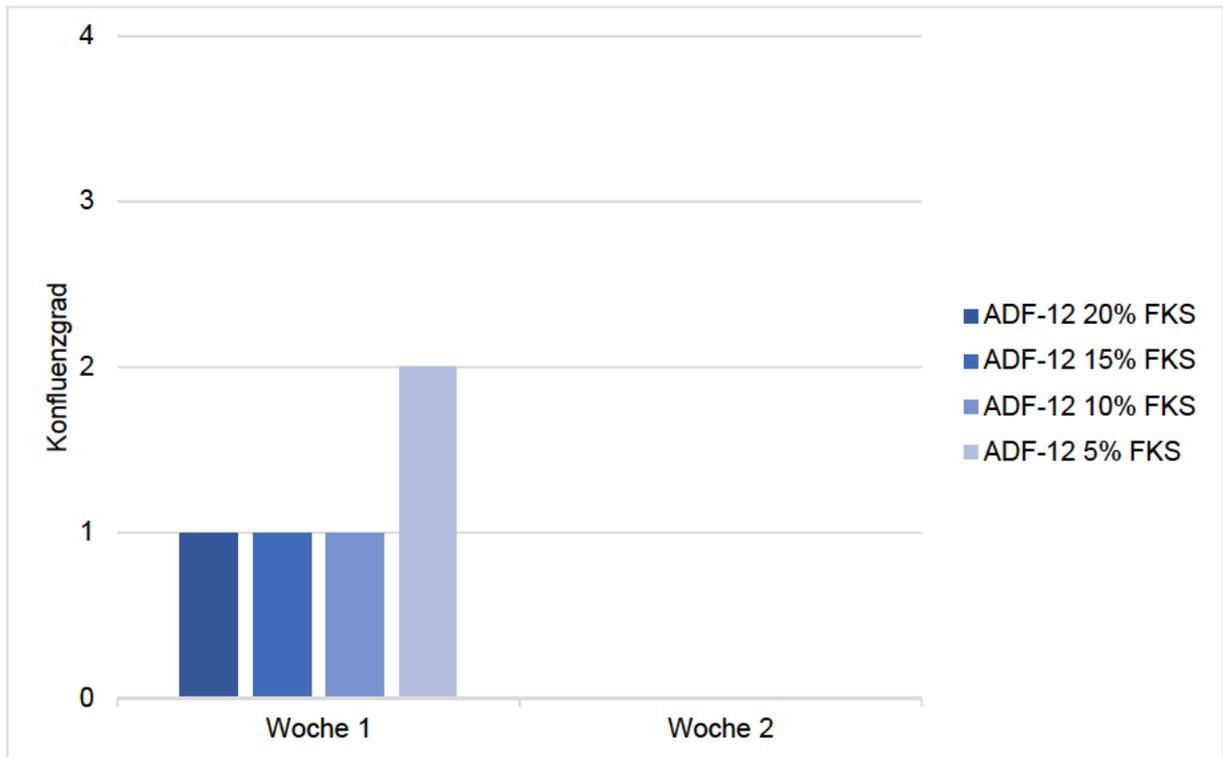


Abbildung 7: Verlauf der Konfluenz von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS nach der Subkultivierung. Die Zellen starben 2 Wochen nach der Subkultivierung ab.

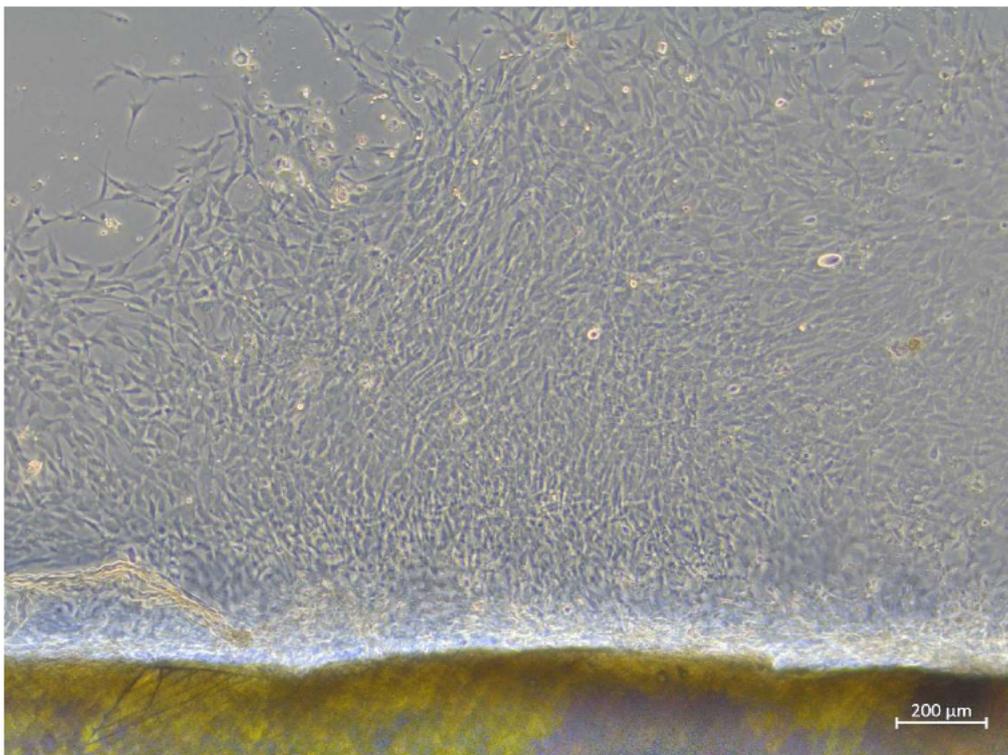


Abbildung 8: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 20 % in 5-facher Vergrößerung. Das *Well* hatten zu diesem Zeitpunkt einen Konfluenzgrad von etwa 25 % erreicht.

Als Probleme der Explantatmethode wurde das Ablösen der Explantate in den ersten Wochen während der Pflege der Kulturen identifiziert, da das Migrieren von Zellen aus den Explantaten wahrscheinlich noch möglich gewesen wäre. In folgenden Versuchen sollen daher Deckgläschen verwendet werden. Sie sollen die Explantate vor versehentlichem Absaugen oder zufälligem Ablösen schützen. Da die Deckgläschen nach dem Einlegen angedrückt werden, wird dadurch die Kontaktfläche zwischen Wachstumsoberfläche und Explantat erhöht. Dies könnte die Migration von Zellen aus dem Gewebe begünstigen. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit wurde in der Größe der Explantate gesehen. Es wird vermutet, dass aus kleinere, dafür einer höheren Anzahl an Explantaten mehr Zellen herauswachsen und die Kultur so schneller ein subkultivierbares Stadium erreicht. In folgenden Versuchen wurde die Kantenlänge der Explantate auf 1 bis 2 mm reduziert, wobei der Boden des *Wells* möglichst vollständig mit Explantaten bedeckt wurden.

In einem weiteren Versuch wurde das Alter der Fische variiert. In einem Vorversuch haben aus Muskelgewebe isolierte Zellen aus atlantischen Lachsen (*Salmo salar*) mit vergleichbarem Alter ein schnelles Wachstum gezeigt. Es soll überprüft werden, ob dies auch auf Hautzellen junger Regenbogenforellen zutrifft. Die Explantate wurden aus 20 etwa 3 Monate alten Regenbogenforellen gewonnen. Auf das Entschuppen der Haut konnte verzichtet werden, da diese noch nicht ausgebildet waren. Die Explantate wurden im 24-*well*-Format ausgesät und mit Deckgläsern angedrückt. Die Medien DMEM und ADF-12 mit 5, 10, 15 und 20 % FKS wurden mit einem *Well* je Kondition verwendet. Die *Wells* wurden über einen Monat hinweg beobachtet. Das Zellwachstums blieb jedoch aus. Eine mögliche Ursache dafür könnten Muskelreste auf der Haut sein. Abbildung 9 zeigt die Muskelreste an den Hautexplantaten.

### 3.1.2 Primärzellkulturen aus Kiemenexplantaten

Die Kiemen aus 2, 1-jährigen Tiere wurden, wie unter 2.4.1 beschrieben, entnommen und unter Verwendung von Deckgläschen als Explantatkultur ausgesät. Es wurden die Medien DMEM und ADF-12 mit 5, 10, 15 und 20 % FKS mit jeweils einem *Well* je Kondition getestet. Die Kultur wurde über fünf Wochen hinweg beobachtet. Nach einer Woche wurden jedoch ein Pilzmycel in ADF-12 mit 10 % FKS bemerkt. Daraufhin wurden Deckgläschen und Geweberest entfernt, das Medium abgesaugt und das *Well* mit 1 ml 70 % Ethanol aufgefüllt. Innerhalb dieser Zeitspanne wurde kein Zellwachstum und keine weiteren Pilzmycele beobachtet. Die Kultur wurde ohne Subkultivierung entsorgt. Das Experiment wurde mit den Konditionen ADF-12 20 % FKS und DMEM 10 % FKS mit jeweils vier *Wells* wiederholt. Die Explantate wurden für vier Wochen beobachtet, jedoch wurde kein Zellwachstums festgestellt, sodass die *Wells* ohne Subkultivierung entsorgt wurden.

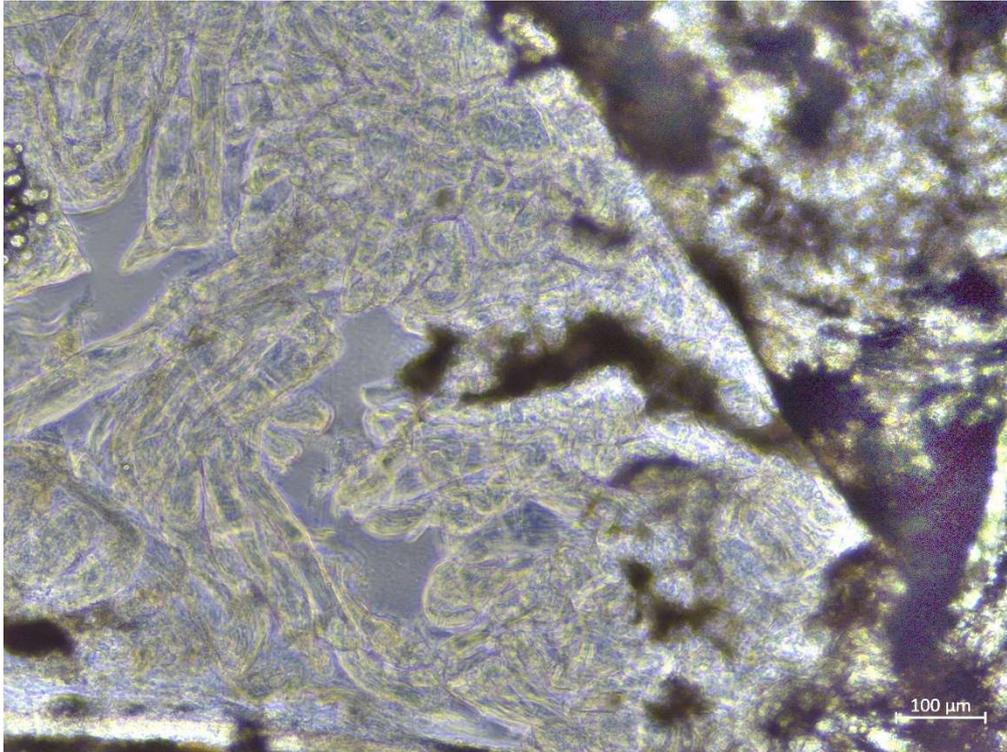


Abbildung 9: Aufnahme der Hautzellkultur in ADF-12 5 % FKS aus jungen Regenbogenforellen eine Woche nach der Aussaat in 10-facher Vergrößerung. Zusehen sind Hautexplantate (dunkel, rechter Rand) und die Muskelreste (hell, faserig, mittig).

### 3.1.3 Primärzellkulturen aus Herzexplantaten

Das Gewebe wurde wie unter 2.4.1 beschrieben aus 2, 1-jährigen Regenbogenforellen entnommen und zerkleinert. Anschließend wurden sechs *Wells* im 24-*well*-Format ausgesät und mit Deckgläschen versehen. Als Medien wurden ADF-12 20 % und DMEM 20 % verwendet, sodass drei *Wells* je Medium beobachtet werden konnten. Es wurde kein Zellwachstum beobachtet, sodass die *Wells* nach 6 Wochen entsorgt wurden.

### 3.2 Versuche mit enzymatisch dissoziiertem Gewebe

Eine enzymatische Dissoziation hydrolysiert die EZM und löst so Zellen aus dem Gewebe, sodass enzymatische Aufschlüsse höhere Zellausbeuten pro Gramm Gewebe aufweisen als das Ausbringen von Explantaten.<sup>1</sup> In den nachfolgenden Versuchen wurden die Gewebeproben vor der Aussaat enzymatisch behandelt. Es wurde erwartet, dass die Zellen schneller, im Vergleich zu den Explantatkulturen, einen subkultivierbaren Zustand erreichen, da die Zellen durch den Isolationschritt schneller auf die Wachstumsoberfläche gelangen können.<sup>1</sup>

#### 3.2.1 Versuche mit enzymatisch aufgeschlossener Haut

Ziel des Versuchs war es zu überprüfen, ob durch das Behandeln des Gewebes mit Enzymen die Kultur schneller in einen subkultivierbaren Zustand erreicht. Hierzu wurden die Hautexplantate, welche aus 7, 1-jährigen Forellen gewonnen wurden, mit einem Collagenase II/IV Mix behandelt. Nach 120 min Inkubationszeit waren die Gewebestücke nicht zersetzt. Anschließend wurden die Gewebestücke im 12-well-Format ausgesät und mit einem Deckgläschen bedeckt. Nach der Trocknungszeit von 30 Minuten wurden sie mit Medium überschichtet. Es wurden vier technische Replikate je Kondition angelegt. Da ADF-12 20 % FKS in Versuchen mit unbehandelten Hautexplantaten subkultivierbare Zellen hervorgebracht hat wurde dieses Medium gewählt. Weiterhin wurden vier *Wells* mit DMEM 15 % FKS ausgesät. Abbildung 10 visualisiert den Versuchsaufbau.

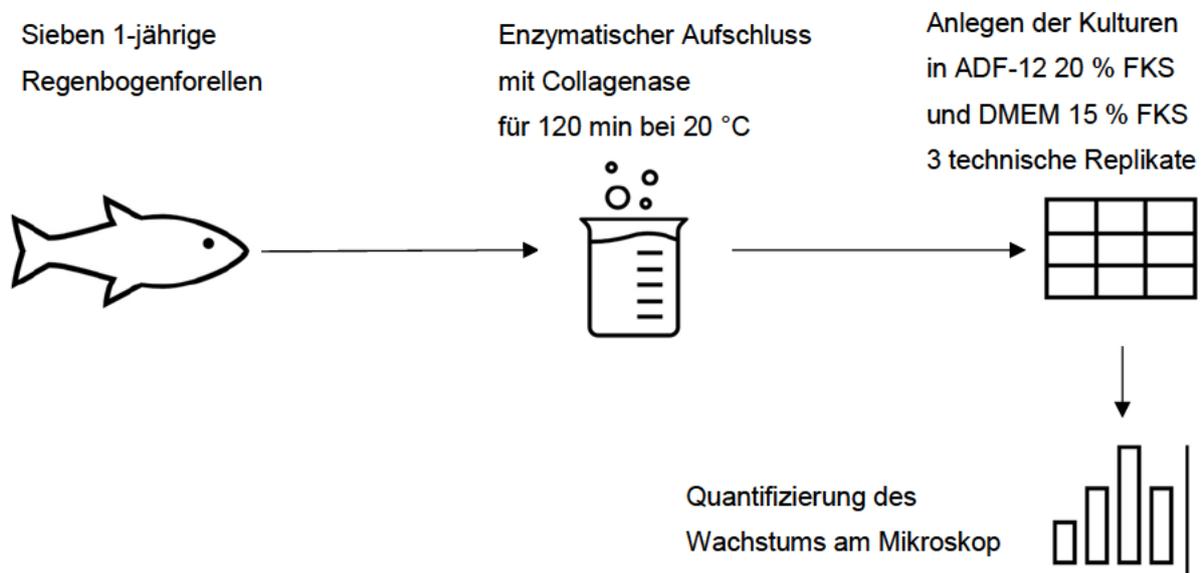


Abbildung 10: Schematischer Ablauf des Anlegens von Zellkulturen aus enzymatisch aufgeschlossener Haut.

Der Verlauf des Konfluenzgrades der Zellen in ADF12 20 % FKS und DMEM 15 % FKS ist nachfolgend in Abbildung 11 bzw. Abbildung 13 visualisiert. Das Aussehen der Zellen in allen *Wells* kann als fibroblastisch beschrieben werden (Abbildung 12). Die Zellen erreichten nach

4 Wochen Konfluenzgrade zwischen 50 und 75 % und wurden subkultiviert. Es wurden die Wells 1 und 3, sowie 2 und 4 in je eine 6-well Platte überführt. Durch das Poolen der Wells soll eine zu geringe Zelldichte vermieden werden. Es wird vermutet das eine zu geringe Zelldichte nach der Subkultivierung zu einem schnelleren sterben der Kultur führt. Die vereinigten Zellen wuchsen nicht auf der 6-well-Platte an, sodass die Zellen 2 Wochen nach der Subkultivierung verworfen wurden. Ein möglicher Grund dafür könnte der Gesundheitszustand der Zellen sein. Abbildung 14 zeigt die Zellen aus Well 1 kurz vor der Subkultivierung. Die Zellen erscheinen eher epithelisch als fibroblastisch. Eine weitere Auffälligkeit besteht in den dunkelblauen Punkten in den Zellen sowie in den wenig scharfen Abgrenzungen der Zellen. Die Rohdaten des Versuchs befinden sich im Anhang unter 8.3.

