

Forschungs- und Tätigkeitsbericht 2009

Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen

Tierschutz durch Wissenschaft



Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort 2009.....	3
2	BioMed – zet Netzwerk	5
3	zet-Life Science Laboratorium	6
3.1	Hintergrund.....	6
3.2	Abschlussbericht des Laborausbaus	7
3.3	Forschungsbeirat zet-Life Science Laboratorium	9
3.3.1	Mitglieder des Forschungsbeirates des zet-LSL.....	9
3.3.2	Jahresbericht 2009 des Forschungsbeirates.....	9
3.4	Projekte des zet-Life Science Laboratoriums	12
3.4.1	Datenbank: Alternativen zu tierischen Seren in der Zellkultur	12
3.4.2	Alternativen zur Verwendung von fötalem Kälberserum (FCS). Thrombozytenextrakte als Serum-Ersatz in der Zell- und Gewebekultur.....	18
3.4.3	Entwicklung eines funktionellen dreidimensionalen (3D) Leberzellkulturmodellsystems für die Arzneimittelforschung	31
3.5	Projekt- / Drittmittelanträge im Jahr 2009	43
3.5.1	Gestellte Anträge	43
3.5.2	Projekte/Projektideen, bei denen eine Drittmittelförderung abgelehnt wurde:....	44
4	zet PR & Fundraising	46
4.1	zet-Charity unter dem Motto „kunst kontra Tierversuche“	46
4.1.1	Projektbeschreibung.....	46
4.1.2	Herangehensweise.....	47
4.1.3	Marketing und Corporate Design.....	47
4.1.4	Galaabend und Kunstverkaufsausstellung	49
4.1.5	Resonanz.....	50
4.1.6	Folgemaßnahmen.....	51
4.2	Gestaltung und Entwicklung Newsletter „zet-konkret“	52
4.2.1	Projektziele	52
4.2.2	Durchführung.....	53
4.3	Innovatives Land OÖ 2010.....	56
4.3.1	Projektbeschreibung:.....	56
4.3.2	Projektziele	56
4.4	Lange Nacht der Forschung	56
4.4.1	Ziel des Projektes:	57
4.5	Medienpräsenz 2009	59
5	Vorträge 2009	62
6	Publikationen 2009.....	63
6.1	Full papers.....	63
6.2	Abstracts.....	63
6.3	Posterbeiträge	64



Dr. Harald Schöffl
Vorstandsvorsitzender



Dr.in Miriam Eder
Vorstand für Finanzen, Personal und
Organisationsentwicklung

1 Vorwort 2009

Der vorliegende Forschungs- und Tätigkeitsbericht für das Jahr 2009 stellt unsere Aktivitäten im Bereich der Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen dar. Wissenschaftlicher Tierschutz stand auch in diesem Jahr wieder an erster Stelle. Dem Thema Tierschutz haben wir uns im Jahr 2009 aber auch von gesellschaftlicher Seite her zugewandt mit einer groß angelegten Charity-Aktion: Kunst Kontra Tierversuche.

Vor drei Jahren haben wir erfolgreich das zet- Life Science Laboratorium (zet LSL) in Betrieb genommen. Die angemieteten Räumlichkeiten wurden alsbald recht beengt, so dass nach Alternativen Ausschau gehalten wurde.

Im November des Jahres 2009 wurde die Errichtung eines fast 400 m² großen Life Science Laboratoriums im Linzer Donauplex-Gebäude fertig gestellt. Somit ist der Grundstein gelegt für ein GLP-konformes Labor, mit dem ambitionierten Ziel, dieses als nationales Referenzlabor für nicht-klinische gesundheits- und umweltrelevante Sicherheitsprüfungen im Bereich Alternativmethoden zu etablieren. Die Etablierung nationaler Referenzlaboratorien für die Entwicklung, Validierung und Anerkennung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen stellt eine Forderung der sich noch im Entwurf befindlichen novellierten Tierversuchs-Richtlinie 86/609 (Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere) dar. Das zet-Life Science Laboratorium bereitet sich auf diese Aufgabe vor.

Im Geschäftsbereich Kommunikation & Kongress wurde der Schwerpunkt auf eine groß angelegte Charity gelegt. Unter dem Motto „Kunst gegen Tierversuche“ stellten namhafte Künstler ihre Werke zur Verfügung, um von dem Erlös die Entwicklung von Alternativmethodenprojekten zu fördern. Während der „langen Nacht der Forschung“ präsentierte sich das zet-LSL laut Besucherabstimmung als drittbeste außeruniversitäre Einrichtung.

Mit der aktiven Unterstützung unserer Förderer und Partner und dem Engagement unserer MitarbeiterInnen werden wir uns auch im wirtschaftlich schwierigen Jahr 2010 mit voller Kraft dem wissenschaftlichen Tierschutz widmen und unserem gemeinsamen Ziel, Tierversuche langfristig durch Alternativmethoden zu ersetzen, ein Stück näher kommen.



Dr. Harald Schöffl
Vorstandsvorsitzender



Dr.ⁱⁿ Miriam Eder
Vorstand für Finanz,
Personal und

2 BioMed – zet Netzwerk

BioMed – Zentrum für biomedizinische & medizintechnische Forschung und zet - Zentrum für Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen sind zwei gemeinnützige außeruniversitäre Forschungseinrichtungen, die bereits seit der Gründung von BioMed eng miteinander kooperieren. Jede der beiden Organisationen ist untergliedert in jeweils 2 große Geschäftsbereiche und verfügt über einen Verwaltungsrat, einen Vorstand und einen Kontrollausschuss. Sowohl BioMed als auch zet unterziehen sich jährlich einer freiwilligen Prüfung durch einen beeideten Wirtschaftsprüfer. Um Synergien zwischen den beiden Organisationen möglichst effizient nutzen zu können, bilden BioMed und zet ein gemeinsames Netzwerk.

3 zet-Life Science Laboratorium

Der derzeit größte Geschäftsbereich ist das zet-Life Science Laboratorium (zet-LSL) in Linz. Nachdem im Jahr 2006 die Planungen und die Verhandlungen mit Geldgebern erfolgreich abgeschlossen wurden, konnte das Labor mit Jahresbeginn 2007 seinen Betrieb aufnehmen. Das zet-Life Science Laboratorium wurde ursprünglich in den Räumlichkeiten der Upper Austrian Research (UAR) angesiedelt und wird von Prof. Dr. Jürgen Frank geleitet. Aufgrund der alsbald beengten Verhältnisse musste nach Alternativen Ausschau gehalten werden. Im November 2009 wurde ein ca. 400 m² großes Life Science Laboratorium im Donauplex-Gebäude fertiggestellt. Nun kann das ambitionierte Ziel angegangen werden, das zet-LSL als nationales Referenzlabor für nicht-klinische gesundheits- und umweltrelevante Sicherheitsprüfungen im Bereich Alternativmethoden zu etablieren. Die Etablierung nationaler Referenzlaboratorien für die Entwicklung, Validierung und Anerkennung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen stellt eine Forderung der sich noch im Entwurf befindlichen novellierten Tierversuchs-Richtlinie 86/609 (Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere) dar. Mit der Novellierung dieser Richtlinie hat sich die Europäische Gemeinschaft klar zur Zielsetzung der Reduktion von Tierversuchen und der Förderung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen bekannt. So sollen langfristig standardisierte Tierversuchsmodelle, die in allen Unternehmen gleich ablaufen, gegen standardisierte Alternativmethoden ausgetauscht werden. Dem Voraus geht allerdings eine intensive Entwicklungsarbeit von neuen Methoden, die anschließend überprüft und mittels internationalen multizentrische Studien aufwendig validiert werden müssen. Erst dann kann die Anerkennung durch die entsprechenden Regulierungsbehörden erfolgen. Um Tierversuche dauerhaft ersetzen zu können, ist eine verstärkte Kooperation von Industrie, Forschungseinrichtungen und Behörden unerlässlich. Das zet-Life Science Laboratorium bereitet sich intensiv auf diese Aufgabe vor.

Finanziell unterstützt sind die Aktivitäten des zet-LSL vom Land Oberösterreich und der Pollux Privatstiftung über einen Zeitraum von 6 Jahren.

3.1 Hintergrund

Der statutarisch verankerten Verpflichtung von zet gegenüber den Prinzipien der 3R (Refinement, Reduction and Replacement of Animal Experiments) wird durch das neue Laboratorium voll Rechnung getragen, indem künftig in einem noch größeren Ausmaß als bisher aktiv nach Alternativen zu Tierversuchen auf Zell- und Gewebekulturebene geforscht wird.

Den Anstoß zur Gründung lieferten neben den hohen Tierversuchszahlen in Österreich auch die neue Chemikalienpolitik der Europäischen Union mit ihren zwingend vorgeschriebenen Prüfverfahren zur Risikoabschätzung von Chemie-Produkten für Mensch und Umwelt. 30.000 bisher noch nicht nach REACH-Kriterien geprüfte Chemikalien sind derzeit im Umlauf

und müssen mit ausgesprochen teuren und langwierigen Verfahren klassifiziert und auf ihr Gefährdungspotential hin untersucht werden. Dabei werden nach dem derzeitigen Stand der Prüfvorschriften unglaublich hohe Versuchstierzahlen verbraucht werden. Die Ursache dafür liegt im Fehlen von ausreichend standardisierten und validierten Alternativen, also in vitro Methoden in Form von Zell- oder Gewebekulturtechniken.

Das mit der Upper Austrian Research (UAR) gestartete Labor, welches den Schwerpunkt auf der Entwicklung von spezifischen Testverfahren hat, um Alternativen zu entwickeln, kann die Erfüllung seiner Aufgaben in neuen Räumlichkeiten unter erweiterten Bedingungen intensivieren.

Durch die Kooperation mit der Wirtschaft und weiteren außer- und universitären Forschungseinrichtungen wird mit dem zet-Life Science Laboratorium angestrebt, ein Optimum an Potentialsteigerung, Synergieoptimierung und Effizienzstärkung am Technologie- und Forschungsstandort OÖ umzusetzen. Durch die breite Einbindung dieser technischen Standortstärken werden Multiplikatoreffekte in allen Ebenen auftreten. Dabei soll gleichzeitig die Zahl der Tierversuche reduziert werden. Aus diesen Gründen wurde noch im Jahr 2008 die Ausgründung der gemeinnützigen BioMed-zet Life Science GmbH initiiert, mit dem Ziel, Anbieter für die Entwicklung und Durchführung tierversuchsfreier Methoden für KMUs oder die Industrie zu werden. Im Rahmen der Initiative „Innovatives Oberösterreich 2010“ wurde im Juli 2008 ein Investitionsantrag für die Errichtung und Inbetriebnahme eines erweiterten und GLP-konformen Standortes für das zet-Life Science Laboratorium gestellt. Die BioMed-zet Life Science GmbH hat mit 1. Januar 2010 ihre Arbeit aufgenommen.

Neben der Identifizierung neuer Forschungsfelder hat sich das zet-Life Science Laboratorium weiters zum Ziel gesetzt, insbesondere junge ForscherInnen zu unterstützen. Im Rahmen des zet-Life Science Laboratoriums und dessen Erweiterung werden hochqualifizierte Spitzenkräfte an den Standort Oberösterreich gebracht.

Streng genommen gehört der Ausbau des Labors den Aktivitäten der BioMed-zet Life Science GmbH an. Da jedoch alle wesentlichen Vorarbeiten im Verein getätigt wurden, ist an dieser Stelle ein Bericht des Ausbaus unerlässlich.

3.2 Abschlussbericht des Laborausbaus

Die Entscheidung am Standort Industriezeile 36 zu bauen hatte für zet neben den geringen Mietkosten/m² weiters des Vorteil, dass das Büro bereits an diesem Standort platziert ist. Damit ist es möglich viele Notwendigkeiten des Arbeitsalltages effizienter zu nutzen bzw. laufende Kosten zu senken.

Nach der Auswahl des Objektes kam es zu einer Reihe von Gesprächen mit anderen Forschungseinrichtungen aus Linz und Oberösterreich, als auch mit dem Gebäudebesitzer (Donaulager GmbH), da die Errichtung eines „Life Science Parks“ angedacht wurde. Die Idee war es, mehrere Firmen aus ähnlichen Forschungsfeldern an einem Standort zu

konzentrieren, um für den einzelnen sinn- und wertvolle Kooperationspotentiale schaffen zu können. Die Vision von zet war es damals, die Forschungskraft gemeinsam noch stärker voran zu treiben.

Dies begründet im Wesentlichen auch die Entscheidung, die Laborflächen größer zu planen als im Ursprung geplant war. Anfangs galt es als Richtwert ca. 260m² Laborflächen und 60m² Büro- und Lagerflächen zu gestalten, in der realisierten Form wurden jedoch rd. 280m² Laborflächen und 120m² Büro- und Lagerflächen geschaffen.

Da seitens des Magistrats Linz anfangs nicht klar war, welche Anforderungen für die Errichtung des Labors notwendig sind, kam es zu einigen Verzögerungen, wodurch die Adaptierungs- und Umbauarbeiten im Juni 2009 begonnen haben.

Die Fertigstellung des Ausbaus war für das letzte Quartal 2009 geplant. Unter Vernachlässigung von (Fein-)Einstellungsarbeit, diversen Korrekturen und Adaptierungen konnte dieser Plan auch umgesetzt werden.

Im Bereich der Elektroinstallationen, der Verrohrungen für Gase und im Lüftungsbereich waren jedoch auch noch im ersten Quartal 2010 mehr Aktivitäten notwendig, die jedoch keine negative Einflussnahme auf die Inbetriebnahme zur Folge hatten und so konnte die Übersiedelung des Labors Ende 2009/ Anfang 2010 vorgenommen werden.

Weiters ist an dieser Stelle noch festzuhalten, dass sich der Ausbau rein über die zur Verfügung gestellten Fördergelder des Landes Oö finanziert hat, und keine weiteren Mittel benötigt wurden.

3.3 Forschungsbeirat zet-Life Science Laboratorium

Zweck des Forschungsbeirates ist es, in Form eines Expertengremiums die permanente Weiterentwicklung der wissenschaftlichen Forschung und Entwicklung des zet Life Science Laboratoriums zu gewährleisten. Ferner kontrolliert der Forschungsbeirat die F&E-Aktivitäten des Laboratoriums und unterstützt die Vereinsleitung bei der Optimierung der Forschungsaktivitäten des Vereines und der BioMed-zet GmbH.

Der Forschungsbeirat hat insbesondere darauf zu achten, dass die Forschungsergebnisse des zet-Life Science Laboratoriums dem einschlägigen, internationalen Forschungsstandard entsprechen.

3.3.1 Mitglieder des Forschungsbeirates des zet-LSL

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Gerhard Gstraunthaler

stv. Vorsitzender:

DI Dr. Otmar Höglinger (UAR, Vertreter des Landes OÖ)

Mitglieder:

Univ.-Prof. Dr. Walter Pfaller (Vorstand für F&E von zet)

Univ.-Prof. Dr. Christoph Romanin (JKU, Vertreter Universität)

Dr. Martin Fussenegger (IGOR, Vertreter KMU)

kooptiert:

Dr. Urs Peter Geiger (Vertreter der Pollux Privatstiftung)

3.3.2 Jahresbericht 2009 des Forschungsbeirates

6. April 10. Sitzung des Beirats:

Besprechung des Förderantrages „COIN-Aufbau“ an die FFG
Genehmigungen/rechtliche Grundlagen zum Laborausbau

1. Juli 11. Sitzung des Beirats:

Laborausbau - erste Besichtigung
ecopa - START-UP Workshop in Innsbruck
Vorbereitungen zum 7. Weltkongress in Rom,
Fertigstellung der Datenbank zu serum-freien Zellkulturmedien

10. Dez. 12. Sitzung des Beirats:

Vorstellung des Neubestellten Leiters des zet-LSL, Dr. Klaus Schröder
Fertigstellung des LSL, Übersiedelung mit Jahresende 2009
weitere Zukunft von zet und BioMed-zet Life-Science-GmbH
Forschungsbeirat: Ernennung/Zusammensetzung, Geschäftsordnung

3.3.2.1 Chronologischer Übersichtsbericht über die wichtigsten Ereignisse des zet-LSL im Jahr 2009

Januar 2009

Einladung von ECVAM an einem Workshop über die Errichtung von Partnerlaboratorien teilzunehmen (Ispra, Italien 07.04. – 08.04.2008). Eingeladene Personen: Prof. Dr. Walter Pfaller, Prof. Dr. Jürgen Frank.

Mai 2008

Gründung der BioMed-zet Life Science GmbH

Hervorgegangen ist die BioMed-zet Life Science GmbH aus den beiden Vereinen BioMed und zet, die auch weiterhin existieren. Aus dem Verein BioMed wurden die Bereiche maz (mikrochirurgisches Ausbildungs- und Forschungszentrum) und Rehathechnik, sowie aus dem Verein zet der Bereich zet-Life Science Laboratorium (zet-LSL) in die GmbH überführt. BioMed und zet bestehen seit 2002 bzw. 1996 und sind außeruniversitäre gemeinnützige Forschungseinrichtungen in der Rechtsform eines gemeinnützigen Vereins. Die BioMed-zet Life Science GmbH ist eine gemeinnützige Forschungs- und Ausbildungseinrichtung. Ihre zentrale Aufgabe besteht in der Erforschung und Entwicklung, sowie der Validierung, von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen, sowie in der Forschung und standardisierten Ausbildung im Bereich Mikrochirurgie. Ein zukunftsorientiertes Tätigkeitsfeld der BioMed-zet Life Science GmbH stellt die Entwicklung/Anwendung von 3D Zellkultursystemen auf der Basis synthetischer Scaffolds und die Entwicklung/Anwendung von in vitro Modellsystemen für die Medikamentenentwicklung/Pharmaforschung dar. Eine zukünftige Zusammenarbeit mit öö. Unternehmen aus den Bereichen/Branchen Kunststoff und Oberflächenstrukturen, Labortechnik und BioScience sowie mit Unternehmen der pharmazeutischen Industrie und Biotechnologie wird angestrebt.

