

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

**Plättchenlysate aus differenzierten MEG-01 Zellen als Serumersatz
in der Zellkultur**

Bachelorarbeit
im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von

Mareike Leoni Pfützner



Hamburg den 03.02.2025

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Julien Béthune	(HAW Hamburg)
Zweitgutachter: Herr Dr. Oliver Wehmeier	(acCELLerate GmbH)

Die Abschlussarbeit wurde im Labor der Firma acCELLerate GmbH betreut und erstellt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	2
2.1 Humanes Plättchenlysate	3
2.2 Megakaryopoese	5
2.3 Megakaryozytische Zelllinien als Quelle für Plättchenlysate	7
2.4 Zielsetzung	9
3. Ergebnisse	10
3.1 Differenzierung von MEG-01-Zellen zu Megakaryozyten durch PMA	10
3.1.1 Morphologie von MEG-01-Zellen während der Differenzierung	10
3.1.2 Zellwachstum und Viabilität von MEG-01-Zellen während der Differenzierung ..	11
3.1.3 Expression von CD41a in MEG-01-Zellen und PLP	12
3.1.4 Anreicherung von PDGF während der MEG-01 Differenzierung.....	15
3.1.5 MEG-01 Zelllysate und Plättchenlysate.....	16
3.1.6 <i>Scale-Up</i> der MEG-01 Differenzierung in einem CellSTACK	17
3.2 Verwendung vom MEG-01 abgeleitetem Plättchenlysate als Serumersatz.....	18
3.2.1 A549-Kultivierung mit Reduzierung von FBS.....	18
3.2.2 A549-Kultivierung mit humanem Plättchenlysate als Serumersatz	20
3.2.3 MEG-01 abgeleitetes Plättchenlysate als Serumersatz	21
4. Diskussion.....	25
5. Materialien und Methoden	30
5.2 Materialien	30
5.2.1 Reagenzien.....	30
5.2.2 Kits.....	31
5.2.3 Antikörper.....	31
5.2.4 Zelllinien.....	31
5.2.5 Geräte.....	32

5.2.6	Verbrauchsmaterialien.....	33
5.2.7	Software.....	34
5.3	Methoden.....	35
5.3.1	Auftauen und Kultivieren von humanen Zellen	35
5.3.2	Zellzählung mit dem CASY®-Analyzer	36
5.3.3	Zellzählung mit der Neubauerkammer.....	37
5.3.4	Optimierung der Differenzierung von MEG-01-Zellen mit PMA.....	38
5.3.5	Antikörperfärbung.....	39
5.3.6	Durchflusszytometrie.....	39
5.3.7	PDGF-Anreicherung während der MEG-01 Differenzierung	40
5.3.8	Aufschluss mit der PARR-Bomb	41
5.3.10	BCA-Assay.....	42
5.3.11	ELISA PDGF Assay.....	43
5.3.12	Plättchenlysat als Serumersatz	44
6.	Danksagung	45
7.	Literaturverzeichnis	46
8.	Eigenständigkeitserklärung	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Inhalte der α -Granula von Plättchen.....	3
Abbildung 2 Herstellungsprozess von humanem Plättchenlysate	4
Abbildung 3 Thrombopoetin Rezeptor Aktivierung	5
Abbildung 4 Phasen der Megakaryopoese und anschließende Plättchen-Bildung	6
Abbildung 5 MEG-01-Zellen	7
Abbildung 6 MEG-01-Zellen unter dem Einfluss von PMA	10
Abbildung 7 Wachstumsrate und Viabilität der MEG-01-Zellen unter PMA-Induktion.....	11
Abbildung 8 Durchflusszytometrie MEG-01-Zellen und PLP	12
Abbildung 9 CD41a-Expression von MEG-01-Zellen und PLP nach den Ruhephasen	14
Abbildung 10 PDGF in Kulturüberständen differenzierter MEG-01	15
Abbildung 11 PDGF von Überständen und Lysaten der MEG-01 Differenzierung	16
Abbildung 12 PDGF in MEG-01 Lysaten.....	17
Abbildung 13 A549-Kultur bei verschiedenen FBS-Konzentrationen.....	18
Abbildung 14 Wachstumsrate und Viabilität von A549-Zellen in Abhängigkeit von FBS	19
Abbildung 15 A549-Zellen mit humanen Plättchenlysate als Serumersatz	20
Abbildung 16 Wachstumsrate und Viabilität von A549-Zellen in Abhängigkeit von hPL.....	21
Abbildung 17 A549-Zellen mit Plättchen ähnlichem Partikel Lysate als Serumersatz.....	22
Abbildung 18 Wachstumsraten und Viabilität von A549-Zellen mit PLP-Lysate.....	23
Abbildung 19 A549-Zellen mit MEG-01 Zelllysate als Serumersatz	24
Abbildung 20 Vorgangsweise der Zellzählung mit der Neubauerkammer	37
Abbildung 21 Differenzierungsprozess von MEG-01-Zellen mit 5 nM PMA.....	40
Abbildung 22 Plattenlayout Testung der Lysate	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 verwendete Reagenzien	30
Tabelle 2 verwendete Kits	31
Tabelle 3 verwendete Antikörper	31
Tabelle 4 verwendete Zelllinien	31
Tabelle 5 verwendete Medium-Zusammensetzung	32
Tabelle 6 verwendete Geräte	32
Tabelle 7 verwendete Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 8 verwendete Software	34
Tabelle 9 Kulturgefäße	36
Tabelle 10 Einsaaten verschiedener Zelllinien	36
Tabelle 11 Standardverdünnungen	42
Tabelle 12 Standardreihe für den PDGF ELISA	43

Abkürzungsverzeichnis

BCA-Assay	Bicinchoninic Acid Assay
BSA	Bovine Serumalbumin
DPBS	Dulbecco's Phosphatpuffer
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FBS	Fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulichtintensität
hPL	Humanes Plättchenlysat
IgG1	Immunoglobulin I
IGF-1	Insulin-Wachstumsfaktor
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
MFI	Mittlere Fluoreszenz Intensität
PARR-Bomb	Pressure-Activated Release Reagent Bomb
PDGF	Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor
PLP	Plättchen ähnliche Partikel
PLPL	Plättchen ähnliches Partikel Lysat
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSC	Seitwärtsstreulichtintensität
TGF- β	Transformations-Wachstumsfaktor- β
UV/VIS Spektralphotometer	Ultraviolett-Sichtbar Spektralphotometer
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZL	differenziertes MEG-01 Zelllysat

1. Zusammenfassung

Die *in vitro* Zellkultur ist ein zentrales Werkzeug der Zellkultur. Das dabei häufig verwendete fötale Kälberserum (FBS) wirft ethische und praktische Herausforderungen auf, darunter die Gewinnung, die begrenzte Verfügbarkeit und die hohe Variabilität in der Zusammensetzung. Humanes Plättchenlysat (hPL) gilt als potenzieller Ersatz, birgt jedoch ebenfalls logistische Schwierigkeiten, da es auf Blutspenden basiert. Ein alternativer Ansatz besteht in der Nutzung der MEG-01-Zelllinie, die durch Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu megakaryozytären Zellen differenziert werden kann, welche wiederum Plättchen ähnliche Partikel (PLP) produzieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Differenzierung der MEG-01-Zellen zu optimieren, PLP zu generieren, diese zu lysieren und das resultierende Plättchen ähnliche Partikellysat (PLPL) als Serumalternative in der Zellkultur zu testen. Die Differenzierung von MEG-01-Zellen wurde unter Verwendung verschiedener PMA-Konzentrationen (5 nM und 10 nM) untersucht. Morphologische Analysen zeigten, dass 5 nM PMA zu einer höheren Anzahl vergrößerter Zellen führte, was auf eine effektive Differenzierung hinweist. Höhere Konzentrationen resultierten hingegen in einer erhöhten Zelltoxizität. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten die Expression des Megakaryozytenmarkers CD41a, wobei die stärkste und konsistenteste Expression bei 5 nM PMA beobachtet wurde. Zusätzlich wurde die Freisetzung des Plättchen abgeleiteten Wachstumsfaktors (PDGF) während der Differenzierung analysiert. PDGF war primär im Überstand der Zellkultur nachweisbar, während geringere Mengen im Lysat detektiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass PDGF vorwiegend in löslicher Form vorliegt und während der Differenzierung freigesetzt wird. Ein *Scale-up* der Zellkultur in einem CellSTACK-System erhöhte die PDGF-Konzentration, was eine verbesserte Differenzierung unter optimierten Kultivierungsbedingungen zeigte. Die Funktionalität von PLPL wurde durch Kultivierung der epithelialen A549-Zelllinie evaluiert. Während A549-Zellen ohne FBS nicht lebensfähig waren, zeigte hPL vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich Zellwachstum und Viabilität zur Standardkultivierung mit FBS. PLPL unterstützte die Adhäsion der Zellen und stabilisierte die Morphologie, führte jedoch nicht zu einer Wachstumsförderung. Obwohl PLPL in seiner Funktionalität hinter hPL zurückbleibt, zeigt es unter geeigneten Bedingungen vielversprechende Eigenschaften, insbesondere als ergänzender Faktor in der Zellkultur. Diese Ergebnisse liefern eine Grundlage für die Weiterentwicklung alternativer Serumersatzstoffe, die sowohl ethisch vertretbar als auch ökonomisch skalierbar sind. Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit das Potenzial der MEG-01-Zelllinie als nachhaltige und standardisierbare Quelle für Plättchen ähnliche Partikel und Wachstumsfaktoren.

2. Einleitung

Die *in vitro* Kultivierung ist eine Methode in der Zellkultur, um Zellen kontrolliert außerhalb ihres natürlichen Umfelds zu kultivieren und zu untersuchen. Damit die Zellen *in vitro* wachsen, müssen die physiologischen Bedingungen des Körpers nachgeahmt werden. Dafür werden Kulturmedien verwendet, welche eine Vielzahl von Komponenten enthalten, die den Stoffwechsel und die Proliferation der Zellen unterstützen. Dazu gehören basale Nährstoffe, wie Aminosäuren, Glukose, Vitamine und anorganische Salze, die als Energiequelle für die Zellen dienen. Puffersysteme wie Natriumcarbonat stabilisieren den pH-Wert und gewährleisten optimale Bedingungen für zelluläre Prozesse [1]. Für die Wachstumsförderung wird den meisten Medien FBS zugesetzt, um das Wachstum der Zellen zu fördern. FBS gilt seit mehr als 50 Jahren als die universelle Quelle für Wachstumsfaktoren in der Zellkultur [2]. Zu den Hauptbestandteilen von FBS gehören unter anderem Insulin, Transferrin und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF). FGF fördert vor allem die Zellproliferation und die Differenzierung [3]. Albumin regelt als Transportmolekül die Osmolarität der Zellkultur [4]. Die Verwendung von FBS ist jedoch hinsichtlich der Gewinnung, Verfügbarkeit und ethischen Vertretbarkeit problematisch. Ein Problem beim Einsatz von FBS ist die große quantitative und qualitative Variabilität der Bestandteile, wodurch die Reproduzierbarkeit und Standardisierung von Experimenten erschwert wird. Die Herstellung von FBS stellt ein ethisches Problem dar [5]. Diese erfolgt durch die Schlachtung von trächtigen Kühen und die Entnahme von Fötusblut. Dieses Blut wird durch eine Herzpunktion ohne jegliche Anästhesie entnommen, wobei die Föten Schmerzen ausgesetzt sind. Laut Schätzungen sterben jährlich etwa zwei Millionen Kälber, um den globalen Bedarf an FBS zu decken [5]. Das Fötusblut wird zu Serum weiterverarbeitet, welches dann im Medium als Zusatz in der Zellkultur verwendet wird [5]. Die genannten Probleme zeigen, dass es um des Tierleides notwendig ist eine Alternative zu FBS zu entwickeln. Die serumfreie Kultivierung von Zellen stellt eine große Herausforderung dar, insbesondere im Hinblick auf die spezifischen Anforderungen verschiedener Zelllinien. Die Umstellung auf serumfreie Bedingungen kann tiefgreifende Auswirkungen auf die Morphologie, das Wachstum und die Viabilität der Zellen haben. Ein zentrales Problem besteht in den Zelllinien spezifischen Nährstoffanforderungen, welche durch individuelle Anpassungen mit erhöhtem experimentellem Aufwand und höheren Kosten verbunden sind. Um diese Hürden zu überwinden wurden synthetische Zusätze entwickelt, welche essenzielle biochemische Komponenten, wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Lipide und Proteine enthalten [1]. Ein bekanntes Beispiel dafür ist der Serumersatz Panexin, der als Alternative zu FBS verwendet wird. Panexin weist trotz einiger Vorteile, wie einer definierten Zusammensetzung und weniger ethischer Bedenken Nachteile gegenüber FBS auf. So ist es wesentlich teurer als FBS und einige Zelllinien reagieren variabel auf diesen Zusatz [6].

Die Wachstumsfaktoren werden durch die Lyse der Blutplättchen freigesetzt. Die Lyse kann durch verschiedene chemische oder physikalische Methoden erfolgen, die die Zellmembran zerstören. hPL ist eine zunehmend genutzte Alternative zu FBS in der *in vitro* Zellkultur. Für die Präparation von hPL wird Blut von mehreren Spendern entnommen und dann unter verschiedenen Methoden weiterverarbeitet. Darunter gibt es das *Buffy-Coat*-Verfahren und das Plättchenreiche-Plasma-Verfahren [9]. In beiden Verfahren werden Blutplättchenkonzentrate durch verschiedene Zentrifugationsschritte gewonnen, welche durch weitere Lyseprozesse aufgeschlossen werden und zu hPL weiterverarbeitet werden (Abbildung 2).

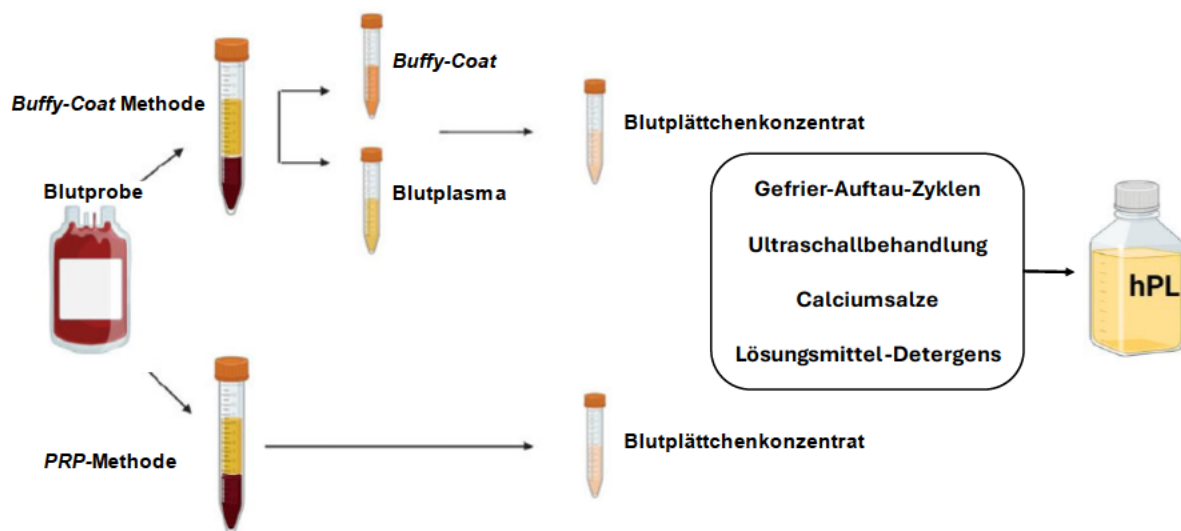


Abbildung 2 | Herstellungsprozess von humanem Plättchenlysats

Das Lysat kann durch zwei verschiedene Methoden erreicht werden. Bei der PRP-Methode wird das gesamte Blut zentrifugiert, um das Blutplättchenkonzentrat von roten Blutkörperchen zu trennen. Bei der *Buffy-Coat* Methode entstehen drei Fraktionen nach der Zentrifugation. Das Blutplasma (oberhalb), rote Blutkörperchen (unten) und der *Buffy-Coat* in der Mitte. Die ersten beiden Fraktionen werden entnommen und nochmals zentrifugiert, wobei das Blutplättchenkonzentrat gesammelt wird. In beiden Methoden werden die Blutplättchenkonzentrate durch verschiedene Lysemethoden aufgeschlossen und es entsteht humanes Plättchenlysats (hPL) [8] [10] [11].

Das entstehende hPL ist reich an Wachstumsfaktoren, die die Proliferation von Zellen fördern können. Ein Vorteil von hPL ist, dass dieses nachhaltig und ohne tierische Bestandteile ist und somit keine ethischen Bedenken auftreten bei dem Herstellungsprozess. Da Blutplättchenkonzentrate durch viele Spender gepoolt werden, kommt es zur geringen Chargenvariabilität, was die Reproduzierbarkeit in Experimenten erhöht [10][11]. Ein Nachteil an hPL sind die im Vergleich zu FBS hohen Kosten, da es schwierig ist ausreichend Spender von Blut zu finden. Zudem besteht das Risiko der Übertragung humanpathogener Viren wie HIV oder Hepatitis [14].