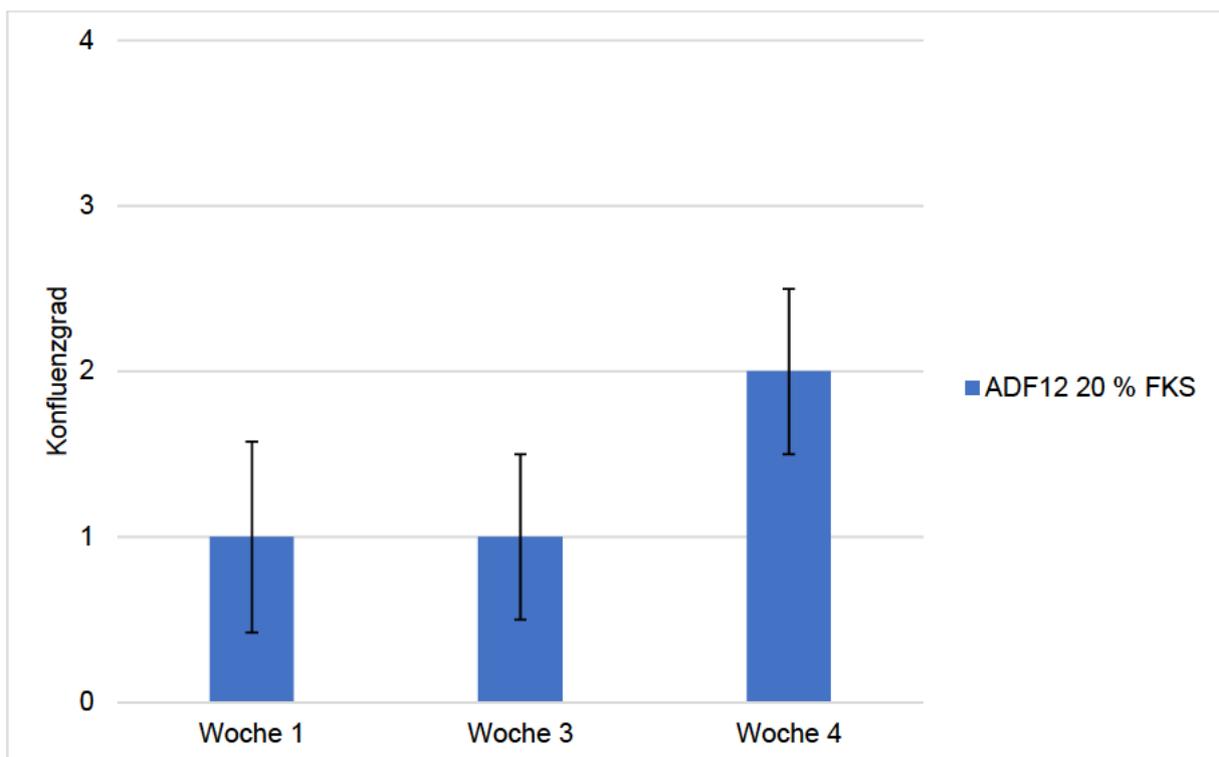


Abbildung 11: Mittelwerte des Verlaufs der Konfluenzgrade von aus der Haut isolierten Zellen in ADF-12 20 % FKS. Die Mittelwerte wurden aus vier technischen Replikaten gebildet. Weiterhin ist die Standardabweichung eingezeichnet. Die Zellen erreichten nach 4 Wochen einen subkultivierbaren Zustand.

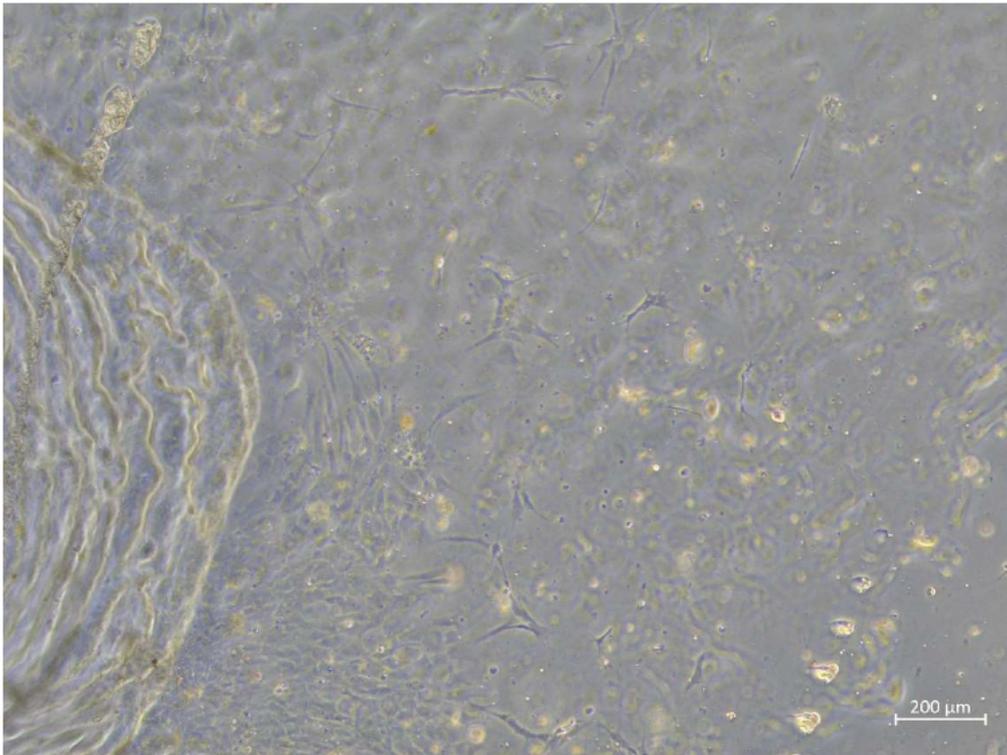


Abbildung 12: Aus Haut isolierte Zellen aus *Well* 1 drei Wochen nach der Aussaat in ADF-12 20 % in 5-facher Vergrößerung. Die Zellen sehen fibroblastisch aus und waren zum Zeitpunkt der Aufnahme zu etwa 50 % konfluent.

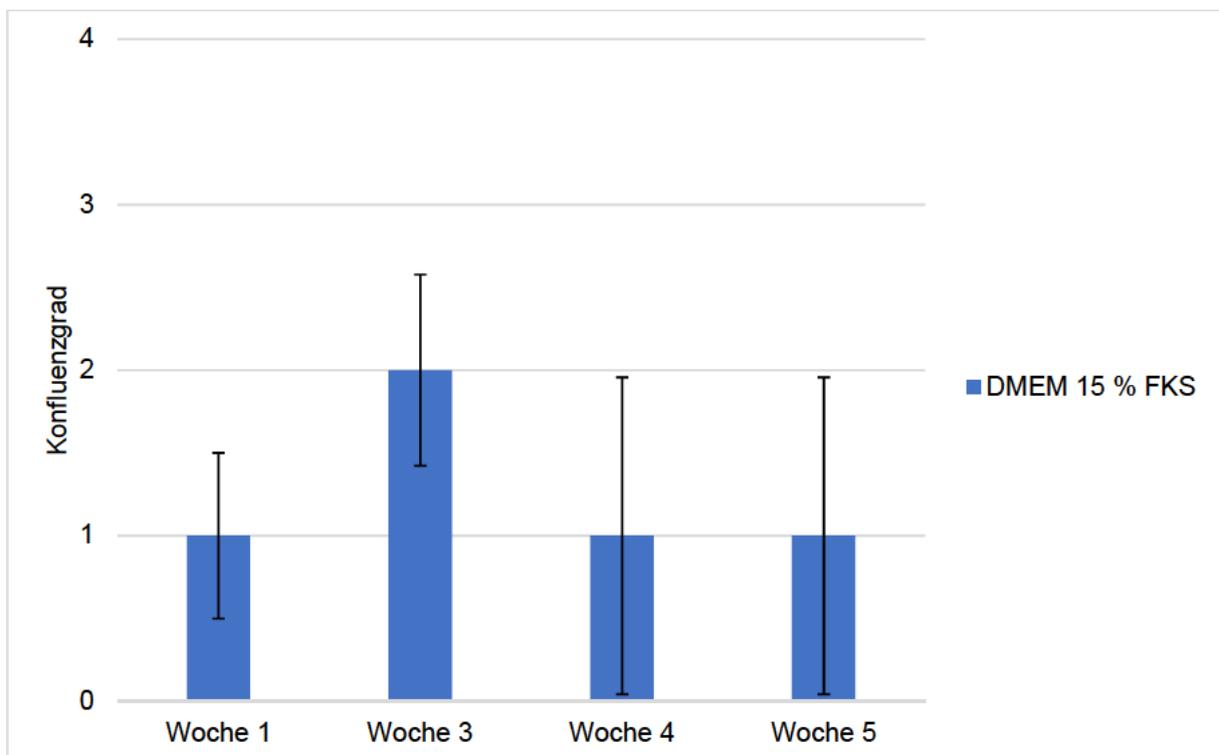


Abbildung 13: Mittelwerte des Verlaufs der Konfluenzgrade von aus der Haut isolierten Zellen in DMEM 15 % FKS. Die Mittelwerte wurden aus vier technischen Replikaten gebildet. Weiterhin ist die Standardabweichung eingezeichnet.

Die Zellen in DMEM erreichten nach 4 Wochen eine stationäre Phase. Eine Subkultivierung wurde nach 6 Wochen durchgeführt, wobei die *Wells* 1 bis 3 auf ein neues 12er *Well* vereinigt wurden.

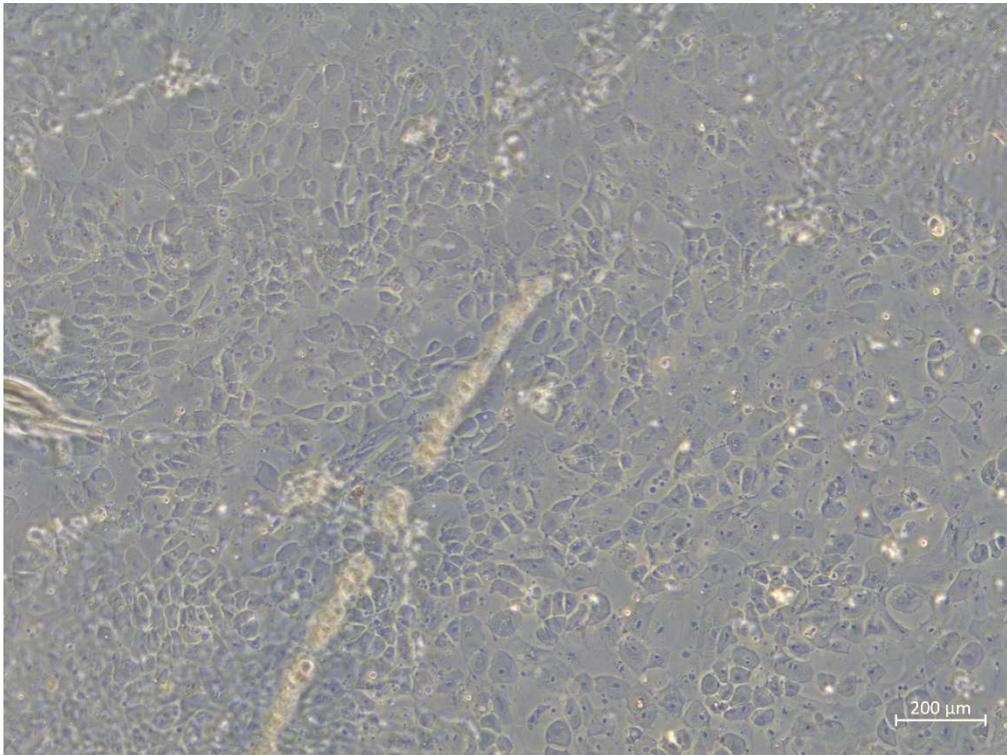


Abbildung 14: Zellen aus *Well* 1 am Tag der Subkultivierung 4 Wochen nach der Aussaat aus Hautexplantaten in ADF-12 20 % FKS in 5-facher Vergrößerung.

Die enzymatische Dissoziation wurde in einem weiteren Versuch mit Gewebe aus 15 Jungfischen getestet. Im Kontrast zu vorangegangenen Versuchen konnte der Collagenase-Mix die Gewebeprobe innerhalb von 90 min vollständig dissoziieren. Grund dafür könnte die dünnere Haut der Jungfische gegenüber den 1-jährigen Forellen sein. 250  $\mu$ l dissoziierte Haut wurde im 24-*well*-Format ausgesät und mit 500  $\mu$ l Medium gemischt. Es wurden die Medien ADF-12 und DMEM mit 5, 10, 15 und 20 % FKS verwendet und ein *Well* je Kondition ausgesät. Die *Wells* wurden für vier Wochen beobachtet, es wurde jedoch kein Wachstum festgestellt. Ein möglicher Grund dafür könnte die vollständige Dissoziation des Gewebes sein.

Trotz der enzymatischen Behandlung der Hautexplantate konnten die Zellen erst nach vier Wochen subkultiviert werden, jedoch hatten 2 der 4 *Wells* in ADF-12 20 % FKS in dieser Zeit einen höheren Konfluenzgrad erreicht. Die Zellen in DMEM 20 % FKS wären ebenfalls nach 4 Wochen subkultivierbar gewesen, jedoch waren die Konfluenzgrade geringer als in ADF-12 20 % FKS.

### 3.2.2 Versuche mit enzymatisch aufgeschlossenem Herzgewebe

Die Herzen wurden aus drei, 1-jährige Regenbogenforellen gewonnen und enzymatisch nach 2.4.3.1 aufgeschlossen. Das erhaltene Pellet wurden im 24-well-Format in den Medien ADF12 und DMEM mit jeweils 5, 10, 15 und 20 % FKS ausgesät. Anschließend wurde das Wachstums beobachtet. Abbildung 15 stellt den Versuchsaufbau schematisch dar. Die Verläufe der Konfluenz sind in Abbildung 16 und Abbildung 17 dokumentiert.

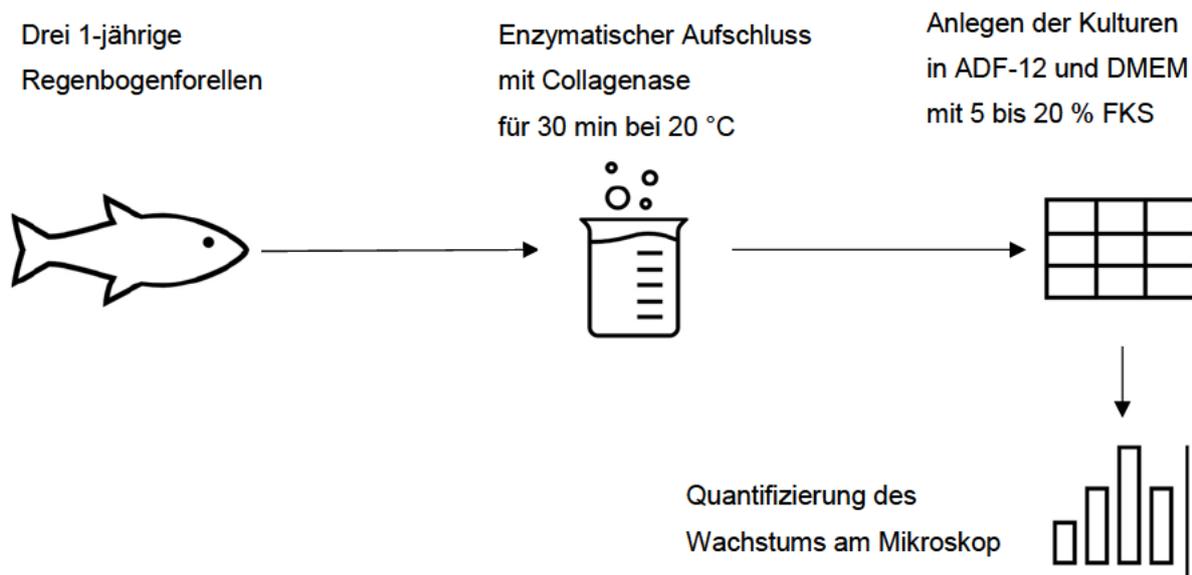


Abbildung 15: Schematischer Ablauf des Anlegens von Zellkulturen aus enzymatisch aufgeschlossenem Herzgewebe.