“.

März 2009

Besuch der Firma Igor (Institut für Organ- und Geweberekonstruktion GesmbH) in Wels zwecks Besichtigung einer bereits etablierten Qualitätsmanagement Struktur und einer Software gesteuerten Dokumentenlenkung, die eventuell in die BioMed-zet Life Science GmbH übernommen werden könnte. IGOR ist ein KMU welches unter GMP-Bedingungen humane Knorpelzellen *in vitro* kultiviert und autolog reimplantiert. (*„Good Manufacturing Practice“ beinhaltet Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produktionsabläufe und -umgebung in der Herstellung von Arzneimitteln, Wirkstoffen und Medizinprodukten*)

Besuch der Firma GWP (Gesellschaft für Werkstoffprüfung mbH) in Zorneding bei München, Deutschland

Teilnehmer: Prof. J. Frank, Dr. C. Schäfer und Dr. M. R. Lornejad-Schäfer

Gespräch über die Herstellung und Modifikation von 3D-Scaffolds (Polysterol-Schwämmchen) zur Etablierung eines 3D-Leberzellkultursystems. Abklärung ob ein gemeinsamer Antrag bei EUROSTARS (EU) eingereicht werden soll.

Mai 2009

Teilnahme am Forinvitox-Kongress (The Forum event "From innovation to market success") in Schweden (Stockholm). <http://www.forinvitox.org/>

Vorstellung des 3D-Leberzellkultursystems durch Prof. Dr. Jürgen Frank

Juli 2009

Einladung von Prof. Frank zu dem Workshop „3R Refinement, Replacement, Reduction: Bottlenecks in pharmaceutical investigations“ in Innsbruck, Österreich

Veranstalter: ECOPA (European Consensus Platform for 3R Alternatives)

Oranisatoren: zet, Medizinische Universität Innsbruck, ZonMW

September 2009

VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome, Italy

Teilnehmer: Prof. J. Frank, Prof. G. Gstraunthaler, Dr. C. Schäfer, Dr. M. R. Lornejad-Schäfer, Mag. D. Brunner, Mag. rer. Nat. C. Rauch

Vorstellung des 3D-Leberzellkultursystems durch Dr. C. Schäfer, Dr. M. R. Lornejad-Schäfer

Ausscheiden von Prof. J. Frank

November 2009

Umsiedlung von zet-LSL vom Standort Scharitzerstr. in die Industriezeile

3.3.2.2 Weitere Aktivitäten von zet und dem zet-LSL im Jahr 2009

Mitgliedschaft im österreichischem Netzwerk „BioNanoNet“

Das BioNanoNet ist ein österreichisches Netzwerk welches eine Vielzahl von Expertisen in verschiedensten Themenbereichen der medizinischen und pharmazeutischen Forschung, der Nanomedizin und Nanotoxikologie zusammenführt. Das BioNanoNet verbindet führende Unternehmen, universitäre und außeruniversitäre Forschungsinstitutionen in einer Technologieplattform mit dem klaren Ziel, innovative interdisziplinäre Forschung auf dem Gebiet der Arzneimittelentwicklung chronisch-degenerativer und infektiöser Krankheiten voranzutreiben. Das BioNanoNet entwickelt und koordiniert in enger Zusammenarbeit mit ihren Kooperationspartnern interdisziplinäre Forschungs- und Auftragsprojekte. Es fungiert als „one stop shop“ mit der klaren Zielsetzung, effizient und gezielt Kontakt zwischen potentiellen Kunden aus der pharmazeutischen Industrie und Netzwerkpartnern herzustellen. Aufgrund der unterschiedlichen Expertisen der einzelnen Netzwerkpartner kann so eine effiziente Lösung für den Kunden geboten werden. Ein weiterer wichtiger Auftrag der BioNanoNet ist die Initiierung und Koordination von nationalen und internationalen Forschungsprojekten entlang der pharmazeutischen Wertschöpfungskette. Ausgehend von der Untersuchung des Pathomechanismus, der Suche nach geeigneten Targets, über die Entwicklung neuer Wirksubstanzen und deren Formulierung, der präklinischen und klinischen Studien, werden große Teile von den Netzwerkpartnern abgedeckt. Weiters stehen Netzwerkressourcen für die Produktion entwickelter Wirkstoffe sowohl für den klinischen als auch industriellen Maßstab zur Verfügung. Hierdurch ist es möglich, den

gesamten Wertschöpfungsprozess in Österreich zu halten. Das BioNanoNet führt relevante Akteure der medizinischen und pharmazeutischen Forschung in all ihren Facetten in einer Plattform zusammen, um die internationale Konkurrenzfähigkeit und Sichtbarkeit zu erhöhen. Die BioMed-zet Life Science GmbH und die BioNanoNet Forschungsgesellschaft mbH haben einen Kooperationsvertrag abgeschlossen, so dass die BioMed-zet Life Science GmbH Mitglied in diesem österreichischen Netzwerk wird.

Organisation und Durchführung des Workshops "3R: Refinement, Replacement, Reduction. Bottlenecks in pharmaceutical investigations". 03. – 04. Juli 2009 in Innsbruck. Organisatoren: zet, Medizinische Universität Innsbruck und ZonMW. Veranstalter: ECOPA (European Consensus Platform for 3R Alternatives).

3.4 Projekte des zet-Life Science Laboratoriums

3.4.1 Datenbank: Alternativen zu tierischen Seren in der Zellkultur

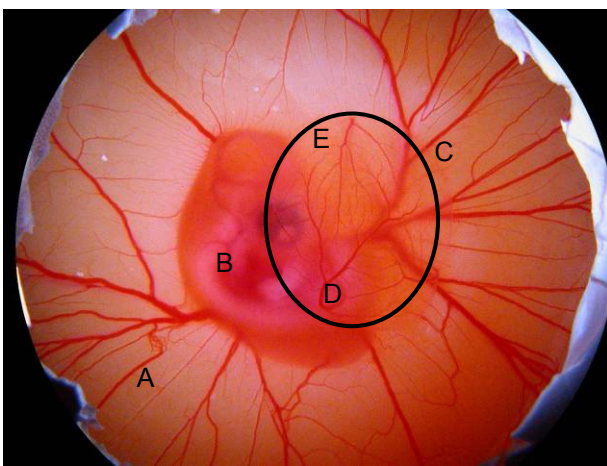
Projektleiter: Univ. Prof. Dr. Gerhard Gstraunthaler, Prof. Dr. Jürgen Frank
Projektmitarbeiterin: Mag. Daniel Brunner
Projektbeginn: Januar 2003 (CD-Version)
Juli 2007 (Beginn: online Datenbank Programmierung)
Projektabschluss: abgeschlossen

3.4.1.1 Ziel des Projektes

Datenbank: Alternativen zu tierischen Seren in der Zellkultur

Einleitung

Fötale Seren werden in Zellkulturen nahezu ubiquitär verwendet. Seren versorgen die Zellkultur mit allen für das Wachstum notwendigen Substanzen und können artübergreifend zur Kultivierung von Zellen verwendet werden. Es gibt jedoch hinsichtlich der Zusammensetzung und der Gewinnung von fötalen Seren starke Bedenken. Die chemische Zusammensetzung ist von tierischen Seren im Allgemeinen nicht genau definiert, unterliegt Schwankungen und kann z.B. durch Krankheitserreger oder Antikörper verunreinigt sein. Die



Gewinnung erfolgt beim fötalen Kälberserum (kurz FBS für fetal bovine serum) – ethisch höchst bedenklich – durch eine kardiale Interpunktion des Fötus bei vollem Bewusstsein. Für einen Liter des fötalen Kälberserums werden ca. zwischen ein bis zwei Föten benötigt.

Aus diesen Gründen ist es der Wissenschaft ein großes Bestreben Alternativen zu tierischen Seren zu finden¹. Auch beim Tissue Engineering (Gewebekonstruktion) im humanen Bereich muss auf tierische Seren verzichtet werden. Dort werden chemisch gut definierte Medien (Nährlösungen) zur Anzucht und Propagation eine immer wichtigere Rolle spielen. Inzwischen gibt es chemisch gut definierte Medien, mit denen eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen kultiviert werden können. Dies ermöglicht es ohne ethische Einschränkungen und unter genau definierten Bedingungen zu arbeiten.

Das Angebot an Serum-freien Zellkulturmedien ist in den letzten Jahren stark gestiegen. Es bedarf jedoch - bedingt durch die selektive Einsetzbarkeit der Medien – eines gründlichen und zeitaufwendigen Rechercheaufwandes, um ein erprobtes Medium für eine bestimmte Zelllinie zu finden. Die durch das zet-LSL erstellte Datenbank „goodcellculture“ reduziert den Aufwand auf ein Minimum und fasst die auf dem Markt befindlichen Systeme übersichtlich zusammen. Mit Hilfe umfangreicher Suchfunktionen können somit „alternative“ Medien schnell gefunden werden.

Mithilfe unserer Datenbank möchten wir den Nutzern einen Überblick auf die aktuelle – von fötalem Serum-freie – Produktpalette verschiedenster Hersteller verschaffen. DeR BenutzerIn erspart sich die aufwendige Recherche und gewinnt Zeit. Darüber hinaus kann er/sie auf ein Medium umsteigen, das aus ethischer Sicht unbedenklich ist, und aus wissenschaftlicher Sicht hinsichtlich seiner Inhaltsstoffe besser definiert ist.

Resümee



Abbildung 1: Homepage "goodcellculture": Serum-freie interactive online Datenbank

¹ ESAC statement on the use of FCS and other animal-derived supplements, May 2008, <http://ecvam.jrc.it/>

Seit der Ideenentstehung einer interaktiven online Datenbank (2004) für Serum-freie Medien bis zum Abschluss des Projekts haben sich die Anforderungen an das Projekt – getrieben durch die rasante Entwicklung der Kommunikationsplattform Internet – erhöht. Es war nunmehr möglich und nötig den Wissenschaftlern ausführlichere Daten zur Verfügung zu stellen, um den Ersatz des fötalen Kälberserums effizienter zu erleichtern. Es wurden die spezifischen Einsatzmöglichkeiten und nicht nur die Eckdaten der Medien systematisch geordnet und verknüpft inkludiert. Darunter verstehen sich die Eignung von Medien für Organismen, Gewebe, Organe, Zelltypen und Krankheiten, sowie spezifischen Zelllinien oder Hybridomas (Hybrid-Zellen aus z.B. zwei Organismen). Hierdurch unterscheidet sich diese Datenbank von anderen (Siehe Abschnitt Vergleich).

Datenlage

Die Daten der Medien der Hersteller wurden erhoben und systematisch nach internationalen Standards (u.a. ICD 2007² der WHO oder ITIS³) kategorisiert. Medien und Zellen wurden einerseits durch die oben angeführten Attribute zugeordnet und andererseits auch direkt per Produktname miteinander verknüpft. Die Struktur der Datenbank ist so angelegt, dass auch zukünftig verschiedenste Produkte einander zugeordnet werden und andere Zellen, wie Stammzellen und primäre Zellen, sowie dafür geeignete Medien aufgenommen und angeboten werden können.

Aktueller Stand

Zum jetzigen Zeitpunkt enthält die Datenbank ca. 450 Serum-freie Medien. Als besonderes Merkmal von „goodcellculture“ ist es möglich von über 4500 Zelllinien oder Hybridomas der größten Hersteller (ATCC⁴, ECACC⁵ und DSMZ⁶) ein Produkt auszuwählen und sich die dafür passenden Serum-freien Medien anzeigen zu lassen (Abbildung 2).

² WHO ICD - International Statistical Classification of Diseases der World Health Organisation

³ ITIS - Integrated Taxonomic Information System

⁴ ATCC - American Type Culture Collection

⁵ ECACC - European Collection of Cell Cultures

⁶ DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

media and cells

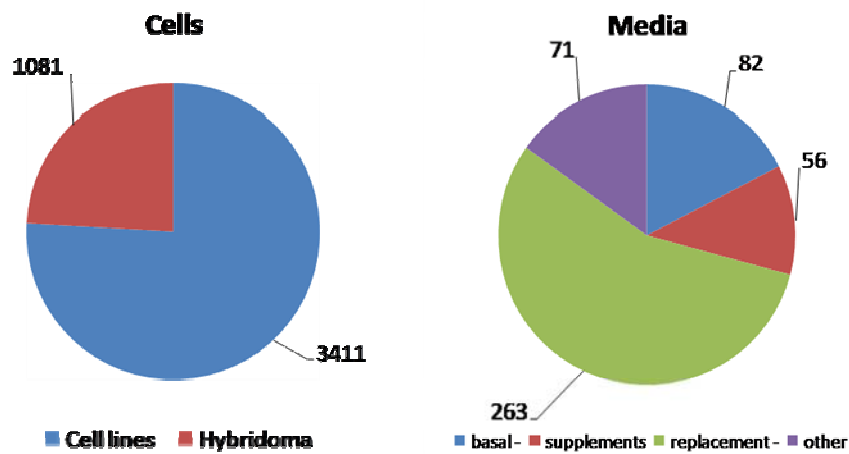


Abbildung 2: Anzahl der Zellen und Medien in der Datenbank

Die meisten Medien (346 von 476 Medien) sind im engeren Sinne „Serum-frei“. Sie können durchaus noch tierische Komponenten oder andere undefinierte Komponenten enthalten. Demgegenüber sind ADCF (animal derived component free) oder CD (chemically defined) Medien einerseits frei von tierischen Komponenten oder andererseits ohne undefinierte Zusätze (Abbildung 3).

chemical degree and species

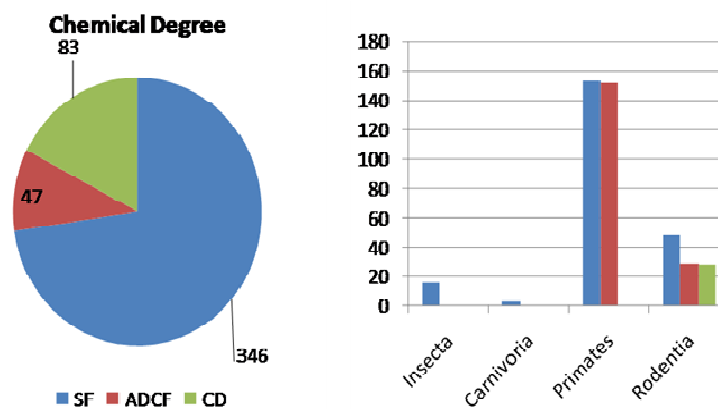


Abbildung 3: Verteilung der Medien nach Inhaltsstoffen und Taxonomie

Suchmodi

Die Anordnung der Daten ermöglicht mehrere Sucharten. Mittels der „einfachen Suche“ (Abbildung 4) kann man per Texteingabe zum gewünschten Ergebnis gelangen.

Search Term:

Search in: Media Cells Diseases

- Media -

- Chemical Degree - ▶ Description

search database ▶

▶ Power Search

Abbildung 4: Einfache Suche mit Auswahlfeldern

Mittels „Power Suche“ ist eine Spezifikation der Attribute (Organismus, Gewebe, Organ, Zelltyp und Krankheit) bis hin zur kleinsten definierten Einheit möglich (Abbildung 5). Für das gewünschte Ergebnis stehen Detailinformationen (Abbildung 6 und Abbildung 7) zur Verfügung.

Zu jedem Zeitpunkt ist es möglich mit den individuellen Einstellungen zwischen den zwei Produktarten (Medien und Zellen) zu wechseln. Dies hat den Vorteil, dass falls für die individuellen Einstellungen kein Medium verfügbar ist, ein naheliegendes Medium als Alternative schnell gefunden werden kann.

Search Term:

Search in: Media Cells

- Media -

- Chemical Degree - ▶ Description

Company:

search database ▶

▶ Simple Search

Taxonomy	Organs	Cell Types	Diseases	Growth properties
Animalia	Genito-urinary sy			
Chordata	Urinary organs			
Vertebrata				
Mammalia				
Theria				
Eutheria				
Primates				
Hominidae				
Homo				
Homo sapiens				

Abbildung 5: Auswahl der Kategorien bei der Power Suche

search result media < | 1 | >

Title / Prod No.	Product Type	Chem. Deg.	Species	Organ	Cell Type	Disease	Growth Prop.
CnT-21 Bladder Epithelium Medium	replacement	SF	Homo sapiens [cell line]	Bladder	Epithelial cells		
PCT CnT-18 Bladder epithelium Medium	replacement	SF	Homo sapiens [cell line]	Bladder	Epithelial cells		
PCT CnT-58 Bladder Epithelium Medium	replacement	SF	Homo sapiens [cell line]	Bladder	Epithelial cells		
PromoCell Renal Epithelial Cell GrowthMedium	replacement	SF	Homo sapiens [cell line]	Kidney			

Abbildung 6: Power Suche mit Ergebnis für Medien für menschl. gesunde Zelllinien des Harnsystems

Airway epithelial cell growth Medium

< previous searchresult

Title / Prod No.	Product Type	Chem. Deg.	Species	Organ	Cell Type	Disease	Growth Prop.
Airway epithelial cell growth Medium	replacement	SF	Homo sapiens [cell line]	Respiratory system	Epithelial cells		
fitting cells							
fitting cells			Sus [cell line]	Respiratory system	Epithelial cells		


Description	PromoCell Small Airway Epithelial Cell Growth Medium is a serum free medium developed for the in vitro cultivation of epithelial cells from the distal respiratory system. The medium is optimized for primary human cells, but can also be used for porcine small airway epithelial cells.	Company: PromoCell
References		 Links:
Protein free	No	Tested Cells:

Abbildung 7: Detailinformationen des Mediums für Epithelzellen der Luftwege

Vergleich

Im Gegensatz zu anderen Datenbanken, wie „Sefrec“⁷ und dem „Serum Free Resource Updated“ der FoA⁸ ist es „goodcellculture“ gelungen die Daten der Medien systematisch zu erfassen und auch mit den dazugehörigen Pendants „logisch“ zu verknüpfen. „Serum free Resource Update“ besteht aus einem jährlich aktualisierten PDF-File. Diese Datenbank ist nicht geeignet, annähernd die Menge an Informationen zur Verfügung zu stellen, welche in „goodcellculture“ zu finden ist. „Sefrec“– als „Interactive database about serum free medias and cell lines“ Datenbank - bietet eine gute Übersicht über Medien und Zellen, kann aber die Interaktivität von „goodcellculture“ nicht erfüllen. Es weist eine Textsuche ohne Gliederung und Verknüpfung der Daten auf.