2.2 Megakaryopoese

Die Megakaryopoese ist der Prozess der Differenzierung von Megakaryozyten aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC) im Knochenmark, die zur Bildung von Blutplättchen führt. Dieser komplexe Prozess lässt sich in mehrere Phasen unterteilen, die durch spezifische Zytokine und Transkriptionsfaktoren reguliert werden [15]. Zu Beginn der Megakaryopoese werden hämatopoetische Stammzellen (HSC) über das Zytokin Thrombopoetin (TPO) angeregt, das an seinen Rezeptor c-MPL bindet. Diese Bindung aktiviert die Januskinase 2 (JAK2), die wiederum c-MPL phosphoryliert und eine Reihe von Effektorproteinen, darunter Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren wie STATs, PI3K und MAPK, rekrutiert (Abbildung 3) [16]. Die Aktivierung dieser Signalwege induziert die Differenzierung der HSC in

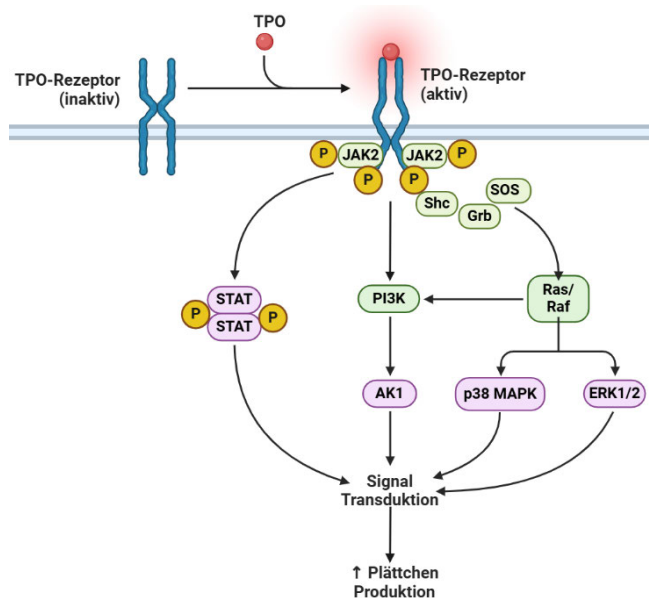


Abbildung 3 | Thrombopoetin Rezeptor Aktivierung
TPO aktiviert seinen Rezeptor (c-MPL) durch dessen Bindung. Dadurch wird die JAK2 aktiviert, die den Rezeptor phosphoryliert (P). Dadurch werden Effektorproteine wie Signaltransduktoren und Transkriptionsaktivatoren rekrutiert, welche die Plättchen-Produktion fördern. [13] [15]

multipotente Vorläuferzellen (MPP), die noch die Fähigkeit besitzen, verschiedene Zelltypen zu bilden (Abbildung 4). Diese Differenzierung wird durch Zytokine wie KIT-Ligand (KITLG), Erythropoetin (EPO) und Interleukine (z.B. IL-3, IL-11) unterstützt [17]. Aus den multipotenten Vorläuferzellen entwickeln sich Megakaryozyten-Erythroid-Vorläuferzellen (MEP), die durch TPO und IGF1 weiter zu Megakaryozyten-Vorläuferzellen (MKP) differenzieren. In

dieser Phase spielen weiterhin TPO und andere Zytokine eine entscheidende Rolle. Die Reifung der Megakaryozyten erfolgt durch den Prozess der Endomitose, bei dem sich der DNA-

Gehalt ohne Zellteilung vervielfacht, was zu einer polyploiden Zellstruktur führt [18]. Während dieser Phase erweitern sich die Zellen, und es kommt zu einer Akkumulation von Zytoskelettproteinen und der Bildung plättchenspezifischer Granula, was die Zellen auf die endgültige Blutplättchen-Bildung vorbereitet [17]. Zytokine wie IL-6 sowie Transkriptionsfaktoren wie GATA1, RUNX1 und TAL1 spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression, die für diese Differenzierung notwendig ist [15] [16].

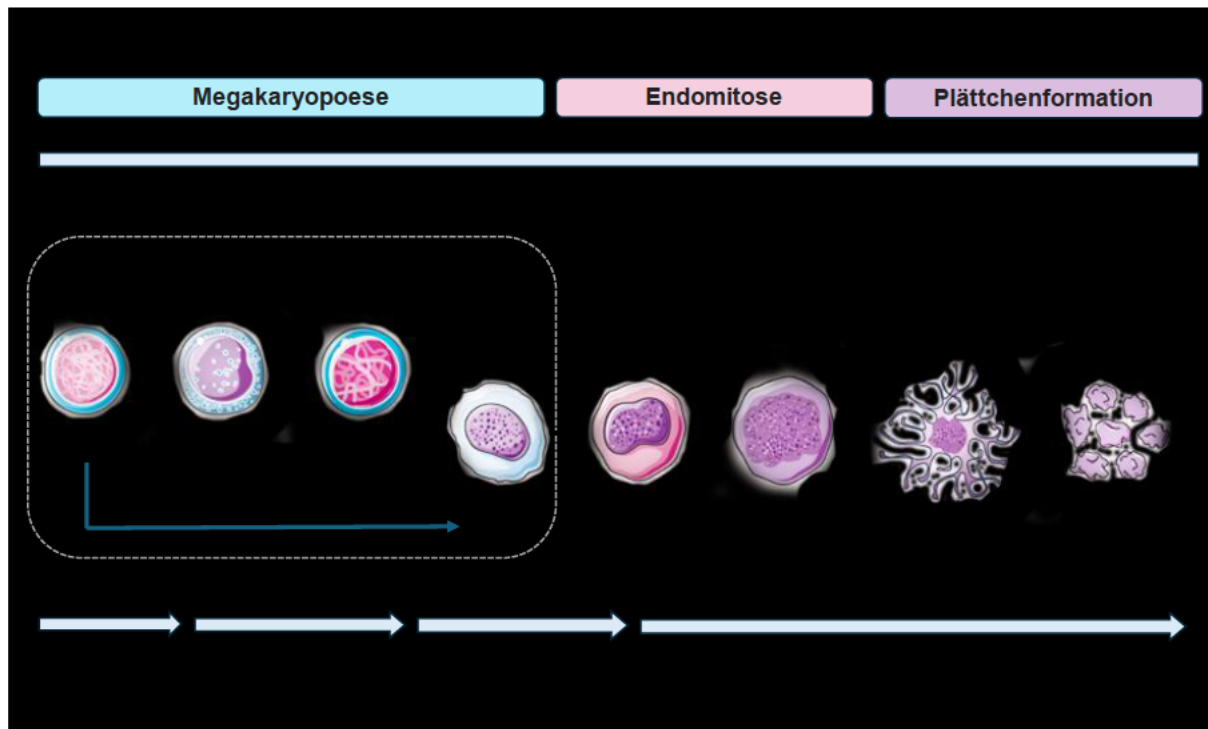


Abbildung 4 | Phasen der Megakaryopoese und anschließende Plättchen-Bildung

Prozess der Megakaryopoese, der Endomitose und der Plättchenformation. Hämatopoetische Stammzellen (HSC) differenzieren durch unterstützende Transkriptionsfaktoren und Zytokinen zu MKs. Diese durchlaufen eine Endomitose und reifen zu Vorläuferplättchen an. Durch Scherkräfte werden die Plättchen von den Megakaryozyten abgeschnürt und wandern dann in den Blutfluss über. Angepasst nach: [17].

Nachdem die Megakaryozyten ausgereift sind durchlaufen sie biomolekulare Veränderungen, die zur Bildung von Vorläuferplättchen führen, die mit Granula und Organellen gefüllt sind. Diese Vorläuferplättchen werden durch Scherkräfte des Blutstroms in Blutplättchen aufgeteilt und über die Knochenmarksinus ins Blut abgegeben. Weitere Zytokine, wie IL-1 α , CCL5 (RANTES) und der von-Willebrand-Faktor (vWF) sind entscheidend für den Abschluss dieses Prozesses [19]. Einmal ins Blut übergetreten, überleben die Blutplättchen im menschlichen Körper etwa 5 bis 10 Tage bevor sie abgebaut werden [6] [14].

2.3 Megakaryozytische Zelllinien als Quelle für Plättchenlysat

Die Knappheit an Blutspendern hat eine direkte Auswirkung auf die Kosten und allgemeine Verfügbarkeit von hPL, weshalb FBS in vielen Zellkulturen weiterhin bevorzugt wird. Ein Ansatz, der sich dieser Herausforderung widmet, ist die Nutzung megakaryozytischer Zelllinien wie z.B. MEG-01 [20]. Diese Zelllinien können gezielt zur Herstellung von Plättchen ähnlichen Partikeln (PLP) verwendet werden, welche wiederum als Ausgangsmaterial für Plättchenlysat dienen [21]. Der Vorteil des Ansatzes liegt in der Möglichkeit einen kontrollierten reproduzierbareren Prozess zu etablieren, der unabhängig von Blutspenden ist und dadurch humanpathogene Viren wie HIV oder Hepatitis vollständig ausschließt.

2.3.1 MEG-01-Zellen

Die MEG-01 Zelllinie leitet sich von Zellen aus dem Knochenmark eines 55-jährigen Patienten mit Philadelphia-Chromosom-positiver-myeloischer Leukämie ab. MEG-01-Zellen haben einen Durchmesser von ca. 30 bis 40 μm und besitzen eine ovale bis runde Morphologie. MEG-01-Zellen wachsen semi-adhären; es haften einige der Zellen an Kulturoberfläche, während andere in Suspension wachsen [22].

MEG-01-Zellen exprimieren spezifische Marker, wie das Glykoprotein IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) auf ihrer Zelloberfläche und enthalten intrazellulär das Plättchen-Glykoprotein IB sowie Faktor VIII-verwandte Antigene. Ein Megakaryozyten spezifisches Merkmal, was auch die MEG-01-Zellen aufweisen, ist die Plättchen-Oxidase. MEG-01-Zellen sind eine megakaryoblastische Zelllinie, die sich in einem frühen Stadium der Megakaryozyten-Differenzierung befinden [22].

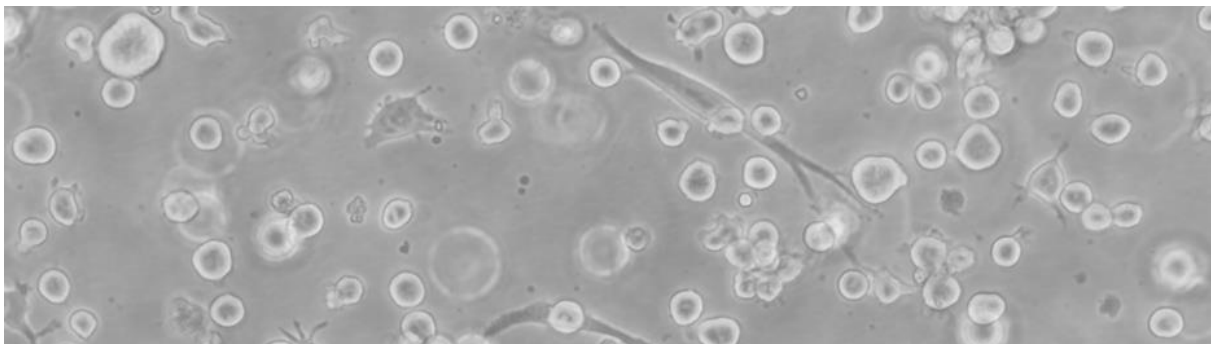


Abbildung 5 | MEG-01-Zellen

MEG-01-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Aufnahme wurde nach der dritten Passage nach dem Auftauen des Kryoröhrchens bei 100-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen. Die Zellen sind semi-adhären, wobei ein Großteil der Zellen in Suspension vorliegt und vereinzelte Zellen an der Zellkulturflasche anhaften.

Der Vorteil an den MEG-01-Zellen sind nicht allein nachgewiesene ähnliche Marker, sondern auch das Potential der Differenzierung zu Megakaryozyten ähnlichen Zellen und die damit verbundene Herstellung von wichtigen wachstumsfördernden Molekülen. PMA ist ein weit verbreitetes Differenzierungsmittel. Es wird häufig verwendet, um die Differenzierung von Zelllinien zu induzieren und zelluläre Signalwege zu untersuchen. PMA ist ein Diacylglycerol

(DAG)-Analogon, welches als Aktivator verschiedener Isoformen der Proteinkinase C (PKC) vor allem PKC β und PKC α fungiert [20] [21]. Durch die lipophile Struktur kann PMA die Zellmembran durchdringen und direkt an die regulatorische Domäne von der PKC binden, wodurch diese aktiviert wird. Die Aktivierung der PKC führt zu einer Kaskade intrazellulärer Ereignisse, darunter die Aktivierung des MAPK/ERK Signalweges, die die Genexpression und den Phänotypen der Zelle verändern [21]. Zu den intrazellulären Ereignissen gehören die vermehrte Expression von β -1-tubulin, CD62P und GPIIb α , welche mit Megakaryozyten assoziiert werden. Des Weiteren wird die Aktivität von mehreren Transkriptionsfaktoren beeinflusst, welche für die Megakaryozyten-Entwicklung relevant sind. Dazu gehört z.B. der Transkriptionsfaktor GATA1, welcher eine entscheidende Rolle in der Genexpression für Reifung und Funktion von Megakaryozyten spielt [25].

2.4 Zielsetzung

Serumzusätze spielen in der modernen Zellkulturtechnik eine unverzichtbare Rolle, da sie essenzielle Nährstoffe für das Zellwachstum und die Zellfunktion liefern. Etablierte Zusätze wie FBS und hPL haben jedoch ihre Nachteile. FBS ist aufgrund seines tierischen Ursprungs ethisch umstritten und weist eine Chargenvariabilität auf [5]. Humanes Plättchen Lysat bietet zwar eine humane Alternative, ist jedoch durch die Abhängigkeit von Blutspenden und dem Risiko von humanpathogener Erregern eingeschränkt [11]. Diese Herausforderungen verdeutlichen die Notwendigkeit, eine standardisierte, ethisch vertretbare und reproduzierbare Serumalternative zu entwickeln.

Ziel dieser Arbeit ist es eine Grundlage für die Entwicklung einer Serumalternative auf der Basis von MEG-01-Zellen zu schaffen, um Einsatz von tierischen und humanen Serumkomponenten in der Zellkultur zu reduzieren. MEG-01-Zellen, eine Megakaryoblasten-Zelllinie, bieten aufgrund ihrer Fähigkeit Plättchen ähnliche Partikel zu produzieren ein hohes Potenzial als Quelle für Wachstumsfaktoren und Plättchen basierte Lysate. Um dieses Ziel zu erreichen, wird zunächst die durch PMA induzierte Differenzierung von MEG-01-Zellen untersucht, um eine Methodik zur gezielten Umwandlung in Megakaryozyten zu entwickeln. Der Erfolg der Differenzierung wird anhand der Expression von CD41a (GP IIb/IIIa), einem typischen Marker für Megakaryozyten, mittels Durchflusszytometrie analysiert [22]. Zusätzlich wird während der Differenzierung und nach Lyse der Zellen mit Hilfe eines Zellaufschlussreaktors (PARR-Bomb), die Menge an PDGF in Zellüberständen und Lysaten quantifiziert, um den Differenzierungsprozess zu charakterisieren. Im weiteren Verlauf wird die Eignung der hergestellten Lysate als Serumersatz getestet. Dazu werden A549-Zellen, eine etablierte Zelllinie für Serumsubstitutionsstudien, unter verschiedenen Bedingungen kultiviert [26]. Mit reduziertem FBS, hPL und den aus MEG-01-Zellen hergestellten Lysaten werden Parameter wie Zellwachstum, Viabilität und Morphologie untersucht, um die Funktionalität und den potenziellen Nutzen der Lysate zu bewerten.

3. Ergebnisse

3.1 Differenzierung von MEG-01-Zellen zu Megakaryozyten durch PMA

Um die optimale Konzentration von PMA für die Differenzierung von Megakaryozyten aus MEG-01 zu bestimmen, wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen PMA-Konzentrationen kultiviert (5 nM und 10 nM). Das Ziel bestand darin den Einfluss der PMA-Konzentrationen auf die Differenzierung zu analysieren und die Bedingungen für eine effektive Megakaryozyten-Bildung und anschließende Plättchen-Abschnürung zu ermitteln. Dabei wurde die Morphologie der Zellen, Zellzahl, Viabilität, Expression von CD41a und Anreicherung an PDGF betrachtet.

3.1.1 Morphologie von MEG-01-Zellen während der Differenzierung

Aus einer drei-wöchigen Erhaltungskultur wurden MEG-01-Zellen in zwei T25-Flaschen mit einer Zelldichte von 5×10^5 c/mL ausgesät. Das Kultivierungsmedium wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von PMA versetzt. Die Zellen wurden zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, danach folgte eine erste Ruhephase von 24 h gefolgt von einem Medienwechsel und einer weiteren Ruhephase von 72 h. Im Verlauf der Differenzierung wurden morphologische Veränderung der MEG-01 analysiert (Abbildung 6).

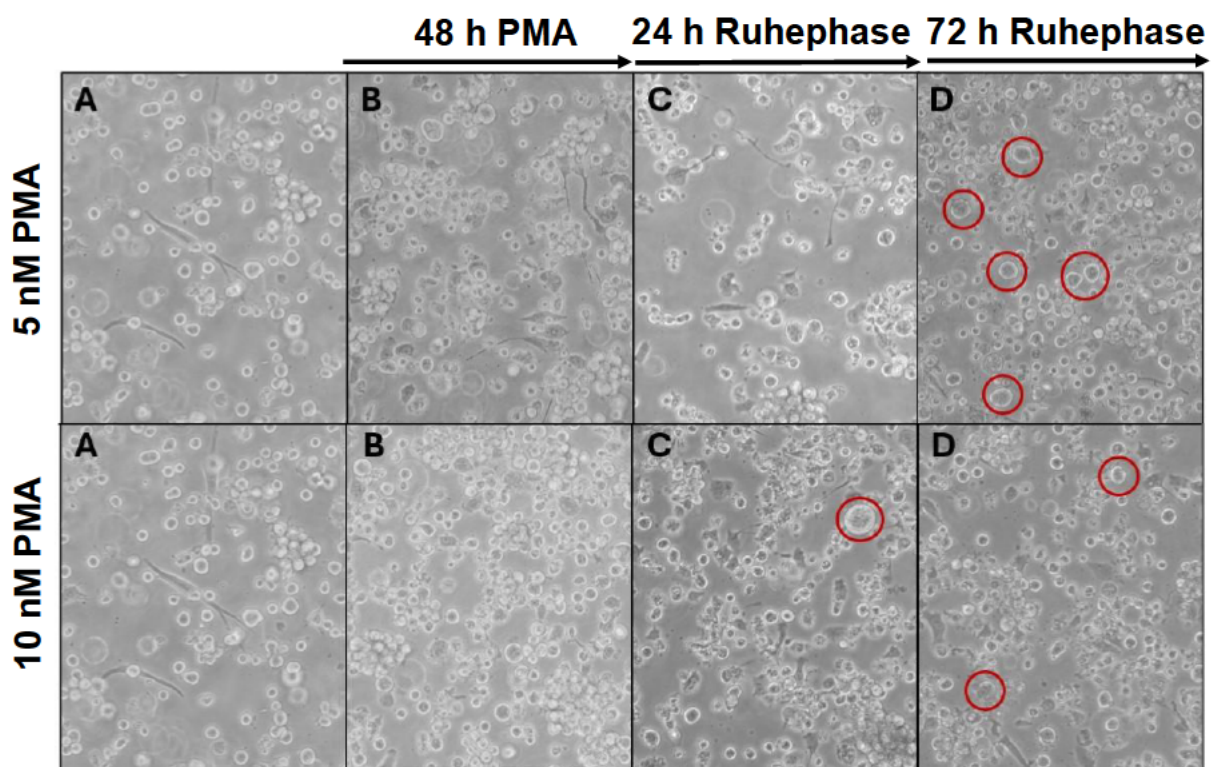


Abbildung 6 | MEG-01-Zellen unter dem Einfluss von PMA

MEG-01-Zellen in der Dichte von 5×10^5 c/mL wurden zwei Tage mit PMA (5 nM und 10 nM) induziert. Es folgten zwei Ruhephasen von 24 h und nochmals von 72 h. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop erstellt. A zeigt MEG-01-Zellen vor der Differenzierung. B-D zeigt die Zellen während den Differenzierungsschritten. In roten Kreisen wurden Zellen markiert, die morphologisch größer erscheinen als unter Standardkulturbedingungen.