Nach 5 Wochen wurden die Zellen in DMEM 15 und 20 % FKS sowie ADF-12 20 % FKS in neue 24iger Wells subkultiviert. Für DMEM 10 % wurde keine Subkultivierung vorgenommen, da der Konfluenzgrad zu gering war. Die Zellen wurden für weitere 3 Wochen beobachtet, jedoch wurde kein weiteres Wachstum festgestellt. Die Zellen in ADF-12 20 % FKS überlebten die Subkultivierung, zeigten jedoch kaum weiteres Wachstum und starben nach 3 Wochen ab. Die Zellen in DMEM 20 und 15 % überlebten ebenfalls die Subkultivierung und gingen danach in eine stationäre Phase über. Der Verlauf der Konfluenz der subkultivierten Zellen ist in Abbildung 18 dargestellt. Die Rohdaten des Versuchs befinden sich im Anhang unter 8.4.

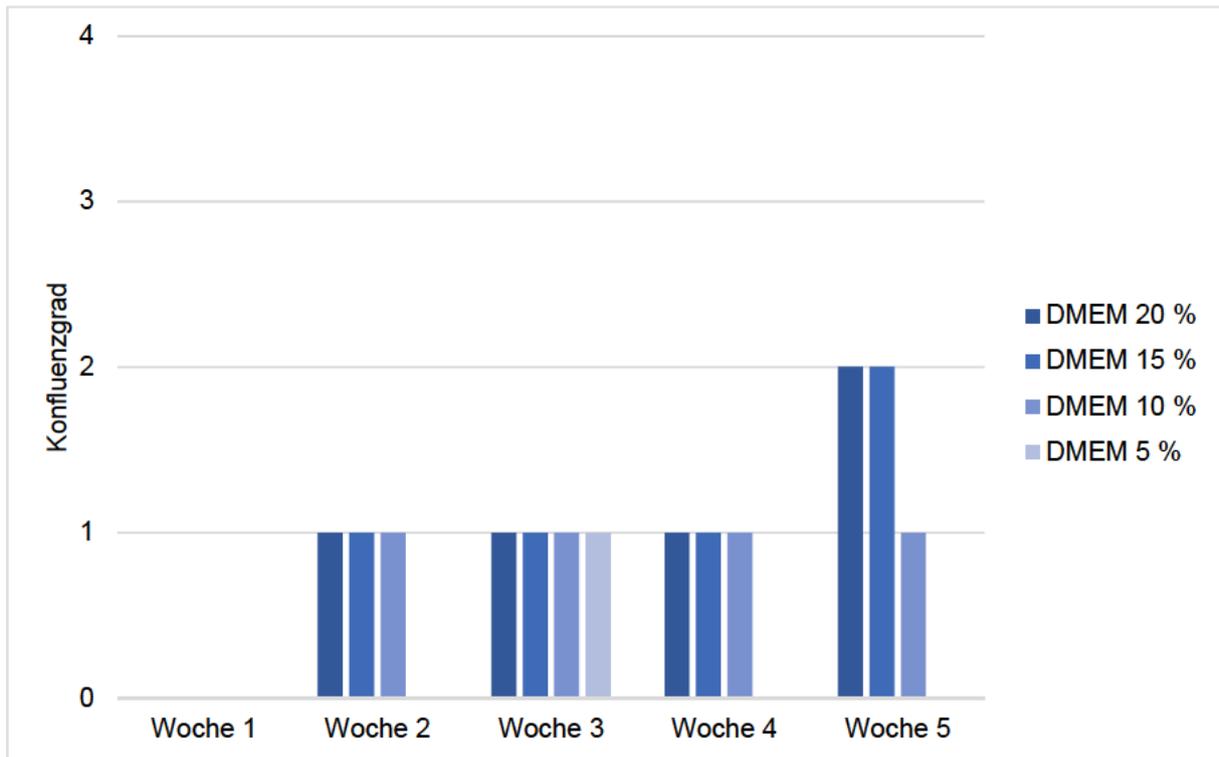


Abbildung 16: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in DMEM mit 5 bis 20 % FKS. Die Zellen in DMEM 20 und 15 % FKS erreichten nach 5 Wochen einen Subkultivierbaren Zustand.

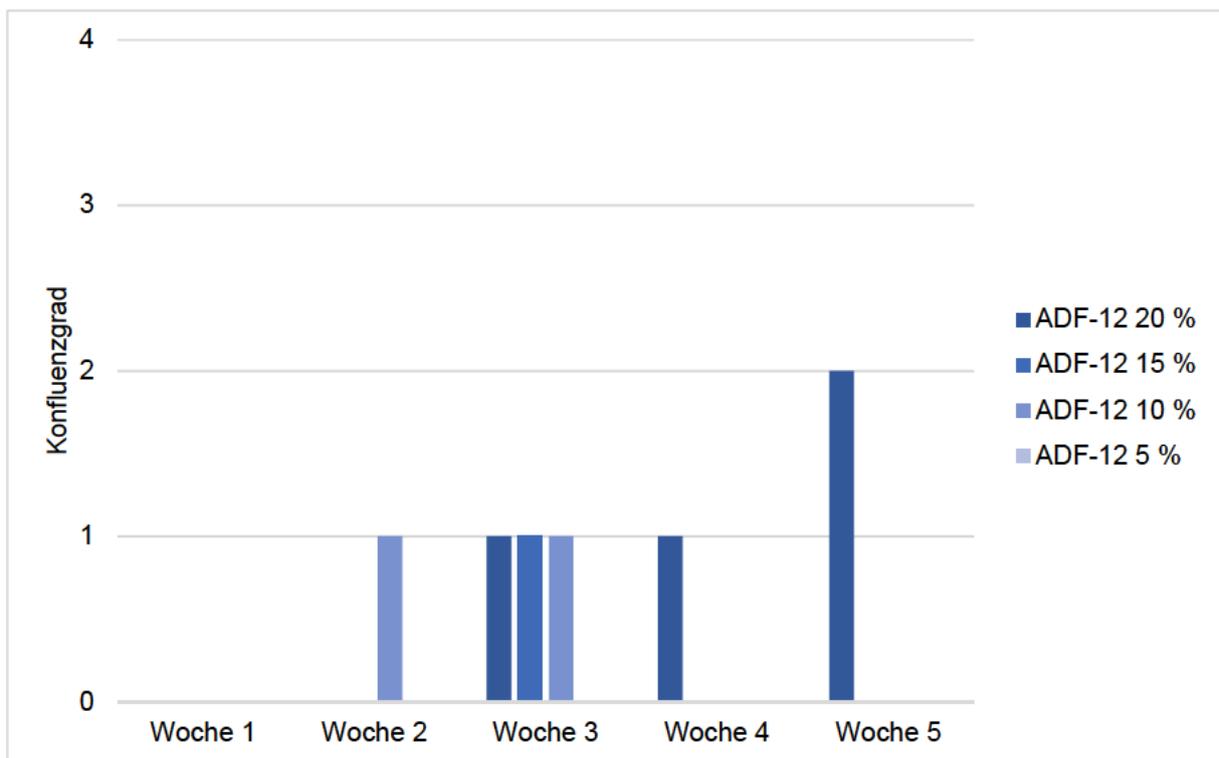


Abbildung 17: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS. Die Zellen in ADF-12 20 % FKS erreichten nach 5 Wochen einen subkultivierbaren Zustand.

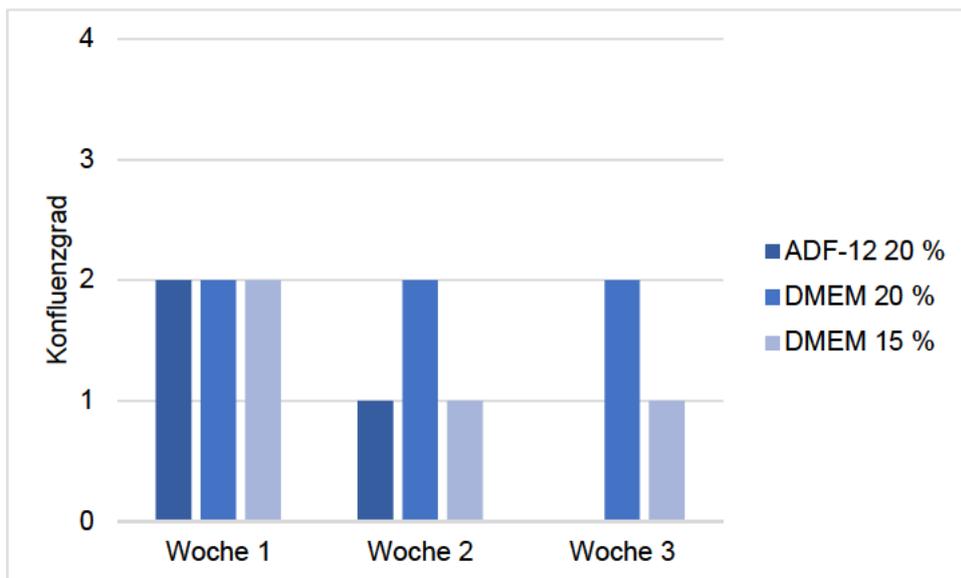


Abbildung 18: Wachstums von Zellen der Passage 1 aus Herzgewebe in ADF-12 20 % FKS und DMEM 15 und 20 % FKS.

### 3.3 Versuche mit Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren können die Zellen zur Proliferation und Differentiation anregen.<sup>14</sup> In den nachfolgenden Versuchen wurden die Effekte verschiedener Wachstumsfaktoren auf das Wachstum von Primärzellkulturen aus Haut- und Muskelgewebe untersucht. Weiterhin wurde in vorrangegangenen Versuchen mit Hautzellen beobachtet, dass sich ein enzymatischer Aufschluss positiv auf den Wachstumsverlauf auswirkt, jedoch erreichten die Kulturen nicht wesentlich schneller einen subkultivierbaren Zustand. Daher wurde der Einfluss verschiedener Aufschlussprotokolle auf die Isolation von Zellen aus Hautgewebe getestet.

#### 3.3.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellen aus Haut

In diesem Versuch wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Primärzellen aus der Haut von 1-jährigen Regenbogenforellen getestet. Gleichzeitig wurde die Art der Zellisolation variiert. Dabei wurden die zweifache Collagenasebehandlung (vgl. 2.4.3.2) und die Collagenase-Trypsin-Behandlung verwendet (vgl. 2.4.3.3), sowie Explantete ausgebracht. Das Gewebe wurde aus 4 Tieren entnommen. Da die Zellen in ADF-12 20 % FKS in vorherigen Versuch mit enzymatisch aufgeschlossenem Gewebe unter 3.2.1 ein höheres Wachstum gezeigt hatten, wurde für diesen Versuch ebenfalls ADF-12 20 % FKS als Medium verwendet. Weiterhin wurde es für diesen Versuch mit den Wachstumsfaktoren hEGF und hFGF sowie mit Forellenserum versetzt. Je Aufbereitungsmethode und Medium wurden drei technische Replikate im 12-well-Format ausgesät. Die Aufzeichnungen über das Wachstum der Zellen sind im Anhang unter 8.5 dokumentiert. Abbildung 19 visualisiert schematisch den Versuchsaufbau.

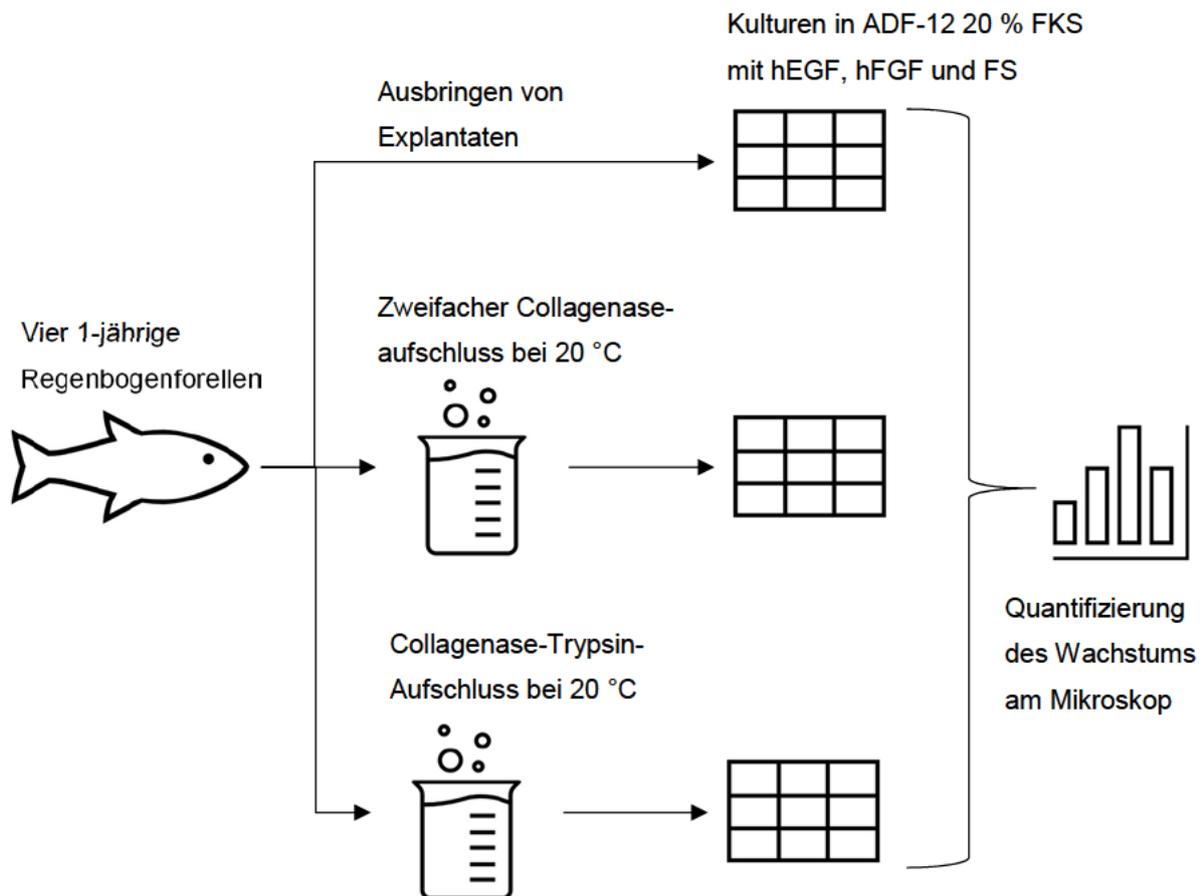


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Überprüfung des Einflusses von verschiedenen Aufarbeitungsmethoden und Wachstumsfaktoren im Medium auf Hautzellen.

Die Explantatkulturen und die Kulturen, welche aus der zweifachen Collagenasebehandlung entstanden sind, erreichten im beobachteten Zeitraum keinen subkultivierbaren Zustand. Daher wird auf diese Kulturen nicht weiter eingegangen. Für die Kulturen die aus der Collagenase-Trypsin-Behandlung angelegt wurden, wurde beobachtet, dass der Konfluenzgrad zwischen Tag 11 und 19 in den meisten *Wells* konstant oder rückläufig war. In Vorbereitung auf eine Subkultivierung der Zellen wurden die Explantate und Deckgläschen an Tag 19 entfernt. An Tag 20 sollten die Zellen subkultiviert werden, jedoch sind beim Abnehmen der Explantate Zellen verloren gegangen, sodass die Zellen mehrheitlich nur Konfluenzgrade von bis zu 25 % aufwiesen. Für eine Visualisierung der Konfluenzgrade der Zellen, wurde der Mittelwert der drei *Wells* gebildet und auf ganze Zahlen gerundet. Abbildung 20 visualisiert den Verlauf des Konfluenzgrades der Hautzellen.

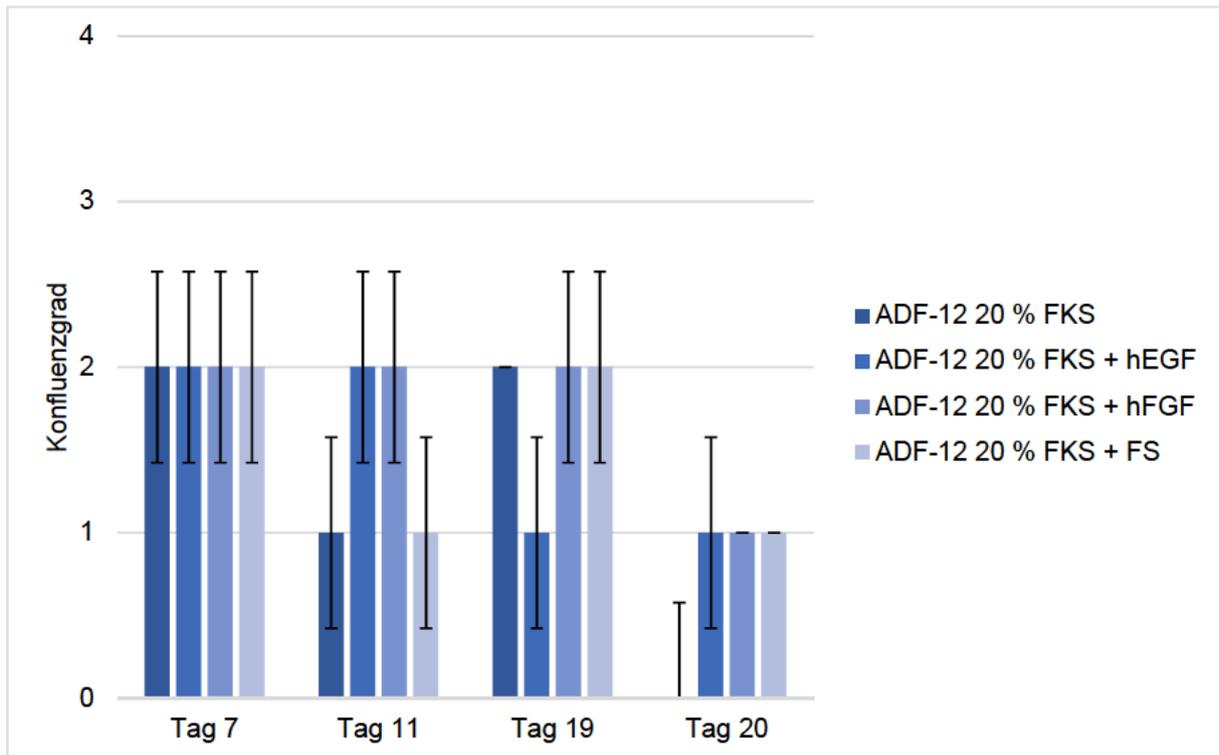


Abbildung 20: Verlauf des mittleren Konfluenzgrades der Zellen aus mit Collagenase und Trypsin behandelte Haut mit Standardabweichung.