Neben diesen deutlichen Verbesserungen besticht „goodcellculture“ dadurch, dass diese Datenbank für den Nutzer frei zugänglich ist.

Präsentation

Die Datenbank ist seit Anfang September 2009 online und unter <http://www.goodcellculture.com> zu finden. Sie wurde an folgenden renommierten wissenschaftlichen Veranstaltungen vorgestellt:

- „VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences“, 30.8.-3.09.2009 in Rom
- Themenbezogener Workshop, 4.11-6.11.2009 in Kopenhagen

Die Rückmeldungen waren durchwegs positiv.

⁷ Sefrec – <http://www.sefrec.com>

⁸ Focus on Alternatives - <http://www.focusonalternatives.org.uk>

Zukünftige Maßnahmen

Um das Ziel der Datenbank zu verfolgen, den Ersatz von fötalem Kälberserum zu erleichtern, sind noch folgende Maßnahmen erforderlich:

- Bewerbung von „goodcellculture“ auf wissenschaftlichen Wege (Internet, Kongresse, Messen, ...)
- Erstellung und Betreuung eines Forums, um den Wissenschaftlern den Meinungsaustausch zu ermöglichen
- Verfeinerung der Datensätze
- Ständige Aktualisierung der Medien und Zellen
- Implementierung von ergänzenden Informationen
- Implementierung der kommerziell erhältlichen Serum-freien Zelllinien

Publikationen

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. The serum-free media interactive online database. Altex (eingereicht)

Publikation aus Workshop November 2009 (in Arbeit)

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. The serum-free media interactive online database. Altex 26 (Spec. Issue), 94, 2009

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. Altex 25 (Suppl. 1), 12, 2008

Vorläuferprojekt

Falkner E., Appl H., Eder C., Losert U.M., Schöffl H., Pfaller W. Serum free cell culture: the free access online database. Toxicol In Vitro 20(3), 395-400, 2006

Serum free cell culture media – updated Product guide 1/2004-05

Replacement of Sera for Cell Culture Purposes: A Survey, 2003

Beteiligte Labore:

zet-LSL: Projektleiter: Mag. D. Brunner

Medizinische Universität Innsbruck: Prof. Dr. Gstraunthaler, Prof. Dr. Pfaller

Stand des Projektes: abgeschlossen

3.4.2 Alternativen zur Verwendung von fötalem Kälberserum (FCS). Thrombozytenextrakte als Serum-Ersatz in der Zell- und Gewebekultur

Projektleiter: Univ. Prof. Dr. Gerhard Gstraunthaler

Projektmitarbeiterin: Mag. Caroline Rauch

Projektbeginn: Mai 2006

Projektabschluss: April 2012

3.4.2.1 Ziel des Projektes

Von besonderer Wichtigkeit für die Qualität des Serums ist der durchlaufene Gerinnungsprozeß. Es kann demnach davon ausgegangen werden, daß die im Serum

nachgewiesenen und für die Proliferation kultivierter Zellen essentiellen Faktoren, wie PDGF, FGF, TGF- β , VEGF, u. a., thrombozytären Ursprungs sind (s. auch Tabelle 1).

Ziel des geplanten Forschungsprojektes ist es also, die wachstums- und proliferationsfördernde Wirkung humaner Thrombozytenextrakte auf *in vitro* kultivierte Zellen zu untersuchen und Thrombozytenextrakte als Alternative zur Verwendung von foetalem Kälberserum in der Zell- und Gewebekultur zu entwickeln. Humane Ersatzstoffe können in Zukunft auch im Tissue Engineering von besonderer Bedeutung sein: In der adulten Stammzell-Therapie oder in der Anzucht von Zellen zur autologen Zelltransplantation könnten die aufwändig zu gewinnenden Humanseren durch Thrombozytenextrakte ersetzt werden. Damit beinhaltet dieses Projekt auch ein hohes biotechnologisches Potential für eine weitere kommerzielle Verwertbarkeit, nämlich der kommerziellen Produktion und des Vertriebs humaner Thrombozytenextrakte als Serum-Ersatz in der Zell- und Gewebekultur sowie im Tissue Engineering.

3.4.2.2 Hintergrund des Projektes

Für eine optimale Kultivierung von eukaryontischen Zellen benötigen diese den Zusatz von Serum zum Kulturmedium. Mit dem Serum werden notwendige Hormone und Wachstumsfaktoren, Bindungsproteine und Anheftungsfaktoren, sowie Vitamine und Spurenelemente eingebracht. Neben tierischen Seren, die oft aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien (fötale, neugeborene oder adulte Seren) hergestellt werden, kommen auch Seren verschiedener Spezies zum Einsatz. Die Verwendung von Serum birgt jedoch auch eine Reihe von Nachteilen: (1) Serum ist ein undefinierter Mediumzusatz, die genaue qualitative Zusammensetzung ist bis heute nicht bekannt. Die quantitative Zusammensetzung unterliegt ebenfalls starken Schwankungen. (2) In letzter Zeit wurden massive ethische Bedenken laut in Bezug auf ein mögliches Leiden der Rinderföten bei der Rohserumgewinnung. (3) Jüngst wurde auch die Frage aufgeworfen, ob der weltweite Bedarf an fötalem Kälberserum in Forschung und Biotech-Industrie überhaupt abgedeckt werden kann (siehe dazu auch die Presseaussendung von zet, März 2009). Um diese Nachteile der Verwendung von Serum zu vermeiden und um definierte und kontrollierte Kulturbedingungen zu schaffen, wird intensiv nach Alternativen zur Verwendung von Serum in der Zellkultur gesucht.

3.4.2.3 Stand der experimentellen Arbeiten

Extraktgewinnung:

Die Herstellung der Thrombozytenextrakte aus Konzentratbeuteln nach einer Thrombozytenspende (Apherese) konnte optimiert und standardisiert werden.

Der Inhalt eines Beutels, 200 bis 250 ml, wird in sterile 250 ml Zentrifugenbecher überführt und bei 8°C für 20 min und 9000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die

Thrombozyten mit physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl, steril) gewaschen. Die Blutplättchen werden nochmals sedimentiert und in 15 ml frischer Kochsalzlösung aufgenommen. Dadurch werden die Thrombozyten unter Berücksichtigung aller Waschverluste ca. 10-fach aufkonzentriert.

Von allen getesteten Methoden zur Thrombozytenaktivierung und nachfolgender Extraktion hat sich das Tiefrieren der Thrombozytenpellets auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht, mit nachfolgendem Tauen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ als effektive und zugleich kostengünstigste Methode erwiesen.

Extraktcharakterisierung:

Die Charakterisierung der gewonnenen Extrakte und die Bestimmung ihrer wachstumsfördernden (mitogenen) Wirkung erfolgte auf mehreren Ebenen:

- Quantifizierung freigesetzter Thrombozytenfaktoren mittels ELISA
- Messung der Freisetzung von P-Selectin in Western Blots
- Bestimmung der mitogenen Wirkung in serum-freier Zellkultur:
 - Erstellung von Wachstumskurven
 - Proliferations-Assays mittels Resazurin und WST-8
- Nachweis der spezifischen Aktivierung ausgewählter MAP-Kinasen als Proliferationsmarker

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay):

Als Leitmarker wurden PDGF, TGF- β 1 und EGF mittels ELISA bestimmt. Des Weiteren wurden auch IGF-1, HGF und VEGF als u. U. relevante Wachstumsfaktoren quantifiziert.

In einer breit angelegten Versuchsreihe, in welche noch weitere Lysatpräparationen (Lysate A – E) aus einer Kooperation mit einem Biotech-Unternehmen miteinbezogen wurden, wurden zusätzlich noch bFGF und Proteingehalt bestimmt (**Tabelle 1**).

PDGF (Platelet derived Growth Factor) erlaubt eine Aussage über den tatsächlichen Aktivierungsgrad und ist ein starkes Mitogen. Neue Ergebnisse ergeben eine gemittelte Konzentration von rd. 50 ng/ml in den Thrombozytenextrakten und liegen damit 10x über dem Bereich von Werten im Humanserum, welches als Kontrolle mitgetestet wurde. Der hohe Grad an PDGF-Freisetzung zeigt, dass die gewählten Aktivierungsmethoden erfolgreich sind.

EGF (Epidermal Growth Factor) ist ebenfalls ein starkes Mitogen und wird in definierten Zellkulturmedien (serum-freie Kulturmedien) als Wachstumsfaktor zugegeben und ließe somit einen direkten Vergleich mit foetalem Kälberserum zu. Die EGF-Konzentration ergibt einen Mittelwert von 15 ng/ml Extrakt, im Vergleich zu 1.5 ng/ml in humanem Kontrollserum.

TGF- β 1 (Transforming Growth Factor) moduliert das Wachstum und die Proliferation der Zellen eher als Suppressor. Eine mögliche Interaktion zwischen TGF- β 1 und Hepatocyte Growth Factor (HGF) wird derzeit untersucht.

Ferner wurden die Gehalte an Hydrocortison und Prostaglandin E2 (PGE2), zwei synergistisch wirkenden katabolen Faktoren in chemisch-definierten Medien, bestimmt. Deren Gehalte in den Thrombozytenextrakten waren ausreichend, sodass keine weitere Substitution mit Hydrocortison oder PGE2 notwendig ist.

Die bisher erhobenen Werte sind in der **Tabelle 1** zusammengefaßt:

Samples Lysates	Growth Factors [ng/ml]						Protein [mg/ml]
	EGF	PDGF-AB	TGF-β1	IGF-1	bFGF	VEGF	
A	2,58	45,03	68,1	83,34	1,93	0,095	58,21
B	2,40	53,78	69,4	88,92	2,12	0,074	51,92
C	2,16	44,86	59,7	77,23	2,04	0,130	45,32
D	1,69	67,72	55,8	11,13	1,62	0,111	20,37
E	1,82	62,30	54,4	11,93	1,31	0,133	22,84
# 56	11,63	57,28	1179,7	12,81	0,96	8,46	
# 69	15,34	76,48	533,2	16,70	1,04	3,47	
# 70	20,55	53,60	1462,6	8,90	1,05	10,63	9,03
# 71	13,45	58,26	503,7	16,13	0,90	19,65	
# 72	16,69	46,34	1272,5	9,32	0,81	5,17	
# 73	14,27	51,88	1084,3	16,66	0,98	19,99	6,94
# 108	13,44	89,26	518,1	25,89	1,33	1,27	9,34
human serum	1,52	4,64	46,87	75,96	0,0019	0,063	70,00
	0,02	5,20	33,85	83,98	0,018		70,00

Tabelle 1: Menge an Wachstumsfaktoren und Gesamtprotein in verschiedenen Thrombozytenpräparationen und humanem Serum. Die Lysate A – E wurden von anderen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden hergestellt, die Proben #56 – #108 sind Präparationen des laufenden Projekts.

An Hand der erhobenen Werte (Tabelle 1) konnten folgende Qualitätskriterien für die Thrombozytenlysate festgelegt und formuliert werden:

hoher Gehalt an PDGF, VEGF, EGF and TGF-β1

niedriger Gehalt an IGF-1, **niedriger** Proteingehalt [< 10 mg/ml]

Western Blot:

Als weiterer Marker des Aktivierungsgrades diene das granuläre Membranprotein P-Selectin, das während der Aktivierung bzw. Granula-Sekretion an der Zelloberfläche der Thrombozyten erscheint bzw. in den Überstand freigesetzt wird. Die Freisetzung von P-Selectin in den Überstand aktivierter Thrombozyten wurde mittels Western-Blot (Immuno-

Blot) - Technik nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen eine spezifische Freisetzung dieses Aktivierungsmarkers. Mehrere Extraktpräparationen wurden für diese Versuche ausgetestet.

Zellkultur:

Die unterschiedlich gewonnenen und behandelten Extrakte (s. o.) wurden an verschiedenen Zelllinien ausgetestet. Dafür wurden folgende Zelllinien ausgewählt:

1. HK-2: humane proximale Nierentubuluszellen
2. LLC-PK₁: proximale Nierentubuluszellen aus dem Schwein
LLC-PK₁-FBPase⁺: gluconeogenetischer Subklon der LLC-PK₁ Zelllinie
3. MDCK: distale Nierentubuluszellen aus dem Hund
4. CaCo-2: humane Colocarcinom-Zelllinie
5. Raji-Zellen: in Suspension wachsende Burkitt-Lymphomlinie

Alle bisher getesteten epithelialen Zelllinien konnten unter serum-freien Bedingungen unter Zugabe von Thrombozytenextrakten erfolgreich kultiviert werden. Es zeigte sich kein Unterschied in der Proliferationszeit und im Differenzierungsgrad der Zellen im Vergleich zur Kultivierung in serum-haltigen Medium.

Auch die humane Colocarcinom-Zelllinie CaCo-2, welche normalerweise mit 20 % Serumanteil, also dem doppelten Anteil gegenüber anderen Zelllinien, kultiviert wird, zeigte normales Proliferationsverhalten. Dies weist darauf hin, dass die Extrakte auch deren erhöhten Wachstumsansprüchen weitgehend genügen.

Zusätzlich wurde mit den Raji-Zellen eine in Suspension wachsende Lymphomlinie in die Tests mitaufgenommen. Auch diese Zellen konnten in serum-freiem RPMI 1640-Medium und Zugabe der Thrombozytenextrakte erfolgreich kultiviert werden (siehe Jahresbericht 2008).

Aktivierung der ERK1/2 MAP (mitogen activated protein) Kinasen:

Die MAP (mitogen activated protein) Kinasen vermitteln als Signaltransduktoren (Signalkaskaden) extrazelluläre Signale in das Zellinnere. Die 3 wichtigsten MAPK Signalwege sind: die ERK(extracellular signal-regulated)1/2-Kaskade, die JNK (jun N-terminal kinase)-Kaskade und der p38-Signalweg. Die Aktivierung der Kinasekaskaden erfolgt durch spezifische, sequentielle Phosphorylierung, und damit Aktivierung, nachgeschalteter Proteinkinasen. Am Ende steht die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren und das Anschalten eines spezifischen Genprogramms.

Die Aktivierung der ERK-Kaskade wird durch Wachstumsfaktoren und Mitogene, welche extrazellulär an spezifische Rezeptoren binden, ausgelöst. Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt durch übergeordnete MAP Kinase Kinasen (MKK und MKKK), welche die ERK-Kinase an Threonin- und Tyrosinresten sequenzspezifisch phosphorylieren. Dies führt zur Phosphorylierung des nachgeschalteten Transkriptionsfaktors Elk-1, und mit dem Anschalten des *Serum Response Elements* zur Induktion von *Early Response Genes*. Das Anschalten dieser Gene (z. B. c-fos) ermöglicht Zellen, die in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind (G₀), den Eintritt in die S-Phase und nachfolgende Zellteilung (Proliferation).

Werden subkonfluente Kulturen Serum depletiert, laufen die Zellen in der G1-Phase auf. Neuerliche Zugabe von Serum (und damit von Wachstumsfaktoren und Hormonen) oder von Thrombozytenextrakten bewirkt das Überschreiten des *Restriction Points* und den Eintritt in die S-Phase (G1/S-Transition).

Die spezifische Phosphorylierung und Aktivierung von ERK1/2 kann mittels phosphospezifischer Antikörper im Western Blot sichtbar gemacht werden. Die durch Thrombozytenextrakte ausgelöste Phosphorylierung der ERK1/2 Kinase ist also ein direktes Maß für die mitogene Aktivität des Extraktes und der darin enthaltenen Faktoren (siehe Jahresbericht 2008).

Erstellung von Wachstumskurven und Proliferationsassays:

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurde in 24 h-Abständen die Zelldichte (= Zellzahl/Wachstumsfläche) epithelialer Kulturen bestimmt. Die Kulturen wurden dazu täglich fotografiert und ein Zählquadrat geeigneter Größe darüber gelegt. Die Auszählung der Zellen pro Fläche erfolgte wie in einer Zählkammer. Für die statistische Auswertung wurden täglich mehrere Gesichtsfelder einer Kultur fotografiert und ausgewertet.

Bei dieser Methode bleibt die Kultur während der gesamten Kultivierungsdauer erhalten und es kann ein und dieselbe Kultur (bzw. Kulturschale) täglich fotografiert werden (gepaarte Testpunkte einer Kultur).

Abb. 1 zeigt eine repräsentative Wachstumskurve einer LLC-PK₁-Kultur unter unterschiedlichen Medienbedingungen (10 % FBS, Thrombozytenextrakt, serum-frei).

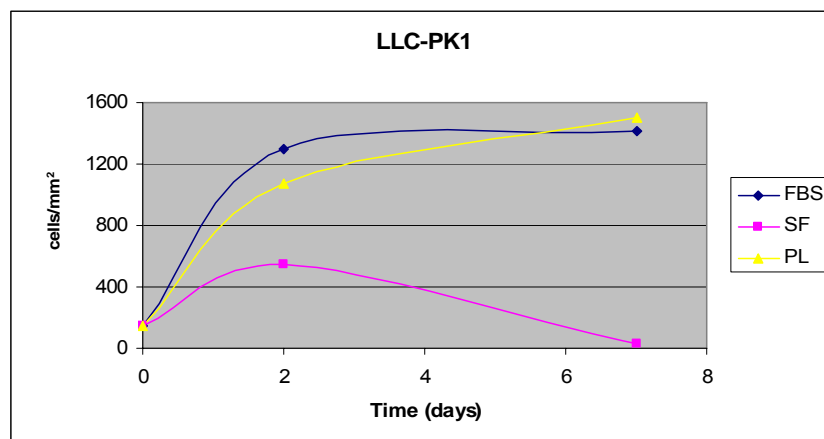


Abb. 1. Wachstums-(Proliferations-)verhalten einer LLC-PK₁-Kultur unter 10 % FBS, serum-freien Bedingungen (SF) oder nach Zugabe von 5 % Thrombozytenextrakt (PL) zum Kulturmedium.