Unter Standardkulturbedingungen zeigten MEG-01-Zellen eine semi-adhärente Wachstumsform mit vereinzelt auftretenden größeren Zellen. Während der Differenzierung unter Einfluss von PMA kam es zu einer Ausbildung von Zellclustern sowie einer Zunahme größerer Zellen. Es waren weniger vergrößerte Zellen bei der Induktion mit 10 nM PMA zu beobachten.

3.1.2 Zellwachstum und Viabilität von MEG-01-Zellen während der Differenzierung

Während der Differenzierung der MEG-01-Zellen wurde sichergestellt, dass die Zellen trotz der Toxizität von PMA ihre Viabilität behalten [27]. Deshalb wurde überprüft, ob die Zellen während der Differenzierung normal weiter proliferieren. Um diese Prozesse zu überwachen wurden während der Medienwechsel Viabilität und Wachstumsrate der Zellen analysiert (Abbildung 7).

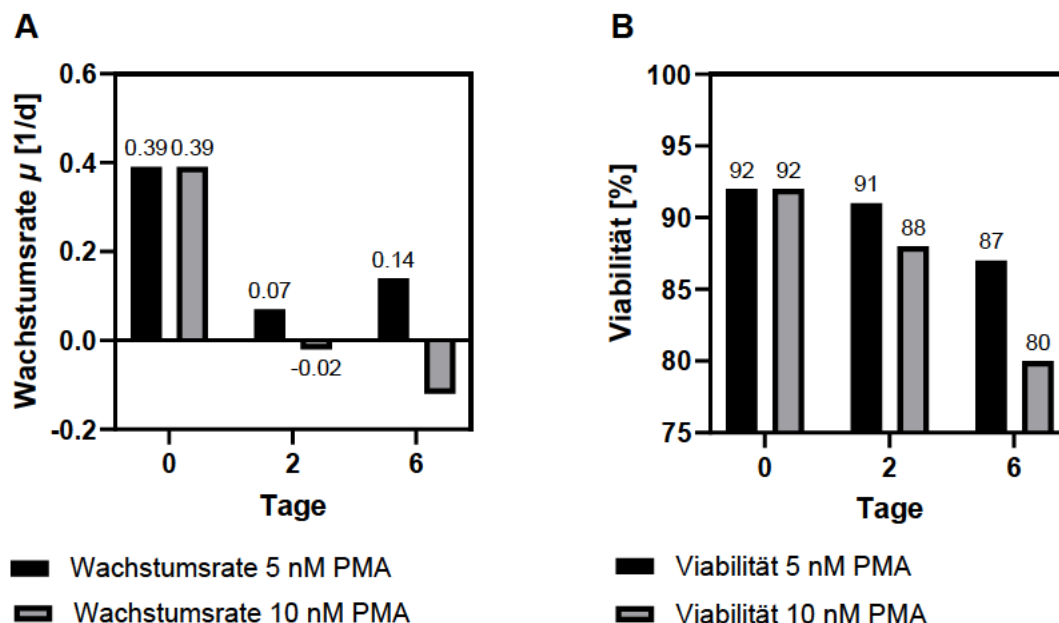


Abbildung 7 | Wachstumsrate und Viabilität der MEG-01-Zellen unter PMA-Induktion

MEG-01-Zellen wurden mit unterschiedlichen PMA-Konzentrationen (5 nM und 10 nM) für 48 h differenziert, danach folgten Ruhephasen mit Medienwechsel (24 h und 72 h). Proben der verschiedenen Zellkulturen wurden beim Medienwechsel entnommen und durch den CASY® wurden die Wachstumsraten (A) und die Viabilität (B) bestimmt.

Durch die Induktion mit PMA wurde eine Hemmung des Zellwachstums beobachtet. Bei einer Konzentration von 5 nM PMA verringerte sich das Zellwachstum zunächst, bevor es zu einer leichten Zunahme kam, was auf eine Stabilisierung der Zellzahl schließen lässt. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit 10 nM PMA zu einem vollständigen Wachstumsstopp, gefolgt von einem Zellverlust. Die Viabilität nahm bei beiden Konzentrationen im Verlauf der Differenzierung ab, wobei die Abnahme bei 10 nM PMA stärker ausgeprägt war. Insgesamt zeigten die Zellen unter 5 nM PMA eine höhere Viabilität und keinen Zellverlust.

3.1.3 Expression von CD41a in MEG-01-Zellen und PLP

Nach jeder Ruhephase (24 h und 72 h) wurden Proben von MEG-01-Zellen und der gegebenenfalls im Medium abgeschnürter PLP entnommen. Um die Trennung von Zellen und PLP zu erreichen wurden zwei unterschiedliche Zentrifugationsschritte angewandt. Die Zellen wurden bei niedriger Umdrehungszahl pelletiert (200 x g), wobei die PLP im Überstand verblieben. Diese wurden anschließend bei einer hohen Umdrehungszahl (4.000 x g) aus dem Überstand abzentrifugiert. Anhand der Expression von CD41a, einem Marker für Blutplättchen [22], wurde überprüft, ob die Differenzierung von MEG-01-Zellen zu megakaryozytären Zellen und die Bildung von PLP funktioniert hat. Zellen und PLP wurden in DPBS/BSA resuspendiert, mit fluoreszenten Antikörpern gegen CD41a markiert und durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 8).

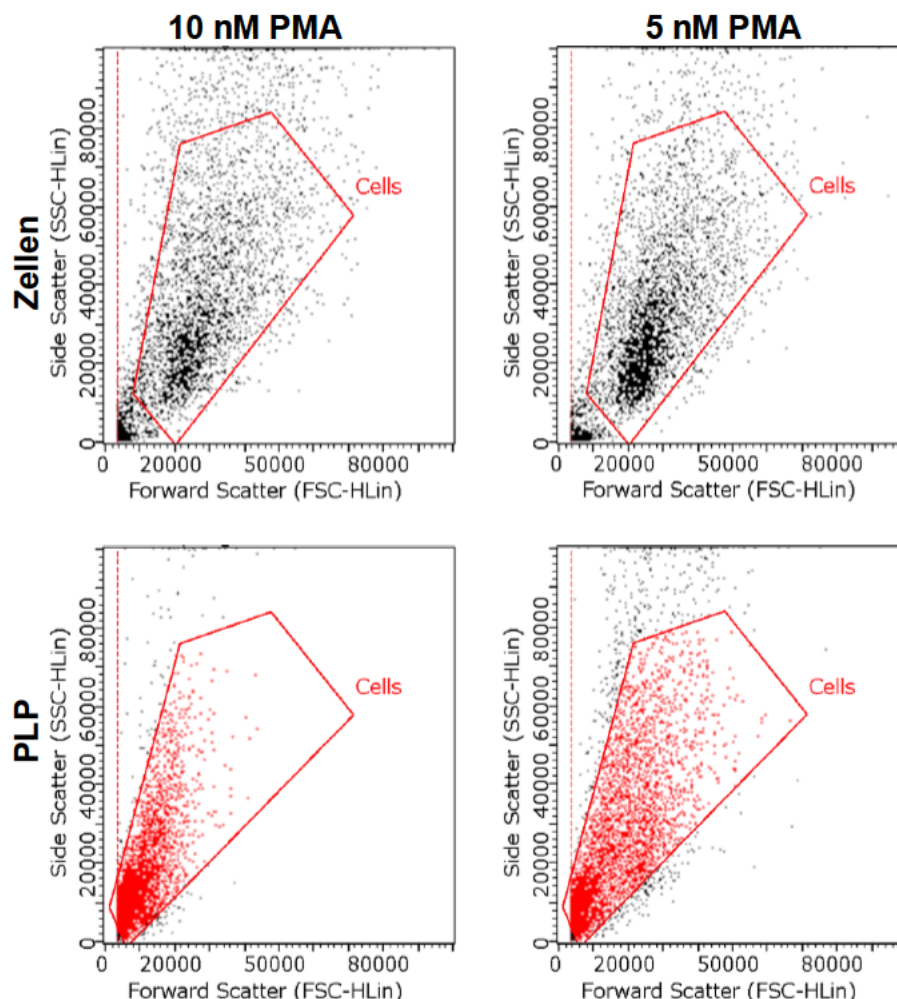


Abbildung 8 | Durchflusszytometrie MEG-01-Zellen und PLP

MEG-01-Zellen und PLP wurden nach Differenzierung mit 5 nM PMA oder 10 nM PMA mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wurden Populationen der MEG-01-Zellen (schwarz) und PLP (rot) identifiziert. Die Partikelpopulationen geben die Signale der gemessenen Zellen und PLP wieder. Die Vorwärtstreulichtintensität (FSC) zeigt die relative Größe der Partikel an und die Seitwärtstreulichtintensität (SSC) weist auf die Granularität der Partikel hin. Die Populationen werden in einem Gate (Cells) eingeschränkt, um die Streuung der Partikel einzugrenzen.

Eine Population bestand aus größeren und komplexeren Partikeln (Zellen), die andere aus kleineren und weniger komplexen Partikeln (PLP). Die Komplexität dieser Partikel, gemessen über den SSC, spiegelt die Struktur und Zusammensetzung der Partikel wider, einschließlich der Dichte und Anzahl von Granula sowie anderen zellulären Organellen. MEG-01-Zellen zeigten bei beiden PMA-Konzentrationen (5 nM und 10 nM) Partikel unterschiedlicher Größe und Komplexität. Im Gegensatz dazu wiesen die PLP bei 10 nM PMA eine dichtere und homogenere Population auf, was auf eine geringere Variabilität der Partikelgröße hindeutet. Bei 5 nM PMA hingegen waren die PLP deutlich heterogener, da neben der dichten Hauptpopulation eine Vielzahl von Partikeln unterschiedlicher Größe beobachtet wurden. Die PMA-Konzentration hat einen Einfluss auf die Homogenität der PLP, wobei eine höhere Konzentration (10 nM PMA) zu einer größeren Homogenität der Partikelgröße führt.

Nach Markierung der Zellen und PLP mit fluoreszenz-markierten Antikörpern (PE) gegen CD41a wurden die in der Durchflusszytometrie gemessene Partikelzahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die gemessene Fluoreszenzintensität korreliert direkt mit der Anzahl der an die Partikel gebundenen Antikörper und spiegelt die Menge der CD41a-Expression auf der Zelloberfläche wider (Abbildung 9).

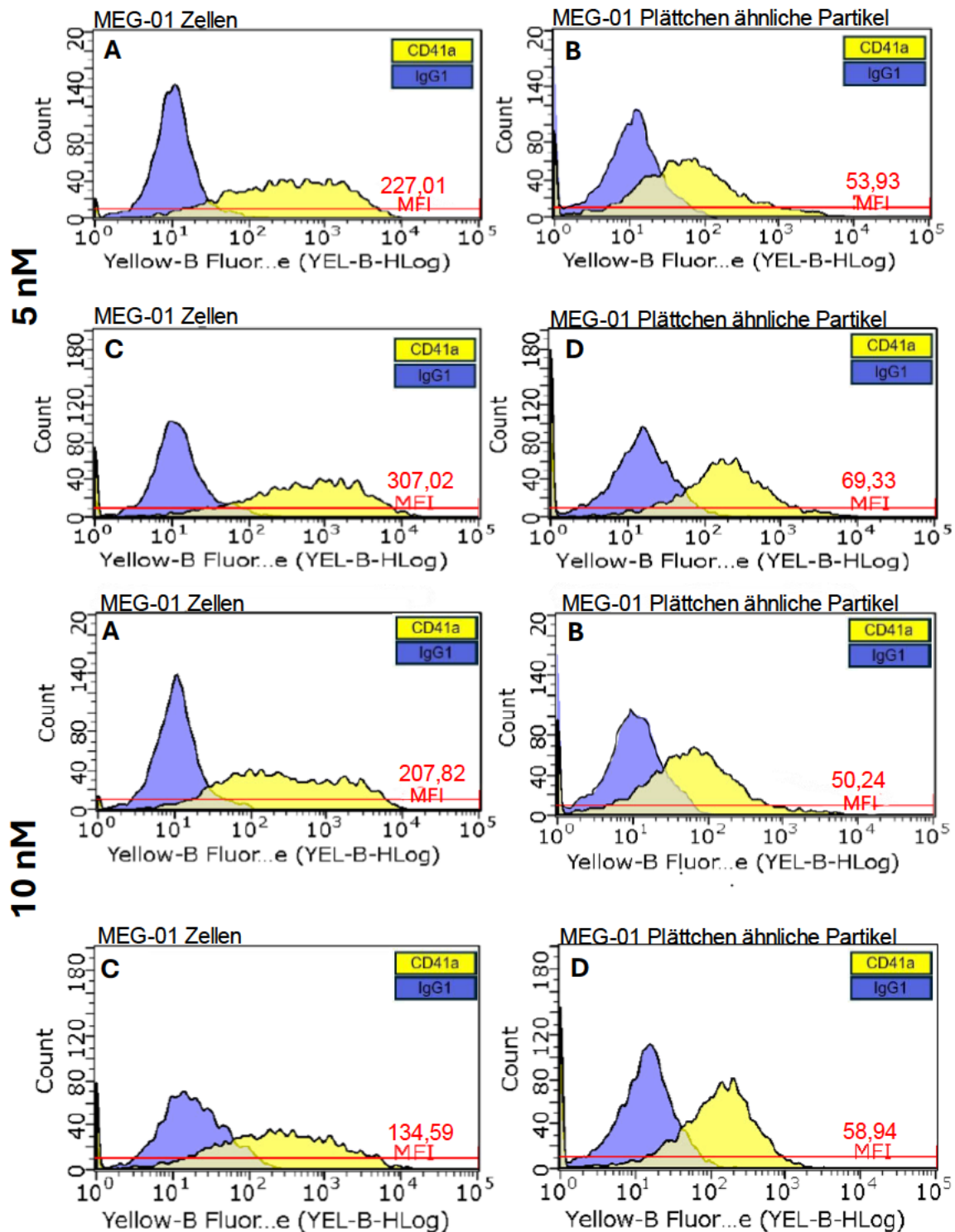


Abbildung 9 | CD41a-Expression von MEG-01-Zellen und PLP nach den Ruhephasen

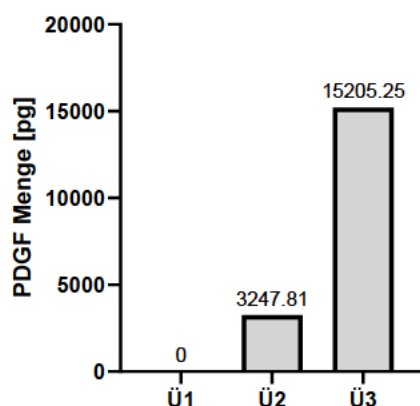
Differenzierte MEG-01-Zellen und PLP (5 nM und 10 nM PMA) wurden anhand ihrer CD41a Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Eingegrenzte gemessene Partikel (y-Achse) wurden gegen die Fluoreszenzintensität (x-Achse) aufgetragen. A-B zeigt die Expression von CD41a nach 24 h Ruhephase. C-D zeigt die Expression von CD41a nach 72 h Ruhephase. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) stellt den durchschnittlichen Wert der Fluoreszenzintensität der Partikel dar, die CD41a exprimieren, wobei die Fluoreszenzintensität des Isotyps (IgG1) als Hintergrundsignal subtrahiert wurde.

Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) war in den MEG-01-Zellen bei beiden PMA-Konzentrationen höher als in den PLP, was auf eine stärkere Expression von CD41a in den Zellen schließen lässt. Zudem zeigten die MEG-01-Zellen im Vergleich zu den PLP ein breiteres Fluoreszenzintensitätsspektrum, was auf eine heterogene Verteilung der CD41a-exprimierenden Partikel innerhalb dieser Zellpopulation deutet. Das schmalere Intensitätsspektrum der PLP weist auf eine homogenere Verteilung der CD41a-Expression in dieser Population hin. Während der Ruhephase zeigte sich bei einer PMA-Konzentration von 10 nM PMA eine Abnahme der MFI-Werte in den MEG-01-Zellen von 207,82 auf 134,59, während die MFI der PLP leicht von 50,24 auf 58,94 anstieg. Bei einer Konzentration von 5 nM PMA stieg die MFI sowohl in den MEG-01-Zellen als auch in den PLP. In den Zellen erhöhte sich die MFI von 227,01 auf 307,02, und in den PLP stieg die MFI von 53,93 auf 69,33. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen, dass durch die mit 5 nM PMA sowohl in Zellen als auch in PLP eine höhere Expression von CD41a nachgewiesen werden konnte. Dies war insbesondere nach einer anschließenden Ruhephase der Fall.

Für weitere Differenzierungsversuche wurde daher eine PMA-Konzentration von 5 nM mit nachfolgenden Ruhephase von 48 und 72 Stunden gewählt, da die Ruhephasen zu einer höheren Expression von CD41 geführt haben.

3.1.4 Anreicherung von PDGF während der MEG-01 Differenzierung

Ein weiteres Maß für die Differenzierung von Megakaryozyten, die insbesondere für deren Einsatz als Serumersatz relevant ist, ist die Expression von PDGF. Dafür wurde die Differenzierung von MEG-01-Zellen in T175-Flaschen wiederholt. Die Menge von PDGF im Medium wurde direkt nach der Differenzierung (Ü1), nach 48 Stunden Ruhephase (Ü2) und nach weiteren 72 Stunden Ruhephase (Ü3) über ELISA quantifiziert (Abbildung 10).



Während der Differenzierung von MEG-01-Zellen, konnte eine Zunahme an PDGF in den Überständen festgestellt werden. In Ü1 (48 h, 5 nM PMA) war kein PDGF nachweisbar. Wohingegen nach einer Ruhephase (Ü2, 48h) ein PDGF-Anteil von 3247,81 pg nachgewiesen werden konnte. Nach einer weiteren Ruhephase (Ü3, 72h) ist die Menge an PDGF weiter auf 15205,25 pg angestiegen.

Abbildung 10 | PDGF in Kulturüberständen differenzierter MEG-01

PDGF wurde in Überständen (Ü1-Ü3) von differenzierten MEG-01-Zellen (5 nM PMA) mittels ELISA nachgewiesen. Ü1: 48 h PMA-Induktion, Ü2: 48 h Ruhephase und Medienwechsel, Ü3: 72 h Ruhephase.

3.1.5 MEG-01 Zelllysate und Plättchenlysate

MEG-01-Zellen wurden für 48 Stunden mit 5 nM PMA differenziert gefolgt von einer 48-stündigen und einer 72-stündigen Ruhephase. Die differenzierten MEG-01 wurden abzentrifugiert (200 x g) und in der PARR-bomb lysiert (ZL). Aus dem Überstand (Ü3) wurden die PLP abzentrifugiert (4.000 x g) und ebenfalls lysiert (PLPL). Der resultierende Überstand wurde ebenfalls analysiert (Ü4). Die PDGF-Konzentration wurde anschließend bei den Überständen (Ü3 und Ü4) und den MEG-01 Zell- und PLP-Lysaten durch einen ELISA quantifiziert (Abbildung 11).