Möglicherweise hafteten viele Zellen am Deckglas oder am Gewebe und nicht an der Wachstumsfläche des *Wells*. Dennoch konnten mit Hilfe der Collagenase-Trypsin-Behandlung innerhalb einer Woche in allem Medien Konfluenzgrade von bis zu 50 % erzielt werden. Der Einfluss der Wachstumsfaktoren und des Regenbogenforellenserums sind nicht klar auszumachen, da in Abbildung 20 kein eindeutiger Trend abzulesen ist. Lediglich ADF-12 20 % FKS+FGF zeigt bis zum Entfernen der Explantate an Tag 19 einen konstanten Konfluenzgrad von bis zu 50 %.

### 3.3.2 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellen aus Muskelgewebe

Um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf Zellen aus Muskelgewebe zu testen, wurde Muskelgewebe aus 20 Jungfischen entnommen und mit der Collagenase II/IV Mixtur aus 2.4.3.1 behandelt und einer Lamininbeschichtung im 24-*well*-Format ausgesät. Es wurden die Medien DF-12 20 % FKS, ADF-12 20 % FKS und ADF-12 *Growth* mit 4 *Wells* je Kondition, bzw. 5 *Wells* bei ADF-12 *Growth* verwendet. Abbildung 21 visualisiert den Versuchsaufbau.

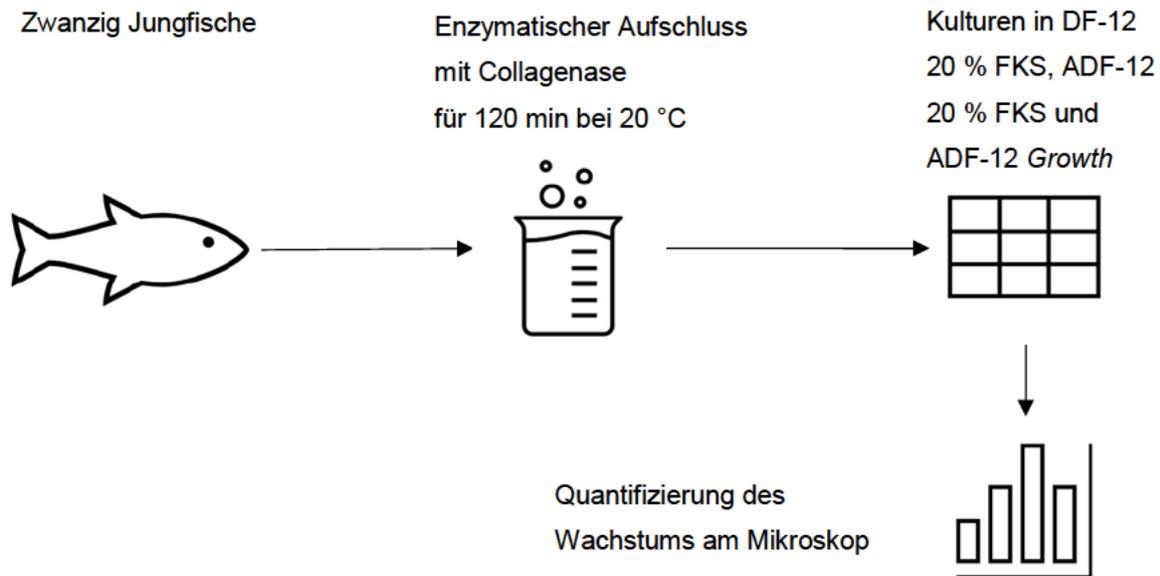


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Überprüfung des Einflusses von Wachstumsfaktoren im Medium auf das Wachstum von Zellen aus Muskelgewebe.

Da Gewebereste die Sicht versperrten, konnte das Wachstum der Zellen erst nach zweimaligem Waschen mit PBS an Tag 13 nach der Aussaat bewertet werden. Für die Visualisierung in Abbildung 22 wurden Mittelwerte aus den Replikaten gebildet. In ADF-12 20 % FKS wurden keine Zellen beobachtet. 19 Tage nach der Aussaat wurde die Konfluenz in den *Wells* mit DF-12 20 % und ADF-12 *Growth* als konstant gegenüber Tag 13 bewertet, sodass die Zellen subkultiviert wurden. Die *Wells* 1, 2 und 5 wurden vom 24-*well*-Format auf ein 12er *Well* vereinigt. Der Verlauf der Konfluenz der subkultivierten Zellen ist nachfolgend in Tabelle 25 dokumentiert. Nach 7 Tage waren die subkultivierten Muskelzellen in beiden Medien nahe zu konfluent. Die Rohdaten des Versuchs befinden sich im Anhang unter 8.6.

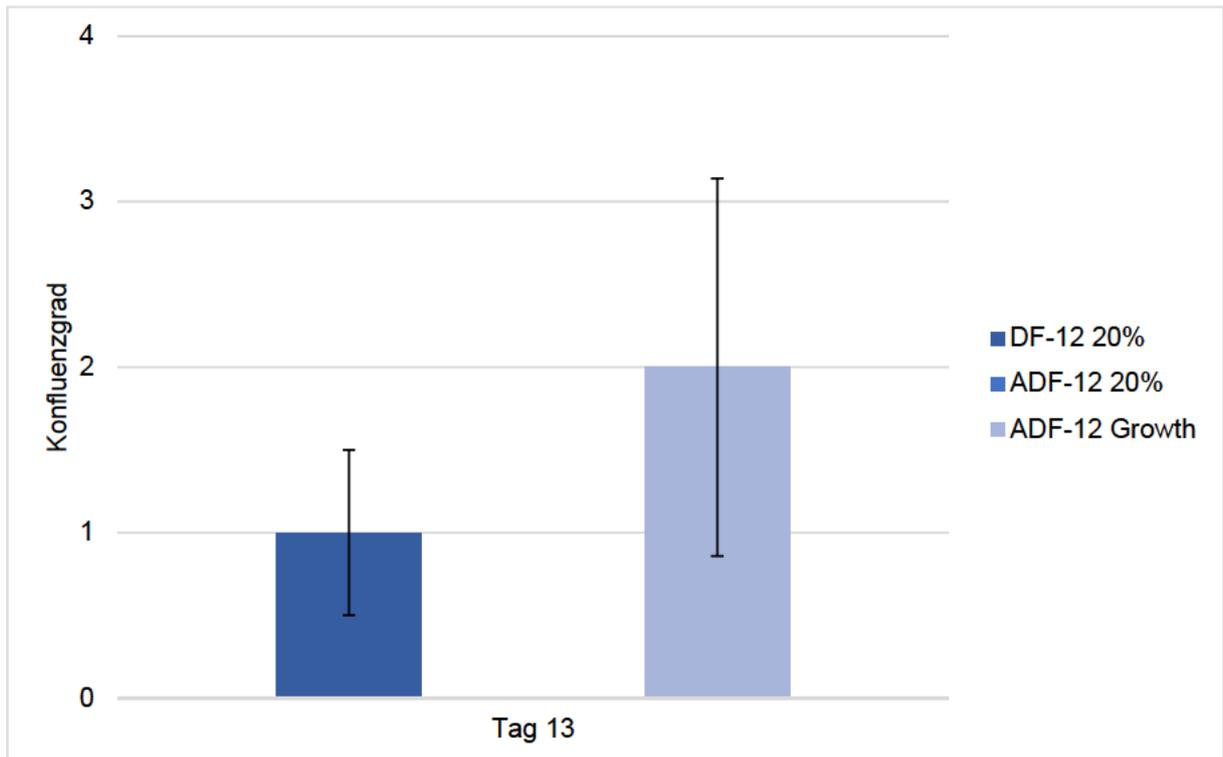


Abbildung 22: Bewertung des mittleren Wachstums der Zellen aus Muskelgewebe 13 Tage nach der Aussaat in den Medien DF-12 20 %, ADF-12 20 % FKS und ADF-12 *Growth* mit Standardabweichung.

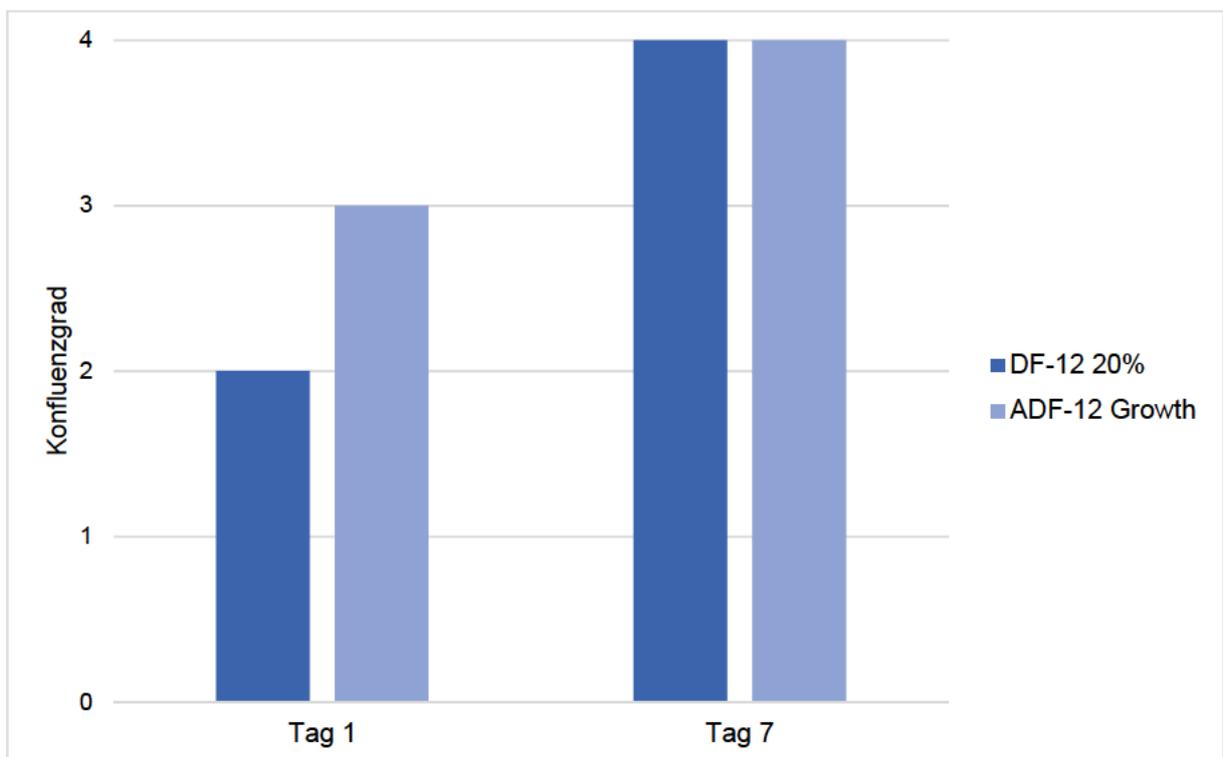


Abbildung 23: Verlauf des Konfluenzgrades der subkultivierten Zellen aus Muskelgewebe in DF-12 20 % und ADF-12 *Growth*.

### 3.4 Charakterisierung von Zellen aus Muskelgewebe

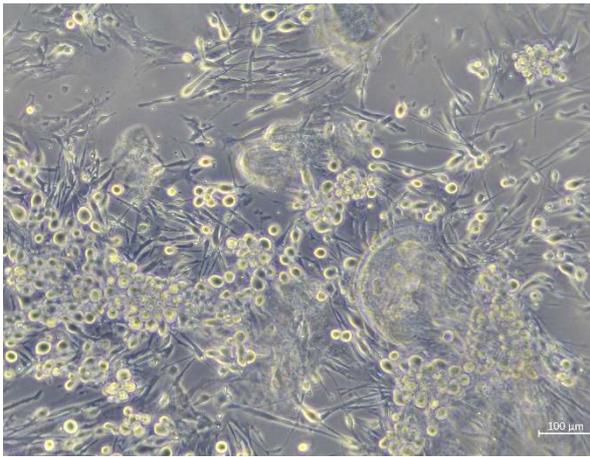
Die unter 3.3.2 erhaltenen Muskelzellen wurden auf ihre morphologischen Unterschiede hin untersucht. Hierzu wurde die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, sowie eine Immunfluoreszenzfärbung auf Tropomyosin unterzogen.

#### 3.4.1 Optische Unterschiede der Zellen

Es sollte überprüft werden, ob sich das Medium auf die Morphologie der Zellen auswirkt. Weiterhin sollte der Einfluss einer Subkultivierung untersucht werden. Hierzu wurden Aufnahmen der Zellen 13 Tage nach der Aussaat und am Tag nach der Subkultivierung gemacht, welche in Abbildung 8 dargestellt sind.

Bei Betrachtung von Abbildung 24 fällt zunächst auf, dass in beiden Medien lange, schmale, spindelförmige Zellen zu sehen sind. Darüber hinaus enthalten beide Primärzellkulturen kürzere, breite Zellen, welche jedoch in den gezeigten Bildern in der Unterzahl sind. Nach der Subkultivierung, in der zweiten Zeile, sind in DF-12 20 % FKS nur wenige lange, dünnen, spindelförmigen Zellen zu sehen. Die Mehrzahl der Zellen sehen fibroblastisch aus, da sie in etwa doppelt so lang wie breit sind. In ADF-12 *Growth* sind ebenfalls einige lange, dünne, spindelförmige Zellen enthalten. Weiterhin sind auch hier fibroblastisch aussehende Zellen enthalten. Zusätzlich sind hier auch polygonale, epithelisch aussehende Zellen zu sehen. Der Anteil an fibroblastisch aussehenden und epithelisch aussehenden Zellen wurde etwa gleich hoch eingeschätzt.

**DF-12 20 % FKS**



**ADF-12 Growth**

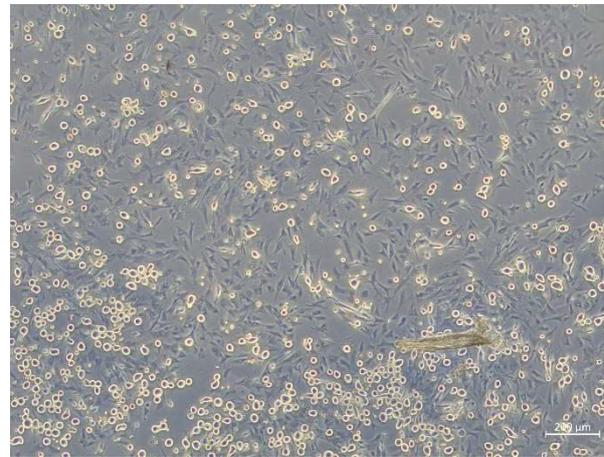
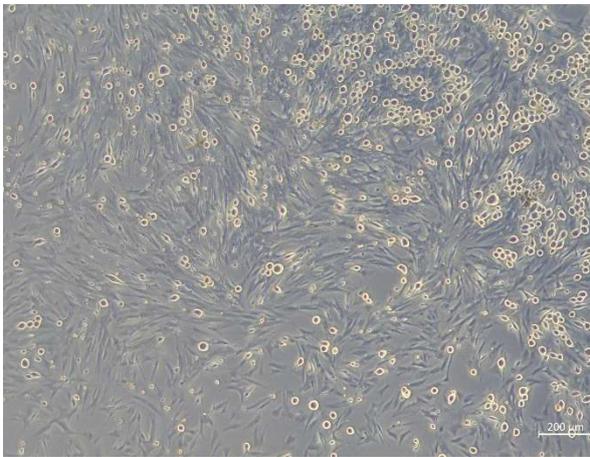
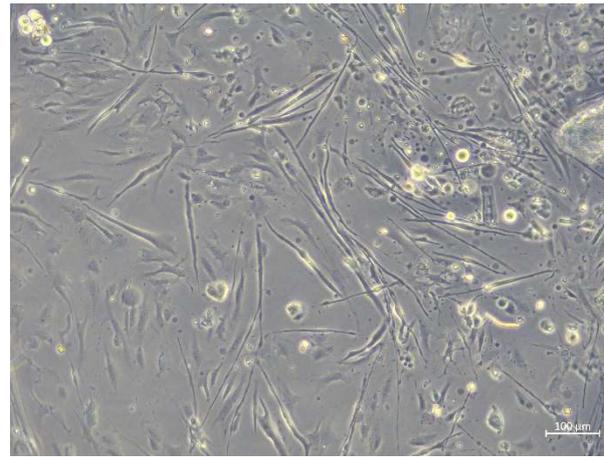


Abbildung 24: Vergleich der Morphologie von Zellen aus Muskelgewebe. Die erste Zeile zeigt die Zellen ca. 2 Wochen nach der Aussaat in 10-facher Vergrößerung. Die Bilder der zweiten Zeile wurden einen Tag nach der Subkultivierung in 5-facher Vergrößerung aufgenommen.