Parallel dazu wurden Proliferationsassays mittels Bestimmung der Aktivität zellulärer Dehydrogenasen (WST-8) durchgeführt. Der Test misst die Enzymaktivität unabhängig davon, ob die Zellen im Moment DNA synthetisieren bzw. proliferieren oder nicht. Als Indikatoren werden neuerdings wasserlösliche Tetrazolium-Derivate verwendet.

Abb. 2 zeigt einen repräsentativen WST-8 Test an MDCK-Kulturen unter den unterschiedlichen Medienbedingungen (wie in Abb. 1 beschrieben).

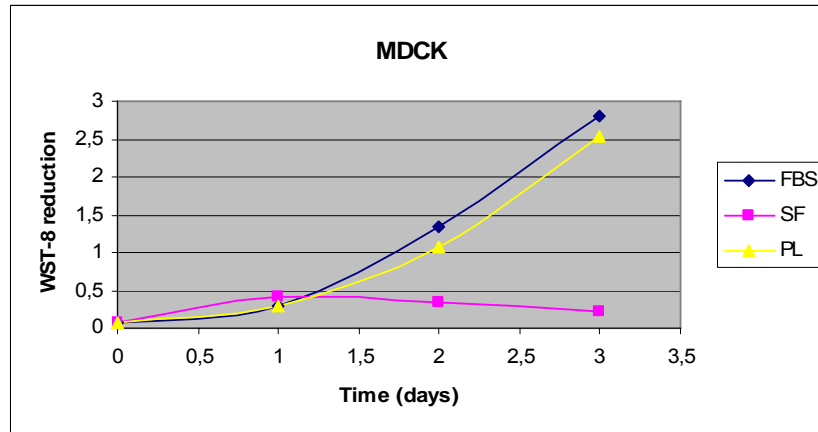


Abb. 2. Proliferationsverhalten einer MDCK-Kultur (WST-8 Test) unter 10 % FBS, serum-freien Bedingungen (SF) oder nach Zugabe von 5 % Thrombozytenextrakt (PL) zum Kulturmedium.

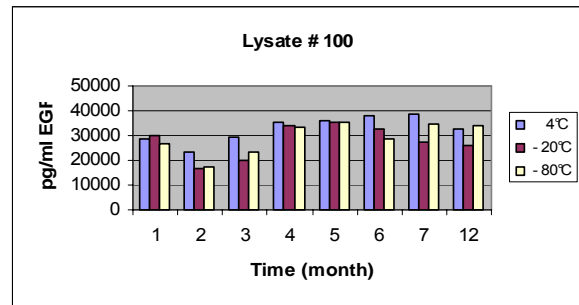
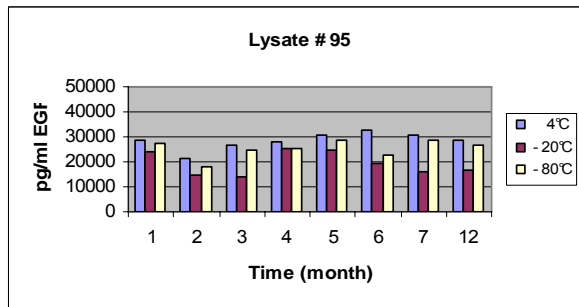
Diskussion - Offene Fragen - Ausblick:

Insgesamt wurden bis Ende des Jahres 2009 ca. 160 Thrombozytenspenden aufgearbeitet. Die stichprobenartig vorgenommenen ELISAs ergaben z. T. große Variationen hinsichtlich der Wachstumsfaktorkonzentrationen (s. Tabelle 1). Dies liegt nicht an der Extraktionsmethode, die mittlerweile standardisiert ist, sondern sind interindividuelle Unterschiede, abhängig von Alter, Geschlecht, Gewicht und Allgemeinzustand der Spender.

Zur weiteren Charakterisierung und evtl. als Erklärungsmöglichkeit für die z. T. sehr unterschiedlichen Ergebnisse in der Zellkultur in Bezug auf Proliferation, Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, Zellmorphologie, etc. sollen ferner EGF, HGF und IGF (evtl. auch TGF- β) als Einzelsubstanzen in unterschiedlichen, definierten Konzentrationen mit Gesamtextrakten verglichen werden. Dabei können u. U. die Konzentrationsunterschiede, speziell von EGF und IGF, ermittelt und die unterschiedlichen Ansprüche der getesteten Zelllinien eingegrenzt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt der experimentellen Arbeiten im laufenden Projektjahr umfaßt die Ausarbeitung eines *Good Manufacturing Practice* (GMP)-Protokolls zur Herstellung, Lagerfähigkeit und Anwendung der Thrombozytenextrakte. Erste Versuche zur Haltbarkeit und Lagerfähigkeit der Extrakte wurden bereits initiiert. Dabei werden Extraktproben bei 4 °C, -20 °C und -80 °C für 1, 3, 6, 9 und 12 Monate gelagert und anschließend analysiert:

Die nachfolgenden Abbildungen (**Abb. 3a, 3b**) zeigen erste Ergebnisse der Lagerungsversuche. Zwei unterschiedliche Extraktpräparationen (#95 und #100) wurden bei 4 °C, -20 °C und -80 °C für 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 12 Monate gelagert und der Gehalt an EGF mittels ELISA bestimmt:



In der geplanten und z. T. bereits begonnen Zusammenarbeit mit anderen Zellkulturlaboratorien sollen die von uns hergestellten Thrombozytenextrakte an weiteren Zellsystemen getestet werden, deren Ansprüche an Wachstumsfaktoren im Vergleich zu den bisher kultivierten Zellen unterschiedlich sein könnten.

Erste Vorversuche mit Tissue Engineering-Labors in Österreich und Deutschland (Kultivierung humaner Chondrozyten und Cornea-Epithelien) sowie Experimente an humanen mesenchymalen (adulten) Stammzellen erbrachten durchwegs **positive** und sehr **erfolgsversprechende** Resultate.

Im **Berichtsjahr 2009** wurden die gesammelten Ergebnisse auf der Jahrestagung der *European Society for Animal Cell Technology* (ESACT) in Dublin, Irland, Juni 2009, auf dem *7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences* in Rom, September 2009, sowie auf der *1. Jahrestagung der Österreichischen Gesellschaft für Molekulare Biowissenschaften und Biotechnologie* (ÖGMBT) in Innsbruck, September 2009, erfolgreich präsentiert:

Abstracts:

Rauch C., Feifel E., Spötl H.P., Amann E.-M., Schennach H., Schöffl H., Pfaller W. and Gstraunthaler G. Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. 21st Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, 2009.

Rauch C., Feifel E., Spötl H.P., Amann E.-M., Schennach H., Frank. J., Schöffl H., Pfaller W. and Gstraunthaler G. Alternatives to the Use of Fetal Bovine Serum: Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome, Italy, ALTEX 26 (Spec. Issue): 119, 2009.

Rauch C., Feifel E., Spötl H.P., Amann E.-M., Schennach H., Schöffl H., Pfaller W. and Gstraunthaler G. Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. 1st Annual Meeting of the Austrian Association of Molecular Life Sciences and Biotechnology, Innsbruck, 2009.



Beteiligte Labore:

Medizinische Universität Innsbruck – Sektion f. Physiologie; zet-LSL

3.4.3 Entwicklung eines funktionellen dreidimensionalen (3D) Leberzellkulturmodellsystems für die Arzneimittelforschung

Projektleiter: Prof. Dr. Jürgen Frank

ProjektmitarbeiterIn: Dr. Reza Mohammad Lornejad-Schäfer
Dr. Christine Schäfer

Projektbeginn: Juni 2008

Projektabschluss: offen

3.4.3.1 Ziel des Projektes

Gegenstand des Projektes ist die Entwicklung und Charakterisierung eines komplexen dreidimensionalen (3D) *in vitro* Zellkulturmodellsystems, in dem humane Leberzellen (HepaRG) ihre Funktionen über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten und die daher auch zur Untersuchung von Langzeiteffekten verwendet werden können. Die Eignung des entwickelten Modells für die Untersuchung zur hepatischen Toxizität von Medikamenten soll anhand von Referenzsubstanzen überprüft werden.

Hintergrund des Projektes:

Vorhersagen zur Toxizität und Effekten von Wirkstoffen sind für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse. Vor allem sind *in vitro* Analysen mit Leberzellen zur Ermittlung der Toxizität und Verträglichkeit von Arzneimitteln in der letzten Zeit verstärkt in den Mittelpunkt gerückt, nicht zuletzt auch, um die Anzahl von Tierversuchen zu reduzieren. Bei diesen *in vitro* Analysen werden bisher überwiegend isolierte Leberenzyme, primäre Hepatozytenkulturen oder Organschnitte verwendet. Obwohl vor allem die primären Leberzellkulturen als „goldener Standard“ gelten, haben auch sie gravierende Nachteile im täglichen Gebrauch. Eine kontinuierliche Versorgung mit primären humanen Hepatozyten ist kostspielig und schwierig durchzuführen. Außerdem lassen sich die physiologischen Eigenschaften primärer Hepatozyten nur für wenige Tage in Kultur aufrecht erhalten. Weiterhin gibt es interindividuelle Schwankungen bei der Expression wichtiger Leberenzyme der Phase I und II (Phase I Enzyme fügen funktionelle Gruppen (-OH; -SH) in die unpolaren Moleküle ein; in der Phase II (Konjugationsreaktionen) werden die Moleküle über die funktionellen Gruppen mit wasserlöslichen Molekülen verbunden (konjugiert) und können dann entweder über die Nieren oder über die Galle ausgeschieden werden), sodass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse oft nicht gewährleistet werden kann. Eine Alternative zu primären Hepatozyten stellen Leberkarzinomzelllinien (Hepatomzelllinien) wie zum Beispiel HepG2-Zellen dar, die jedoch einen Teil ihrer leberspezifischen Funktionen (Expression spezifischer Cytochrom P450 Oxidoreduktasen) verloren haben. Sie können daher nur noch für spezifische Fragestellungen eingesetzt werden. Die patentierte Zelllinie HepaRG scheint die Eigenschaften von primären Hepatozyten und Hepatomzelllinien zu vereinen. HepaRG-Zellen lassen sich je nach Kulturbedingung entweder als stark proliferierende Progenitorzellen halten oder, unter Zugabe von DMSO, in hepatozytäre Zellen differenzieren.

Die *in vitro* differenzierten HepaRG-Zellen besitzen ähnliche physiologische Eigenschaften wie primäre Hepatozyten, lassen sich aber wesentlich länger funktionell in Kultur halten. Obwohl *in vitro* Systeme nie die Komplexität eines ganzen Organismus ersetzen können ist man bestrebt, der *in vivo* Situation so nahe wie möglich zu kommen. Man hat festgestellt, dass das Wachstum der Zellen im dreidimensionalen Raum die Ausprägung zelltypischer Eigenschaften fördert.

Eine Nachbildung des natürlichen dreidimensionalen Zellmilieus erfolgt in unserem Projekt mithilfe einer dreidimensionalen offenen Struktur aus plasmaaktiviertem (hydrophil-modifiziertem) Polystyrol, welches uns von der GWP GmbH, München, Deutschland zur Verfügung gestellt wird. Durch die Kultivierung von Zellen in dreidimensionalen Konstrukten soll versucht werden, die natürlichen Wachstumsbedingungen der Zellen nachzubilden, sodass eine organoide Struktur geschaffen werden kann. Die so hergestellten und validierten Zellträger im 24-Well Format können nach einer geeigneten Besiedlung als leistungsfähiges Testsystem für pharmazeutische Wirkstoffe eingesetzt werden.

Stand der experimentellen Arbeiten:

Im April 2008 konnte mit der Kultivierung der Leberzelllinie HepaRG, welche uns von INSERM-Transfert zur Verfügung gestellt worden ist, begonnen werden. Es wurde zunächst ein ausreichend großer Zellstock angelegt, um einen kontinuierlichen Nachschub an HepaRG-Zellen sicher zu stellen.

HepaRG-Zellen wurden zunächst in handelsüblichen Zellkulturschalen zweidimensional (2D) kultiviert. Wird diese humane Leberprogenitor-Zelllinie bei geringer Zelldichte kultiviert und passagiert, befinden sich die HepaRG-Zellen in einem undifferenzierten, sich aktiv teilendem Stadium. Werden die Zellen konfluent, beginnen sie teilweise zu differenzieren und es bilden sich Kolonien von Hepatozyten ähnlichen und biliären epithelialen Zellen. Will man die Zellen „vollständig“ differenzieren, müssen postkonfluent gehaltene Zellen unter hohen Konzentrationen von DMSO weiterkultiviert werden.

Ziel unserer Arbeiten ist es, eine Langzeitkultur von differenzierten, metabolisch aktiven Leberzellen über mindestens 28 Tage in einer dreidimensionalen Matrix (3D) zu erhalten. Als 3D-Matrix dient oberflächenmodifiziertes Polystyrol (plasmaaktiviertes Polystyrol), welches in Form eines kleinen „Schwämmchens“ von der GWP (München, Deutschland) in Form einer Kooperation bereitgestellt wurde (Abb.1).

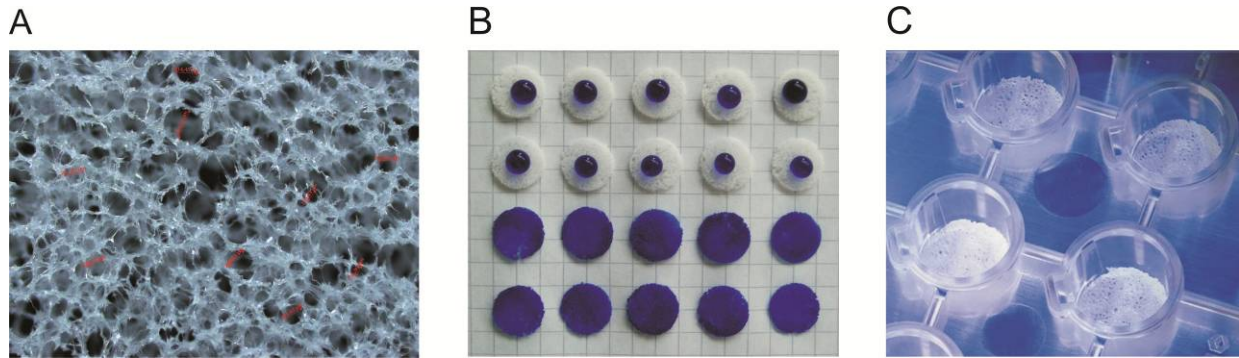


Abb.1: Zeigt die verwendete 3D-Matrix (Scaffold). Material: Polystyrol. Flüssigkeitsaufnahme der „Schwämmchen“: Max. 100 μL . Durchschnittliche Porengröße: 200 – 300 μM . Durchmesser: 1,0 – 1,2 mm, Volumen: 95,03 - 114,04 mm^3 . **A:** Zeigt die Struktur und Porengröße der verwendeten Polystyrolmatrix. **B:** Durch Oberflächenmodifikation (Plasmaaktivierung) nimmt die Benetzbarkeit der Polystyrolmatrix sehr stark zu. Erst dadurch können sich Zellen an die Kunststoffoberfläche anheften. **C:** Das Polystyrol wird in Form eines „Schwämmchens“ in extra dafür entwickelte Kulturschalen eingebracht und sterilisiert. Danach kann es für die Zellkultur verwendet werden. (Die Aufnahmen in Abb. 1 wurden uns freundlicherweise von der GWP zur Verfügung gestellt).

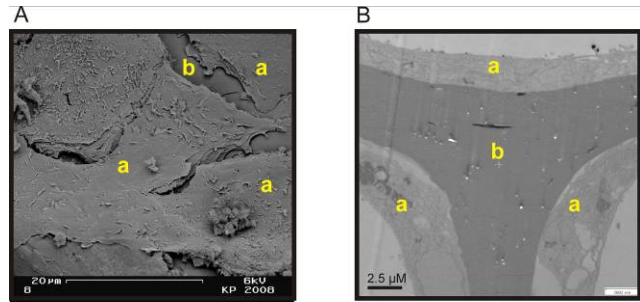
Besiedelung der oberflächenmodifizierten Polymerschäume durch HepaRG-Zellen

Durch Anfärbung der Zellen mit Hämatoxylin konnten wir feststellen, dass eine Suspension von HepaRG-Zellen in die 3D-Polystyrolmatrix eindringt und die Polystyrolmatrix von den Zellen besiedelt wird (Abb. 2 A, (I)). Momentan können wir noch keine Aussage treffen, ob die 3D-Polystyrolmatrix vollständig, d.h. auch in der Tiefe, von den Leberzellen besiedelt wird, da die histologische Aufarbeitung der Polymerschäume noch Schwierigkeiten bereitet. MTT-Tests ergaben eine gleichmäßige Blaufärbung der besiedelten Polystyrolmatrix, was durch die intrazelluläre Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalzes in blaues unlösliches Formazan durch metabolisch aktive Zellen zustande kommt. Abb. 2 lässt auf eine homogene Besiedelung der Polystyrolmatrix, mit HepaRG-Zellen schließen (Abb. 2 B, (I), Schwämme in Well 2, 3). Als Negativkontrolle (Well 1) wurden unbesiedelte „Schwämme“ analysiert. Sie blieben nach dem MTT-Test gelblich gefärbt und zeigten, wie erwartet, keine Metabolisierung des gelblichen Substrates in blaues Formazan.