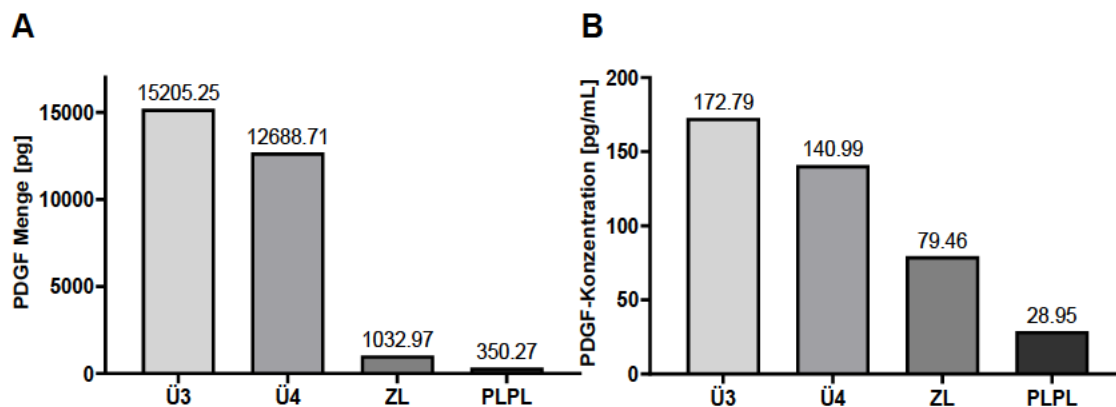


Abbildung 11 | PDGF von Überständen und Lysaten der MEG-01 Differenzierung

Aus differenzierten MEG-01-Zellen (5 nM PMA) wurden die Überstände der Zellkultur vom letzten Differenzierungsschritt (Ü3-Ü4) von den Zellen und PLP und die mit der PARR-Bomb produzierten Lysate auf ihren PDGF-Anteil mittels ELISA analysiert. Es ist die Gesamtmasse von PDGF (A) und die PDGF-Konzentration (B) der Proben abgebildet.

In den Überständen war nach Abtrennung von Zellen (Ü3) und PLP (Ü4) weiterhin ein hoher Anteil an PDGF nachweisbar. Im ZL und PLPL konnten nur geringe Mengen an PDGF (Abbildung 11, A) nachgewiesen werden. Auch eine Aufkonzentrierung in den PLP wurde nicht erreicht (Abbildung 11, B). Es ist bezogen auf die PDGF-Konzentration keine Anreicherung in den Lysaten erkennbar, da diese weiterhin niedriger ist als in den Überständen der MEG-01 Zellkultur. Insgesamt wurde im Verlauf der Differenzierung ein höherer PDGF-Anteil im Medium nachgewiesen als in den Lysaten von differenzierten MEG-01-Zellen und PLP.

3.1.6 Scale-Up der MEG-01 Differenzierung in einem CellSTACK

Um zu prüfen, ob die Differenzierung von MEG-01-Zellen skalierbar ist, wurden die Zellen auf einen CellSTACK (6320 cm²) expandiert. Differenzierte Zellen und PLP wurden abgetrennt und in der PARR-Bomb lysiert. Infolgedessen wurden die produzierten Lysate in einem ELISA spezifisch für PDGF analysiert. Die hergestellten Lysate wurden mit den Lysaten aus T175-Flaschen (siehe Kapitel 3.1.4) verglichen. Da die Ausgangsmengen der Kulturen nicht direkt vergleichbar waren, wurden die gemessenen Mengen an PDGF an die Gesamtproteinmenge in den Lysaten, gemessen über BCA, normalisiert (Abbildung 12).

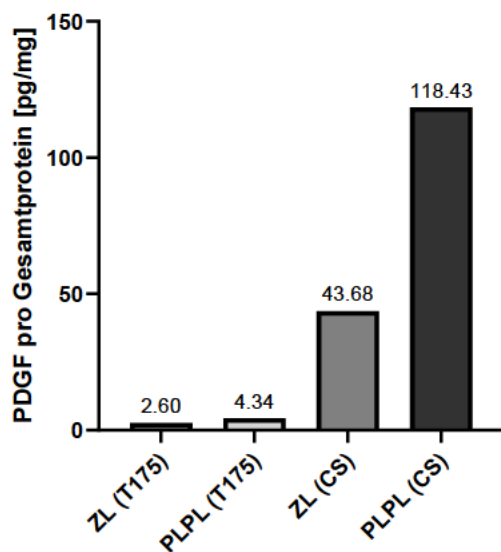


Abbildung 12 | PDGF in MEG-01 Lysaten
PDGF wurde in Zell- und PLP-Lysaten von differenzierten MEG-01-Zellen (5 nM PMA) mittels ELISA nachgewiesen.

Die PDGF-Mengen, normiert auf die Gesamtproteinmenge, waren in den Lysaten der CellSTACK-Kulturen höher als im Vergleich zu den Lysaten der T175-Flaschen. Im ZL der CellSTACK-Kultur wurde ein PDGF-Anteil pro Gesamtprotein von 43,68 pg/mg gemessen, wohingegen das ZL der T175-Flaschen nur 2,60 pg/mg aufwies. Ähnlich zeigte das Lysat der PLP aus der CellSTACK-Kultur einen höheren Wert von 118,43 pg/mg im Vergleich zu den 4,34 pg/mg im Lysat der T175-Flaschen. In beiden Kultursystemen war die PDGF-Konzentration in den Lysaten der PLP höher als im ZL. In der CellSTACK-Kultur betrug der PDGF-Anteil im PLPL etwa das 2,7-fache der Konzentration als im ZL, während in den T175-

Flaschen die Konzentration vom PLPL etwa das 1,7-fache der Konzentration im ZL ausmachte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Differenzierung der MEG-01-Zellen im CellSTACK-System zu einer höheren Produktion und Ausschüttung von PDGF in beiden Lysaten führte. Insgesamt war die Differenzierung im CellSTACK hinsichtlich der PDGF-Ausbeute effizienter als im T175-Flaschen-System.

3.2 Verwendung vom MEG-01 abgeleitetem Plättchenlysat als Serumersatz

A549 ist eine humane Lungenepithelzelllinie, die in Gegenwart von FBS mit einer Zellverdopplung von 0,74 pro Tag wächst. Wegen dieser guten Wachstumseigenschaften wurde die Zelllinie ausgewählt, um das Zellwachstum mit reduzierten Serumkonzentrationen und PLPL als Serumersatz zu untersuchen. Die A549-Zellen wurden bezogen auf das Wachstum, die Morphologie und die Viabilität analysiert. Das Ziel war festzustellen, ab welcher Konzentration ein deutlicher Unterschied in diesen Parametern erkennbar ist.

3.2.1 A549-Kultivierung mit Reduzierung von FBS

Zunächst wurde untersucht, wie sich A549-Zellen mit weniger FBS im Medium verhalten. Dafür wurden die Zellen unter Normbedingungen und mit den unterschiedlichen FBS-Konzentrationen von 10%, 5%, 2%, 1% und 0% kultiviert. Der Versuch wurde in T25-Flaschen für sechs Passagen durchgeführt mit Ausnahme der 0% FBS-Zellkultur, wo bereits nach einer Passage fast alle Zellen abgestorben waren. Die übrigen Bedingungen wurden sechs Passagen lang kultiviert. Bei jeder Passage wurden Wachstum und Morphologie der Zellen mikroskopisch untersucht (Abbildung 13).

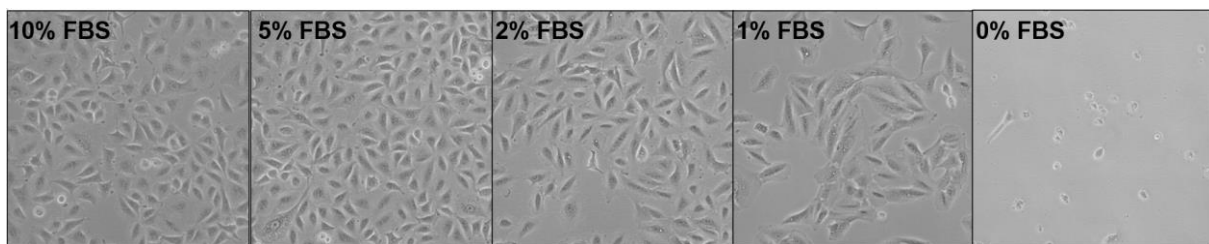


Abbildung 13 | A549-Kultur bei verschiedenen FBS-Konzentrationen

A549-Zellen wurden bei unterschiedlichen FBS-Konzentrationen für sechs Passagen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Die Aufnahmen wurden nach sechs Zellpassagen (0% FBS nach einer Passage) bei 100-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen.

Mit abnehmender Konzentration an FBS zeigte sich bei gleicher eingesäter Zellzahl eine Abnahme der Konfluenz der A549-Zellen. Unter Normbedingungen (10% FBS) wiesen die Zellen eine polygonale, epitheliale Morphologie auf. Bei einer Reduktion der FBS-Konzentration auf 2% war hingegen eine veränderte Zellform erkennbar, wobei die Zellen elongierter erschienen. Bei vollständigem Verzicht auf FBS (0%) ist kaum noch Adhäsion der Zellen an die Kulturflasche zu beobachten. Während die Zellen bei einer FBS-konzentration von 5% morphologisch gesund erschienen, wirken sich reduzierte FBS-Konzentrationen von 2% oder weniger negativ auf das Wachstum und die Adhäsion aus.

Zur quantitativen Bewertung des Wachstums wurden die Zellen bei jeder Passage gezählt und die Viabilität wurde bestimmt (Abbildung 14).

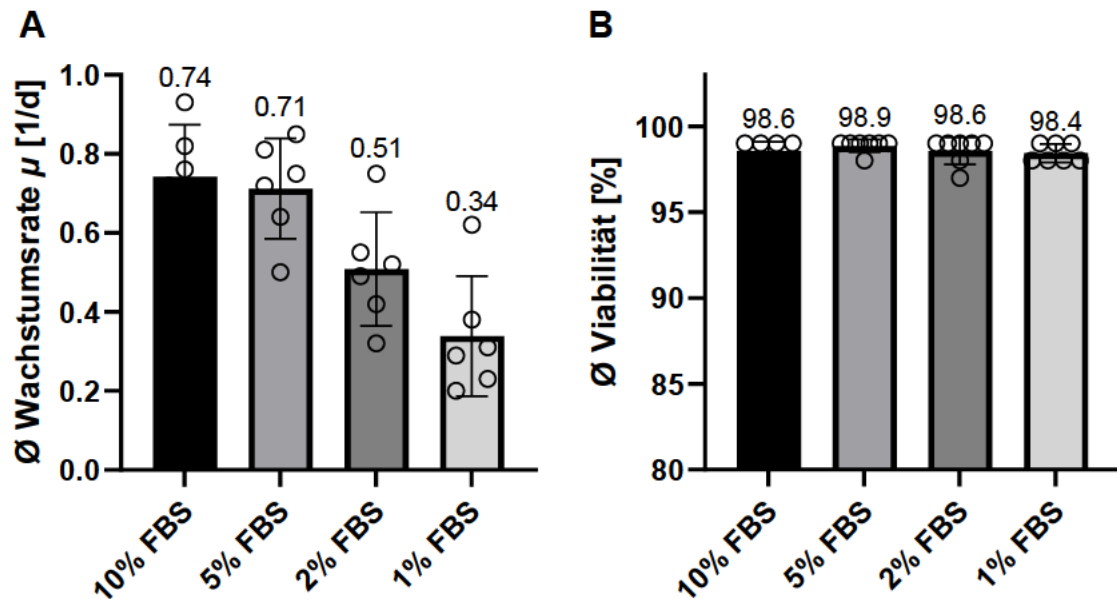


Abbildung 14 | Wachstumsrate und Viabilität von A549-Zellen in Abhängigkeit von FBS

A549-Zellen wurden sechs Passagen mit unterschiedlichen FBS-Konzentrationen kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert. Die Wachstumsrate (A) und Viabilität (B) wurde mit dem CASY® bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Jeder Punkt repräsentiert eine Passage.

Bei allen Bedingungen kam es zu Schwankungen im Wachstum während der gesamten Kultivierung. Mit einer geringer werdenden Konzentration von FBS sank die Wachstumsrate von A549-Zellen. Während die mittlere Wachstumsrate bei 10% FBS mit 0,74 und bei 5% FBS mit 0,71 Zellverdopplungen pro Tag nahezu identisch blieb, zeigte sich bei 2% FBS eine Abnahme auf 0,51 und bei 1% FBS auf 0,34 Zellverdopplungen pro Tag. Trotz der abnehmenden Wachstumsrate und der langsameren Proliferation zeigten die Zellen durchgehend eine hohe Viabilität, was auf eine intakte Zellgesundheit hinweist. Sowohl bei 10% als auch bei 5% FBS lag die durchschnittliche Viabilität bei 99%, während sie bei 2% und 1% FBS bei 98% lag. Ein Zellverlust durch die Reduktion von FBS konnte daher, abgesehen von der Bedingung ohne FBS, nicht beobachtet werden.

3.2.2 A549-Kultivierung mit humanem Plättchenlysat als Serumersatz

Basierend auf den Ergebnissen der FBS-Reduktion wurde in einem weiteren Versuch geprüft, ob A549-Zellen in einem Medium mit hPL als einzigem Zusatzstoff wachsen. Die Ergebnisse der FBS-Reduktion dienten als Grundlage für die Einschätzung der Mindestanforderungen an ein alternatives Kulturmedium, insbesondere in Hinblick auf die Erhaltung von Zellwachstum, Adhäsion und morphologischer Integrität. Dabei wurden die Zellen mit 10%, 8%, 6%, 4% und 2% hPL in T25 Flaschen für sieben Passagen kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert, gezählt und mikroskopisch bewertet (Abbildung 15).

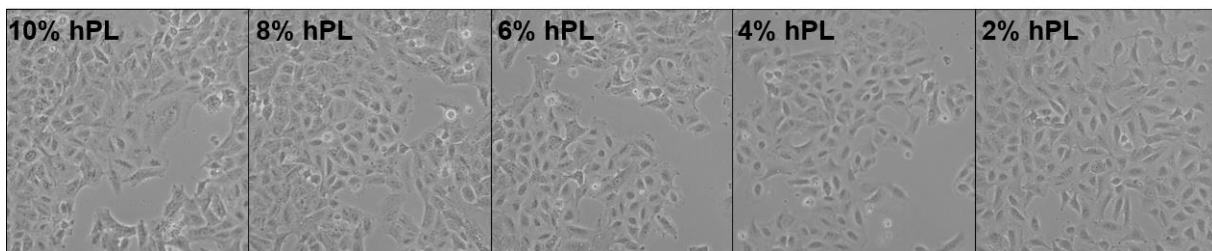


Abbildung 15 | A549-Zellen mit humanen Plättchenlysat als Serumersatz

A549-Zellen wurden sieben Passagen in unterschiedlichen hPL-Konzentrationen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Die Aufnahmen wurden nach sieben Zellpassagen bei 100-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen.

Mit abnehmender hPL-Konzentration wiesen die Zellen eine Veränderung ihrer Dichte und Morphologie auf. Bei 10% und 8% hPL zeigten die Zellen standardmäßige Konfluenz, eine epitheliale Morphologie sowie Zell-Zell-Kontakte. Ab einer Konzentration von 6% und 4% hPL war eine Abnahme der Zellzahl zu beobachten. Während die epitheliale Morphologie der Zellen weitgehend erhalten blieb, wurden die Zellzwischenräume größer. Bei 4% hPL erschienen die Zellen elongierter und verteilten sich zunehmend isoliert. Bei der niedrigsten Konzentration von 2% hPL kam es zu einer Reduktion der Zellzahl, begleitet von einer weiteren Vergrößerung der interzellulären Abstände und einer Einschränkung des Zell-Zell-Kontaktes. Insgesamt zeigte sich, dass mit abnehmender hPL-Konzentration die Zellzahl und die Interaktionen zwischen den Zellen abnehmen, während die epitheliale Morphologie der Zellen weitgehend erhalten bleibt.

Zur quantitativen Bewertung des Wachstums wurden die Zellen bei jeder Passage gezählt und die Viabilität wurde bestimmt (Abbildung 16).

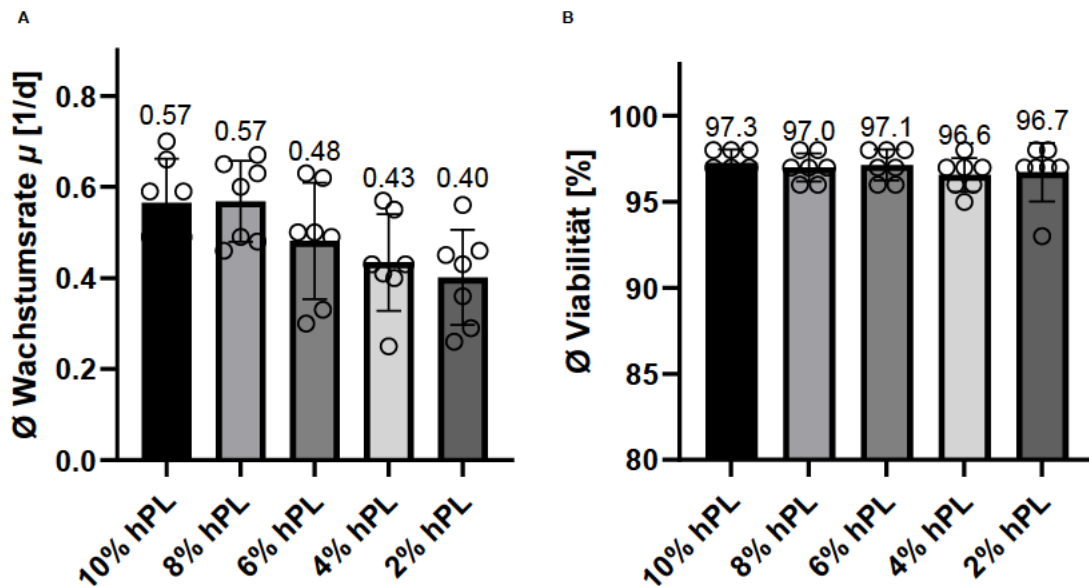


Abbildung 16 | Wachstumrate und Viabilität von A549-Zellen in Abhängigkeit von hPL

A549-Zellen wurden sieben Passagen mit unterschiedlichen hPL-Konzentrationen kultiviert und alle zwei bis drei Tage passagiert. Die Wachstumrate (A) und Viabilität (B) wurde mit dem CASY®-System bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Jeder Punkt repräsentiert eine Passage.