### 3.4.2 Tropomyosinfärbung

Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurde eine Tropomyosinfärbung durchgeführt. Es sollte überprüft werden, ob die Zellen Tropomyosin-Aktin-Filamente aufweisen, was charakteristisch für Muskelzellen ist. Hierzu wurden die Zellen, die unter 3.3.2 gewonnen wurden, 19 Tage nach der Aussaat angefärbt. Abbildung 25 zeigt die erhaltenen Aufnahmen, wobei die mit DAPI angefärbten Zellkerne blau und das mit Antikörpern markierte Tropomyosin gelb erscheinen. In der ersten Zeile von Abbildung 25 wurde die lange, dünne, spindelförmige Form vieler Zellen aus Abbildung 24 wiedererkannt. Weiterhin konnten in diesen Strukturen mehrere Zellkerne ausgemacht werden, was darauf hindeutet, dass es sich um fusionierte Komplexe handelt. In der zweiten Zeile wurden Bilder von Zellen gemacht, welche zwar stark durch den tropomyosinspezifischen Antikörper markiert wurden, jedoch eine eher polygonale, unregelmäßige Form aufweisen. Weiterhin wurden in den Zeilen 1 und 2 viele Zellen erfasst, welche nicht durch die Antikörper markiert wurden. In der dritten Zeile wurden Aufnahmen der langen,

dünnen Zellen gemacht und beobachtet, dass das Tropomyosin in einer scheibenförmigen Struktur vorliegt. Die Beobachtungen wurden für die Zellen aus beiden Medien gemacht.

**DF-12 20 % FKS**

**ADF-12 Growth**

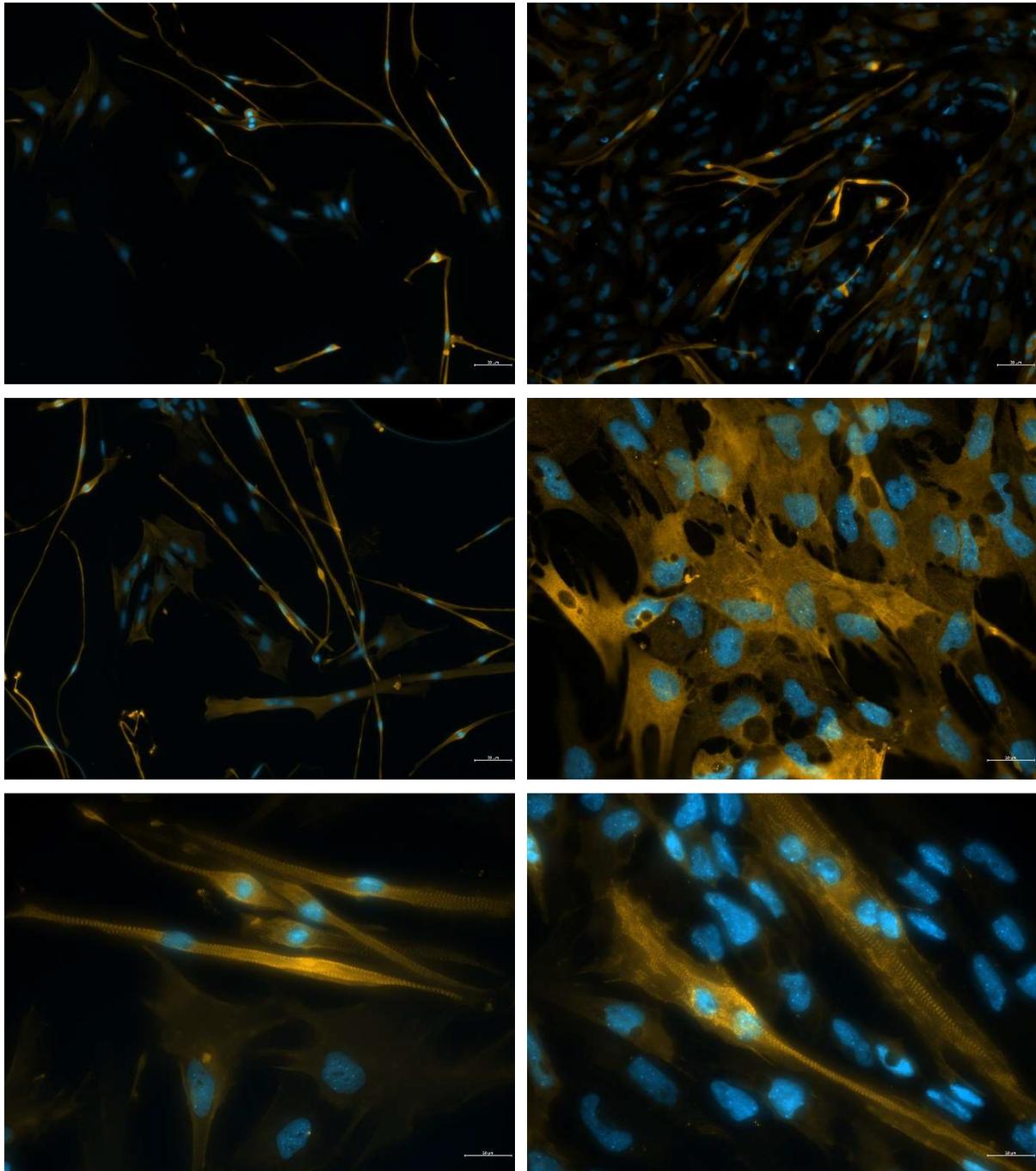


Abbildung 25: Aufnahmen der Tropomyosinfärbung 19 Tage nach der Aussaat. Blaue Färbung zeigt Zellkerne nach der DAPI-Färbung an. Gelbes Signal zeigt markiertes Tropomyosin an. Die Aufnahmen oben links, mittig links und oben rechts wurden 20-facher Vergrößerung gemacht. Unten links, mittig rechts und unten rechts wurden in 63-facher Vergrößerung aufgenommen.

## 4. Diskussion

Ziel der Arbeit war die Konditionen beim Anlegen von Primärzellkulturen zu verbessern, wobei die Parameter Zellisolation, Aussaat, Basalmedium und Medienzusätze betrachtet wurden. Im ersten Schritt wurden versucht Primärzellkulturen auf verschiedene Weisen mit unterschiedlichen Medienkonditionen angelegt und das Wachstum beobachtet. Im zweiten Schritt wurde versucht die erhaltenen Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie zu charakterisieren.

### 4.1 Einfluss der Isolation auf das Wachstum von Primärzellkulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Explantaten und enzymatischen Aufschlüssen gearbeitet. Beim Explantieren von Haut wurden sowohl in ADF-12 als auch in DMEM nach einer Woche Auswüchse von Zellen aus den Explantaten beobachtet. Dies ist vergleichbar mit den Beobachtungen einer Arbeit von Rakers *et al.* Hier wurden Hautstücke aus der Regenbogenforelle von geringerer Größe (1 mm<sup>2</sup>) explantiert und Auswüchse nach 3 bis 4 Tagen in DMEM 20 % FKS beobachtet.<sup>65</sup> Dies deckt sich nicht mit den Beobachtungen im Rahmen dieser Arbeit, da ADF-12 in Verbindung mit Hautexplantaten ein besser Wachstum zeigte (vgl. Abbildung 6). Jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit keine mehrfach subkultivierbaren Zellen aus Hautexplantaten hervorgebracht werden, wohingegen Rakers *et al.* mehrere Subkultivierungen durchführen konnte. Dies ist möglicherweise auf geringe Unterschiede in der Handhabung der Zellen zurückzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Medienwechsel mindestens einmal pro Woche durchgeführt und die Subkultivierung der ausgewachsenen Zellen erfolgte nach drei Wochen. Rakers *et al.* wechselten das Medium alle 3 bis 4 Tage und die Subkultivierung erfolgte ein bis zwei Wochen nach dem initialen Auswuchs. Ein weiterer Unterschied in der Vorgehensweise besteht darin, dass Rakers *et al.* die Explantate im 6-well-Format ausäten.<sup>65</sup> In Verbindung mit den kleineren Explantaten wurde so möglicherweise eine höhere Zelldichte nach dem initialen Auswuchs erreicht, was sich positiv auf das Wachstum nach der Subkultivierung ausgewirkt haben könnte. Eine Arbeit von Rakers legt nahe, dass sich eine geringe Zelldichte negativ auf das Proliferationsverhalten auswirkt.<sup>78</sup>

Beim Arbeiten mit Kiemengewebe konnten, sowohl aus Explantaten als auch nach einem enzymatischen Aufschluss, keine Zellen gewonnen werden. Ein möglicher Grund für den Misserfolg könnten zu große Explantate, Verunreinigungen der Kultur durch Blutzellen oder ein unvorteilhafter Aufschluss sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ca. 1-2 mm breite Streifen aus den Kiemen geschnitten und ausgesät oder nach dem Zerschneiden mit Collagenase II/IV Lösung behandelt. In einer Arbeit von Motherstill *et al.* (1995) wurden das Kiemengewebe zunächst in 2 mm<sup>2</sup> Stücke geschnitten, gewaschen und anschließend in einer 0,25 % Trypsinlösung mit 1 mg/ml Collagenase Klasse 4 für 30 min bei 19 °C aufgeschlossen und die Suspension samt Geweberesten in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup> Wachstumsoberfläche) ausgesät.<sup>79</sup> Mit dieser Methode konnten nach 15 Tagen 530.000 Zellen in LSE-Medium erlangt

werden.<sup>79</sup> Ein weiteres Beispiel für einen erfolgreichen Aufschluss mit Trypsin stellt eine Arbeit von Butler *et al.* (2004) dar, in dem Kiemen nach der Entnahme äußerlich gewaschen wurden, jedoch nicht von innen. Butler *et al.* wuschen die Kiemen von innen, in dem sie vor der Entnahme der Kiemen dem Fisch Blut abnahmen und anschließend durch das Herz eine heparinhaltige Lösung in den Blutkreislauf einbrachten, wodurch verbleibenden Blut aus den Kiemen gespült wurde.<sup>80</sup> Anschließend wurde das Kiemengewebe zunächst in 4 mg/ml Collagenase-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur und anschließend in 1 % Trypsinlösung bei 4 °C für 30 min aufgeschlossen.<sup>80</sup> Mit dieser Methode konnten in 30 von 32 Versuchen eine Primärzellkultur angelegt werden.<sup>80</sup> Diese Arbeiten deuten darauf hin dass ein Aufschluss mit Trypsin, ob er bei Raumtemperatur oder 4 °C erfolgt, entscheidend für eine erfolgreiche Isolation von Zellen aus Kiemen ist. Ein möglicher Grund dafür könnte sein dass Trypsin eine Protease mit breiterem Spektrum als Collagenase ist.<sup>1</sup>

Der positive Einfluss von Trypsin auf Gewebeaufschlüsse konnte im Rahmen dieser Arbeit bei der Isolation von Zellen aus Hautgewebe beobachtet werden. Im Vergleich zum Aufschluss mit Collagenase II/IV Mix und der zweifachen Behandlung mit Collagenase NB8 konnte bei der zusätzlichen Behandlung mit 0,01 % Trypsin für 15 min bei 20 °C nach einer Collagenase IV Behandlung bereits nach 7 Tage zu etwa 50 % Konfluente 12er *Wells* erhalten werden. Ein möglicher Grund für den positiven Effekt von Trypsin könnte die Struktur der EZM der Haut sein. Diese besteht hauptsächlich aus Collagenen, enthält jedoch auch Laminine und Fibronectine.<sup>34</sup> Daher scheint ein vollständiger Aufschluss der EZM alleine durch Collagenasen unwahrscheinlich. Trypsin scheint die übrigen Proteine der EZM zu spalten, wodurch eine höhere Anzahl an Zellen aus der EZM gelöst wird und auf die Wachstumsoberfläche gelangen kann. Da nach dem Trypsinaufschluss ebenfalls das Gewebe ausgesät wurde, besteht eine weitere Möglichkeit darin, dass die Zellen nach dem Aufschluss leichter aus der Haut auf die Wachstumsoberfläche migrieren konnten.

Beim Explantieren von Herzgewebe konnten im Verlauf der Beobachtung keine Zellen auf der Wachstumsoberfläche verzeichnet werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte ein geringeres Migrationsvermögen der Zellen aus Herzgewebe im Vergleich zu Zellen aus der Haut sein. In einer Arbeit von Kim *et al.* (2019) wurden Zebrafischherzen auf Fibrinogen explantiert und ein anschließend Auswuchs von Zellen beobachtet.<sup>81</sup> Das Gel wurde aus Fibrinogen und Thrombin hergestellt. Diese Reaktion findet im lebenden Organismus bei der Wundheilung statt.<sup>81</sup> Das Enzym Thrombin ist ein Blutgerinnungsfaktor und vernetzt das im Blutplasma vorliegende Fibrinogen. Anschließend diente das Gel als EZM und regte möglicherweise die Migration und Proliferation von Zellen an.<sup>81,82</sup> Bei der Isolation von Zellen aus Herzgewebe mit Hilfe eines enzymatischen Aufschlusses mittels Collagenase II/IV Mix konnten Zellen gewonnen werden,

welche über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden konnten. Dies deckt sich mit verschiedenen Berichten in denen Collagenase für den Aufschluss verwendet wird.<sup>72,83</sup>

#### 4.2 Einfluss des Basalmediums auf das Wachstum von Primärzellkulturen

Versuche mit Zellen aus Haut- und Herzgewebe haben gezeigt, dass optimale Basalmedium zwischen Gewebetypen variieren kann. Für Zellen aus der Haut wurden in ADF-12 bessere Ergebnisse, hinsichtlich des Wachstums, als mit DMEM erzielt. Andererseits überlebten die Zellen aus Herzgewebe isolierten Zellen nach der Subkultivierung länger in DMEM. Jedoch konnten im Rahmen der Arbeit keine mehrfach subkultivierbaren Zellen gewonnen werden. Ein Grund hierfür könnte die Zusammensetzung der Medien sein. Nachfolgend soll die Zusammensetzung der Basalmedien verglichen werden, dabei werden die einzelnen Komponenten nach Kategorien zusammengefasst. Eine vollständige Liste der Inhaltsstoffe der Medien befindet sich im Anhang in Tabelle 26. Weiterhin soll das Blutplasma von Salmoniden in den Vergleich mit einbezogen werden. Tabelle 12 zeigt die Konzentrationen der verschiedenen Kategorien an Inhaltsstoffen.

Tabelle 12: Vergleich der Zusammensetzung der Basalmedien ADF-12 und DMEM mit Blutplasma von Salmoniden.

<b>Komponente</b>	<b>ADF-12</b>	<b>DMEM, high Glucose</b>	<b>Blutplasma von Salmoniden<sup>84,85</sup></b>
Aminosäuren, mg/l	1.329	1.570	41.000 bis 57.000
Vitamine, mg/l	36	31	k. A,
Anorganische Salze, mg/l	10.074	11.105	6.000 bis 9.200
Proteine, mg/l	418	-	49
D-Glucose, mg/ml	3.151	4.500	260 bis 1.280
Bemerkung	Enthält rekombinantes Insulin Enthält 110 mg/ml Natriumpyruvat		Aus Pund, 1998 und Sandnes et al. 1988

Zunächst fällt auf, dass beide Basalmedien wesentlich mehr Zucker und wesentlich weniger Aminosäuren als das Blutplasma von Salmoniden enthalten. Weiterhin ist die Konzentration an anorganischen Salzen in den Basalmedien höher als im Blutplasma. Darüber hinaus enthält ADF-12 bereits Proteine und Insulin, jedoch in wesentlich höherer Konzentration, als das Blutplasma. Regenbogenforellen sind fleischfressende Fische, sodass sie den Großteil ihrer Energie aus der Verstoffwechslung von Proteinen und Fetten beziehen.<sup>86</sup> Daher könnte die

Aminosäurekonzentration der Medien einen höheren Einfluss auf das Wachstum der Zellen haben als der Zuckergehalt. DMEM weist einen höheren Aminosäuregehalt auf als ADF-12 auf, im Vergleich zum Gehalt im Blutplasma scheint der Unterschied nicht ausschlaggebend, da die Medien keine großen Unterschiede in ihren Wachstumsverläufen zeigten. Beispielsweise sind die Verläufe der aus Herzgewebe isolierten Zellen in Tabelle 18 und Tabelle 19 zwischen ADF-12 20 % FKS und DMEM 20 % FKS sehr ähnlich, was die These untermauert. Ein möglicher Grund für das bessere Wachstum von Hautzellen in ADF-12 20 % FKS könnte das enthaltene Insulin sein, da Insulin die Aufnahme von Zucker begünstigt und die Zellen so möglicherweise den im Medium enthaltenen Zucker besser aufnehmen konnten, was zu einer höheren Proliferationsrate geführt haben könnte.<sup>14</sup> In der Literatur wurde das Leibovitz L-15 Basalmedium häufig erfolgreich zum Kultivieren von Fischzellen eingesetzt. Beispielsweise für Zellen aus der Haut oder den Kiemen.<sup>61,87</sup> Ein Grund für den Erfolg könnte die höhere Konzentration an Aminosäuren sein. Sie ist mit 3.561 mg/l mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu ADF-12 und DMEM (Tabelle 26).