Ultrastrukturanalysen

Die mit HepaRG besiedelte 3D-Polystyrolmatrix wurde in Innsbruck (Univ. Prof. Dr. Walter Pfaller, Medizinische Universität Innsbruck – Sektion für Physiologie) mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) analysiert. Dort, wo die Zellen die plasmaaktivierte Polystyrolmatrix besiedelten, wuchsen sie einschichtig und bildeten auf ihrer Oberfläche Mikrovilli aus (Abb. 3 A und B).

Abbildung 3: Rasterelektronen- (REM) und Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen von HepaRG-Zellen (Aussaat 1×10^5 Zellen/3D-Matrix) nach 6 Tagen Kultivierungszeit. **(A):** REM: Ausbildung eines einschichtigen Epithels von HepaRG-Zellen auf der Polystyrolmatrix. Die 35-40 μm langen HepaRG-Zellen bilden auf ihrer apikalen Seite eine Reihe von Mikrovilli aus. **(B):** TEM: Einschichtig an der Polystyrolmatrix anhaftende HepaRG-Zellen (Höhe ca. 5 μm). a) HepaRG-Zellen, b) Polystyrol scaffold. Deutlich sichtbar sind verschiedene Zellorganellen wie Zellkern, Mitochondrien, Endoplasmatisches Retikulum, etc. (Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an der Medizinische Universität Innsbruck – Sektion für Physiologie von Univ. Prof. Dr. Walter Pfaller angefertigt).



Bestimmung der Zellproliferation von HepaRG-Zellen unter 2D- und 3D-Zellkulturbedingungen

Die „Zellproliferation“ von HepaRG-Zellen unter 2D- und 3D-Zellkulturbedingungen wurde mittels MTT-Test bestimmt. Die Bildung von Formazan im 3D-Modell war im Vergleich zum konventionellen 2D-Modell stark erhöht. (Abb.4). Dies lässt auf eine erhöhte Proliferation im 3D-Modell schließen.

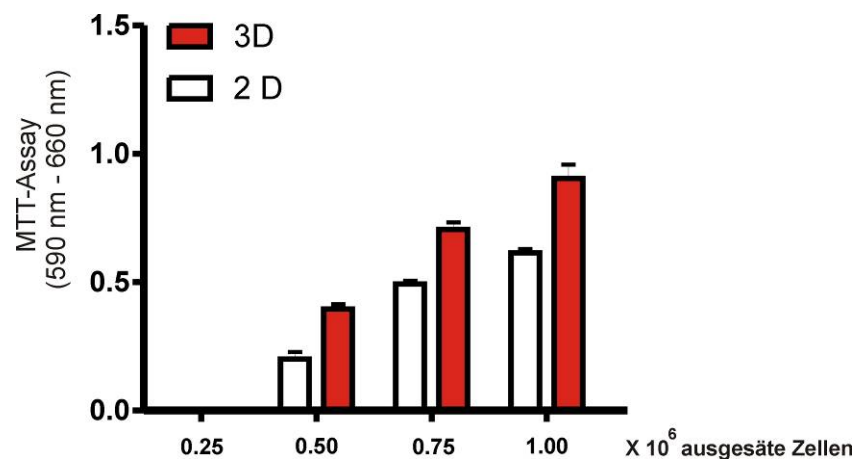
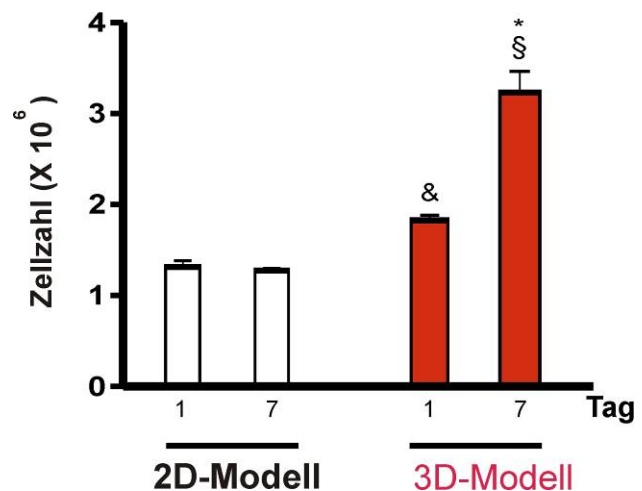


Abbildung 4: Vergleich der Zellproliferation von HepaRG-Zellen unter 2D- und 3D Zellkulturbedingungen mittels MTT-Test ($n=3$). Es wurden $0,25 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$, $0,75 \times 10^6$ und 1×10^6 HepaRG-Zellen ausgesät und in 2D- bzw. 3D-Kultur 24 h kultiviert und dann mit dem MTT-Reagenz inkubiert. Die Absorption von umgesetzten gelben Tetrazoliumsals zum blauen Formazan in den ausgesäten Zellen wurde photometrisch bestimmt.

Zellzahlbestimmung von HepaRG-Zellen mittels MTT-Assay

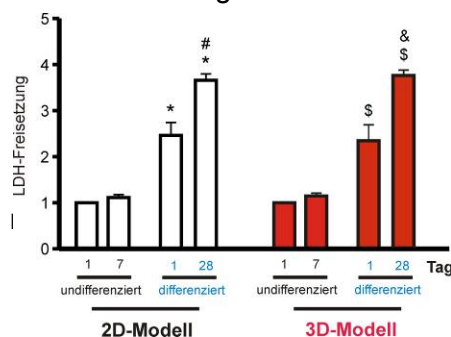
Die Zellzahlbestimmung von HepaRG-Zellen wurde unter 2D- bzw. 3D-Zellkulturbedingungen indirekt mittels MTT-Test erfasst. Wenn man davon ausgeht, dass die intrazelluläre Umsetzung des gelben Tetrazoliumsals in blaues unlösliches Formazan in Abhängigkeit von der Zellzahl stattfindet, kann man mit diesem Test auch indirekt auf die Anzahl der Zellen schließen. Die Zellzahlbestimmung von HepaRG-Zellen im 2D- bzw. 3D-Modell erfolgte anhand der Standardkurve der Zellproliferation von HepaRG-Zellen im 2D- bzw. 3D-Modell mittels MTT-Test (Abb. 5).

Abbildung 5: Zellzahlbestimmung mittels MTT-Assay. Die Zellzahlbestimmung von HepaRG-Zellen im 2D- bzw. 3D-Modell erfolgte anhand der Standardkurve der Zellproliferation von HepaRG-Zellen im 2D- bzw. 3D-Modell mittels MTT-Test. &: $p < 0.005$ vs. Tag 1 von proliferierenden Zellen im 2D-Modell; §: $p < 0.001$ vs. Tag 7 von proliferierenden Zellen im 2D-Modell; *: $p < 0,005$ vs. Tag 1 von proliferierenden Zellen im 3D-Modell. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM mit $n = 3$ Wiederholungen.



Bestimmung der Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung

Die LDH-Freisetzung als Zytotoxizitätsparameter wurde in differenzierten und undifferenzierten (proliferierenden) HepaRG-Zellen im 2D- und 3D-Modell mittels LDH-Assay untersucht. Undifferenzierte HepaRG-Zellen zeigten in beiden Modellen keine Zunahme der LDH-Freisetzung. Erst nach Induktion der Differenzierung mittels DMSO kam es in beiden



Modellen zu einer signifikanten LDH-Freisetzung, die nach 28 Tagen die höchsten Werte erreichten (Abb. 6). Die LDH-Freisetzungen bei undifferenzierten und

differenzierten HepaRG-Zellen sind zu Beginn (Tag 1) und zum Ende (Tag 28) der Kultivierung im 2D und 3D-Modell vergleichbar.

Abbildung 6: Bestimmung der Zytotoxizitätsrate mittels LDH-Assay. Für den Vergleich der Zytotoxizität in differenzierten und undifferenzierten (proliferierenden) HepaRG-Zellen im 2D- und 3D-Modell wurden die Zellen mit 1×10^6 Zellen/Well (24-Well Zellkulturplatte) bzw. Polystyrolmatrix ausgesät. Die Differenzierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1% DMSO in das Zellkulturmedium. Die angegebene DMSO-Konzentration war während der gesamten Differenzierungsphase (Tag 1–28) konstant. Anschließend wurde in den Zellkulturüberständen die LDH-Freisetzung mittels LDH-Assay ermittelt. *: $p < 0.0001$ vs. Tag 1, undifferenzierte Zellen im 2D-Modell; #: $p < 0.0001$ vs. Tag 1 von differenzierten Zellen im 2D-Modell, \$: $p < 0.005$ vs. Tag 1 von undifferenzierten Zellen im 3D-Modell, &: $p < 0.005$ vs. Tag 1 von differenzierten Zellen im 3D-Modell. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM mit $n=8$ Wiederholungen.

Wachstumsverhalten von HepaRG-Zellen im 3D-Modell

Im Lauf der Zeit hat sich herausgestellt, dass die Besiedelung der 3D-Polystyrolmatrix (Durchmesser 11 mm, Schichtdicke 1,0 – 1,2 mm, Porengröße 200 -300 μ m) am besten mit einer Aussaatdichte von 1×10^6 HepaRG-Zellen pro „Schwämmchen“ erfolgen soll. Eine Woche (7 Tage) nach der Aussaat ist die max. Zelldichte in der räumlich begrenzten 3D-Polystyrolstruktur erreicht. Zwischen Tag 8 und 14 sterben die nicht differenzierten Zellen teilweise ab oder beginnen sich von ihrer Unterlage abzulösen. Die Zellproliferation sinkt und die Zytotoxizität (Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) in das Medium) steigt zwischen Tag 7 und 14 stark an. Aufgrund dieser Beobachtungen haben wir festgelegt, die Zellen nach Tag 7 mittels DMSO zu differenzieren, sodass in der 3D-Matrix differenzierte, metabolisch aktive Hepatozyten zur Verfügung stehen. Wie lange sich differenzierte HepaRG-Zellen unter 3D-Bedingungen kultivieren lassen ist bisher unbekannt und wird von uns derzeit untersucht.

Vergleich der Cytochrom-P450 Expression in differenzierten und undifferenzierten HepaRG-Zellen

Eine wichtige Stoffwechsellistung metabolisch aktiver Leberzellen ist die Biotransformation von Fremdstoffen und Giften durch zahlreiche Cytochrom P450 (CYP) Oxidoreduktasen. Wichtige humane CYPs sind die Phase I Enzyme (CYP3A4, CYP2B6, CYP1A2, CYP2D6 und CYP2C9). Die humane Leber ist das Organ mit dem höchsten Cytochrom P450-Enzymgehalt des Organismus. Sie enthält 90 bis 95 % der Cytochrom P450-Enzyme, von denen viele den Arzneimittelmetabolismus katalysieren. Die CYP3A-Subfamilie ist für die Verstoffwechslung einiger besonders wichtiger Arzneistoffe wie Amiodaron, Ciclosporin, Diazepam, Lidocain, Warfarin, Cerivastatin, Phenytoin oder Loratadin verantwortlich.

Differenzieren HepaRG-Zellen unter DMSO, sollte sich dies auch in der Grundexpression und der Induzierbarkeit leberspezifischer CYPs niederschlagen. Daher wurde die mRNA-

Expression ausgewählter CYPs in undifferenzierten und differenzierten HepaRG-Zellen im 2D- und 3D-Modell gemessen und verglichen. Die Differenzierung von HepaRG-Zellen wurde mittels DMSO induziert. Am Tag 1 und Tag 28 nach Induktion der Differenzierung wurde die CYP-Expression mittels qRT-PCR bestimmt (Abb. 7).

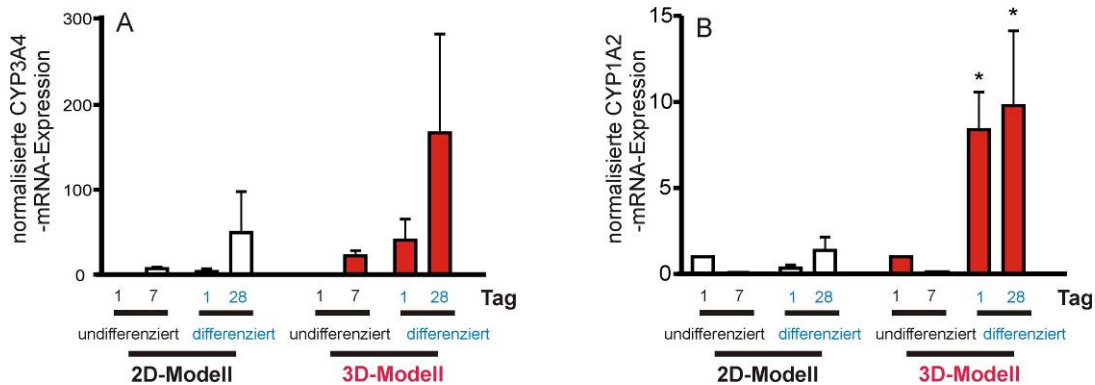


Abbildung 7: CYP3A4- (A) und CYP1A2-mRNA-Expression (B) in HepaRG Zellen in 2D- bzw. 3D-Modellen. Für den Vergleich der CYP-Expression in differenzierten und undifferenzierten (proliferierenden) HepaRG-Zellen im 2D- und 3D-Modell wurden die Zellen mit 1×10^6 Zellen/Schwamm beziehungsweise 1×10^6 Zellen/Well (24-Well Zellkulturplatte) ausgesät. Die Differenzierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1% DMSO in das Zellkulturmedium. Die angegebene DMSO-Konzentration war während der gesamten Differenzierungsphase (Tag 1 – 28) konstant. Nach der Ernte wurden die Zellen lysiert und die RNA isoliert. Die Untersuchungen zum Nachweis der CYP mRNA-Expression erfolgten mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR). Die angegebenen Werte sind relative Werte und beziehen sich auf die mRNA Expression am Tag 1 von undifferenzierten HepaRG Zellen, die auf 1 gesetzt wurden. * $p < 0.05$ vs. Tag 1 von undifferenzierten Zellen im 3D-Modell. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM mit $n=4-6$ Wiederholungen.

Es zeigte sich, dass es in beiden Modellsystemen (2D und 3D) zu einer zeitabhängigen Zunahme der CYP mRNA-Expression nach Induktion der Differenzierung durch DMSO kam. Die Induktion der CYP mRNA Expression war im 3D-Modell jedoch wesentlich höher als im 2D Modell (Abb. 7). HepaRG-Zellen, die sich in der proliferativen Phase befanden, zeigten keine bzw. nur eine geringe Induktion der untersuchten CYPs auf mRNA Ebene. Einige der Oxidoreduktasen wie z.B. CYP2C9 (Daten nicht gezeigt) konnten nur im 3D-Modell und nicht im 2D-Modell nach Differenzierung induziert werden. Dies lässt auf eine funktionelle Verbesserung der Leberzellen im 3D-Modell schließen.

Bestimmung der CYP-Aktivität mittels fluorogener Substrate

Die spezifische Aktivität von CYP1A2 nahm in differenzierten HepaRG-Zellen nach 28 Tagen Kultivierungszeit gegenüber den nicht differenzierten HepaRG-Zellen signifikant zu. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass im 3D-Modell die spezifische CYP1A2-Aktivität in differenzierten HepaRG-Zellen sehr viel höher ausfiel als im 2D-Modell.

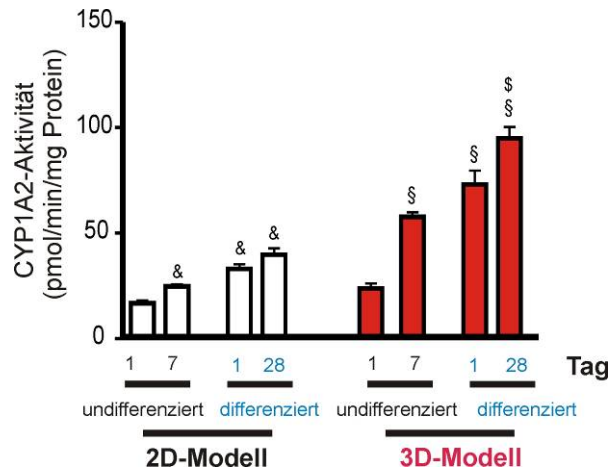


Abbildung 8: Aktivität von CYP1A2 in HepaRG-Zellen. Für den Vergleich der CYP1A2-Aktivität in differenzierten und undifferenzierten (proliferierenden) HepaRG-Zellen im 2D- und 3D-Modell wurden die Zellen mit 1×10^6 Zellen/Schwamm beziehungsweise 1×10^6 Zellen/Well (24-Well Zellkulturplatte) ausgesät. Die Differenzierung der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1% DMSO in das Zellkulturmedium. Die angegebene DMSO-Konzentration war während der gesamten Differenzierungsphase (Tag 1–28) konstant. Die Aktivität von CYP1A2 wurde nach 1h Inkubation mit dem fluorogenen Substrat (15 μ M Ethoxyresorufin (EROD)) in den Zellkulturüberständen mittels Fluoreszenzreader ermittelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteinmenge bestimmt (Bio-Rad Protein-Assay). & $p < 0.005$ vs. Tag 1 von undifferenzierten Zellen im 2D-Modell; § $p < 0.0005$ vs. Tag 1 von undifferenzierten Zellen im 3D-Modell; § $p < 0.005$ vs. Tag 28 von differenzierten Zellen im 2D-Modell. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM mit $n = 4-6$ Wiederholungen.

Bestimmung der Albuminsynthese durch HepaRG-Zellen als leberspezifischer Parameter mittels ELISA:

Die Albuminsekretion (Leberfunktionsparameter) wurde in undifferenzierten (Tag 1 und 7) und in differenzierten (Tag 1, 14, 28) HepaRG-Zellen unter 2D- bzw. 3D-Kulturbedingungen untersucht. Wir konnten zeigen, dass unter 3D-Kulturbedingungen in den Kulturüberständen von undifferenzierten HepaRG-Zellen am Tag 7 signifikant mehr Albumin vorhanden war als bei vergleichbaren Zellen unter 2D-Kulturbedingungen. Nach Differenzierung der Zellen kam es in beiden Modellsystemen im Verlaufe der Zeit zu einer leichten Abnahme der Albuminsynthese, wobei die Albuminsynthese im 3D-Modell stets höhere Werte erreichte. Dies spricht für eine bessere Funktionsweise der Zellen unter 3D-Zellkulturbedingungen.