Bei 10% und 8% hPL zeigten A549-Zellen eine durchschnittliche Wachstumrate von 0,57 Zellverdopplung pro Tag auf. Bei 6% lag diese bei 0,48 und bei 4% bei 0,43 Zellverdopplungen pro Tag. Die geringste Wachstumrate zeigte die Bedingung mit 2% hPL mit 0,40 Zellverdopplungen pro Tag. Die Viabilität von A549-Zellen lag bei allen Bedingungen über 95%, was auf eine intakte Zellgesundheit hinweist.

3.2.3 MEG-01 abgeleitetes Plättchenlysat als Serumersatz

Aus vorherigen Versuchen ging hervor, dass A549-Zellen ohne Serumzugabe nicht in der Lage sind zu wachsen. Mit der Verwendung von hPL als Serumersatz wuchsen die A549-Zellen, jedoch war die Wachstumrate im Vergleich zu FBS leicht verringert. Aus einer CellSTACK-Kultur mit differenzierten MEG-01-Zellen (behandelt mit 5 nM PMA) wurde Zelllysat und PLP-Lysat durch die Lysierung mit der PARR-Bomb gewonnen. In beiden Lysaten konnte PDGF nachgewiesen werden, ein wesentlicher Wachstumsfaktor von Blutplättchen [7]. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde untersucht, wie sich A549-Zellen unter der Zugabe von verschiedenen Konzentrationen dieser Lysate als Serumersatz verhalten. Für diese Testung wurden A549-Zellen über drei Passagen hinweg mit 5% hPL in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen in 6-Well-Platten in verschiedenen Konzentrationen von PLP-Lysat (1%, 2%, 5% und 10%), einer Kombination von 1% PLP-Lysat und 1% hPL sowie einer hPL-Kontrolle (2%) ausgesät und kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert, gezählt und mikroskopisch analysiert (Abbildung 17). Das Experiment wurde nach drei Passagen abgebrochen, da die Zellen nicht weiterwuchsen und es zu einem Zellverlust innerhalb der Kultur kam. In den Kulturen, die mit 1%, 2% und 5% PLP-Lysat kultiviert worden

waren, trat bereits nach der ersten Passage ein Zellverlust auf, sodass die gesamte Zellpopulation erneut ausgesät werden musste. In den Kulturen mit den übrigen Bedingungen wurde die Zellen für zwei oder drei Tage Kultivierung ausgesät (2×10^4 c/mL oder 1×10^4 c/mL).

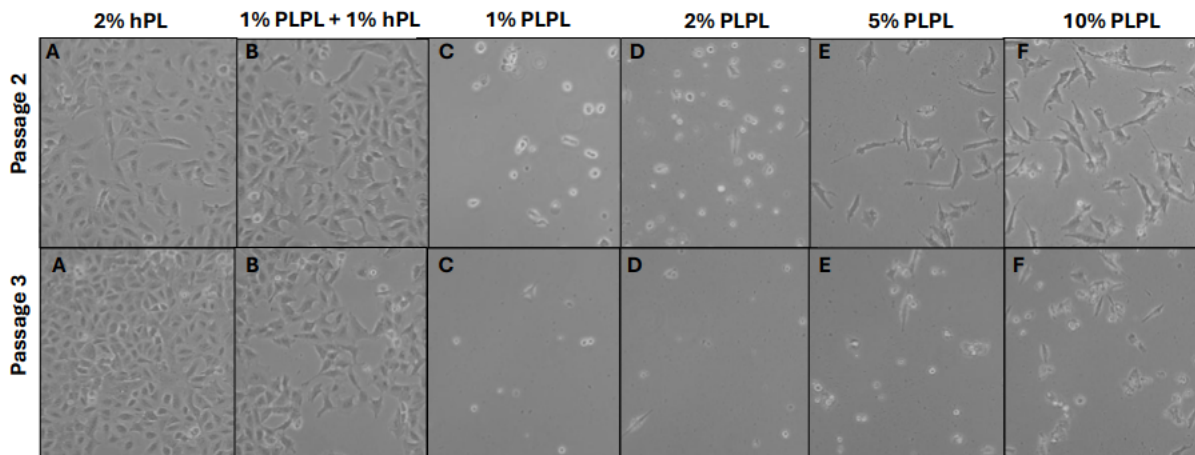


Abbildung 17 | A549-Zellen mit Plättchen ähnlichem Partikel Lysat als Serumersatz

A549-Zellen wurden drei Passagen in unterschiedlichen PLPL-Konzentrationen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen. A-F zeigt die unterschiedlichen Bedingungen bei Passage 2 oder 3.

Nach der zweiten Passage wiesen die Zellen der Kontrolle (2% hPL) eine typische epitheliale Morphologie und eine hohe Dichte auf. Die Kombination aus 1% ZL und 1% hPL resultierte in einer leicht reduzierten Zellzahl, wobei die Zellmorphologie weitgehend intakt blieb. Mit steigenden Konzentrationen von PLPL (1–10%) zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung. Bei 1% PLPL waren weniger Zellen vorhanden, die zudem rundlicher erschienen. Bei 5% und 10% PLPL zeigten die Zellen eine elongierte Formen und eine verringerte Dichte. Jedoch war hier eine Adhäsion an die Zellkulturflasche zu erkennen. Nach der dritten Passage nahm die Zellzahl weiterhin ab und bei 5-10% PLPL verringerte sich die Adhäsion der Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass PLPL in höheren Konzentrationen die Zellen in ihrer regulären Morphologie unterstützten. Es war kein Zellwachstum in allen PLPL-Bedingungen zu beobachten, in den höheren Konzentrationen aber eine Aufrechterhaltung der Zellen, die in die Flasche eingesät wurden.

Bei jeder Passage wurden die Wachstumsraten und Viabilität von A549-Zellen bestimmt (Abbildung 18). Die Viabilität von A549-Zellen der Bedingungen von 1% PLPL bis 10% PLPL konnten nicht bestimmt werden, da zu viel Zelldebris in den Proben enthalten war, wodurch tote Zellen nicht mit der Zelldebris vom PLPL unterschieden werden konnte.

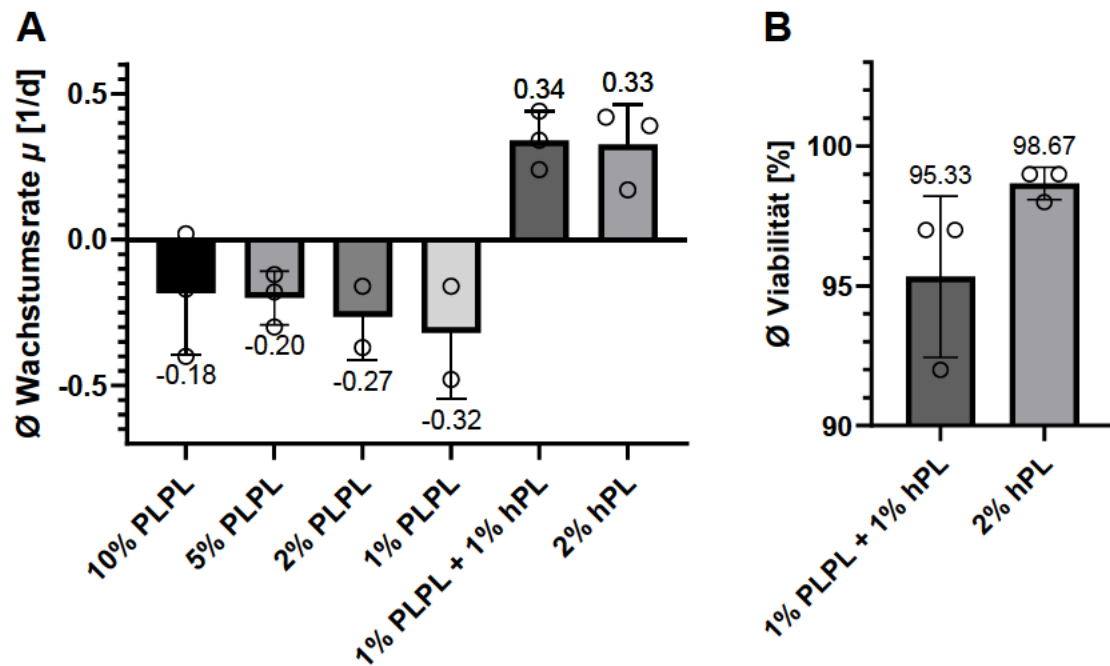


Abbildung 18 | Wachstumsraten und Viabilität von A549-Zellen mit PLP-Lysat

A549-Zellen wurden drei Passagen mit unterschiedlichen Konzentrationen von MEG-01 hergeleiteten PLPL und hPL als Kontrolle kultiviert. Von Passage eins bis drei wurden die durchschnittlichen Wachstumsraten (A) und Viabilität (B) mithilfe der Neubauerkammer bestimmt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Jeder Punkt repräsentiert eine Passage.

A549-Zellen die ausschließlich mit PLPL kultiviert worden sind, zeigten eine negative Wachstumsrate. Es kam zu einem Verlust der Zellen während der Kultivierung. Dennoch konnte ein positiver Effekt von PLPL auf das Wachstum der Zellen festgestellt werden. Je mehr PLPL im Medium zugegeben wurde, desto geringer war der zu beobachtende Zellverlust. Die Wachstumsrate von A549-Zellen mit der Bedingung von 1% PLPL und 1% hPL war mit 0,34 nahezu identisch zu der von 2% hPL mit 0,33 Zellverdopplungen pro Tag. Die durchschnittliche Viabilität von A549-Zellen der Bedingung mit 1% PLPL und 1% hPL betrug 95,3% und die von der 2% hPL-Kontrolle 98,6%. Bei der Zugabe von PLPL wurde die Zellgesundheit nicht beeinträchtigt.

Um zu überprüfen, ob MEG-01 ZL A549-Zellen in ihrem Wachstum fördern könnte, wurde der Versuch nochmals mit dem ZL wiederholt. Dafür wurde in 6-Well-Platten mit verschiedenen Konzentrationen von ZL (1%, 2%, 5% und 10%), einer Kombination von 1% ZL und 1% hPL sowie einer hPL-Kontrolle (2%) ausgesät und kultiviert. A549-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen alle zwei bis drei Tage passagiert, gezählt und mikroskopisch behandelt (Abbildung 19). Das Experiment wurde nach zwei Passagen abgebrochen, da die Zellen kein Wachstum zeigten und das ZL eine toxische Wirkung auf die Zellen hatte.

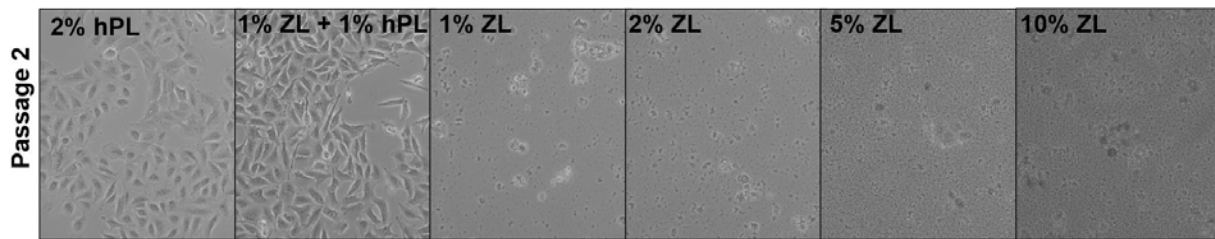


Abbildung 19 | A549-Zellen mit MEG-01 Zelllysatz als Serumersatz

A549-Zellen wurden zwei Passagen in unterschiedlichen ZL-Konzentrationen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Die Aufnahmen wurden bei 100-facher Vergrößerung mit einem Phasenkontrastmikroskop aufgenommen.

Nach der zweiten Passage wiesen die Zellen der Kontrollgruppe (2% hPL) eine typische epitheliale Morphologie sowie eine reguläre Zelldichte auf. Im Gegensatz dazu führte die Kombination von 1% ZL und 1% hPL zu einer reduzierten Zellzahl und einer ausgeprägten elongierten Zellform. Bei alleiniger Zugabe von ZL ohne hPL waren mikroskopisch kaum bis keine lebensfähigen Zellen sichtbar. Mit zunehmenden Konzentrationen von ZL (1–10%) zeigte sich eine deutliche Zunahme von Zelldebris in den jeweiligen Kulturen. Diese Beobachtungen zeigen, dass das ZL weder in Kombination mit hPL noch als alleinige Komponente das Zellwachstum oder die Lebensfähigkeit von A549-Zellen unterstützt. Im Gegenteil, das ZL zeigte eine toxische Wirkung, die sich negativ auf die Zellkulturen auswirkte.

4. Diskussion

Die *in vitro* Kultivierung bildet eine unverzichtbare Grundlage für die moderne biomedizinische Forschung und Industrie [2]. Dabei stellt FBS eine der am häufigsten verwendeten Komponenten dar, um Zellen in Kultur eine physiologisch geeignete Umgebung zu bieten. Aufgrund der ethischen Bedenken hinsichtlich der Gewinnung von FBS, der limitierten Verfügbarkeit sowie der Variabilität seiner Zusammensetzung wird jedoch zunehmend nach Alternativen gesucht [5]. Humanes Plättchenlysat hat sich als vielversprechender Ersatz etabliert. Mohamed et al. zeigte, dass hPL viele Wachstumsfaktoren in höheren Konzentrationen als im FBS enthält und epithelialen Zelllinien eine vergleichbare Proliferation ermöglicht. Trotz der Vorteile von hPL bleibt die Beschaffung eine Herausforderung, da große Mengen freiwillig gespendeten Blutes benötigt werden, um den Bedarf als vollständigen Serumersatz zu decken [6]. Ein alternativer Ansatz beruht auf Studien wie von Isakari et al., die zeigten, dass MEG-01-Zellen nach Differenzierung durch PMA Plättchen ähnliche Partikel generieren können [21]. Ogura et al. beschrieben zudem typische megakaryozytäre Eigenschaften der MEG-01-Zelllinie, einschließlich der Expression von megakaryozytären Oberflächenmarkern, wie das Glykoprotein IIb/IIa und der Aktivität plättchenspezifischer Enzyme [22]. Das Ziel dieser Arbeit war es, aus differenzierten MEG-01- PLPs zu generieren und ein Lysat von diesen als Serumalternative zu untersuchen. Dafür wurde die Differenzierung hinsichtlich der Konzentration von PMA sowie der Expression von CD41a (GPIIb/IIa) analysiert. Zudem wurde die Anreicherung von Wachstumsfaktoren, insbesondere PDGF, im Zellkulturüberstand und Plättchenlysat untersucht. Zuletzt wurden MEG-01 abgeleitete Zell- und PLP-Lysate an A549-Zellen als Serumersatz getestet.

Die Behandlung der MEG-01-Zellen mit PMA führte zu Zellveränderungen, die auf eine Differenzierung der Zellen hindeuten. Morphologisch auffällig war das vermehrte Auftreten vergrößerter Zellen bei der niedrigeren PMA-Konzentration nach der letzten Ruhephase. Dies weist möglicherweise auf den Zustand der Endomitose während der Differenzierung zu Blutplättchen hin, bei dem sich der DNA-Gehalt ohne Zellteilung vervielfacht [17]. Eine Weiterentwicklung der Zellen zu Vorläuferplättchen mit zytoplasmatischen Ausstülpungen konnte dagegen nicht beobachtet werden, was auf eine unvollständige Differenzierung hindeutet. Wie bereits von Ogura et al. beschrieben, zeigen MEG-01-Zellen während der Differenzierung ähnliche morphologische Veränderungen wie hämatopoetische Stammzellen im Übergang zu Megakaryozyten und Blutplättchen [22]. Wachstums- und Viabilitätsanalysen bestätigten diese Beobachtungen. PMA hemmte das Zellwachstum, was der Erwartung entspricht, dass während der Differenzierung kein Zellwachstum stattfindet. Eine höhere PMA-Konzentration (10 nM) führte jedoch zu einem stärkeren Zellverlust. Schweinfurth et al. zeigten ebenfalls, dass hohe PMA-Konzentrationen toxische Effekte auf Zellen haben können [27].

Eine durchflusszytometrische Analyse konnte zwei Populationen von größeren, granuläreren Partikeln (Zellen) und kleineren, weniger granuläreren Partikeln (PLP) nachweisen. Die erhöhte Granularität der kleinen Partikel, gemessen über den SSC, lässt vermuten, dass es sich dabei tatsächlich um PLP handelt. Die Zellpopulation zeigte eine größere Streuung, während die PLP eine dichtere Verteilung aufwies, wobei eine ausgeprägtere Streuung bei 5 nM PMA induziert wurde. Die breitere Streuung bei 5 nM PMA könnte auf eine ineffiziente Differenzierung der MEG-01-Zellen zurückzuführen sein, die zu einer erhöhten Freisetzung von unreifen Vorläufern oder zytoplasmatischen Fragmenten geführt hat, die die zelluläre Heterogenität erhöhen. Die Verteilung und auch die Granularität der Partikel könnte aber auch Hinweise auf unterschiedliche Differenzierungsstadien der Zellen und PLP bieten. Megakaryozyten durchlaufen während ihrer Differenzierung eine Größenveränderung von 10-15 µm auf 50-100 µm [28].

Die in den Experimenten beobachteten morphologischen Veränderungen sind keine alleinigen Indizien, dass MEG-01-Zellen Eigenschaften von Megakaryozyten aufweisen. Nach der Differenzierung exprimieren MEG-01-Zellen spezifische Oberflächenproteine, die für Megakaryozyten und Blutplättchen typisch sind. Dazu gehört das Glykoprotein IIb/IIIa (CD41a), das mittels Durchflusszytometrie in den differenzierten Zellen und Plättchen ähnlichen Partikeln nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass MEG-01-Zellen bei beiden getesteten PMA-Konzentrationen eine erhöhte CD41a-Expression aufwiesen, wobei bei 5 nM PMA-Induktion ein breiteres Fluoreszenzintensitätsspektrum beobachtet wurde. Dieses breitere Spektrum reflektiert die Heterogenität der Partikel innerhalb der Zellpopulation. Im Vergleich dazu zeigten die PLP ein schmaleres Fluoreszenzspektrum, das mit der homogenen Partikelverteilung korreliert. Ein zusätzlicher Faktor, der die Differenzierung beeinflusste, waren die Ruhephasen (24 h und 72 h). Bei 5 nM PMA führte die Ruhephase zu einer verstärkten CD41a-Expression. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass die Ruhezeit nach der PMA-Induktion eine entscheidende Rolle bei der finalen Reifung der Zellen spielt. Die Optimierung der Differenzierung durch unterschiedliche PMA-Konzentrationen zeigte, dass die MEG-01-Zellen typische Eigenschaften von Megakaryozyten annahmen, einschließlich morphologischer Veränderungen von kleineren zu größeren Zellen, Wachstumshemmung und einer verstärkten CD41a-Expression. Die Differenzierung bei 5 nM PMA erwies sich als besonders vorteilhaft durch eine größere Anzahl vergrößerter Zellen, eine geringere Toxizität und eine insgesamt höhere CD41a-Expression. Zusätzliche Ruhephasen zeigten, dass niedrigere PMA-Konzentrationen die CD41a-Expression in den Zellen sowie PLP verstärkte. Die Methode mit 5 nM PMA-Induktion und zwei hintereinander folgenden Ruhephasen (48 h und 72 h) wurden als beste Vorgehensweise zur Differenzierung von MEG-01-Zellen festgestellt. Dennoch ist die Differenzierung noch nicht vollständig. In weiterführenden Experimenten sollte das Differenzierungsprotokoll weiter optimiert werden.