Ein Grund für das Ausbleiben von mehrfach passagierbaren Zellen aus allen Gewebetypen könnte der höhere Gehalt an osmotisch wirksamen Substanzen sein. Die Medien ADF-12 und DMEM weisen eine höhere Konzentration an anorganischen Salzen und Zucker auf als das Blutplasma von Salmoniden, sodass die isolierten Zellen möglicherweise hypertonischem Stress ausgesetzt waren, welcher sich negativ auf das Proliferationsverhalten ausgewirkt haben könnte.

#### **4.3 Einfluss von Nährmedienzusätzen auf das Wachstum von Primärzellkulturen**

Um den Einfluss der FKS-Konzentration auf das Wachstum von Primärzellkulturen zu überprüfen, wurden Versuche mit den Konzentrationen 5, 10, 15 und 20 % FKS durchgeführt. Dabei wurde für Medien mit 5 % FKS ein schlechteres bis gleichwertiges Wachstum gegenüber den Medien mit 20 % FKS beobachtet. Beispielsweise wurden bei der Kultivierung von Zellen aus Herzen sowohl in ADF-12 5 % FKS als auch DMEM 5 % FKS keine subkultivierbaren Zellen erhalten. In den Medien mit 20 % FKS konnten die Zellen auch nach der Subkultivierung für mehrere Wochen in Kultur gehalten werden (Tabelle 18 und Tabelle 19). Für einzelne Abstufungen war die Messmethode zur Quantifizierung des Wachstums, das Schätzen der Konfluenz im wöchentlichen Takt am Mikroskop, wahrscheinlich zu ungenau. Bei der Kultivierung von Zellen aus Muskel- und Hautgewebe wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf das Proliferationsverhalten von Primärzellkulturen getestet. Bei der Kultivierung von Muskelzellen wurden die Medien DF-12 20 % FKS, ADF-12 20 % FKS und ADF-12 *Growth* getestet. In ADF-12 20 % FKS keine Zellen erhalten, was nicht den Erwartungen entsprach, da zum einen Vorversuche mit Muskelgewebe aus dem Atlantischen Lachs positive Ergebnisse gezeigt hatte. Weiterhin wurden in DF-12 20 % FKS und ADF-12 *Growth* subkultivierbare Zellen erhalten,

wobei DF-12 weniger und ADF-12 *Growth* mehr Nährstoffe als ADF-12 20 % FKS enthält (Tabelle 26). Weiterhin wurde in ADF-12 *Growth* ein schnelleres Wachstum der Zellen als in DF-12 20 % beobachtet. Dieses Verhalten wurde in Passage 0 und 1 beobachtet. Das schnellere Wachstumsverhalten kann möglicherweise auf die zugesetzten Wachstumsfaktoren hEGF, hFGF, das Glucocorticoid Dexamethason sowie das, im ADF-12 bereits enthaltene, Insulin zurückgeführt werden. Der positive Effekt von hEGF und hFGF auf die Proliferation von Zellen aus Muskelgewebe wurde von Zhao *et al.* (2020) an *Larimichthys crocea* gezeigt werden.<sup>88</sup> Weiterhin konnten Muskelzellen aus Zebrafischen bereits in einem Medium mit ähnlicher Konzentration an hEGF, hFGF, Insulin und Dexamethason kultiviert werden.<sup>89</sup>

#### **4.4 Charakterisierung von Zellen aus Muskelgewebe**

Bei der Charakterisierung der unter 3.3.2 erhaltenen Zellen aus Muskelgewebe wurden drei morphologisch verschiedene Zelltypen beobachtet. In den Kulturen wurden spindelförmige, fibroblastisch aussehend und epithelisch aussehende Zellen beobachtet. Die Beobachtungen von Dodson *et al.* (2008) deuten darauf hin, dass es sich bei den unterschiedlichen Morphologien um Muskelzellen in verschiedenen Stadien der Differenzierung handelt.<sup>69,90</sup>

Die fibroblastisch aussehenden Zellen wurden in verschiedenen Berichten als Myocyten beschrieben.<sup>91,92</sup> Ein weiterer Bericht von Oestbye *et al.* (2019) deutet darauf hin, dass es sich bei den langen, spindelförmigen Zellen um vorläufige multinukleare Myotuben handelt, welche aus der Differenzierung und Fusion von Myocyten entstehen.<sup>92</sup> Dies wird durch Abbildung 25 unterstützt, da hier durch die Zellkernfärbung mehrere Zellkerne innerhalb der spindelförmigen Zellen sichtbar gemacht werden konnten. Weiterhin konnte die Anwesenheit von Tropomyosin in den multinuklearen Spindeln nachgewiesen werden. Dies stellt ein weiteres Indiz dafür dar, dass es sich um Vorläufer von Myotuben handelt, da Tropomyosin an kontraktilen Filamenten bindet, welche häufig in Muskelzellen vorkommen.<sup>76,77</sup> Weiterhin zeigt Abbildung 25 eine scheibenförmige Struktur des Tropomyosins. Hierbei könnte es sich um die Z-Scheiben der Skelettmuskulatur handeln, bei der die Z-Scheiben die Grenze zwischen den Sarkomeren bilden.<sup>93</sup> Sarkomere bilden die kleinste funktionelle Einheit einer Myofibrille.<sup>93</sup> Die epithelisch aussehenden Zellen enthielten ebenfalls Tropomyosin (Abbildung 25), es könnte daher sein, dass es sich hierbei um einen weniger ausdifferenzierten Muskelzelltyp handelt, da in ihnen keine Z-Scheiben identifiziert werden konnten.<sup>69</sup>

## 5. Fazit und Ausblick

Ziel der Arbeit war es die Konditionen von Primärzellkulturen im Bereich Zellisolation, Nährmedienauswahl und Zusammensetzung zu optimieren. Dazu wurden Versuche mit Haut-, Herz-, Kiemen- und Muskelgewebe durchgeführt und die Zellen auf verschiedene Weisen isoliert und in ADF-12 und DMEM mit verschiedenen FKS-Konzentrationen kultiviert. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Zellproliferation in Kulturen aus Haut- und Muskelgewebe getestet. Weiterhin wurde eine Tropomyosinfärbung der Muskelzellkultur zur Charakterisierung der Zellen unternommen.

Im Laufe der Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein enzymatischer Aufschluss des Gewebes häufig schneller zu Zellen auf der Wachstumsoberfläche führt. Weiterhin konnte am Beispiel von Hautgewebe gezeigt werden, dass eine Kombination aus verschiedenen Enzymen zu einer Verbesserung der Zellausbeute führen kann. Bezüglich der Medienauswahl konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass weder DMEM noch ADF-12 ideale Medien für die Kultivierung von Fischzellen sind und andere Medien mit höherem Aminosäuregehalt, wie zum Beispiel Leibovitz L-15, möglicherweise besser geeignet sein könnten. In Bezug auf die Medienzusätze konnte festgestellt werden, dass höhere FKS-Konzentration meist zu schnellerem Zellwachstum führen als niedrige. Genauer konnte der Effekt aufgrund der Quantifizierungsmethode nicht beschrieben werden. Bei den verwendeten Wachstumsfaktoren konnte ebenfalls ein positiver Effekt auf das Proliferationsverhalten gezeigt werden, jedoch konnte dieser nicht genau quantifiziert werden, da keine signifikanten Unterschiede erfasst werden konnten. Anhand der Tropomyosinfärbung konnte gezeigt werden, dass bei der Isolation von Zellen aus Muskelgewebe gewonnen werden konnten, die Eigenschaften von differenzierten Muskelzellen besaßen.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden diverse Konditionen für Primärzellkulturen getestet, jedoch konnten keine Bedingungen optimiert werden oder ihre Effekte auf statistisch relevante Weise quantifiziert werden. Daher könnten nachfolgende Arbeiten sich beispielsweise mit der Zellausbeute von enzymatischen Aufschlüssen oder der Quantifizierung des Einflusses von Wachstumsfaktoren auf bereits bestehende Zellkulturen beschäftigen. Weiterhin könnten die im Laufe der Arbeit gewonnenen Zellen weiter kultiviert werden. Beispielsweise die Zellen aus Hautgewebe aus 3.3.1 oder die Muskelzellen aus 3.3.2.

## 6. Literatur

1. Primary Culture. In *Culture of animal cells. A manual of basic technique and specialized applications*, edited by R. I. Freshney. 6th ed. (Wiley-Blackwell, Hoboken, N.J, 2010), pp. 163–186.
2. Frantz, C., Stewart, K. M. & Weaver, V. M. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* **123**, 4195–4200; 10.1242/jcs.023820 (2010).
3. Schoneveld, O. J. L. M., Gaemers, I. C. & Lamers, W. H. Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et biophysica acta* **1680**, 114–128; 10.1016/j.bbaexp.2004.09.004 (2004).
4. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* **37**, 614–636; 10.1016/0014-4827(65)90211-9 (1965).
5. Schlessinger, J. *et al.* Regulation of cell proliferation by epidermal growth factor. *CRC critical reviews in biochemistry* **14**, 93–111; 10.3109/10409238309102791 (1983).
6. The error of determination of toxicity. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **101**, 483–514; 10.1098/rspb.1927.0030 (1927).
7. Akhila, J. S., Shyamjith, D. & Alwar, M. C. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Current Science* **93**, 917–920 (2007).
8. Gospodarowicz, D. & Moran, J. S. Growth factors in mammalian cell culture. *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 531–558; 10.1146/annurev.bi.45.070176.002531 (1976).
9. Aarattuthodi, S. & Dharan, V. Applications of Fish Cell Cultures. In *Biotechnological Advances in Aquaculture Health Management*, edited by S. K. Gupta & S. S. Giri (Springer Singapore, Singapore, 2021), pp. 123–163.
10. Carrel, A. & Burrows, M. T. CULTIVATION OF TISSUES IN VITRO AND ITS TECHNIQUE. *The Journal of experimental medicine* **13**, 387–396; 10.1084/jem.13.3.387 (1911).
11. Suja Aarattuthodi, Vandana Dharan & Manoj Koshy. Fish Cell Cultures -Uses and Prospects. *Journal of Aquaculture Research and Development* **13**, 667 (2022).
12. Part, P., Norrgren, L., Bergstrom, E. & Sjoberg, P. PRIMARY CULTURES OF EPITHELIAL CELLS FROM RAINBOW TROUT GILLS. *Journal of Experimental Biology* **175**, 219–232; 10.1242/jeb.175.1.219 (1993).
13. Rubio, N., Datar, I., Stachura, D., Kaplan, D. & Krueger, K. Cell-Based Fish: A Novel Approach to Seafood Production and an Opportunity for Cellular Agriculture. *Front. Sustain. Food Syst.* **3**; 10.3389/fsufs.2019.00043 (2019).

14. Yao, T. & Asayama, Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reproductive Medicine and Biology* **16**, 99–117; 10.1002/rmb2.12024 (2017).
15. Basalmedium - RÖMPP, Thieme. Available at <https://roempp.thieme.de/lexicon/RD-02-00305> (2022).
16. Nicholson, B. L. Fish Cell Culture: An Update. In *Advances in Cell Culture. Volume 7*, edited by K. Maramorosch & G. H. Sato (Elsevier Science, Burlington, 2014), Vol. 7, pp. 1–18.
17. Arora, M. Cell Culture Media: A Review. *MATER METHODS* **3**; 10.13070/mm.en.3.175 (2013).
18. Froehlich, J. M., Seiliez, I., Gabillard, J.-C. & Biga, P. R. Preparation of primary myogenic precursor cell/myoblast cultures from basal vertebrate lineages. *Journal of visualized experiments : JoVE*; 10.3791/51354 (2014).
19. InvivoGen. Normocin™ - Antimicrobial Reagent. Available at <https://www.invivo-gen.com/normocin> (2016).
20. Jochems, C. E. A., van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R. & Baumans, V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Alternatives to laboratory animals : ATLA* **30**, 219–227; 10.1177/026119290203000208 (2002).
21. van der Valk, J. *et al.* Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **24**, 1053–1063; 10.1016/j.tiv.2010.03.016 (2010).
22. van der Valk, J. *et al.* Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX* **35**, 99–118; 10.14573/altex.1705101 (2018).
23. Tritsch, G. L. & Moore, G. E. Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Experimental Cell Research* **28**, 360–364; 10.1016/0014-4827(62)90290-2 (1962).
24. Guerriero, V. & Florini, J. R. Dexamethasone effects on myoblast proliferation and differentiation. *Endocrinology* **106**, 1198–1202; 10.1210/endo-106-4-1198 (1980).
25. Watanabe, T., Nakano, M., Asakawa, H. & Moritomo, T. Cell culture of rainbow trout liver. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI* **53**, 537–542; 10.2331/suisan.53.537 (1987).
26. Wieser, R. J. *et al.* Growth control in mammalian cells by cell-cell contacts. *Environmental health perspectives* **88**, 251–253; 10.1289/ehp.9088251 (1990).

27. Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H. & Lee, S.-H. Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **26**, 164–180; 10.1089/ten.TEB.2019.0256 (2020).
28. Durbeej, M. Laminins. *Cell Tissue Res* **339**, 259–268; 10.1007/s00441-009-0838-2 (2010).
29. Janisch, E. Über die Temperaturabhängigkeit biologischer Vorgänge und ihre kurvenmäßige Analyse. *Pflügers Arch.* **209**, 414–436; 10.1007/BF01730929 (1925).
30. Wolf, K. & Quimby, M. C. 5 Fish Cell and Tissue Culture. In *Fish physiology*, edited by W. S. Hoar, *et al.* (Elsevier1969), Vol. 3, pp. 253–305.
31. DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement. Available at <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10566016?SID=srch-srp-10566016> (2022).
32. Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, L. G. & Sánchez, M. L. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of cosmetic dermatology* **17**, 20–26; 10.1111/jocd.12450 (2018).
33. Jafari, H. *et al.* Fish Collagen: Extraction, Characterization, and Applications for Biomaterials Engineering. *Polymers* **12**; 10.3390/polym12102230 (2020).
34. Yurchenco, P. D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**; 10.1101/cshperspect.a004911 (2011).
35. Head, D. L. & Yankeelov, J. A. The effect of calcium chloride on the activity and inhibition of bacterial collagenase. *International journal of peptide and protein research* **8**, 155–165; 10.1111/j.1399-3011.1976.tb02491.x (1976).
36. Collagenase NB 8 Broad Range - Nordmark Pharma GmbH. Available at <https://www.nordmark-pharma.de/en/business-customers/biochemicals/products/collagenase-for-research/collagenase-nb-8-broad-range/?msclid=30cd3657cf7c11ec959d4bc74efbc4c7> (2022).
37. Leiros, H.-K. S. *et al.* Trypsin specificity as elucidated by LIE calculations, X-ray structures, and association constant measurements. *Protein science : a publication of the Protein Society* **13**, 1056–1070; 10.1110/ps.03498604 (2004).
38. Stanković, D., Crivelli, A. J. & Snoj, A. Rainbow Trout in Europe: Introduction, Naturalization, and Impacts. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* **23**, 39–71; 10.1080/23308249.2015.1024825 (2015).
39. *The state of world fisheries and aquaculture 2020. Sustainability in action* (Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2020).