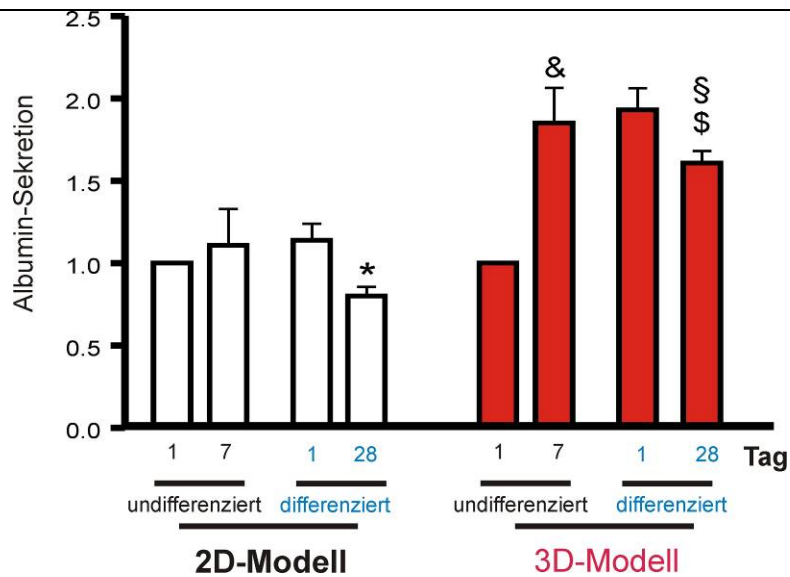


Abbildung 10: Unterschiede in der Albuminsekretion in undifferenzierten und differenzierten HepaRG-Zellen unter 2D- bzw. 3D-Zellkulturbedingungen. Die Albuminsekretion am Tag 1 von undifferenzierten Zellen im 2D oder 3D-Modell wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte des jeweiligen Modells darauf bezogen. *: $p < 0.01$ vs. Tag 1 von undifferenzierten Zellen im 2D-Modell, &: $p < 0.001$ vs. Tag 1 von undifferenzierten Zellen im 3D-Modell, §: $p < 0.0001$ vs. Tag 28 von differenzierten Zellen im 2D-Modell. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM mit $n = 4-12$ Wiederholungen.

Co-Kulturen von LX-2 (Sternzellen) und HepaRG-Zellen

LX-2 Zellen (Sternzellen)

LX-2 Zellen (Sternzelllinie) wurden uns von Herrn Prof. Friedman (USA) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wird derzeit in unserem Labor kultiviert (siehe Abb. 11).

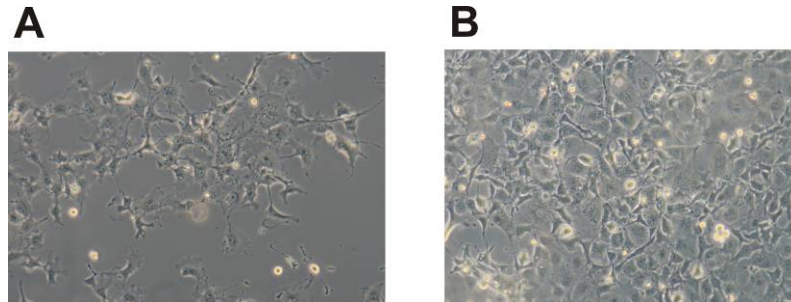


Abbildung 11: LX-2-Zelllinien 3 Tage (A) bzw. 5 Tage (B) nach ihrer Aussaat in normale Zellkulturflaschen (2D-Kultur). Vergrößerung 10 x.

Die Sternzellen (Ito-Zellen) sind an der Bildung von extrazellulärer Matrix in der Leber beteiligt und interagieren mit Leberparenchymzellen. Ihnen wird eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Hepatozyten zugesprochen.

Co-Kulturen von HepaRG-Zellen mit LX-2 Zellen

Eine Verbesserung unseres Lebermodells in funktioneller Hinsicht versprechen wir uns von der Co-Kultivierung von HepaRG- mit LX-2 Zellen, da erst die Interaktion von unterschiedlichen Leberzellen eine „organoide“ Struktur schaffen kann. Zur Zeit werden verschiedene Zellkulturmedien getestet, um herauszufinden, welche für die Proliferation bzw. Differenzierung von HepaRG-Zellen in Co-Kultur mit LX-2 geeignet sind. Abbildung 12 zeigt ein Beispiel einer gemeinsamen Kultivierung von LX-2 und HepaRG im Verhältnis 1:1. Der Nachweis der Verbesserung von leberspezifischen Funktionsparametern wurde an diesem Co-Kultursystem bisher noch nicht durchgeführt.

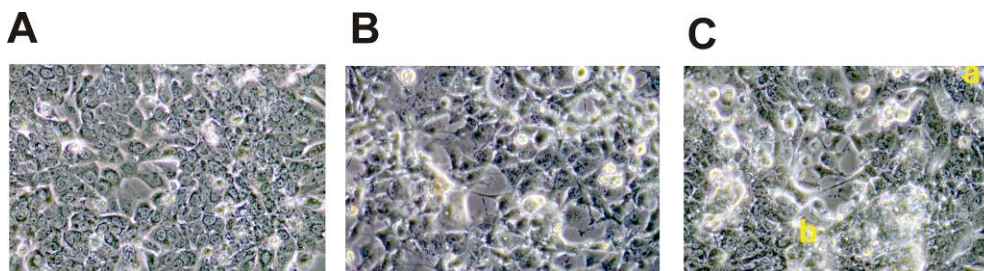
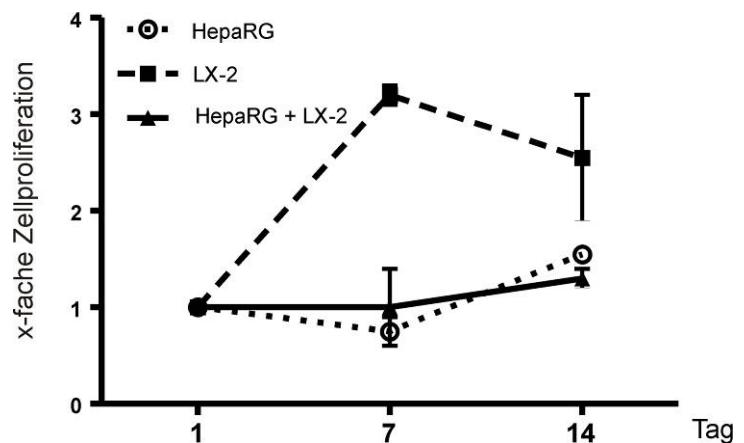


Abbildung 12: HepaRG- (A), LX-2-Zelllinien (B) und deren Co-Kultivierung (C) im herkömmlichen 2D-Modell. a) LX-2-Zellen. b) HepaRG-Zellen, Vergrößerung 10 x.

Vergleich des Wachstumsverhaltens der HepaRG-LX-2-Kokultur mit der HepaRG- oder LX-2-Monokultur im 3D-Modell

Um das Wachstumsverhalten der HepaRG-LX-2-Kokultur zu vergleichen, wurden die HepaRG- und LX-2-Zellen gleichzeitig auf PS-Scaffolds ausgesät und für 1, 7 bzw. 14 Tage kultiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die HepaRG-LX-2-Kokultur eine ähnliche Wachstumskurve wie die HepaRG-Zell-Monokultur in Abhängigkeit von der Zeit aufwies, während in Monokultur die LX-2 Zelllinie anfangs stärker proliferierte im Vergleich zur HepaRG Zelllinie. Die Wachstumskurve der HepaRG-LX-2 Kokultur war gegenüber der Wachstumskurve der LX-2-Zellen-Monokultur zwar verlangsamt, aber vergleichbar mit der der HepaRG-Zellen. Die LX-2-Zellen wuchsen in der Kultur in der Anfangsphase viel schneller aber nach 14 Tage Kultivierungszeit nahm die Zellproliferation rapid wieder ab (siehe Abb. 13). Im Gegensatz dazu blieb die Zellproliferation in der Kokultur während der Kultivierung auf stabilem Niveau.

Abbildung 13: Vergleich der Zellproliferation von HepaRG-, LX-2-Zellen und der HepaRG-LX-2-Kokultur im 3D-Modell. Es wurden 1×10^6 HepaRG- bzw. 1×10^4 LX-2-Zellen oder beide Zellen/Schwamm beziehungsweise Well (24-Well Zellkulturplatte) ausgesät und für 1, 7 oder 14 Tage im Kultur gehalten. Anschließend wurde die Zellproliferation mittels MTT-Assay ermittelt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm SEM mit $n=2$ Wiederholungen.



Beteiligte Labore:

- I) zet-LSL: Projektleiterinnen: Dr. C. Schäfer und Dr. M. R. Lornejad-Schäfer
- II) Prof. Friedman aus USA und Prof. Weiskirchen aus Universitätsklinikum Aachen Klinik
- III) GWP, München, Deutschland
- IV) Medizinische Universität Innsbruck – Institut für Physiologie und Medizinische Physik

3.5 Projekt- / Drittmittelanträge im Jahr 2009

3.5.1 Gestellte Anträge

3.5.1.1 FP7-HEALTH-2010- 4.2.9.7 TOXIC

Im Rahmen des siebten Rahmenprogrammes der Europäischen Kommission haben der Dachverband der Europäischen Kosmetikindustrie und die Europäische Kommission eine Ausschreibung für 6 Projekte gestartet, die die grundlegende Entwicklung zur Absicherung von Kosmetika finanziell fördert. Das vorliegende Projekt beantragt finanzielle Mittel für die wissenschaftliche Koordinierung aller 6 Projekte.

Beteiligte Labore:

Interfaceurope

IVTIP (In Vitro Testing Industrial Platform)

zet-LSL

3.5.1.2 FP7-NMP-ArtIncell

Es wurde ein Eurostars-Antrag mit einem spanischen KMU (Institut univ. De Ciencia i Tecnologia) initiiert. Im Rahmen der Kooperation soll zet-LSL in vitro Assays für die Biokompatibilität und Aktivität von Exopolysacchariden entwickeln, welche bei Patienten mit Gelenk-Entzündungen zum Einsatz kommen sollen.

3.5.1.3 FP7-NMP-IntelliScaff

INTELLIScaff macht Gebrauch von der neuesten Entwicklungen in der Polymer Chemie, Oberflächenphysik und Herstellung von Nano-Biomaterialien, insbesondere Nanofasern und monolithischen Nanomaterialien, um neue Matrices für das Tissue Engineering zu entwerfen und herzustellen.

Diese Materialien werden intensiv daraufhin untersucht, in wie weit sie Verwendung finden können, geschädigte Zellen, Gewebe und Organe zu regenerieren. Hierbei wird vermehrt auf in vitro Methoden zurückgegriffen, die während des Projektverlaufs etabliert werden. Sie werden in erster Linie mit Zellen menschlichen Ursprungs entwickelt.

Besondere Aufmerksamkeit wird den Oberflächen geschenkt, insbesondere den Eigenschaften, die durch Oberflächenbindung von Molekülen verändert werden können.

3.5.2 Projekte/Projektideen, bei denen eine Drittmittelförderung abgelehnt wurde:

3.5.2.1 COIN – Programmlinie Aufbau (FFG)

Konkretes Ziel des Forschungsantrages in COIN-Programmlinie Aufbau ist es,

- Die wachstums- und proliferationsfördernde Wirkung humaner Thrombozytenextrakte auf *in vitro* kultivierte Zellen zu untersuchen und
- Thrombozytenextrakte als Alternative zur Verwendung von fötalem Kälberserum in der Zell- und Gewebekultur zu entwickeln.

Vor allem im Bereich „Tissue Engineering“ (Gewebezüchtung) müssen Alternativen zu tierischen Seren gefunden werden, da tierische Seren eine immunologische Reaktion bei der Reimplantation von Zellen- und Geweben hervorrufen können und das Risiko einer Kontamination mit tierischen Erregern oder Pyrogenen aufweisen. Für die Realisation des Projektes muss die notwendige Infrastruktur geschaffen werden. Zurzeit verfügt das zet-LSL über eine Labor- und Bürofläche von ca. 40 m², die bei der UAR (Upper Austrian Research GmbH) in der Abt. ZBN (Zentrum für Biomedizinische Nanotechnologie) angemietet sind. Da bei der UAR selbst räumliche Engpässe bestehen, ist eine Weiterentwicklung des Labors an diesem Standort nicht möglich. Für die Durchführung des geplanten Projektes als auch für den Aufbau eines Kompetenzzentrums „Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen“ ist eine Erweiterung des zet-LSL unbedingt notwendig. Die angestrebte Partnerschaft mit dem EU-Validierungszentrum ECVAM (European Centre for the Validation of Alternatives) ist nur mit einem Ausbau der Labor- und Büroflächen und der Einführung einer QM-Struktur zu erreichen. D. h., die bestehende Büro- und Laborfläche des zet-LSL muss von ca. 40 m² auf ca. 400 m² erweitert werden. Eine Akkreditierung des Labors gemäß GLP/GMP und/oder ISO 9001, als auch die Aufstockung von Personal und apparativer Ausstattung im Laborbereich, sind für die umfangreichen F&E Arbeiten im Projekt selbst als auch für die Stärkungen unserer zentralen Kompetenz unbedingt notwendig.

Beteiligte Labore:

zet-LSL

3.5.2.2 3DNANOTOXASSAYS

Development of assays based on *in vitro* animal-free physiological three-dimensional cell cultures for the determination of nanoparticle toxicity. Proposal Acronym: 3DNANOTOXASSAYS. Type of funding scheme: Collaborative project, small or medium-scale focused research project. Work programme: NMP-2008-1.3-2 *Impact of engineered nanoparticles on health and the environment*. Coordinator: Dr. Ernst H.K. Stelzer, Cell Biology & Biophysics, Unit (CBBU), EMBL-Heidelberg, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg.

Das zet-LSL ist die diesem EU-Antrag in Form eines Unterauftragnehmers bei Partner Nr. 5 (IMU Renal physiology group; Division of Physiology, Innsbruck Medical University, Prof. Dr. Walter Pfaller, Austria) als Subkontraktor aufgeführt.

Status: Antragstellung (stage 2)

3.5.2.3 Episys

Proposal full title: System biology of distal lung epithelium: modelling injury, plasticity and regeneration. Proposal acronym: episys. Type of funding scheme: Large scale integrating project. Work program topics addressed: HEALTH-2009-2.1.2-1. Name of coordinating person: Paul Dietl

Status: Vorantrag (stage 1). Falls dieser genehmigt wird, wird zur Hauptantragstellung aufgefordert (stage 2). Das zet-LSL ist bei diesem EU-Antrag als Partner Nr. 19 aufgeführt.

4 zet PR & Fundraising

4.1 zet-Charity unter dem Motto „kunst kontra Tierversuche“

Projektleitung: Mag. (FH) Agnes Zohner

ProjektmitarbeiterInnen: Mag. Agnes Zohner
Mag. Daniel Brunner
Dr. Klaus Sommer
DI. (FH) Wolfgang Steiner
Melanie Lechner
Christina Krenner
Jasminka Husic
Silvia Pangerl
Helga Goldberger

Projektzeitraum: April 2008 – Juni 2010

4.1.1 Projektbeschreibung

*...„Kunst im Spannungsfeld zwischen Tierschutz und Wissenschaft“
„Künstler engagieren sich für Alternativmethoden zu Tierversuchen“...*

Auf diesen beiden Ideen basiert das Konzept zur zet - Charity 2009

Das Projekt „zet-Charity 09“ unter dem Motto „kunst kontra Tierversuche“ wurde als Spenden- und Informationskampagne für die Arbeit von zet geplant, die sich über rund neun Monate zog. Ziel der Kampagne war, zet durch möglichst viele Berichterstattungen während des Projektzeitraumes in den Zielgruppen (Generation 35+, Tierfreund, Kunstliebhaber) bekannter zu machen. Die zet-Charity Gala am 9.Oktober.2009 stellte den Höhepunkt der Kampagne dar.

Ein weiteres Ziel des Projekts war, durch den Verkauf von Kunstwerken, die uns KünstlerInnen spendeten, eine Steigerung der Spendeneinnahmen zu erreichen. Als konkretes Ziel wurden mindestens 100 Exponate zu akquirieren und damit Einnahmen von € 40.000,-- zu erzielen, definiert.

4.1.2 Herangehensweise

Der Spenden- und Sponsoringmarkt im NPO-Sektor ist heiß umkämpft. Immer mehr NPOs müssen auf Grund von sinkenden staatlichen Transferleistungen oder Förderungen selbst Spenden- und Sponsoringaktionen durchführen um Finanzierungslücken zu schließen. Um sich mit seiner Aktion von den „Mitbewerber“ abzuheben, muss man

- eine kreative Projektidee vorweisen,
- sich als Organisation professionell präsentieren und
- den Nutzen des Projekts für den Unterstützer und die Organisation klar herausarbeiten.

Alle drei Aspekte, wurden bei der Projektplanung berücksichtigt:

Als kreative Idee wurde für diese „zet-Charity 09“ das Thema „Kunst“ gewählt. Neu und ungewöhnlich an dieser Herangehensweise ist, dass das Thema Tierversuche, dass in der Öffentlichkeit eher negative Assoziationen und ein „wegschauen“ hervorruft, aus einem anderen neuartigen „schöneren“ Blickwinkel gesehen wird. Durch diese geänderte Betrachtungs- und Herangehensweise soll eine Auseinandersetzung mit dem Thema auch in jenen Gesellschaftsgruppierungen erfolgen, die sich bislang der Thematik abgewandt haben.