Ein vielversprechender Ansatz zur Optimierung des Differenzierungsprotokolls besteht in der Anwendung regulatorischer Faktoren der humanen Megakaryopoese. Insbesondere spielt Thrombopoetin eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der Signalkaskade, die hämatopoetische Stammzellen in Megakaryozyten und letztlich in Blutplättchen differenziert. Studien von Kawa et al. sowie Takeuchi et al. belegen, dass sowohl die alleinige Anwendung von TPO als auch dessen Kombination mit PMA die Differenzierung in der MEG-01-Zelllinie signifikant fördert und die Produktion Plättchen ähnlicher Partikel erhöht [27] [28].

In einem weiteren Experiment wurde die Anreicherung von dem Wachstumsfaktor PDGF, spezifisch für Megakaryozyten und Blutplättchen untersucht. In den frühen Differenzierungsstadien konnte kein PDGF im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, was auf eine nicht nachweisbare Expression des Wachstumsfaktors zu diesem Zeitpunkt hinweist. Nach der ersten Ruhephase konnte jedoch PDGF nachgewiesen werden, dessen Konzentration nach der zweiten Ruhephase weiter anstieg. Dieser Verlauf spiegelt den natürlichen Differenzierungsprozess wider, bei dem reifere Zellen zunehmend Plättchen produzieren, welche Wachstumsfaktoren wie PDGF enthalten [17]. Die beobachtete Expression von PDGF korreliert mit den morphologischen Veränderungen und der zunehmenden Granularität der Zellen, was die Progression zum megakaryozytären Differenzierungsstatus unterstreicht. Aus der im letzten Stadium differenzierten Zellkultur konnte ein Großteil von PDGF im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, während geringere Mengen in den Lysate der Zellen und PLP nachgewiesen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass PDGF überwiegend in löslicher Form vorliegt, und nur begrenzt in Zellen oder PLP vorhanden ist. Blutplättchen setzen Wachstumsfaktoren primär durch Aktivierung und die damit verbundene Freisetzung ihrer α -Granula frei. Dieser Prozess ist eng mit spezifischen molekularen Mechanismen verknüpft. Ein zentraler Schritt ist die vom von Willebrand-Faktor vermittelte Adhäsion an subendotheliale Strukturen, die über die Bindung an den GPIIb-V-IX-Rezeptorkomplex auf der Oberfläche der Blutplättchen erfolgt. Die daraus resultierende Aktivierung führt zu einer Formveränderung der Blutplättchen und einer gesteigerten Expression von Rezeptoren wie α IIb β 3 (Integrin). Dieses Integrin interagiert unter anderem mit Fibrinogen, was eine weitere Signalkaskade aktiviert. Diese Kaskade bewirkt eine intrazelluläre Calciumfreisetzung, welche die Exozytose der α -Granula und damit die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie PDGF ermöglicht [31]. Möglicherweise induzieren im Kulturmedium enthaltene Serumbestandteile die Freisetzung von PDGF und erklären, warum dieser Wachstumsfaktor im Überstand in höherer Konzentration nachweisbar war. Durch eine Differenzierung der Zellen in serumfreies Medium könnte dieser Einfluss überprüft werden. Möglicherweise kann das PDGF so in den PLP gehalten und bei deren Lyse konzentriert erhalten werden. Ein anderer Ansatz wäre den Kulturüberstand als einen möglichen Serumersatz zu testen. Aus den Ergebnissen ist deutlich geworden, dass MEG-01-Zellen eine

standardisierte und reproduzierbare Plattform für die Produktion von Wachstumsfaktoren bieten könnten.

Die Differenzierung von MEG-01-Zellen wurde in einem CellSTACK wiederholt, um eine größere und konzentriertere Menge an Zell- und PLP-Lysaten zu produzieren. Ein Vergleich zu der Differenzierung in der T175-Flasche sollte Hinweise darauf geben, ob ein größeres Kulturgefäß möglicherweise bessere Differenzierungsbedingungen stellt. Durch den Vergleich der Massen an PDGF pro Gesamtprotein in den Zellkultursystem wurden unterschiedliche Massenverhältnisse festgestellt. Die aus dem CellSTACK hergestellten Lysate wiesen sowohl im ZL als auch im PLPL einen höheren Anteil von PDGF pro Gesamtprotein auf. Die Erwartung war, dass die Massenverhältnisse näher aneinander liegen, da die Rate an produzierten PLPs sich nicht durch eine erhöhte Zellzahl ändern sollte. Vermutlich bietet der CellSTACK bessere Differenzierungsbedingungen für MEG-01-Zellen. Die verbesserte Differenzierung könnte zu einer höheren Anzahl reifer Megakaryozyten führen, die wiederum zu einer erhöhten Produktion von PLP führen. Dies würde die höhere Konzentration von PDGF in den ZL- und PLPL-Proben aus dem CellSTACK erklären.

Aufgrund ihrer hohen Wachstumsrate und stabilen Viabilität wurden A549 als Modellzellen ausgewählt, um zu prüfen, ob FBS durch in MEG-01 hergestelltes Plättchenlysat ersetzt werden kann. Ohne Zugabe von FBS konnten A549-Zellen nicht überleben. Die Verwendung von hPL als Serumalternative zeigte, dass A549-Zellen trotz leicht reduzierter Wachstumsrate weder in ihrer Morphologie noch in ihrer Viabilität beeinträchtigt waren. Dies deutet darauf hin, dass die Zellen, die in hPL enthaltenen Wachstumsfaktoren effektiv nutzen können. Lysat von PLP hingegen, dass im Vergleich zu hPL eine deutlich geringere Konzentration an PDGF aufwies, konnte das Wachstum der Zellen nicht unterstützen. Dennoch konnten dosisabhängige und somit spezifische Effekte beobachtet werden. Höhere Konzentrationen von PLPL (5-10%) führten zwar nicht zu einer direkten Wachstumsförderung, unterstützten aber die Adhäsion der Zellen an die Kulturflasche, was eine deutliche Verbesserung gegenüber dem serumfreien Medium darstellt. Dieser Effekt zeigt, dass PLPL in der Lage ist bestimmte zelluläre Funktionen zu stabilisieren und damit zur Aufrechterhaltung der Kultur beizutragen. Dies unterstreicht das Potenzial von PLPL, unter geeigneten Bedingungen ergänzende Funktionen in der Zellkultur zu übernehmen. Das MEG-01 ZL zeigte in allen getesteten Konzentrationen eine toxische Wirkung auf A549-Zellen. Mit mikroskopischen Analysen wurde gezeigt, dass je mehr Lysat in die Kultur hinzugegeben wurde, umso mehr an Zelldebris war zu beobachten. Um die Toxizität des ZL zu verringern, sollte das Lysat nach der Lyse weiter aufgereinigt werden, um Zelldebris besser zu entfernen.

MEG-01-Zellen stellen ein vielversprechendes Modellsystem für die Herstellung von Serumersatzmaterialien dar. Ihre standardisierte und skalierbare Kultivierung in Systemen wie dem CellSTACK ermöglicht die effiziente Produktion großer Zellmengen und damit eine höhere Ausbeute an PLP und Wachstumsfaktoren wie PDGF. Diese Ansätze bieten eine ethisch vertretbare und ökonomisch nachhaltige Alternative zu traditionellen tierischen Serumprodukten und stehen im Einklang mit den aktuellen Bestrebungen der Zellkulturforschung; tierfreie und ressourcenschonende Produktionsmethoden zu etablieren. Allerdings ist die Differenzierung der MEG-01-Zellen zu Megakaryozyten und die anschließende Produktion von PLP noch nicht vollständig optimiert. Insbesondere die vollständige Reifung der Zellen und die effiziente Generierung von PLP bedürfen weiterer Untersuchungen, um die Produktionsbedingungen weiter zu verbessern. Neben der Verwendung von Zelllysaten als Serumersatz wurde in dieser Arbeit auch die Verwendung von Zellkulturüberständen als vielversprechender Ansatz zur Herstellung eines Serumersatzes erkannt. Zellkulturüberstände stellen eine attraktive Alternative zu Lysaten dar, da sie in der Regel weniger aufwändig zu gewinnen und aufzubereiten sind. Dieser Ansatz sollte jedoch in zukünftigen Versuchen an verschiedenen Modellzelllinien weiter getestet und optimiert werden, um das volle Potenzial als Serumersatz in der Zellkultur zu evaluieren.

5. Materialien und Methoden

5.2 Materialien

5.2.1 Reagenzien

Tabelle 1 | verwendete Reagenzien

Chemikalie	Katalognummer	Lot	Hersteller
Zellkulturwasser	P04-991500	2881022	PAN-Biotech GmbH
Dulbecco's Phosphatpuffer (DPBS)	14190-094	290295	Thermo Fisher Scientific Inc.
Accutase	A6964-100mL	303054	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TrypLE™ Express	12604-054	2767931	Thermo Fisher Scientific Inc.
CASYTon	5651808	177301	OMNI Life Science GmbH + Co. KG
CASYClean	5651787	1,787E+09	OMNI Life Science GmbH + Co. KG
ELAREM™ Perform- FD Plus	PE30611	24-006.03	PL BioScience GmbH
Fetale Bovine Serum	P30-5500	P181203	PAN-Biotech GmbH
Bovine Serum Albumin	A4503-50G	SLCD8207	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin	P04-80100	1900124	PAN-Biotech GmbH
Sodium Pyruvate	S8636-100 mL	RBBL7711	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Pluronic 10%	P08-02100	8370223	PAN-Biotech GmbH
Phorbol-12-Myristat- 13-Acetat	P8139	MKCT0606	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypanblau	T8154	RNBL9246	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RPMI1640	P04-18047	1790121	PAN-Biotech GmbH
IMDM	21980-032	2872464	Life Technologies GmbH

5.2.2 Kits

Tabelle 2 | verwendete Kits

Name	Katalognummer	Hersteller
Pierce™ BCA-Protein-Assay-Kit	23227	Thermo Fisher Scientific Inc.
Guava easyCheck Kit	4500-0025	Luminex Corporation
Guava® ICF Instrument Cleaning Fluid	4200-0140	Luminex Corporation
Human PDGF ELISA Kit	EHPDGFA	Thermo Fisher Scientific Inc.

5.2.3 Antikörper

Tabelle 3 | verwendete Antikörper

Antikörper	Katalognummer	Lotnummer	Hersteller
Isotype REA Control Antibody human IgG1, PE, REAfinity™ Clone REA293	130-113-450	5240804905	Miltenyi Biotec B.V & Co. KG
CD41a Antibody, anti-human, PE, REAfinity™. Clone REA386	130-121-429	5241005956	Miltenyi Biotec B.V & Co. KG
FcR-Blocking Lösung	130-059-901	5240603317	Miltenyi Biotec B.V & Co. KG

5.2.4 Zelllinien

Tabelle 4 | verwendete Zelllinien

Zellname	Interne Lotnummer	Zell-ID
MEG-01	92-181203AD01	1801
A-549	83-240708MAP01	104

Tabelle 5 | verwendete Medium-Zusammensetzung

Zellname	Medium	Zusätze
MEG-01	RPMI 1640	10% FBS
A-549	IMDM	10% FBS 2 nM L-Glutamin 1 mM Sodium Pyruvate

5.2.5 Geräte

Tabelle 6 | verwendete Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Mikroskop	ECLIPSE TS 100	Nikon Europe BV
Mikroskopkamera	MikroCAM II 12 MP	Bresser GmbH
Inkubatoren	Steri-Cycle-i250 HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific Inc. Heraeus Holding GmbH
Sterilwerkbank	HERsafe KS 12	Thermo Fisher Scientific Inc.
Analysewaage	CP124S	Sartorius AG
Zellzähler	CASY® Mobil-TTC	Schärfe System GmbH
Zählkammer	Neubauer	VWR International GmbH
Mikroplattenreader	Safire II-Basic	Tecan Austria GmbH
Wasserbad	WNE 14	Memmert GmbH + Co. KG
Durchflusszytometer	Guava easyCyte HT	Merck KGaA
Zentrifuge	SL Plus Series VWR® MegaStar 1.6 R	Thermo Fisher Scientific Inc. VWR International GmbH
PARR-Bomb	4635 Cell Disruption Vessel, 920 mL, T316SS, with 1831 Nitrogen Filling Connection	Parr Instrument Company
Einkanalpipetten 0,5 – 10 µL 10 – 100 µL 20 – 200 µL 100 – 1000 µL	Reference 1869184 Research® Plus Research® Plus Research® Plus	Eppendorf SE Eppendorf SE Eppendorf SE Eppendorf SE
Mehrkanalpipette 50 – 1200 µL	Xplorer®	Eppendorf SE
Pipettierhilfe	Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH
Kühlschränke/ Tiefkühler		

	4 °C -20 °C -80 °C, TSCSeries	GGM Gastro International GmbH GGM Gastro International GmbH Thermo Fisher Scientific Inc.
Plattenformschüttler	Titramax 100	neoLab Migge GmbH
Stickstofftank	Chronos Labotech Isothermal V-1500	Messer Custom BioGenic System

5.2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7 | verwendete Verbrauchsmaterialien

Materialien	Katalognummer	Hersteller
Zellkulturflaschen:		Sarstedt AG & Co. KG
T25 (Suspension)	83.3910.502	
T75 (Suspension)	83.3911.502	
T175 (Suspension)	83.3912.502	
T25	83.3910.002	
T75	83.3911.002	
T175	83.3912.002	
CellSTACK 10er Layer	3313	Corning Incorporated
Platten:		Sarstedt AG & Co. KG
96-Well (Suspension)	83.3924	
6-Well	83.3920	
Zentrifugengefäße:		Sarstedt AG & Co. KG
15 mL	62.554.502	
50 mL	62.547.254	
500 mL	431123	Corning Incorporated
Zentrifugenbehälter	431123	Corning Incorporated
Mikroreaktionsgefäße		
1,5 ml	72.690.001	Sarstedt AG & Co. KG
Serologische Pipetten		Sarstedt AG & Co. KG
1 ml	86.1251.001	
2 ml	86.1252.001	
5 ml	86.1253.001	
10 ml	86.1254.001	
25 ml	86.1685.001	
50 ml	86.1256.001	

Pipettenspitzen:		
20 µL	70.3020.255	Sarstedt AG & Co. KG
20 – 100 µL	70.760.212	
20 – 200 µL	70.760.211	
1000 µL	70.3050.275	
1250 µL	70.3060.205	
CASY® cups	5651794	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG
Reservoirs	732-0794	VWR International GmbH

5.2.7 Software

Tabelle 8 | verwendete Software

Bezeichnung	Hersteller
MS Office Paket	Microsoft Corporation
GraphPad Prism, Version 8.0.2 und 10.4.1	Graphpad Software
MicroCamLab, Version 7.3.1.8	Bresser GmbH
guavaSoft™, Version 3.1.1	Merck KGaA

5.3 Methoden

5.3.1 Auftauen und Kultivieren von humanen Zellen

Zum Auftauen wurden die von acCELLerate bereitgestellten Zellen aus dem Stickstofftank entnommen. Das Medium wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt und das Kryoröhrchen wurde für zwei bis drei Minuten im Wasserbad aufgetaut. Danach wurden 4 mL Medium in eine serologische Pipette aufgenommen und die Zellsuspension des Kryoröhrchen wurde in die gleiche Pipette mit aufgenommen. Die gesamte Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, in dem bereits 5 mL Medium vorgelegt waren. Das Kryoröhrchen wurde mit der Zellsuspension gespült und in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen wurden dann für drei Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Aspirette abgesaugt und das Zellpellet wurde durch Schnipsen gelockert. Das Pellet wurde in 10,2 mL Medium resuspendiert und daraus wurde eine 200 µL Probe für die Zellzahlermittlung mit dem CASY® genommen. Nach der Messung im CASY® wurden die Zellen nach gewünschter Dichte ausgesät. Die Zellen sollten dabei zunächst drei Tage in Kultur bleiben.

Passagieren von adhärenenten und semi-adhärenenten Zellen:

Für ein stabiles Wachstum der Zellen sollte das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt werden. Für die Passage von semiadhärenenten Zellen wurde die gesamte Zellkultur durch Kippen aus einer Kulturflasche in ein 50 mL oder 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturflasche wurde mit DPBS gewaschen, um Reste des FBS zu entfernen. Der DPBS-Puffer wurde ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen überführt und auf die Zellen wurde ein Ablösereagenz gegeben (Tabelle 9). Nach drei bis fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (Accutase) oder 37°C (TrypLE™ Express) wurden die Zellen durch leichtes Klopfen an der Flasche gelöst. Am Mikroskop wurde überprüft, ob alle Zellen abgelöst waren. Um die Reaktion des Ablösereagenz zu stoppen wurde Medium mit FBS oder einem Serumersatz in die Flasche gegeben und die gesamte Suspension wurde zu der schon bestehenden Zellsuspension gegeben. Adhärenente Zellen wurden gleichbehandelt, jedoch wurde das Medium und der DPBS-Puffer vollständig entfernt, und lediglich die durch Ablösung gewonnenen Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zentrifugenröhrchen wurde bei 200 x g für drei bis fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Aspirette abgesaugt und das Pellet wurde durch leichtes Schnipsen gelockert. Je nach Pelletgröße wurde dieses in 10-20 mL frisches Medium resuspendiert. Bei mehreren Zentrifugenröhrchen wurden die Pellets von klein nach groß resuspendiert und die Zellsuspensionen wurden zusammengeführt. Eine 200 µL Probe wurde für den CASY® entnommen und die Zellzahl wurde gemäß der Methode 5.3.2 bestimmt. Danach wurden die Zellen entsprechend eingesät (Tabelle 10).