40. Bundesamt, S. Erzeugung in Aquakulturbetrieben - Fachserie 3 Reihe 4.6 - 2020 (2020).
41. Lutz, B. J. & Lutz, J. M. Factory Farming and Potential Problems in International Trade. *Glob. Econ. J.* **9**, 1850174; 10.2202/1524-5861.1518 (2009).
42. Cabello, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology* **8**, 1137–1144; 10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x (2006).
43. Shoaibe Hossain Talukder Shefat. *Vaccines for Use in Finfish Aquaculture* (2018).
44. BLV, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen. Infektiöse Pankreasnekrose der Fische. Available at <https://www.blv.admin.ch/blv/de/home/tiere/tierseuchen/uebersicht-seuchen/alle-tierseuchen/Infektioese-pankreasnekrose-der-fische.html> (2022).
45. Our Products. Available at <https://www.pharmaq.com/en/pharmaq/our-products/> (2022).
46. *Update on viral vaccines for fish* (2005).
47. Ständige Impfkommision Veterinärmedizin. Leitlinie zur Impfung von Fischen (2022).
48. Gomez-Casado, E., Estepa, A. & Coll, J. M. A comparative review on European-farmed finfish RNA viruses and their vaccines. *Vaccine* **29**, 2657–2671; 10.1016/j.vaccine.2011.01.097 (2011).
49. Pham, P. H. *et al.* Screening of Fish Cell Lines for Piscine Orthoreovirus-1 (PRV-1) Amplification: Identification of the Non-Supportive PRV-1 Invitrome. *Pathogens (Basel, Switzerland)* **9**; 10.3390/pathogens9100833 (2020).
50. Adamek, M. *et al.* Detection of piscine orthoreoviruses (PRV-1 and PRV-3) in Atlantic salmon and rainbow trout farmed in Germany. *Transboundary and emerging diseases* **66**, 14–21; 10.1111/tbed.13018 (2019).
51. Lee, L. E. J., Dayeh, V. R., Schirmer, K. & Bols, N. C. Fish Cell Lines as Rapid and Inexpensive Screening and Supplemental Tools for Whole Effluent Testing. *Integr Environ Assess Manag* **4**, 372; 10.1897/1551-3793(2008)4[372:FCLARA]2.0.CO;2 (2008).
52. *Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test* (OECD Publishing, Paris, 2019).
53. Bols, N. C. Biotechnology and aquaculture: The role of cell cultures. *Biotechnology Advances* **9**, 31–49; 10.1016/0734-9750(91)90403-I (1991).
54. Evans, D. H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental health perspectives* **71**, 47–58; 10.1289/ehp.877147 (1987).

55. Lee, L. E. J., Dayeh, V. R., Schirmer, K. & Bols, N. C. Applications and potential uses of fish gill cell lines: examples with RTgill-W1. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal* **45**, 127–134; 10.1007/s11626-008-9173-2 (2009).
56. Bury, N. R., Schnell, S. & Hogstrand, C. Gill cell culture systems as models for aquatic environmental monitoring. *Journal of Experimental Biology* **217**, 639–650; 10.1242/jeb.095430 (2014).
57. Fletcher, M., Kelly, S. P., Pärt, P., O'Donnell, M. J. & Wood, C. M. Transport properties of cultured branchial epithelia from freshwater rainbow trout: a novel preparation with mitochondria-rich cells. *Journal of Experimental Biology* **203**, 1523–1537; 10.1242/jeb.203.10.1523 (2000).
58. Schnell, S. *et al.* Procedures for the reconstruction, primary culture and experimental use of rainbow trout gill epithelia. *Nature protocols* **11**, 490–498; 10.1038/nprot.2016.029 (2016).
59. Pancrazio, J. J., Whelan, J. P., Borkholder, D. A., Ma, W. & Stenger, D. A. Development and application of cell-based biosensors. *Annals of Biomedical Engineering* **27**, 697–711; 10.1114/1.225 (1999).
60. Nogueira, L. S., Chen, C. C., Wood, C. M. & Kelly, S. P. Effects of copper on a reconstructed freshwater rainbow trout gill epithelium: Paracellular and intracellular aspects. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* **230**, 108705; 10.1016/j.cbpc.2020.108705 (2020).
61. Leguen, I., Peron, S. & Prunet, P. Effects of iron on rainbow trout gill cells in primary culture. *Cell Biol Toxicol* **27**, 311–319; 10.1007/s10565-011-9189-3 (2011).
62. Walker, P. A., Kille, P., Hurley, A., Bury, N. R. & Hogstrand, C. An in vitro method to assess toxicity of waterborne metals to fish. *Toxicology and applied pharmacology* **230**, 67–77; 10.1016/j.taap.2008.02.012 (2008).
63. Bols, N. C. *et al.* Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* **17**, 601–611; 10.1111/j.1365-2761.1994.tb00258.x (1994).
64. Dowling, K. & Mothersill, C. The further development of rainbow trout primary epithelial cell cultures as a diagnostic tool in ecotoxicology risk assessment. *Aquatic Toxicology* **53**, 279–289; 10.1016/S0166-445X(01)00172-2 (2001).
65. Rakers, S., Klinger, M., Kruse, C. & Gebert, M. Pros and cons of fish skin cells in culture: long-term full skin and short-term scale cell culture from rainbow trout, *Oncorhynchus*

- mykiss. *European Journal of Cell Biology* **90**, 1041–1051; 10.1016/j.ejcb.2011.08.003 (2011).
66. Zammit, P. S., Partridge, T. A. & Yablonka-Reuveni, Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **54**, 1177–1191; 10.1369/jhc.6R6995.2006 (2006).
67. File:Schematic of satellite cell myogenesis and markers typical of each stage.jpg - Wikimedia Commons (2022).
68. Churchman, A. T. & Siow, R. C. M. Isolation, culture and characterisation of vascular smooth muscle cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **467**, 127–138; 10.1007/978-1-59745-241-0\_7 (2009).
69. Dodson, M. V. *et al.* Unidentified cells reside in fish skeletal muscle. *Cytotechnology* **56**, 171–178; 10.1007/s10616-008-9140-5 (2008).
70. Kaplan. *Encyclopedia of Food and Agricultural Ethics* (Springer Netherlands, Dordrecht, 2019).
71. PromoCell. Skeletal Muscle Cell Growth Medium. Available at <https://promocell.com/product/skeletal-muscle-cell-growth-medium/> (2021).
72. Sander, V., Suñe, G., Jopling, C., Morera, C. & Izpisua Belmonte, J. C. Isolation and in vitro culture of primary cardiomyocytes from adult zebrafish hearts. *Nature protocols* **8**, 800–809; 10.1038/nprot.2013.041 (2013).
73. Kruse, C. *et al.* Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas. *Appl Phys A* **79**, 1617–1624; 10.1007/s00339-004-2816-6 (2004).
74. Gabillard, J. C., Sabin, N. & Paboef, G. In vitro characterization of proliferation and differentiation of trout satellite cells. *Cell and tissue research* **342**, 471–477; 10.1007/s00441-010-1071-8 (2010).
75. Ramos-Vara, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology* **42**, 405–426; 10.1354/vp.42-4-405 (2005).
76. Hitchcock-DeGregori, S. E. Tropomyosin: function follows structure. *Advances in experimental medicine and biology* **644**, 60–72; 10.1007/978-0-387-85766-4\_5 (2008).
77. Perry, S. V. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. *Journal of muscle research and cell motility* **22**, 5–49; 10.1023/a:1010303732441 (2001).
78. Rakers, S. *Anwendungspotentiale multipotenter Zellen aus der Regenbogenforellenhaut: Zellkulturen, Zytotoxizität und dreidimensionale Zellkultur* (2012).

79. Mothersill, C., Lyng, F., Lyons, M. & Cottell, D. Growth and differentiation of epidermal cells from the rainbow trout established as explants and maintained in various media. *Journal of Fish Biology* **46**, 1011–1025; 10.1111/j.1095-8649.1995.tb01406.x (1995).
80. Butler, R. & Nowak, B. F. A dual enzyme method for the establishment of long- and medium-term primary cultures of epithelial and fibroblastic cells from Atlantic salmon gills. *Journal of Fish Biology* **65**, 1108–1125; 10.1111/j.0022-1112.2004.00521.x (2004).
81. Kim, J., Rubin, N., Huang, Y., Tuan, T.-L. & Lien, C.-L. In vitro culture of epicardial cells from adult zebrafish heart on a fibrin matrix. *Nature protocols* **7**, 247–255; 10.1038/nprot.2011.440 (2012).
82. Geer, D. J., Swartz, D. D. & Andreadis, S. T. Fibrin promotes migration in a three-dimensional in vitro model of wound regeneration. *Tissue engineering* **8**, 787–798; 10.1089/10763270260424141 (2002).
83. Mitcheson, J. Cultured adult cardiac myocytes Future applications, culture methods, morphological and electrophysiological properties. *Cardiovascular Research* **39**, 280–300; 10.1016/S0008-6363(98)00128-X (1998).
84. Pund, R. P. Anwendung hämatologischer Untersuchungsmethoden für Fischblut und Beeinflussung des Blutbildes von Bachforellen (*Salmo Trutta F. Fario*) durch Haltungs- und Umwelteinflüsse sowie endogene Faktoren, 1998.
85. Sandnes, K., Lie, O. & Waagbo, R. Normal ranges of some blood chemistry parameters in adult farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Journal of Fish Biology* **32**, 129–136; 10.1111/j.1095-8649.1988.tb05341.x (1988).
86. Polakof, S. & Soengas, J. L. Evidence of sugar sensitive genes in the gut of a carnivorous fish species. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **166**, 58–64; 10.1016/j.cbpb.2013.07.003 (2013).
87. Ghioni, C., Tocher, D. R. & Sargent, J. R. The effect of culture on morphology, lipid and fatty acid composition, and polyunsaturated fatty acid metabolism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin cells. *Fish Physiology and Biochemistry* **16**, 499–513; 10.1023/A:1007709508786 (1997).
88. Zhao, L. *et al.* Evidence of virus-responsive pathways in response to poly I: C challenge in a muscle cell line derived from large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish & shellfish immunology* **100**, 179–185; 10.1016/j.fsi.2020.02.061 (2020).
89. Alexander, M. S. *et al.* Isolation and transcriptome analysis of adult zebrafish cells enriched for skeletal muscle progenitors. *Muscle & nerve* **43**, 741–750; 10.1002/mus.21972 (2011).

90. Kreins, L. Bestimmung optimaler Kulturbedingungen für die Primärkultur hochproliferierender Muskelzellen aus dem atlantischen Lachs (*Salmo salar*) (2020).
91. Abmayr, S. M. & Pavlath, G. K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development (Cambridge, England)* **139**, 641–656; 10.1242/dev.068353 (2012).
92. Oestbye, T.-K. K. & Ytteborg, E. Preparation and Culturing of Atlantic Salmon Muscle Cells for In Vitro Studies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1889**, 319–330; 10.1007/978-1-4939-8897-6\_19 (2019).
93. Luther, P. K. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *Journal of muscle research and cell motility* **30**, 171–185; 10.1007/s10974-009-9189-6 (2009).

## 7. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere Hiermit, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Optimierung der Konditionen für Primärzellkulturen aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)“ ohne fremde Hilfeselbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Datum: 01.06.2022

Unterschrift: \_\_\_\_\_

René Büsch

## 8. Anhang

### 8.1 Rohdaten der Zellen aus Hautexplantaten unter 3.1.1

Tabelle 13: Rohdaten zu Abbildung 4. Wachstumsfortschritt der Zellen aus Hautexplantaten im 12-well-Format in DMEM mit 5 bis 20 %FKS. Die Zellen erreichten in keinem der beiden Medien einen subkultivierbaren Konfluenzgrad und starben nach 4 Wochen ab.

Woche	DMEM 20%	DMEM 15%	DMEM 10%	DMEM 5%
1	1	0	0	0
2	1	0	0	0
3	1	1	1	1
4	0	0	0	0

Tabelle 14: Rohdaten zu Abbildung 5. Wachstumsfortschritt der aus den Explantaten migrierten Zellen im 12-well-Format in ADF-12 mit verschiedenen FKS-Konzentrationen. Die Zellen erreichten in keinem der beiden Medien einen subkultivierbaren Konfluenzgrad und starben nach 6 Wochen ab.

Woche	ADF-12 20% FKS	ADF-12 15% FKS	ADF-12 10% FKS	ADF-12 5% FKS
1	0	0	0	0
2	1	0	1	1
3	1	1	1	1
4	0	0	1	1
6	0	0	0	0

Tabelle 15: Verlauf des Konfluenzgrades von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS. Nach Woche 4 wurde eine Semikonfluenzpassage durchgeführt. Die Zellen starben 2 Wochen nach der Subkultivierung ab.

Woche	Passage	ADF-12 20%	ADF-12 15%	ADF-12 10%	ADF-12 5%
1	0	1	1	1	1
3	0	1	1	1	1
4	0	2	2	2	2
5	1	1	1	1	2
6	1	0	0	0	0

### 8.2 Zellen aus Hautexplantaten des wiederholten Versuchs unter 3.1.1

Die Abbildung 26, Abbildung 27 und Abbildung 28 zeigen die fibroblastisch aussehenden Zellen aus Hautexplantaten des wiederholten Versuchs aus 3.1.1 drei Wochen nach der Aussaat.

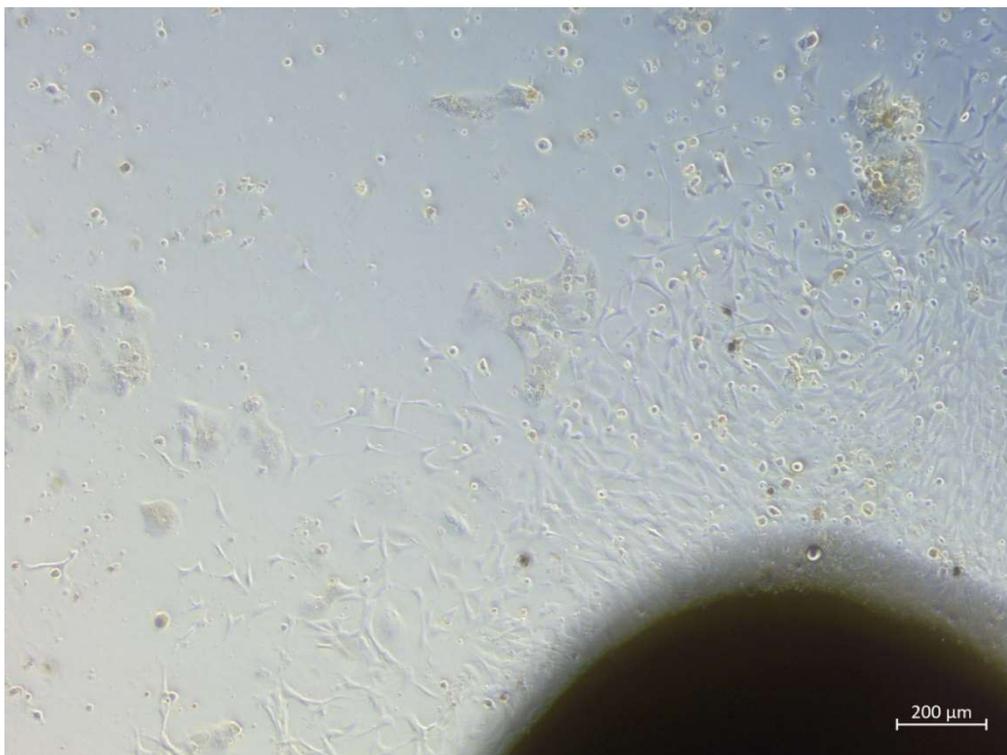


Abbildung 26: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 15 % in 5-facher Vergrößerung. Das Well hatten zu diesem Zeitpunkt einen Konfluenzgrad von etwa 25 % erreicht.

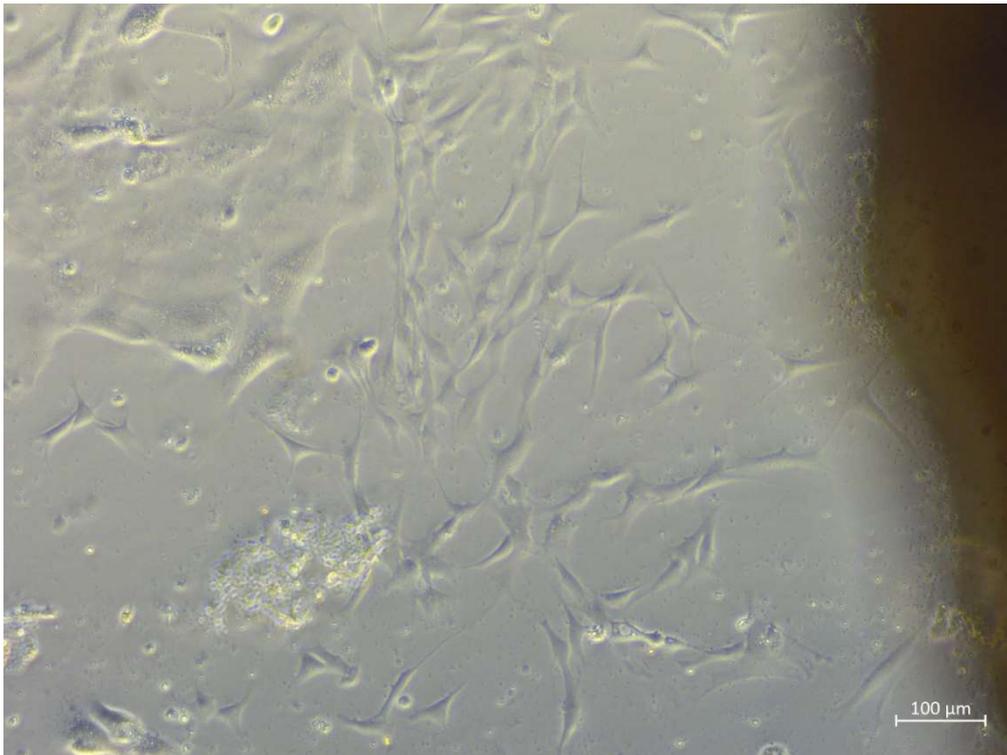


Abbildung 27: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 10 % in 10-facher Vergrößerung. Das *Well* hatten zu diesem Zeitpunkt einen Konfluenzgrad von etwa 25 % erreicht.