In dem für die Aktion ein eigenes Logo mit Claim und Corporate Design (CD) entworfen wurde, dass sich an dem CD von zet orientiert und sich in allen Drucksorten und Medien der Aktion wiederfindet, konnte die Basis für eine professionelle Präsentation von zet und der Aktion gelegt werden

Den Nutzen der Aktion für zet, KünstlerInnen und KäuferInnen der Kunstwerke wurde klar im Konzept beschrieben und auf der Website, Infofolder und Kunstcatalog der zet-Charity publiziert. Der Nutzen für zet stellte das erhöhte Aufkommen von Spenden durch den Bilderverkauf dar. Es wurde im Vorfeld der Aktion festgelegt, dass die Spendengelder der Forschung an Alternativmethoden zu Tierversuchen im zet-LSL und der Öffentlichkeitsarbeit für Schülerprojekte zur Verfügung stehen.

4.1.3 Marketing und Corporate Design

Durch ein durchgängiges Design mit Logo, Claim, Farbgebung und Schriftart wird gewährleistet, dass die Aktion bei jeder Publikation und bei jedem Medium eindeutig wiedererkannt wird. Durch ein einheitliches CD wird auch ein professionelles Auftreten verbunden und durch die ständige Wiederholung bleibt es dem Betrachter länger im Gedächtnis.

Damit ein durchgehendes CD für die Kampagne erarbeitet wird, wurde ein Grafikbüro mit der grafischen Aufbereitung der Kampagne beauftragt.

Der Auftrag umfasste folgende Aufgaben:

- Erstellung eines Logo inkl. Claim für die Aktion, unter der Bedingung, dass dieser für weitere Aktionen in der Art wieder verwendet werden kann und für den Einsatz auf unterschiedlichste Medien geeignet ist. Weiters sollte das Logo, Elemente des CDs von zet aufweisen, um auch hier eine Wiedererkennung zu gewährleisten.
- Entwurf von Briefpapier, Infofolder und Einladungen inkl. Antwortkarte
- Programmierung einer Website, auf der sich die KünstlerInnen mit Ihren Werken präsentieren konnten und die gesamte Kampagne (inkl. Ziele und Verwendung der Spendengelder) vorgestellt wird. Hierzu wurde die die Domain www.kunst-kontra-tierversuche.at reserviert.
- Entwurf von einer gestaffelten Plakatkampagne mit zwei Sujets für den Aushang in den öffentlichen Verkehrsmitteln der Linz AG.
- Layoutierung und Erstellung eines Kunstkatalogs.

Sponsoren und Medienpartner

Die Wahl der Sponsoren ist ganz entscheidend für den Erfolg einer Aktion. Das Image der Sponsorfirma muss in das Konzept der Aktion oder NPO passen und deren Werte mittragen.

Auf Grund dieses Hintergrund wurde in der Anfangsphase das Projekt verstärkt nach externen Partnern und Sponsoren für das Kampagne gesucht. Die Wahl fiel auf folgende Unternehmen: „Tips“, „OÖ Nachrichten“, „Casino Linz“, „Dorotheum“, „Pecho“.

Mit den Printmedien wurde die veröffentlichen von 3-4 Artikeln (1 Seite ½ Seite) über zet und die Aktion im Vorfeld der Veranstaltung und eine Nachberichterstattung inkl. Bild vereinbart. Im Gegenzug wird das Logo der Sponsoren auf allen Drucksorten platziert und in Pressemeldungen genannt. Mit den „Tips“ wurde zusätzlich noch die Verlosung von zwei Eintrittskarten für die Gala vereinbart.

Durch das Engagements des „Dorotheum“, als renommiertes Auktionshaus, sollte einerseits die gehobene, besser verdienende Zielgruppe der 35+ Generation angesprochen und andererseits die Seriosität und das hohe Niveau der angebotene Kunst unterstrichen werden.

Das „Casino Linz“, bot uns das Casineum von 9. – 16.10.2009 inkl. Sektempfang kostenlos an. Die exklusive Lokalität passte ideal in das Konzept, da zum Galaabend am 9.10.2009 nur geladene Gäste aus der Wirtschaft und Politik und die KünstlerInnen anwesend sein würden.

Medienmix

Um die Aktion in vielen Gesellschaftsschichten bekannt zu machen, wurden ein Medienmix aus Plakatwerbung, Pressearbeit, Internet, Infofolder und Kunstkatalog gewählt. Durch diese vielfältige Art der Informationszugänge wurde ein breites Publikum in unterschiedlichen Altersgruppen auf die Aktion aufmerksam.

Für die Plakatwerbung wurden zwei unterschiedlichen Sujets zum Anschlag in den öffentlichen Verkehrsmitteln von Linz entworfen. Jeweils 400 Stk. von jedem Sujet hingen im September und Oktober 2009 im Innenraum von Bussen und Straßenbahnen.

Weiters wurde ein Infofolder über die Aktion erstellt und als Leporello den „OÖ Nachrichten“ in einer Auflage von ca. 55.000 Stk. beigelegt. Diese Maßnahme wurde kurzfristig notwendig, da auf Grund der bevorstehenden Nationalrats- und Landtagswahlen keine Plakatflächen mehr zur Verfügung standen.

Um den Verkauf der Kunstwerke zu voranzutreiben und bestmöglich zu präsentieren, wurde ein Kunstkatalog erstellt. Die Produktion eines Kunstkatalogs sollte die exklusivere Zielgruppe, Kunstliebhaber und Wirtschaft ansprechen, die mit diesem Medium als KäuferIn für die Kunstwerke geworben werden sollte.

4.1.4 Galaabend und Kunstverkaufsausstellung

Als Höhepunkt der Kampagne wurde am 9. Oktober 2009 im „Casino Linz“ die Eröffnung der Kunstverkaufsausstellung organisiert. Die Ausstellung umfasste 140 Kunstwerke von 90 KünstlerInnen und wurden bis 16.9.2009 im Casineum zum Kauf angeboten.

Folgende Programmpunkte wurden am Abend der zet-Charity geboten:

- Begrüßung
- Live-Akt Performance des Künstlers Martin Molda
- Auktion von ausgewählten Kunstwerken durch das „Dorotheum“
- Come-Together mit KünstlerInnen
- Buffet
- Live Musik

Für die Moderation des Abends konnte der bekannte ORF Moderator, Günther Hartl, gewonnen werden. Günther Hartl fungierte als bekannte Persönlichkeit, als „Celebrimonial“ (prominenten Fürsprechern) für die Aktion „kunst kontra Tierversuche“ und damit für die Forschung und Entwicklung von Alternativ- und Ersatzmethoden zu Tierversuchen.

Anschließend an die Live-Akt-Performance folgte die Auktion von 20 Exponaten, die von Mag. Walter Sonnberger, Leiter des Dorotheum Linz, ausgewählt wurden.

4.1.5 Resonanz

Die Resonanz der KünstlerInnen auf die Einladung, sich bei der Aktion zu beteiligen, war gewaltig. Sogar KünstlerInnen aus dem In- und Ausland, die nicht angeschrieben wurden, meldeten sich und sagten uns ihre Unterstützung zu. Insgesamt wurden rund 140 Kunstwerke im Wert von fast € 90.000 akquiriert.

Ein weiterer Grund für die vielen positiven Rückmeldungen war sicherlich das Angebot an die KünstlerInnen, sich und ihre Kunst im Internet kostenfrei präsentieren zu können.

Auf Grund der vielen Medienkooperationen konnten zahlreiche Berichterstattungen in Printmedien erreicht werden. Die Aktion war in Linz und Umgebung so präsent, dass sogar die „Kronen Zeitung“, mit denen keine Kooperation vereinbart wurde, zur Gala kam und einen Bericht mit Foto veröffentlichten.

Die Kontakte zu den diversen Medien, die im Rahmen des Projekts erarbeitet und ausgebaut wurden, bleiben selbstverständlich nicht auf das Projekt beschränkt, sondern sind für jede weitere Pressemeldung und –arbeit dienlich. . Die zet-Charity Kampagne ergab 14 kostenlose Artikeln in folgernden Printmedien: „Tips“, „OÖ Nachrichten“, „City-Magazin“ und „Kronen Zeitung“. (siehe Kapitel: Medienberichterstattung)

Durch diese starke Medienpräsenz, gekoppelt mit dem Aufbau der Website und der Bewerbung der Veranstaltung durch Plakate, konnte das Ziel der Steigerung des Bekanntheitsgrads von zet erreicht werden.

Insgesamt waren 200 bis 250 Gäste der Einladung zur Gala gefolgt und genossen den Abend. Aus den Rückmeldungen der KünstlerInnen geht hervor, dass Ihnen vor allem die Professionalität, mit der die gesamte Kampagne geplant und durchgeführt wurde und der exklusive Galaabend im Casino sehr gut gefallen haben.

Auszüge aus Rückmeldungen, die per Email eingelangt sind:

- *Sonja Dolzer: ich habe selten eine Veranstaltung erlebt, die der Art gut vorbereitet und organisiert wurde. Auch die Bewerbung und Aufbau der Kampagne waren sehr professionell....“*
- *Martin Molda: „...danke für Ihre wunderbare Organisation. Auch für mich war es ein toller Abend...“*
- *Leonard List: „Es war eine gelungene Ausstellung und es ist auch einiges geboten worden...“*
- *Hanna Scheibenpflug: “Vielen herzlichen Dank an Sie zurück, Sie haben wirklich ganze Arbeit geleistet“...*
- *Ulli Alena: „vorerst einmal Gratulation, es war eine wirklich schön, gelungene Veranstaltung....“.*
- *Christine Heitler: „Es war eine sehr gelungene Veranstaltung, ich gratuliere!“*
- *Monika Lederbauer: „Ich möchte ihnen nochmals meine Anerkennung / Bewunderung ausdrücken. Sie haben mit viel Ausdauer und Elan VIEL auf die Beine gestellt!“*

4.1.6 Folgemaßnahmen

Im Rahmen der einwöchigen Ausstellungszeit, konnten nicht alle Bilder verkauft werden. Auf Grund dieser Tatsache entschied man sich, die Bilder bis vorerst bis Weihnachten in den Büroräumlichkeiten der BioMed-zet- Life Science GmbH zu präsentieren und weiterhin zum Verkauf anzubieten.

Um den Verkauf der der noch nicht verkauften Bilder voranzutreiben, wurden folgende Maßnahmen durchgeführt:

- *Programmierung weiterer Internetseiten auf dem „kunst-kontra-Tierversuche“ Portal, mit denen alle Bilder online gekauft werden können.*
- *Aussendung von Kunstkatalogen an jene Personen, die nicht zur Gala kommen konnten, aber die Aktion gerne mit einem Bilderkauf unterstützen wollten.*
- *Es wurden alle persönliche Kontakte und Stakeholder (Interessensgruppe) von zet mittels Emails angeschrieben. Das Email enthielt den Kunstkatalog als Anlage und die Einladung, sich Bilder auszuwählen und bekannt zu geben.*

- Alle Bilder wurden zur Präsentation nochmals in den Büroräumlichkeiten der BioMed zet-Life Science GmbH aufgehängt und so präsentiert.

Ende Januar wurden die KünstlerInnen über den weiteren Verlauf der Aktion informiert und gefragt, ob sie uns die Bilder bis auf Widerruf zur Verfügung stellen und die Kunstwerke auf Onlineportalen zum Verkauf angeboten werden dürfen.

Sobald alle Einverständniserklärungen vorliegen, werden die verbleibenden Bilder in ausgewählten Online-Portalen zum Kauf angeboten.

Der vorläufige Endtermin des Projekts ist mit 30.6.2010 festgelegt.

Im Rahmen des Projekts konnten bislang Bilder im Wert von rund € 20.000,-- verkauft werden. Der Verkauf ist jedoch noch nicht abgeschlossen, somit kann noch kein Endergebnis bekannt gegeben werden.

4.2 Gestaltung und Entwicklung Newsletter „zet-konkret“

Projektleitung: Mag^a. (FH) Agnes Zohner

ProjektmitarbeiterInnen: Mag^a. (FH) Agnes Zohner
Projektzeitraum: Dauerprojekt

zet ist als gemeinnütziger Verein auf Spenden und Sponsorengelder zur Finanzierung und auf einen guten Dialog zu den Zielgruppen des Fundraisings angewiesen. Aus diesem Grund ist es essentiell, dass das Fundraising kontinuierlich aufgebaut, verbessert und ausgebaut wird.

4.2.1 Projektziele

Das aktuelle Projekt wurde als Fortführung des Projekt „Aufbaues und Etablierung eines Spendenwesens“ konzipiert. Dieses Projekt wurde im Januar 2008 gestartet und hatte folgende Ziele:

- Den Spendeneingang mit allen Daten der SpenderInnen zu dokumentieren um ein professionelles Spendenwesen aufzubauen.
- Ein Medium zu schaffen, dass der ständigen Information der SpenderInnen dient.

- Die Bedürfnisse der Stakeholder erfahren und ständig Kontakt halten.
- Der Newsletter soll 4mal jährlich mit aktuellen Berichten der Alternativmethodenforschung und Forschungsarbeit des zet-LSL zu aufzulegen werden.
- Ab dem ersten Halbjahr 2008 soll der Newsletter auch online von SpenderInnen und InteressentInnen abonnierbar sein.
- Der kontinuierliche Auf- und Ausbau an Spendendaten, soll zu einer Steigerung von jährlich 30-50% führen.

4.2.2 Durchführung

Die Realisierung des Projekts erfolgt in mehreren Etappen:

1. Aufbau und Etablierung einer Accessdatenbank zur Sammlung und Auswertung aller Spendendaten. (2008 abgeschlossen)
2. Schaffung von Medien zur regelmäßigen Kontaktierung der SpenderInnen (Umsetzung 2009)
3. Etablierung einer professionellen Spendendatenbank (2010)
4. Organisation einer großem Direkt-Mailing Aktion (2010 oder 2011)

Der zet-Newsletter wurde 2005 zum ersten Mal unter dem Namen „zet-Splitter“ anlässlich der „Langen Nacht der Forschung“ aufgelegt. Auf Grund von Personalmangel blieb es bei der einen Auflage.

Im Oktober 2007 wurde dieses Medium wieder aktiviert und erhielt den neuen Namen „zet-konkret“. Der Name soll den neuen Weg, den zet in Zukunft in der PR-Arbeit beschreiten will, verdeutlichen und Rechnung tragen.

Als weitere Neuerung wird in dem zet-konkret Newsletter in Zukunft nicht nur über die Arbeit von zet informiert, sondern auch ein Betrag von Alternativmethoden und Forschung „konkret“ und verständlich aufbereitet. Der Eintrag wird unter Schlagwort „Forschung konkret“ publiziert.

Im Jahr 2008 wurde der Newsletter an das neue CD von zet angepasst.

Phase zwei der Projekt-Umsetzung erfolgte vor allen im Jahr 2009. „zet-konkret“ wurde 2009 sowohl in Printversion als auch elektronisch nur 2x herausgegeben, da die zet-Charity als

Projekt der PR- Arbeit priorisiert wurde.

Allen zet-konkret-Aussendungen wurde ein personalisierter Erlagschein beigelegt um den/der potenziellen SpenderIn, die Arbeit des Ausfüllens abzunehmen.

Projektergebnis

Durch das regelmäßige Anschreiben der Stakeholder und der Aufbau eines professionellen Spendenwesens durch die Archivierung und Evaluierung aller relevanten Spendendaten konnten zahlreiche Nicht-Spender zu Erstspendern gewonnen werden. Als eine Weitere positive Entwicklung ist zu verzeichnen, dass die Durchschnittsspende durch die zet-Charity auf € 176,21 gestiegen ist.

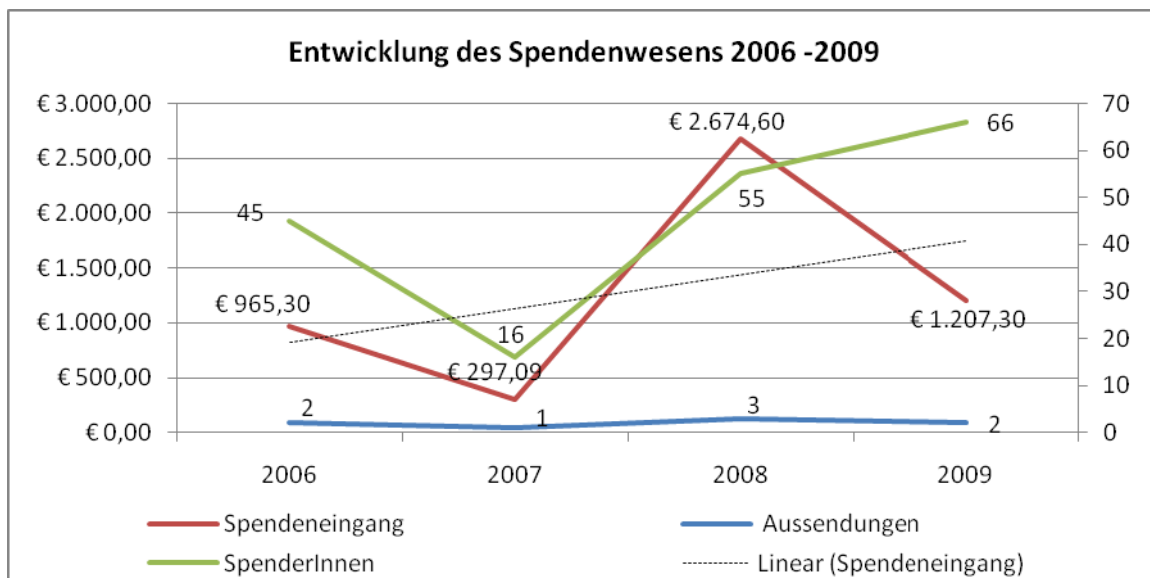


Abbildung 8: Entwicklung der Spendenwesens 2006-2009

Anhand der gesammelten Spendendaten kann folgende Entwicklung analysiert werden:

Durch das regelmäßige Anschreiben der Interessenten von zet konnte die Zahl der aktiven SpenderInnen in den letzten drei Jahren von 16 auf 66 gesteigert werden (ohne KünstlerInnen). Sehr gut ersichtlich ist, dass durch die geringere Information der SpenderInnen im Jahr 2007 die Zahl der aktiven Spender auf 16! gefallen ist.