Tabelle 9 | Kulturgefäße

Gefäß	Fläche [cm ²]	DPBS [mL]	Ablösereagenz [mL]	Kulturmedium [mL]	Kultumedium [mL] adhärent	Kulturmedium [mL] suspension
6 Well	9,6	1	1	2	2	2
T25	25	3	2	8	8	10
T75	75	5	2	8	15	12-40
T175	175	10	3	10	30	25-80
10er CellSTACK	6320	250	100	500	1000	1800

Tabelle 10 | Einsaaten verschiedener Zelllinien

Zelllinie	Einsaat 2 Tage	Einsaat 3 Tage	Einsaat 4 Tage
A549	2 x 10 ⁴ c/cm ²	1 x 10 ⁴ c/cm ²	-
MEG-01	-	2 x 10 ⁵ c/ mL	1 x 10 ⁵ c/mL

5.3.2 Zellzählung mit dem CASY®-Analyzer

Der CASY®-Analyser dient der präzisen Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension und erfasst zusätzlich wichtige Parameter wie Viabilität, Aggregationsfaktor und den Anteil an Debris. Für die Messung wurde eine Probe von 200 µL der Zellsuspension entnommen. Zur Vorbereitung der Probe wurde diese entsprechend der Trübe in der Elektrolytlösung CASY®-Ton verdünnt und in einen CASY®-Cup gefüllt. Davon wurden 70 µL in den CASY®-Cup mit 6950 µL CASY®-Ton durch Reverse-Pipettieren gegeben. Der CASY®-Cup wurde daraufhin dreimal invertiert, um eine gründliche Durchmischung der Zellprobe zu gewährleisten. Anschließend wurde der CASY®-Cup unter die Messkapillare des Geräts platziert. Die Probe fließt durch eine definierte Öffnung in der Kapillare, während eine elektrische Spannung angelegt wird. Diese Spannung führt zu Änderungen im elektrischen Widerstand, die durch die Zellen verursacht werden. Die Elektroden messen diese Änderungen und wandeln sie in elektrische Signale um. Jedes Signal ist spezifisch für die jeweilige Zellgröße und ermöglicht so eine genaue Bestimmung der Zellzahl. Nach der Messung sollten die Ergebnisse den folgenden Kriterien entsprechen: Der Aggregationsfaktor sollte unter zwei liegen, die Zellzahl sollte zwischen 2000 und 20.000 liegen, und der Peak des Zelldebris darf nicht mehr als das Zehnfache des Peaks der lebenden Zellen betragen. Anhand der gemessenen Zellzahl und den Kultivierungszeiten konnte mit der Formel die Wachstumsrate μ bestimmt werden:

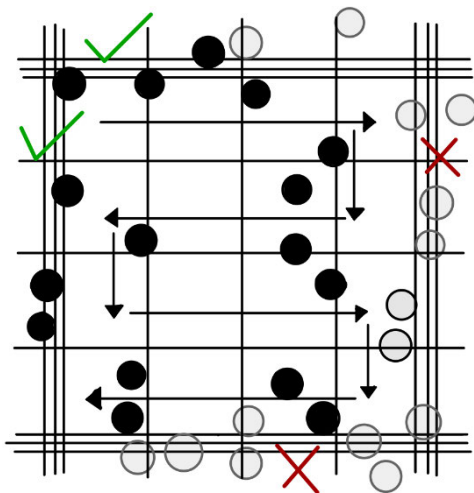
$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{N_L}{N_A} \right)}{\Delta t} \quad (1)$$

mit:

μ	Wachstumsrate [1/d]
N_L	totale Lebendzellzahl [Zellen]
N_A	totale Aussaatzellzahl [Zellen]
Δt	Zeit der Kultivierung [Tage]

5.3.3 Zellzählung mit der Neubauerkammer

Mit der der Neubauerkammer kann die Zellzahl einer Zellsuspension gezählt werden. Die Neubauerkammer besteht aus einem dünnen Deckglas und einer dickeren Glasplatte. Auf der Mitte der Glasplatte befindet sich ein Liniennetz, welches insgesamt vier gleich große Zählfelder ausbildet. Für die Zählung der Zellen wurden diese 1:2 mit einer 2x Trypanblaulösung gefärbt. Für die Vorbereitung der Kammer wurde das Deckglas leicht angehaucht und vorsichtig auf die Glasplatte geschoben, sodass sich ein Vakuum gebildet hat und das Deckglas beim Umdrehen fest war. 10 μL der vorbereiteten Zellsuspension wurden an den Rand des Deckglases gegeben und durch Kapillarkräfte wurde die Probe unter das Glas gezogen.



In Abbildung 20 ist aufgezeigt in welcher Reihenfolge die Zellen gezählt wurden. Dabei wurde beachtet, dass die Kästen im Durchschnitt eine Zellzahl von 20-100 hatten. Helle Zellen sind vitale Lebende Zellen, dunkelblaue Zellen haben eine durchlässige Membran und werden als tote Zellen gezählt. Die Zellen werden den Pfeilen folgend ausgezählt. Zellen die nicht in dem Kasten, sondern auf dem Rand liegen werden oberhalb und auf der linken Seite mitgezählt.

Abbildung 20 | Vorgangsweise der Zellzählung mit der Neubauerkammer

Die Zellen wurden den Pfeilen nachfolgend gezählt. Zellen die am oberen Rand auf dem linken Rand liegen wurden mitgezählt. Alle grauen Zellen wurden nicht mitgezählt. Angepasst nach: [29]

Nach dem Auszählen kann mit diesen Formeln die Viabilität und Zellzahl bestimmt werden:

$$V = \frac{\varnothing \text{Anzahl Lebendzellen}}{\varnothing \text{Anzahl Totzellen} + \varnothing \text{Anzahl Lebendzellen}} \times 100 \quad (2)$$

$$N = \emptyset \text{Anzahl Lebendzellen} \times 10000 \times VF \times VZS \quad (3)$$

mit:

V	Viabilität [%]
N	Gesamtzellzahl
VF	Verdünnungsfaktor
VZS	Volumen Zellsuspension [mL]

5.3.4 Optimierung der Differenzierung von MEG-01-Zellen mit PMA

Für die optimale Differenzierung wurden MEG-01-Zellen in zwei unterschiedlichen T25-Flaschen mit PMA differenziert. Das PMA fördert die Proteinkinase C, welche die Differenzierung bei MEG-01-Zellen zu Megakaryozyten aktiviert. Beide Flaschen wurden mit 10 mL RPMI 1640 Medium versetzt und mit einer Zelldichte von 5×10^5 c/mL ausgesät. Die eine Flasche enthielt eine PMA-Konzentration von 5 nM die andere eine von 10 nM. Die Zellen wurden dann für zwei Tage bei 37°C und 5% CO₂ differenziert. Danach wurden aus beiden Flaschen die Zellen durch Kippen in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt und die Flasche wurde mit 2 mL DPBS gewaschen. Das DPBS wurde ebenfalls in die Zentrifugenröhrchen überführt und es wurde 1 mL Accutase in die Flasche gegeben, welche dann für drei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Durch leichtes Klopfen an der Flasche wurden die adhärennten Zellen gelöst und in die Flasche wurde 8 mL Medium gegeben. Die Zellsuspension wurde in das Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspensionen wurden bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 2 mL Aspirette abesaugt und das Pellet wurde durch Schnipsen gelöst. Die Zellen wurden in 10,2 mL Medium resuspendiert und es wurde eine 200 µL Probe für die Zellzählung entnommen. Von den Zellsuspensionen wurden je 2 mL Probe für die Antikörperfärbung entnommen. Die Zellsuspensionen wurde dann wieder in neue T25-Flaschen überführt und für einen Tag bei 37°C und 5% CO₂ differenziert. Das Medium wurde danach einmal ausgewechselt und dann wurden die Zellen für weitere drei Tage bei gleicher Temperatur differenziert (Ruhephasen). Danach wurden die Zellen gleichermaßen abgelöst und gezählt und es wurde erneut eine 2 mL Probe für die Antikörperfärbung entnommen

5.3.5 Antikörperfärbung

Für die Antikörperfärbung wurde eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen verwendet. Zunächst wurden 500 μL der Zellsuspension in zwei 1,5-mL-Reaktionsgefäße pipettiert und für drei Minuten bei $200 \times g$ zentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde je nach Volumen (50 - 500 mL) für 10.- 30 Minuten bei $4000 \times g$ zentrifugiert, um Plättchen ähnliche Partikel zu pelletieren. Nach Entfernen des Überstands wurden die Pellets in einer 0,5%-DPBS/BSA-Lösung resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei $200 \times g$ oder $4000 \times g$ zentrifugiert. Auf die Pellets wurden 98 μL einer 1:5 verdünnten FcR-Lösung hinzugegeben. Die Proben wurden dann bei 4°C für 10 Minuten inkubiert um unspezifische Bedingungen zu Blockieren. Nach der Inkubation wurden 2 μL des Isotyps IgG1 oder des CD41a-Antikörpers hinzugefügt, um spezifische Marker auf den Zelloberflächen zu markieren. Die Zellen wurden für zehn Minuten bei 4°C inkubiert, um eine vollständige Bindung der Antikörper zu gewährleisten. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit DPBS/BSA, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei $200 \times g$ oder $4000 \times g$ wurden die Pellets in der 0,5% DPBS/BSA-Lösung resuspendiert und in die Probengefäße für die Durchflusszytometrie überführt. Die Messung ist in der Methode 5.3.6 beschrieben.

5.3.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Einzelanalyse von Partikeln, indem diese in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander durch einen fokussierten Laserstrahl geführt werden. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Partikel werden Streu- und Fluoreszenzsignale erzeugt, die detaillierte Informationen über die Eigenschaften der Partikel liefern. Zu den zentralen Parametern in der Durchflusszytometrie gehört die Vorwärtstreulichtintensität (FSC) und die Seitwärtstreulichtintensität (SSC). Der FSC korreliert in erster Linie mit der Partikelgröße, da größere Partikel mehr Licht in Vorwärtsrichtung streuen. Im Gegensatz dazu liefert der SSC Informationen über die Granularität und Komplexität der Partikel. Diese Parameter spiegeln die innere Struktur wider. Eine erhöhte SSC-Intensität deutet auf einen hohen Anteil subzellulärer Strukturen wie Granula, Vesikel oder Organellen hin, was auf eine höhere Granularität schließen lässt. Durch die Verwendung spezifisch markierter Antikörper, die an Oberflächenantigene der Partikel binden, können verschiedene Populationen genau identifiziert werden. Der Grad der Differenzierung wird häufig anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) beurteilt, wobei ein höherer MFI-Wert darauf hinweist, dass ein größerer Anteil der Partikel den spezifischen Marker exprimiert. Diese Methode ermöglicht somit eine differenzierte und quantitative Charakterisierung von Partikelpopulationen.

5.3.7 PDGF-Anreicherung während der MEG-01 Differenzierung

Ein weiteres Maß für den Erfolg der Differenzierung von MEG-01-Zellen zu megakaryozytären Zellen ist der Nachweis der Expression des Wachstumsfaktors PDGF. Dafür wurden MEG-01-Zellen in eine T175 Flasche mit einer Zelldichte von 5×10^5 c/mL ausgesät und für zwei Tage mit 5 nM PMA induziert. Darauf folgten zwei nacheinander folgende Ruhephasen von 48 und 72 Stunden. Nach der PMA-Induktion und den Ruhephasen wurden Proben von den Überständen (Ü1-Ü4) entnommen und mittels ELISA quantifiziert (Methode 5.3.11). Nach der zweiten Ruhephase wurden Lysate von MEG-01-Zellen und den produzierten PLP mithilfe der PARR-Bomb hergestellt. Die Lysate wurden ebenfalls mit ELISA quantifiziert. Das Differenzierungsprotokoll ist in Abbildung 21 gezeigt.

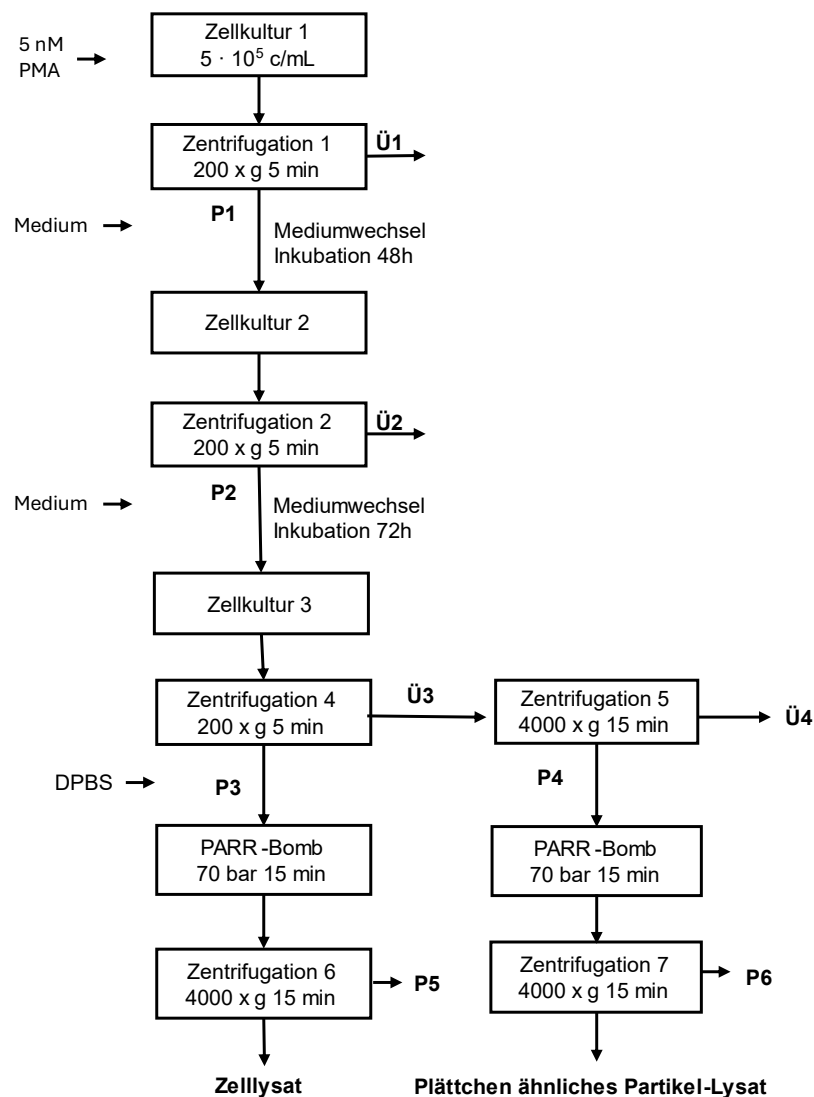


Abbildung 21 | Differenzierungsprozess von MEG-01-Zellen mit 5 nM PMA

Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs zur Differenzierung von MEG-01-Zellen mit anschließender Zelllyse. MEG-01-Zellen wurden mit 5 nM PMA inkubiert, und es erfolgten zwei hintereinanderfolgende Ruhephasen (48h und 72h). Nach der Differenzierung erfolgte die Zelllyse mittels PARR-Bomb und Zentrifugation zur Isolierung von MEG-01 Zell- und PLP-Lysat.

5.3.8 Aufschluss mit der PARR-Bomb

Der Zellaufschlussreaktor lysiert Zellen mithilfe von Druck und Stickstoff. Für die Probenvorbereitung wurden 1×10^8 c/mL verwendet, die pelletiert und in DPBS resuspendiert wurden. Die Probe wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen gegeben. Das Zentrifugenröhrchen wurde geöffnet in den Reaktor gegeben, und das Tauchrohr wurde in die Konische Mitte des Zentrifugenröhrchen gesteckt. Der Reaktor wurde fest verschlossen. Stickstoff wurde in den Reaktor geleitet, um die Zellen zu umströmen. Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Verteilung in der Probe wurde ein Druck von 70 bar angewendet und für eine Dauer von 15 Minuten aufrechterhalten. Während dieses Prozesses wurde die PARR-Bomb auf Eis gelagert. Nach 15 Minuten wurde das Ventil zur Probenentnahme langsam geöffnet und die Probe in einen vorgekühlten, sterilen 500 mL Zentrifugenbecher überführt, dessen Öffnung mit Parafilm abgedeckt war. Durch den starken Druckabfall bildet der gelöste Stickstoff Gasbläschen in den Zellen und dehnt diese aus, wodurch diese lysiert werden. Sobald keine Probe mehr aus dem Tauchrohr austrat, wurde die PARR-Bomb geöffnet und die restliche Probe aus den Zentrifugenröhrchen entnommen. Das Lysat wurde anschließend entsprechend dem Probenvolumen in ein Zentrifugenröhrchen umgefüllt und bei $4000 \times g$ für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet enthielt Zelltrümmer, während der Überstand das Zelllysate enthielt. Das Lysat wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

5.3.9 Differenzierung der MEG-01-Zellen im CellSTACK

Die Differenzierung erfolgte mit einer Konzentration von 5 nM PMA im CellSTACK. Dazu wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^5 c/ mL ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 für zwei Tage differenziert. Danach wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert und gezählt (Methode 5.3.1 und 5.3.2). Für die Durchflusszytometrie wurde eine 2 mL Probe von der Zellsuspension und dem Überstand nach der ersten Zentrifugation entnommen. Danach wurden die Zellen in einen neuen CellSTACK überführt und für zwei weitere Tage differenziert in Form einer Ruhephase. Nach zwei Tagen wurde der Vorgang wiederholt und das Medium gewechselt. Die Zellen wurden dann noch drei weitere Tage differenziert. Hier wurde der Vorgang erneut wiederholt und die Zellen wurden für die Lysierung mit der PARR-Bomb vorbereitet (Methode 5.3.8). Dafür wurden die Zellen bei $200 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Zentrifugationsbecher überführt und erneut bei $4000 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert, da während der Differenzierung Plättchenähnliche Partikel in das Medium abgegeben werden könnten, welche effizient für einen Serumersatz sind. Die Zellen wurden in der Zeit gezählt, nochmals runterzentrifugiert bei $200 \times g$ für 5 Minuten und in DPBS resuspendiert, sodass die Zellzahl bei 1×10^8 c/mL lag. Nach der Zentrifugation des

Zellüberstandes wurde der Überstand der möglichen Plättchen entfernt und diese wurden in gleicher Volumenmenge wie die Zellen resuspendiert. Beide Proben wurden mithilfe der PARR-Bomb lysiert (Methode 5.3.8).