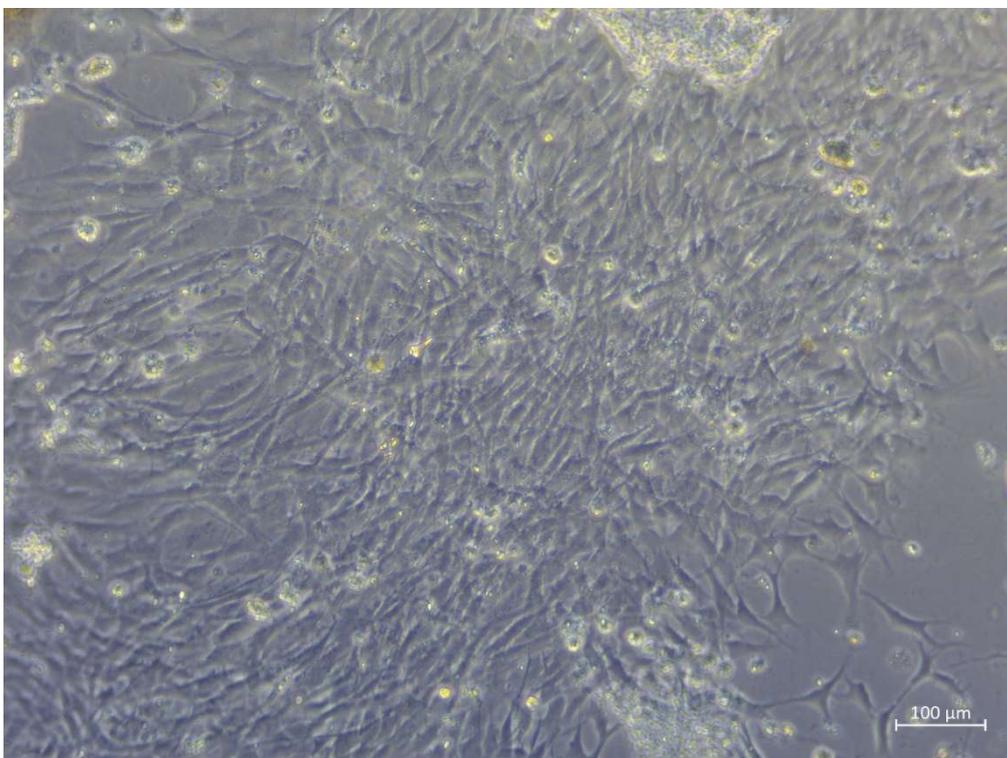


Abbildung 28: Fibroblastische Zellen aus Hautexplantaten drei Woche nach der Aussaat in ADF-12 5 % in 10-facher Vergrößerung. Das *Well* hatten zu diesem Zeitpunkt einen Konfluenzgrad von etwa 25 % erreicht.

### 8.3 Rohdaten der mittels Collagenase isolierten Hautzellen unter 3.2.1

Tabelle 16: Konfluenzgrad der isolierten Hautzellen in ADF-12 20 % FKS mit vier technischen Replikaten. Die Zellen erreichten nach 4 Wochen einen subkultivierbaren Zustand.

Woche	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
1	1	1	1	0
3	2	2	1	1
4	3	3	2	2

Tabelle 17: Verlauf des Konfluenzgrades der isolierten Hautzellen in DMEM 15 % FKS mit vier technischen Replikaten.

Woche	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4
1	1	1	1	0
3	2	2	1	1
4	2	1	2	0
5	2	1	2	0
6	2	1	2	0

### 8.4 Rohdaten der mittels Collagenase isolierten Herzzellen unter 3.2.2

Tabelle 18: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in DMEM mit 5 bis 20 % FKS. Die Zellen in DMEM 20 und 15 % FKS erreichten nach 5 Wochen einen Subkultivierbaren Zustand.

Woche	DMEM 20%	DMEM 15%	DMEM 10%	DMEM 5%
1	0	0	0	0
2	1	1	1	0
3	1	1	1	1
4	1	1	1	0
5	2	2	1	0

Tabelle 19: Wachstum von Zellen der Passage 0 aus Herzgewebe in ADF-12 mit 5 bis 20 % FKS. Die Zellen in ADF-12 20 % FKS erreichten nach 5 Wochen einen subkultivierbaren Zustand.

Woche	ADF-12 20%	ADF-12 15%	ADF-12 10%	ADF-12 5%
1	0	0	0	0
2	0	0	1	0
3	1	1	1	0
4	1	0	0	0
5	2	0	0	0

Tabelle 20: Wachstums von Zellen der Passage 1 aus Herzgewebe in ADF-12 20 % FKS und DMEM 15 und 20 % FKS.

Woche	ADF-12 20 %	DMEM 20 %	DMEM 15 %
1	2	2	2
2	1	2	1
3	0	2	1

### 8.5 Wachstumsverläufe der Zellen dem Versuch unter 3.3.1

Tabelle 21: Verläufe des Wachstums von Zellen aus Hautexplantaten in ADF-12 20 % FKS mit den Wachstums hEGF und hFGF sowie mit zusätzlichen Regenbogenforellenserum. Es wurden je Kondition drei technische Replikate mitgeführt.

		Tag 7	Tag 11	Tag 19	Tag 20
ADF-12 20% FKS	<i>Well 1</i>	1	1	1	0
	<i>Well 2</i>	1	1	2	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	1
ADF-12 20% FKS + hEGF	<i>Well 1</i>	1	1	1	1
	<i>Well 2</i>	1	1	1	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	1

		<b>Tag 7</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 19</b>	<b>Tag 20</b>
ADF-12 20% FKS + hFGF	<i>Well 1</i>	1	1	1	1
	<i>Well 2</i>	1	1	1	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	1
ADF-12 20% FKS+FS	<i>Well 1</i>	2	2	2	1
	<i>Well 2</i>	1	1	2	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	1

Tabelle 22: Verlaufe des Wachstums von Zellen aus mit Collagenase und Trypsin behandelte Haut in ADF-12 20 % FKS mit den Wachstums hEGF und hFGF sowie mit zusätzlichen Regenbogenforellenserum. Es wurden je Kondition drei technische Replikate mitgeführt.

		<b>Tag 7</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 19</b>	<b>Tag 20</b>
ADF-12 20% FKS	<i>Well 1</i>	2	2	2	0
	<i>Well 2</i>	2	1	2	0
	<i>Well 3</i>	1	1	2	1
ADF-12 20% FKS + hEGF	<i>Well 1</i>	2	2	1	1
	<i>Well 2</i>	2	2	2	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	2
ADF-12 20% FKS + hFGF	<i>Well 1</i>	2	2	2	1
	<i>Well 2</i>	2	1	2	1
	<i>Well 3</i>	1	2	1	1
ADF-12 20% FKS + FS	<i>Well 1</i>	2	2	2	1
	<i>Well 2</i>	1	1	1	1
	<i>Well 3</i>	2	1	2	1

Tabelle 23: Verläufe des Wachstums von Zellen aus zweifach mit Collagenase behandelte Haut in ADF-12 20 % FKS mit den Wachstums hEGF und hFGF sowie mit zusätzlichen Regenbogenforellenserum. Es wurden je Kondition drei technische Replikate mitgeführt.

		<b>Tag 7</b>	<b>Tag 11</b>	<b>Tag 19</b>	<b>Tag 20</b>
ADF-12 20% FKS	<i>Well 1</i>	1	1	1	1
	<i>Well 2</i>	1	1	1	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	1
ADF-12 20% FKS + hEGF	<i>Well 1</i>	1	2	1	1
	<i>Well 2</i>	0	1	1	1
	<i>Well 3</i>	1	2	1	2
ADF-12 20% FKS + hFGF	<i>Well 1</i>	1	1	2	1
	<i>Well 2</i>	0	1	1	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	1
ADF-12 20% FKS + FS	<i>Well 1</i>	1	2	2	1
	<i>Well 2</i>	0	0	1	1
	<i>Well 3</i>	1	1	1	1

### 8.6 Wachstumsverläufe der Zellen dem Versuch unter 3.3.2

Tabelle 24: Bewertung des Wachstums der Zellen aus Muskelgewebe 13 Tage nach der Aussaat in den Medien DF-12 20 %, ADF-12 20 % FKS und ADF-12 *Growth*.

<b>Medium</b>	<b><i>Well 1</i></b>	<b><i>Well 2</i></b>	<b><i>Well 3</i></b>	<b><i>Well 4</i></b>	<b><i>Well 5</i></b>
DF-12 20%	2	1	1	1	-
ADF-12 20%	0	0	0	0	-
ADF-12 <i>Growth</i>	2	1	2	0	3

Tabelle 25: Verlauf des Konfluenzgrades der subkultivierten Zellen aus Muskelgewebe in DF-12 20 % und ADF-12 *Growth*.

Tage nach Subkultivierung	DF-12 20%	ADF-12 <i>Growth</i>
1	2	3
7	4	4

### 8.7 Negativkontrolle der Färbung unter 3.4.2

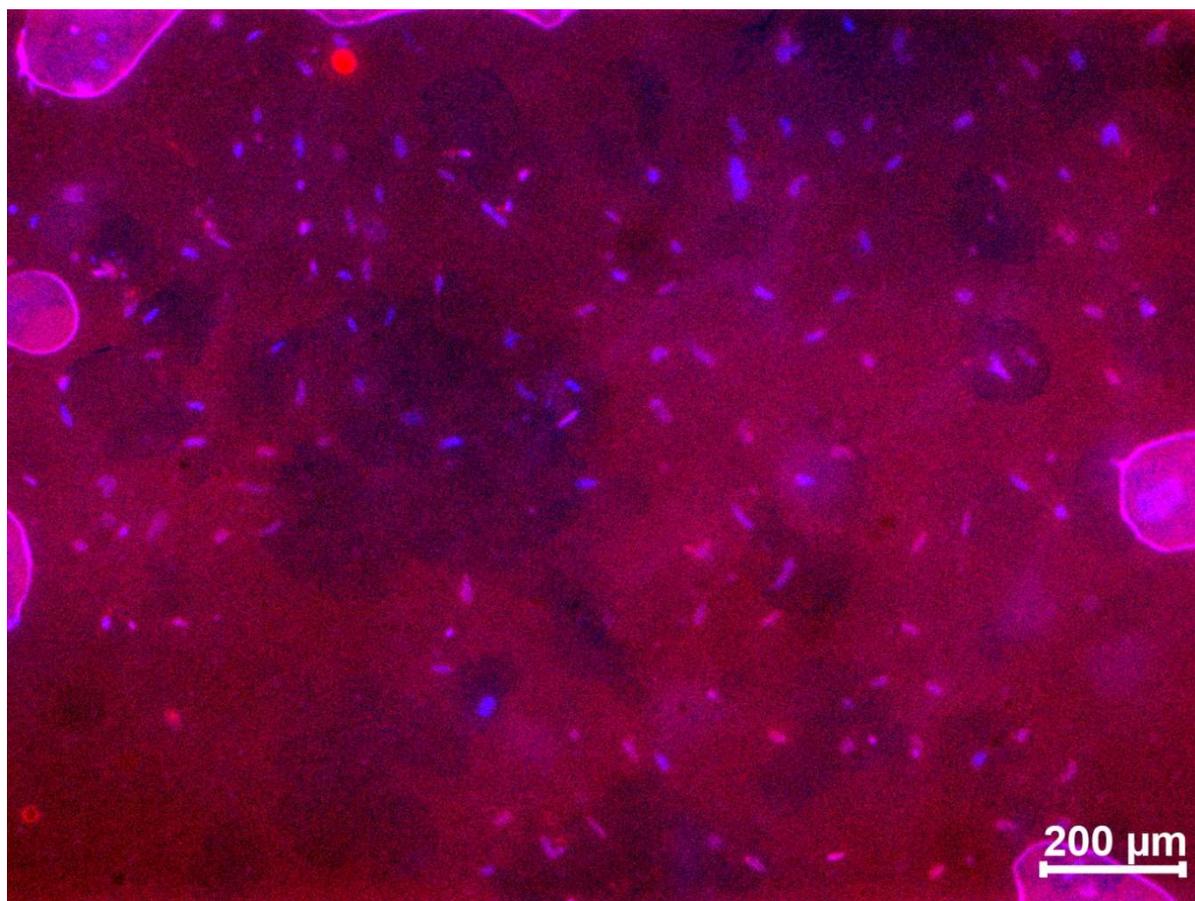


Abbildung 29: Negativkontrolle der Tropomyosinfärbung.

### 8.8 Zusammensetzung der verwendeten Basalmedien

Tabelle 26: Zusammensetzung der Basalmedien ADF-12, DMEM high Glucose, Leibovitz L-15 und DF-12. Konzentration sind in mg/l angegeben. L-Glutamin wurde in ADF-12 nachträglich hinzugegeben.

Komponente	Konzentrationen mg/ml			
	ADF-12	DMEM, high Glucose	Leibovitz L-15	DF-12
<b>Aminosäuren</b>				
Glycine	18,75	30	200	18,75
L-Alanine	4,45	0	225	4,45
L-Arginine	0	0	500	0
L-Arginine hydrochloride	147,5	84	0	147,5
L-Asparagine	0	0	250	0
L-Asparagine-H <sub>2</sub> O	7,5	0	0	7,5
L-Aspartic acid	6,65	0	0	6,65
L-Cysteine	0	0	120	0
L-Cysteine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	17,56	0	0	17,56
L-Cystine 2HCl	31,29	63	0	31,29
L-Glutamine	584,6*	580	0	365
L-Glutamic Acid	7,35	0	0	7,35
L-Alanyl-L-Glutamine	0	0	446	0
L-Histidine	0	0	250	0
L-Histidine hydrochloride-H <sub>2</sub> O	31,48	42	0	31,48
L-Isoleucine	54,47	105	250	54,47
L-Leucine	59,05	105	125	59,05
L-Lysine	0	0	75	0
L-Lysine hydrochloride	91,25	146	0	91,25

L-Methionine	17,24	30	75	17,24
L-Phenylalanine	35,48	66	125	35,48
L-Proline	17,25	0	0	17,25
L-Serine	26,25	42	200	26,25
L-Threonine	53,45	95	300	53,45
L-Tryptophan	9,02	16	20	9,02
L-Tyrosine	0	0	300	0
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	55,79	72	0	55,79
L-Valine	52,85	94	100	52,85
<b>Summe Aminosäuren</b>	<b>1329</b>	<b>1570</b>	<b>3561</b>	<b>1110</b>
<b>Vitamine</b>				
Ascorbic Acid phosphate	2,5	0	0	0
Biotin	0,0035	0	0	0,0035
Choline chloride	8,98	4	1	8,98
D-Calcium pantothenate	2,24	4	1	2,24
Folic Acid	2,65	4	1	2,65
Niacinamide	2,02	4	1	2,02
Pyridoxine hydrochloride	2	4	1	2,013
Riboflavin	0,219	0	0	0,219
Riboflavin 5'-phosphate Na	0	0	0,1	0
Thiamine hydrochloride	2,17	4	0	2,17
Thiamine monophosphate	0	0	1	0
Vitamin B12	0,68	0	0	0,68
i-Inositol	12,6	7,2	2	12,6
<b>Summe Vitamine</b>	<b>36</b>	<b>31</b>	<b>7</b>	<b>34</b>

<b>Anorganische Salze</b>				
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ) (anhyd.)	116,6	0	140	116,6
Calcium Chloride (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	0	264	0	0
Cupric sulfate (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0,0013	0	0	0,0013
Ferric Nitrate (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	0,05	0,1	0	0,05
Ferric sulfate (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,417	0	0	0,417
Magnesium Chloride (anhydrous)	28,64	0	93,7	28,64
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	48,84	0	97,67	48,84
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0	200	0	0
Potassium Chloride (KCl)	311,8	400	400	311,8
Potassium Phosphate monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0	0	60	0
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	2438	3700	0	2438
Sodium Chloride (NaCl)	6995,5	6400	8000	6995,5
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) anhydrous	71,02	0	190	71,02
Sodium Phosphate monobasic (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	62,5	141	0	62,5
Zinc sulfate (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,864	0	0	0,432
<b>Summe Anorganische Salze</b>	<b>10074</b>	<b>11105</b>	<b>8981</b>	<b>10074</b>
<b>Proteine</b>				
AlbuMAX® II	400	0	0	0
Human Transferrin (Holo)	7,5	0	0	0
Insulin Recombinant Full Chain	10	0	0	0
<b>Summe Proteine</b>	<b>418</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

<b>Reduktionsmittel</b>				
Glutathione, monosodium	1	0	0	0
<b>Spurenelemente</b>				
Ammonium Metavanadate	0,0003	0	0	0
Manganous Chloride	0,00005	0	0	0
Sodium Selenite	0,005	0	0	0
<b>Weitere Komponenten</b>				
D-Glucose (Dextrose)	3151	4500	0	3151
D+ Galactose	0	0	900	0
Ethanolamine	1,9	0	0	0
Hypoxanthine Na	2,39	0	0	2,39
Linoleic Acid	0,042	0	0	0,042
Lipoic Acid	0,105	0	0	0,105
Phenol Red	8,1	15	10	8,1
Putrescine 2HCl	0,081	0	0	0,081
Sodium Pyruvate	110	0	550	55
Thymidine	0,365	0	0	0,365