Das beste Ergebnis an Spendeneinnahmen konnte im Jahr 2008 eingefahren werden. Das ist auf die intensive Öffentlichkeitsarbeit in allen Zielgruppen zurückzuführen. Im Jahr 2009 wurde der Schwerpunkt der PR-Arbeit auf die zet-Charity gelegt und es konnten auf Grund geringerer Personalressourcen keine weiteren Projekte oder Aussendungen mehr durchgeführt werden. Dies macht sich sofort in der Höhe der Spendeneingänge bemerkbar.

Die Grafik spiegelt aber auch ganz klar wieder, dass offenbar mehr Interessenten der Meinung sind, nun aktiv einen Betrag zum Tierschutz durch Wissenschaft leisten zu wollen.

Obwohl die Anzahl an SpenderInnen im Jahr 2009 gesteigert werden konnte, sank die Gesamtspendenhöhe. Ein Grund für die sinkende Durchschnittsspende könnte die Wirtschaftskrise sein.

Aus den Aufzeichnungen wird auch ersichtlich, dass Abonnenten der Online-Version des Newsletter keine aktiven Spender sind. Eine Ursache dafür könnte das Fehlen des beigelegten, bereits ausgefüllten Erlagscheins sein.

Die Anzahl der Empfänger konnte auch heuer wieder gesteigert werden. Beide Medien kommen als Medium für die Öffentlichkeitsarbeit von zet sehr gut an. Das ist auch in Zahlen belegbar.

Mit Stichtag 31.12.2009 konnte die Anzahl der Empfänger des elektronischen Newsletters von 90 auf 113 erhöht werden. Die Printversion wurde von 217 SpenderInnen „abonniert“.

Durch die Durchführung der zet-Charity als Fundraisingprojekt konnten die Spendeneinnahmen im Jahr 2009 auf insgesamt € 15.682,10 gesteigert werden.

Weiterführende Maßnahmen

Da es bei dieser Maßnahme um ein Dauerprojekt handelt ist auf Grund der bisher vorliegenden Daten folgendes zu empfehlen:

1. Um den Anteil der aktiven SpenderInnen zu erhöhen, sollte zet-konkret quartalsmäßig an alle Interessenten der Spendendatenbank ausgesandt werden.
2. Die vorhandenen Adressen müssen „gepflegt“ und damit aktuell gehalten werden. Das sind unsere Kernspender! Es sollten kontinuierlich Neuspender geworben werden. Entweder durch Zukauf von „kalten Adressen“ oder durch eine Direkt-Mailing-Aktion. Ansonsten drohen die vorliegenden Spenderdaten zu „vergreisen“.
3. In Zukunft sollten in jeder Projektplanung berücksichtigt werden, wie das Projekt neben der Basisfinanzierung auch noch spendenwirksam „vermarktet“ werden kann. zB.: in dem man den Nutzen einer Spenden sowohl für zet als auch für den/die SpenderIn klar herausarbeitet.
4. Weiters sollte definiert werden, mit welcher Spendenhöhe, welche Maßnahme/Test/Alternativmethode im Labor durchgeführt werden kann, ohne dass ein Tier zu Schaden kommt, oder um viele Tiere weniger Leiden müssen.

4.3 Innovatives Land OÖ 2010

Projektleitung: Prof. Dr. Jürgen Frank

ProjektmitarbeiterInnen: Mag. (FH) Agnes Zohner
Land OÖ
CATT
Gesundheitscluster OÖ

Projektzeitraum: August 2009

4.3.1 Projektbeschreibung:

Im Rahmen der Initiative „Innovatives Oberösterreich 2010“ wurde gemeinsam mit dem Land OÖ, CATT und dem Gesundheitscluster eine Broschüre zum Thema „Life Science- ein Markt mit Zukunft“ verfasst. Prof. Dr. Jürgen Frank stellt als Leiter des zet-LSL den Geschäftsbereich der GmbH vor. Die Broschüre gibt jedem Unternehmen Raum sich zu präsentieren und informiert über die Life Science Initiative OÖ.

4.3.2 Projektziele

Mit der Life Science Initiative OÖ, die im Rahmen des Wirtschaftsprogramms „Innovatives OÖ 2010“ umgesetzt wird, soll in erster Linie drei Dinge erreicht werden:

Die oberösterreichischen Unternehmen auf diesen aufstrebenden Markt aufmerksam machen

Die Unternehmen zum „Einsteigen“ einladen.

Die Innovative soll viele neue Jobs in den Bereich entstehen lassen.

Die Broschüre kann über die CAAT-Website heruntergeladen werden.

4.4 Lange Nacht der Forschung

Projektleiter: Dr. Klaus Sommer

Projektmitarbeiter: Dr. Christine Schäfer, Dr. Reza Mohammed Lornejad-Schäfer, Mag. Daniel Brunner, Mag. (FH) DI Wolfgang Steiner, Mag. (FH) Agnes Zohner

Projektbeginn: September 09

Projektabschluss: November 09

4.4.1 Ziel des Projektes:

Ziel der Teilnahme an der LNF '09 war es, das zet-Life Science Laboratorium (zet-LSL) in diesem öffentlichen Rahmen erstmalig zu präsentieren und unser Anliegen – die Entwicklung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen – einem breiten und interessierten Publikum zugänglich zu machen.

Das zet-LSL war heuer erstmals bei der LNF '09 mit einem Stand vertreten und hat „Forschung zum Angreifen“ präsentiert.

Mit dem genauen Zeitpunkt des Sonnenuntergangs um 16:35 Uhr startete die LNF '09 bei uns in Linz und die zahlreichen Gäste hatten bis Mitternacht Gelegenheit uns am Stand zu besuchen und selber bei verschiedenen Experimenten Hand anzulegen.

Vorbereitende Maßnahmen:

Im Vorfeld wurden diverse Werbemaßnahmen durchgeführt:

- Pressemeldungen für die Regionen Wien und Linz
- Online PR-Tool der Organisation der LNF
- halbseitiges Inserat im Programmagazin für die LNF
- Verlinkung der LNF Homepage auf der zet Homepage
- Werbetext auf unserer Homepage
- E-mail Signatur mit Hinweis auf unseren Stand aller Mitarbeiter.
- Mailing an sämtliche Freunde, Verwandte und Bekannte aller Mitarbeiter.
- Flyer mit Werbetext, die von den Mitarbeitern in Universitäten Fachhochschulen, Schulen, Banken und anderen öffentlichen Gebäuden aufgelegt und im Eingangsbereich des Donauplex-Centers angebracht wurden.
- Aufhängen von Stationsplakaten im Donauplex-Center, Samariterbund Linz, Gymnasium Rohrbach, Hauptschule Ebelsberg,

Weitere vorbereitende Maßnahmen:

- Gestaltung eines „Roll-up“ für zet.
- Anmeldung für das Gewinnspiel „LUPE“
- Lokalaugenschein des Raumes für unseren Stand
- Auswahl der Ausstellungstafeln zur Umrahmung des Standes
- Miete eines Transporters
- Vorbereitung einer Slide-Show

Die Experimente:

Als moderne Alternative zu Tierversuchen wurde in einem Experiment die Wirkung von toxischen (giftigen) Substanzen auf in Plastikschaalen kultivierte lebende Zellen mittels MTT-Assay gezeigt. In einer weiteren Demonstration wurde den BesucherInnen ein 3-dimensionales rekonstruiertes humanes Hautmodell – EpiDermTM, eine künstliche Oberhaut (Epidermis) – gezeigt, bei dessen Evaluierung das zet-LSL erfolgreich beteiligt war.

Weiters wurde den BesucherInnen die Möglichkeit geboten, aus einer Speichelprobe ihre Mundschleimhautepithelzellen anzufärben und so ihre eigenen Zellen zu betrachten und den Zellkern ausfindig zu machen, worin sich DNA (das Erbgut) befindet. In einer parallelen Demonstration konnten BesucherInnen ihre eigene DNA aus der Mundschleimhaut mit einem „quick & dirty“ Prozedere isolieren und auch gerne mit nach Hause nehmen. Sinn und Zweck dieser Demo war es, die BesucherInnen darauf aufmerksam zu machen, dass es viele Substanzen gibt, die unsere DNA verändern und so zu schweren Krankheiten wie z.B. Krebs führen können. Um diese Substanzen ausfindig zu machen oder ihre „krankmachende“ Dosis herauszufinden, werden sehr viele schmerzhaftige Tierversuche gemacht. Unser Ziel – so wurde es während der Demo vermittelt – ist es Methoden zu entwickeln, mit welchen man längerfristig auf solche Tierversuche verzichten kann.

Umrahmt wurde der Stand mit einer Slide-show, worin wir unsere GmbH und das zet-LSL vorstellten und einen Überblick über unsere Aktivitäten und Anliegen gaben. Zusätzlich standen die Mitarbeiter des zet-LSL Rede und Antwort für sämtliche Fragen, die an sie gerichtet wurden. Teilweise ergaben sich recht interessante Diskussionen und man hatte den Eindruck, dass vielen Besuchern der Begriff „DNA“ aus diversen Fernsehserien zwar geläufig war, sie aber keine Vorstellung davon hatten, was das eigentlich sein soll, bzw. wie man sich das vorstellen kann. Ich glaube, dass sich für einige von ihnen bei der LNF '09 ein bisher ungelöstes „Rätsel“ gelöst hat.

Der Besucheransturm:

Die BesucherInnen waren über die Gesamte Dauer der LNF recht zahlreich an unserem Stand interessiert und die Mitarbeiter des zet-LSL hatten allerhand zu tun, die große Nachfrage zu bewältigen. Überschlagsmäßige Zählungen haben ergeben, dass ca. 1200 Personen unseren Stand besuchten und ca. 300 DNA-Präparationen durchgeführt wurden.

Der Erfolg unseres Standes bei der LNF lässt sich auch daran messen, dass wir in der Kategorie der „KMUs“ den 3. Platz beim Zuschauer-Voting erreicht haben und so nur knapp

einen Preis bei der „LUPE“ – dem offiziellen Gewinnspiel – verpasst haben. In allen anderen Kategorien wurden nämlich die Plätze 1-3 prämiert! Allerdings wird dieses Ergebnis vom Organisationsbüro online gestellt. Weiters wurde ein Artikel in der Linzer Rundschau vom 12. November 2009 veröffentlicht.

4.5 Medienpräsenz 2009

Medienpräsenz in Folge von Projekten

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

CityMagazin: Gute Idee: kunst-kontra-tierversuche
Nr 85. August 2009, S. 5

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps Urfahr Umgebung: Rubrik: Land und Leute: Charity Kunst kontra Tierversuche
16.09.2009 KW38, S. 5

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps Linz: Rubrik: Land und Leute: Charity Kunst kontra Tierversuche
21.09.2009 KW38, S. 5

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Kronen Zeitung: Rubrik :Oberösterreich
Charity-Auktion von Linzer Forschungsgruppe: Kunstfreunde gegen Tierleid
12.10.2009, S. 19

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps Urfahr Umgebung: Rubrik: Land und Leute: Charity Kunst kontra Tierversuche
21.09.2009 KW38, S. 5

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps Amstetten: Rubrik: Das ist los: zet-Charity Kunst gegen Tierversuche
7.10.2009, KW 40, S. 49

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps Enns: Rubrik: Land und Leute: zet-Charity Florianer Kunst gegen Tierversuche
7.10.2009, KW 40, S. 8

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

event.at:Ankündigung der zet-Charity
14.09.2009

linzer-city.at

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Ankündigung der zet-Charity im Eventkalender des Cityrings „
14.09.2009

kunst.net

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Ankündigung der zet-Charity
14.09.2009

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps Schärding: Rubrik: Land und Leute: Schärddinger Künstlerinnen setzen sich gegen
Tierversuche ein
7.10.2009, KW 40, S. 6

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps Urfahr Umgebung: Rubrik: Land und Leute: zet-Charity Kunst kontra Tierversuche
7.10.2009, KW 40, S. 4

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

Tipps: Linz: Rubrik: Land und Leute: Galaveranstaltung Kunst-Engagement gegen
Tierversuche
21.10.2009, KW 42, S. 5.

zet-Charity - Kunst kontra Tierversuche:

regionews.at: Kunstwerke für einen guten Zweck - Promotion des Bilderverkaufs.
2.11.2009

Good Cell Culture

Newsin.de. „Moderne Alternativen zu Tierversuchen auch ohne Tierleid möglich“
16.09.2009

Lange Nacht der Forschung

Linzer Wissenschaftseinrichtungen gaben Einblicke in ihre Tätigkeit
Bezirksrundschau, KW 46, 12.11.2009, S. 5

„OÖ Nachrichten“

Rubrik: Chronik: „220.000 Tiere für Tierversuche verwendet“
10.7.2009.

Standard.at

„Deutlicher Anstieg bei Tierversuchen in Österreich“
10.07.2009.

Kammernachrichten „OÖ Wirtschaft“: „Life-Science Initiative OÖ: Erfolg mit Regenerativer und Diagnostischer Medizin“.
24.Juli 2009, Folge 30/31, S. 13.

5 Vorträge 2009

Gstraunthaler G. The Bologna Statement on Good Cell Culture Practice (GCCP) – 10 years later. **7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, Rome, Italy, ALTEX 26 (Spec. Issue): 65, 2009.**

6 Publikationen 2009

6.1 Full papers

Lornejad-Schäfer M.R., Schäfer C., Schöffl H., Frank J. Cytoprotective role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) in human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) after light-induced cell damage. *Photochemistry and Photobiology*, 85(3):834-42; 2009

6.2 Abstracts

Gstraunthaler G.

The Bologna statement on Good Cell Culture Practice (GCCP) – 10 years later
VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rom, Italy; 30.08-3.09.2009

Altex 26 (Spec. Issue): 65; 2009

Schaefer C., Lornejad-Schäfer M. R., Schöffl H., Pfaller W., Frank J.

Development of a 3D-liver cell culture model using polystyrene (PS) scaffolds
VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rom, Italy; 30.08-3.09.2009

Altex 26 (Spec. Issue): 105; 2009

Rauch C., Feifel E., Spötl H. P., Amann E., Schennach H., Frank J., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G.

Alternatives to the use of fetal bovine serum: platelet lysates as serum replacement in cell and tissue culture

VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rom, Italy; 30.08-3.09.2009

Altex 26 (Spec. Issue): 119; 2009

Liebsch M., Gamer A., Curren R., Frank J., Genschow E., Tharmann J., Remmele M., Bauer B., Raabe H., Barnes N., Hilberer A., Wilt N., Lornejad-Schäfer M. R., Schäfer C., Hayden P., Kandarova H.

Validation of an in vitro skin irritation test protocol (EpiDerm SIT) to replace the in vivo rabbit test for hazard identification of chemicals

VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rom, Italy; 30.08-

3.09.2009

Altex 26 (Spec. Issue): 140; 2009

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W. and Gstraunthaler G.

The serum-free media interactive online database

VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rom, Italy; 30.08-3.09.2009

Altex 26 (Spec. Issue): 49; 2009

6.3 Posterbeiträge

Rauch C., Feifel E., Spötl H.P., Amann E.-M., Schennach H., Schöffl H., Pfaller W. and Gstraunthaler G. Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. **21st Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, 2009.**

Rauch C., Feifel E., Spötl H.P., Amann E.-M., Schennach H., Schöffl H., Pfaller W. and Gstraunthaler G. Human Platelet Lysates as a Serum Substitute in Cell Culture Media. **1st Annual Meeting of the Austrian Association of Molecular Life Sciences and Biotechnology, Innsbruck, 2009.**

Schaefer C., Lornejad-Schäfer M. R., Schöffl H., Pfaller W., Frank J.

Development of a 3D-liver cell culture model using polystyrene (PS) scaffolds

VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rome, Italy; 30.08-3.09.2009

Rauch C., Feifel E., Spötl H. P., Amann E., Schennach H., Frank J., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G.

Alternatives to the use of fetal bovine serum: platelet lysates as serum replacement in cell and tissue culture

VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rome, Italy; 30.08-3.09.2009

Brunner D., Frank J., Appl H., Schöffl H., Pfaller W., Gstraunthaler G.

The serum-free media interactive online database

VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rome, Italy; 30.08-3.09.2009

Liebsch M., Gamer A., Curren R., Frank J., Genschow R., Tharman J., Remmele M., Bauer B., Raabe H., Barnes N., Hilberer A., Wilt N., Lornejad-Schäfer M.R., Schäfer C., Hayden P., Kandarova H.

Validation of an in vitro skin irritation test protocol (EpiDerm SIT) to replace the in vivo rabbit test for hazard identification of chemicals

**VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences: Rome, Italy;
30.08-3.09.2009**

Frank J., Schäfer C., Lornejad-Schäfer M.R., Stoever M., Schöffl H.

Development of an in vitro 3D-liver test system for the investigation of drug metabolism and long term drug hepatotoxicity.

The Forinvitrox Forum event, The first Market place in Europe for inventions, applications and products for in vitro toxicology testing methods: Stockholm, Schweden; 12.-14.05.2009

Liebsch M., Gamer A., Curren R., Frank J., Genschow E., Tharmann J., Remmele M., Bauer B., Raabe H., Barnes N., Hilberer A., Wilt N., Lornejad-Schäfer M.R., Schäfer C., Hayden P., Kandarova H.

Follow-up validation of the EpiDerm skin irritation test (SIT): results of a multi-centre study of twenty reference test substances.

48th Society of Toxicology Annual Meeting: Baltimore, USA; 15.-19.03.2009