5.3.10 BCA-Assay

Der Assay weist kolorimetrisch die Gesamtproteinkonzentration von Zelllysaten, Affinitätssäulenfraktionen und gereinigten Proteinproben nach. Der Assay beruht auf der Biuretreaktion, wobei mindestens zwei Peptidverbindungen in einer wässrig alkalischen Lösung einen farbigen Chelatkomplex Kupferionen eingehen. Danach reagiert BCA mit dem reduzierten Kupferkation, wodurch ein violetter Farbkomplex entsteht, welcher mit steigender Proteinkonzentration eine lineare Absorption bei 562 nm aufweist. Für den Assay wurden die Proben 1:20, 1:50 und 1:100 verdünnt, um im Messbereich von 20-2000 µg/mL zu bleiben. Die Standards wurden, wie in Tabelle 7 pipettiert. Die Arbeitslösung je nach Probenanzahl nach den Herstellerangaben mit Formel (4) berechnet und hergestellt. Pro Well wurden 100 µL der Arbeitslösung und 20 µL der Probe pipettiert.

$$V_{AL} = (n_S \times n_U) \times (n_R) \times (V_P) \quad (4)$$

mit:

V_{AL}	Gesamtvolumen Arbeitslösung
n_S	Anzahl Standards
n_U	Anzahl Unbekannte Proben
n_R	Anzahl Replika
V_P	Volumen Arbeitslösung pro Probe

Tabelle 11 | Standardverdünnungen

Probe	Volumen Zellkulturwasser [µL]	Volumen BSA [µL]	BSA-Konzentration [µg/mL]
A	125	300	2000
B	325	375	1500
C	175	325	1000
D	175	175 von B	750
E	325	325 von C	500
F	325	325 von E	250
G	325	325 von F	125
H	400	100 von G	25
I	400	0	0

5.3.11 ELISA PDGF Assay

Der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) weist die Konzentration eines spezifischen Proteins mithilfe der Sandwich-Methode nach. In dem Kit war eine beschichtete 96-well Platte enthalten, die mit einem Antikörper gegen PDGF beschichtet war. Für die Durchführung des Assays wurden zunächst alle Lösungen vorbereitet. Dazu zählte der 20x Wasch-Puffer und die Assay-Verdünnungslösung. Diese wurden nach Herstellerangaben entsprechend verdünnt. Die Standardreihe wurde mit der Assay-Verdünnungslösung nach Tabelle 12 verdünnt. Die Proben wurden verdünnt und auf die 96-well Platte wurden pro Well je 100 µL Probe gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und für zweieinhalb Stunden bei Raumtemperatur und 750 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung mit allen nicht gebundenen Substanzen abgesaugt und es wurde 300 µL Wasch-Puffer zu jeder Probe hinzugegeben. Der Schritt wurde vier Mal wiederholt und beim letzten Mal wurde die Well-Platte auf ein mit 70%-Ethanol eingesprühten Papiertuch umgedreht und leicht beklopft, um alle Reste des Puffers zu entfernen. Danach wurde 100 µL des biotinylierten Detektionsantikörper hinzugegeben und für eine Stunde bei leichten Schütteln und Raumtemperatur inkubiert. Dabei bindet dieser an andere Epitope des PDGF, wodurch ein Sandwich-Komplex entsteht. Danach wurde der Waschschrift wiederholt und die Streptavidin-HRP-Lösung wurde 200-fach mit der Assay-Verdünnungslösung verdünnt. Dann wurde 100 µL des Streptavidin-HRP-Konjugat auf die Wells gegeben und für 45 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Das Streptavidin-HRP-Konjugat bindet hier an das Biotin-Konjugat. Nach der Inkubationszeit wurden die Wells erneut gewaschen und 100 µL des TMB-Substrates wurde in die Wells gegeben und die Platte wurde mit einer Alu-Folie abgedeckt und für 30 Minuten bei leichtem Schütteln und Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zeit wurde 50 µL der Stop-Lösung hinzugegeben, die zu einem Farbumschwung von Blau zu Gelb führt. Nachdem die Stop-Lösung hinzugegeben wurde, wurde die Platte bei einer Absorption von 450 nm vermessen.

Tabelle 12 | Standardreihe für den PDGF ELISA

Probe	Assay Diluent [µL]	PDGF-Standard [µL]	PDGF-Konzentration [µg/mL]
A	0	667	30000
B	400	200 von A	10000
C	400	200 von B	3333
D	400	200 von C	1111
E	400	200 von D	370,4
F	400	200 von E	123,5
G	400	200 von F	41,15
H	400	200 von G	250

5.3.12 Plättchenlysate als Serumersatz

Für die Evaluierung der Wirkung des hergestellten Lysats wurden A549-Zellen als Modellzelllinie verwendet. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von ein bis zwei Wochen in Medium mit 5 % humanem Plättchenlysate (hPL) kultiviert, um die Anpassung der Zellen an Wachstumsfaktoren zu fördern, die in den Lysaten erwartet werden. Das verwendete Plattenlayout ist in Abbildung 22 dargestellt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde jedem Medium 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugesetzt. In der Kultur wurden die Zellen in den verschiedenen Wells mikroskopisch untersucht, um das Zellwachstum und die Adhärenz zu überprüfen. Bei Passagen wurde für nicht adhärenente Zellen das gesamte Medium entnommen und in ein 15-mL-Zentrifugenröhrchen überführt. Bei adhärenenten Zellen wurde das Medium mithilfe einer Aspirette abgesaugt. Anschließend wurden die Wells mit 1 mL DPBS gespült, dieses wurde entweder ebenfalls in das entsprechende Zentrifugenröhrchen überführt oder abgesaugt. Zur Zellablösung wurde TrypLE™ Express zu den Wells gegeben, und die Platte wurde für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen gelöst. Die Wells mit Lysat wurden mit 2 mL Medium, das 1 % Lysat enthielt, gespült und der Inhalt in die jeweiligen Zentrifugenröhrchen überführt. Die Kontrolle wurde mit Medium, das 2 % hPL enthielt, behandelt. Anschließend wurden alle Wells erneut mit 2 mL Medium gespült. Die Zellen in den Zentrifugenröhrchen wurden für 3 Minuten bei 200 × g zentrifugiert, der Überstand mit einer Aspirette entfernt und die Zellpellets in 100–500 µL Medium resuspendiert. Für die Zellzählung wurde eine 10-µL-Probe in einer Zählkammer analysiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach Methode 5.3.3. Basierend auf der ermittelten Zellzahl wurden die Zellen in der gewünschten Aussaatdichte ausgesät.

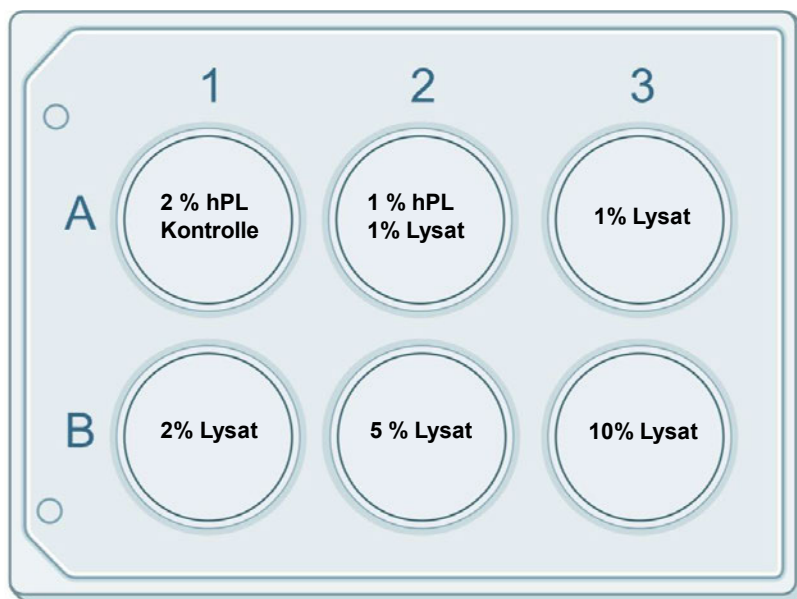


Abbildung 22 | Plattenlayout Testung der Lysate

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei der Firma acCELLerate GmbH und ihren Geschäftsführern Dr. Alexander Loa und Dr. Oliver Wehmeier bedanken. Sie haben mir die wertvolle Möglichkeit gegeben meine Bachelorarbeit in ihrem Unternehmen durchzuführen. Eine Erfahrung, die mich sowohl fachlich als auch persönlich enorm bereichert hat. Ein besonderer Dank gilt Dr. Oliver Wehmeier für die herausragende Betreuung. Oli, ich bin dir unendlich dankbar für deine investierte Zeit, deine wertvollen Ratschläge und deine Unterstützung. Deine Offenheit, Geduld und dein Fachwissen haben mir sehr geholfen diese Arbeit zusammenzustellen!

Ein weiterer Dank gilt an Prof. Dr. Julien Béthune für die Übernahme der Betreuung und Korrektur der Bachelorarbeit und die investierte Zeit.

Ein großes Dankeschön geht an das gesamte Team der Forschung und Entwicklung. Felix Hackstein, Viktoria Patzelt, Jennifer Boldt und Lukas Focke, danke dass ihr mich so herzlich aufgenommen habt, mir im Labor geholfen und meine vielen Fragen geduldig beantwortet habt. Eure Unterstützung hat mir den Arbeitsalltag nicht nur erleichtert, sondern auch sehr viel Freude bereitet. Einen ganz besonderen Dank möchte ich Johannes Peteler aussprechen. Du hast mich jederzeit unterstützt, sei es bei der Planung, Durchführung oder Auswertung meiner Experimente. Dein Fachwissen, deine Hilfsbereitschaft und dein Engagement haben einen enormen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Danke, dass du immer da warst, wenn ich dich gebraucht habe!

Ein weiterer Dank geht an meinen Partner Daniel Stach. Danke, dass du mich in jeder Phase dieser Arbeit unterstützt hast, sei es durch dein offenes Ohr, deine aufmunternden Worte oder deine hilfreichen Ratschläge. Du hast mir nicht nur wertvolle Tipps gegeben und meine Arbeit mit einem kritischen Blick Korrektur gelesen, sondern mir auch in stressigen Momenten den Rücken gestärkt. Dein Verständnis und deine Geduld haben mir geholfen, auch in herausfordernden Zeiten fokussiert zu bleiben. Ohne dich wäre ich heute nicht da, wo ich bin, dafür bin ich dir wirklich sehr dankbar. Я люблю тебя <3

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ihr habt mir mein Studium ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt, dafür kann ich euch gar nicht genug danken. Ein ganz großer Dank geht an meine Schwester Wiebke Jadzia Pfützner. Danke, dass ich mit dir über meine Sorgen sprechen konnte, dass du mich immer wieder aufgebaut und mir Mut zugesprochen hast <3.

7. Literaturverzeichnis

- [1] G. Gstraunthaler und T. Lindl, „Serumfreie Zellkultur“, in *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, G. Gstraunthaler und T. Lindl, Hrsg., Berlin, Heidelberg: Springer, 2021, S. 115–124. doi: 10.1007/978-3-662-62606-1_7.
- [2] J. M. Duarte Rojas, L. M. Restrepo Múnera, und S. Estrada Mira, „Comparison between Platelet Lysate, Platelet Lysate Serum, and Fetal Bovine Serum as Supplements for Cell Culture, Expansion, and Cryopreservation“, *Biomedicines*, Bd. 12, Nr. 1, Art. Nr. 1, Jan. 2024, doi: 10.3390/biomedicines12010140.
- [3] D. M. Ornitz und N. Itoh, „The Fibroblast Growth Factor signaling pathway“, *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, Bd. 4, Nr. 3, S. 215–266, Mai 2015, doi: 10.1002/wdev.176.
- [4] R. N. Moman, N. Gupta, und M. A. Varacallo, „Physiology, Albumin“, in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Zugegriffen: 12. Januar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/>
- [5] C. E. A. Jochems, J. B. F. Van Der Valk, F. R. Stafleu, und V. Baumans, „The Use of Fetal Bovine Serum: Ethical or Scientific Problem?“, *Altern Lab Anim*, Bd. 30, Nr. 2, S. 219–227, März 2002, doi: 10.1177/026119290203000208.
- [6] „Panexin CD, Serum Replace“, PAN-Biotech. Zugegriffen: 2. Februar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://shop.pan-biotech.de/Panexin-CD-Serum-Replacement-with-Defined-Components/P04-93100>
- [7] H. E. Mohamed, M. E. Asker, N. S. Kotb, und A. M. El Habab, „Human platelet lysate efficiency, stability, and optimal heparin concentration required in culture of mammalian cells“, *Blood Res*, Bd. 55, Nr. 1, S. 35–43, März 2020, doi: 10.5045/br.2020.55.1.35.
- [8] M. Holinstat, „Normal platelet function“, *Cancer Metastasis Rev*, Bd. 36, Nr. 2, S. 195–198, Juni 2017, doi: 10.1007/s10555-017-9677-x.
- [9] T. Burnouf, D. Strunk, M. B. C. Koh, und K. Schallmoser, „Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation?“, *Biomaterials*, Bd. 76, S. 371–387, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.065.
- [10] C.-H. Heldin und B. Westermark, „Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor“, *Physiological Reviews*, Bd. 79, Nr. 4, S. 1283–1316, Jan. 1999, doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
- [11] V. Meftahpour u. a., „Platelet lysate: A promising candidate in regenerative medicine“, *Regenerative medicine*, Bd. 16, Feb. 2021, doi: 10.2217/rme-2020-0065.

- [12] „BioRender“. Zugegriffen: 2. Februar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://app.biorender.com/?iss=https%3A%2F%2Fbiorender.us.auth0.com%2F>
- [13] „ELAREM™ Perform-FD PLUS I Research Grade“, PL BioScience. Zugegriffen: 12. Januar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.pl-bioscience.com/products/elarem-perform-fd-plus-research-grade/>
- [14] „(2) (PDF) Feasibility of Human Platelet Lysate as an Alternative to Foetal Bovine Serum for In Vitro Expansion of Chondrocytes“. Zugegriffen: 12. Januar 2025. [Online]. Verfügbar unter: https://www.researchgate.net/publication/348847638_Feasibility_of_Human_Platelet_Lysate_as_an_Alternative_to_Foetal_Bovine_Serum_for_In_Vitro_Expansion_of_Chondrocytes
- [15] D. J. Kuter, „The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists“, *Int J Hematol*, Bd. 98, Nr. 1, S. 10–23, Juli 2013, doi: 10.1007/s12185-013-1382-0.
- [16] M. R. Tijssen und C. Ghevaert, „Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders“, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Bd. 11, Nr. 4, S. 593–604, Apr. 2013, doi: 10.1111/jth.12131.
- [17] S. Yang u. a., „Apoptosis in megakaryocytes: Safeguard and threat for thrombopoiesis“, *Front. Immunol.*, Bd. 13, Jan. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2022.1025945.
- [18] A. E. Geddis, „Megakaryopoiesis“, *Seminars in Hematology*, Bd. 47, Nr. 3, S. 212–219, Juli 2010, doi: 10.1053/j.seminhematol.2010.03.001.
- [19] K. R. Machlus u. a., „CCL5 derived from platelets increases megakaryocyte proplatelet formation“, *Blood*, Bd. 127, Nr. 7, S. 921–926, Feb. 2016, doi: 10.1182/blood-2015-05-644583.
- [20] H. Saito, „Megakaryocytic cell lines“, *Baillieres Clin Haematol*, Bd. 10, Nr. 1, S. 47–63, Feb. 1997, doi: 10.1016/s0950-3536(97)80050-9.
- [21] Y. Isakari u. a., „Gene expression analysis during platelet-like particle production in phorbol myristate acetate-treated MEG-01 cells“, *Biol Pharm Bull*, Bd. 32, Nr. 3, S. 354–358, März 2009, doi: 10.1248/bpb.32.354.
- [22] M. Ogura u. a., „Establishment of a Novel Human Megakaryoblastic Leukemia Cell Line, MEG-01, With Positive Philadelphia Chromosome“, *Blood*, Bd. 66, Nr. 6, S. 1384–1392, Dez. 1985, doi: 10.1182/blood.V66.6.1384.1384.
- [23] C. D. Kang, B. K. Lee, K. W. Kim, C. M. Kim, S. H. Kim, und B. S. Chung, „Signaling Mechanism of PMA-Induced Differentiation of K562 Cells“, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Bd. 221, Nr. 1, S. 95–100, Apr. 1996, doi: 10.1006/bbrc.1996.0551.

- [24] PubChem, „Phorbol 12-myristate 13-acetate“. Zugegriffen: 12. Januar 2025. [Online]. Verfügbar unter: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/27924>
- [25] S. Ranjit u. a., „ABCC4 Impacts Megakaryopoiesis and Protects Megakaryocytes against 6-Mercaptopurine Induced Cytotoxicity“, *Drug Resist Updat*, Bd. 72, S. 101017, Jan. 2024, doi: 10.1016/j.drug.2023.101017.
- [26] M. Hesler, Y. Kohl, S. Wagner, und H. von Briesen, „Non-pooled Human Platelet Lysate: A Potential Serum Alternative for In Vitro Cell Culture“, *Altern Lab Anim*, Bd. 47, Nr. 3–4, S. 116–127, Juli 2019, doi: 10.1177/0261192919882516.
- [27] N. Schweinfurth, S. Hohmann, M. Deuschle, F. Lederbogen, und P. Schloss, „Valproic acid and all trans retinoic acid differentially induce megakaryopoiesis and platelet-like particle formation from the megakaryoblastic cell line MEG-01“, *Platelets*, Bd. 21, Nr. 8, S. 648–657, Dez. 2010, doi: 10.3109/09537104.2010.513748.
- [28] G. Szalai, A. C. LaRue, und D. K. Watson, „Molecular mechanisms of megakaryopoiesis“, *Cell. Mol. Life Sci.*, Bd. 63, Nr. 21, S. 2460–2476, Nov. 2006, doi: 10.1007/s00018-006-6190-8.
- [29] K. Kawa, „Thrombopoietin enhances rapid current responses mediated by P2X1 receptors on megakaryocytic cells in culture“, *Jpn J Physiol*, Bd. 53, Nr. 4, S. 287–299, Aug. 2003, doi: 10.2170/jjphysiol.53.287.
- [30] K. Takeuchi, M. Satoh, H. Kuno, T. Yoshida, H. Kondo, und M. Takeuchi, „Platelet-like particle formation in the human megakaryoblastic leukaemia cell lines, MEG-01 and MEG-01s“, *British Journal of Haematology*, Bd. 100, Nr. 2, S. 436–444, 1998, doi: 10.1046/j.1365-2141.1998.00576.x.
- [31] S. P. Watson, J. M. Auger, O. J. T. McCARTY, und A. C. Pearce, „GPVI and integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ signaling in platelets“, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Bd. 3, Nr. 8, S. 1752–1762, Aug. 2005, doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01429.x.

8. Eigenständigkeitserklärung

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorstehende Bachelorthesis mit dem Titel

Plättchenlysate aus differenzierten MEG-01 Zellen als Serumersatz
in der Zellkultur

– bzw. im Falle einer Gruppenarbeit die entsprechend gekennzeichneten Teile der Arbeit
– selbstständig ohne fremde Hilfe gefertigt und keine anderen als die angegebenen
Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken
entnommene Stellen sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat
in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Hamburg den 03.02.2025

