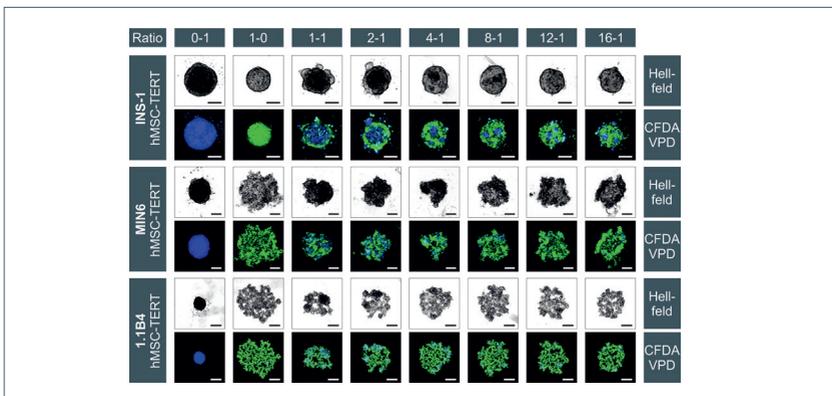


Florian Petry

## Entwicklung eines Produktionsprozesses für Betazellsphäroide von definierter Größe

Einfluss einer 3D Mikroumgebung und Kokultivierung mit mesenchymalen Stammzellen auf die Betazellqualität



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie | Band 25

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

# **Entwicklung eines Produktionsprozesses für Betazellsphäroide von definierter Größe**

**Einfluss einer 3D Mikroumgebung und Kokultivierung mit  
mesenchymalen Stammzellen auf die Betazellqualität**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

**Doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich 08 – Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:

**Florian Petry**

geboren in Bernkastel-Kues

Gießen, Mai 2022



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und  
Pharmazeutische Technologie

Band 25

**Florian Petry**

**Entwicklung eines Produktionsprozesses für  
Betazellsphäroide von definierter Größe**

Einfluss einer 3D Mikroumgebung und Kokultivierung mit  
mesenchymalen Stammzellen auf die Betazellqualität

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag  
Düren 2022

### **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2022

Copyright Shaker Verlag 2022

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-8849-6

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • E-Mail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

---

Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) durch den Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

**Dekan:** **Prof. Dr. Thomas Wilke**

**Erstgutachter:** **Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak**

Technische Hochschule Mittelhessen, Fachbereich Life Science  
Engineering

Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie  
Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Biologie und Chemie

**Zweitgutachter:** **Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Linn**

Justus-Liebig-Universität Gießen

Professur für Innere Medizin, Pathophysiologie des Stoffwechsels und  
Ernährungsmedizin am Fachbereich Medizin, integriert in die  
Medizinische Klinik und Poliklinik 3

In Kooperation mit dem Institut für Ernährungswissenschaft und dem  
Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und  
Umweltmanagement (Zweitmitglied)



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum 2017 bis 2021 mit finanzieller Förderung des Forschungscampus Mittelhessen (FCHM) durchgeführt und am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie (IBPT) der Technischen Hochschule Mittelhessen unter der Leitung von Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak angefertigt.

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak für die Ermöglichung dieser Arbeit und das mir geschenkte Vertrauen sowie die Betreuung und die fachlichen Anregungen herzlich bedanken. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Thomas Linn für den fachlichen Austausch und die konstruktiven Ratschläge. Bei beiden Professoren bedanke ich mich für ihre Gutachtertätigkeiten.

Besonderer Dank gilt Dr.-Ing. Denise Salzig für ihre stets offene Tür, die fachliche Betreuung und gute Zusammenarbeit. Du warst mir in meiner Zeit als Doktorand stets ein Vorbild und ich habe sehr viel von Dir lernen können.

Meinen Kolleginnen und Kollegen möchte ich für ihre fachliche Unterstützung, die aufmunternden Worte und offenen Ohren während meiner Zeit am Institut danken. Ohne Euch wäre vieles schwieriger gewesen und so manche kollegiale Beziehung ist zu einer tiefen Freundschaft geworden.

Ebenso bedanke ich mich bei Rika Agnesens, Patricia Herrmann und Björn Lukas Boshof für den experimentellen Beitrag im Rahmen ihrer Studienarbeiten. In diesem Sinne darf ich mich auch bei Friederike Eilts, Hanna Dambeck und Viktoria Pfening für ihre Korrekturhilfen bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Monika und Joachim Petry, möchte ich ganz besonders danken. Ihr habt mir die Richtung vorgegeben und ohne Eure Unterstützung wäre mein Studium und mein weiterer Weg in dieser Weise nicht möglich gewesen.

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Florian Petry

## Abstract

The number of people suffering from diabetes is increasing rapidly every year. Type-1 diabetes usually occurs in juvenile age and is characterized by autoimmune destruction of the insulin-producing beta cells within the islets of Langerhans. The pathogenesis of type-2 diabetes describes a gradual progression, favored by an unfavorable lifestyle such as smoking, obesity, or lack of exercise, towards hyperinsulinemia, due to onset of insulin resistance. The loss of beta cells, in type 1, can be compensated by beta cell replacement therapy. For this purpose, islets of Langerhans from dead donors, insulin-producing cells generated from pluripotent stem cells (iPSCs), or human beta cell lines can be used. Langerhans islets offer the highest functionality but are only accessible in small quantities. Differentiation of iPSCs into insulin-producing cells implies "infinite" amounts of beta cell-like cells but is currently limited by complex differentiation protocols. Permanent human beta cell lines exhibit high expansion capacity but are inhibited by a lack of glucose-dependent insulin secretion. Nevertheless, beta cell lines such as MIN6 (mouse) and INS-1 (rat) from rodent diabetes models exhibit robust functionality and growth are available and can be used as model cell lines.

Due to the native 3D structure of the islets of Langerhans, reconstitution of a 3D microenvironment in the form of spheroids leads to improvement of beta cell functionality. Similarly, co-transplantation or co-cultivation of beta cells with mesenchymal stem cells (MSCs) has a positive effect on beta cell lifespan, viability, and functionality. This effect is attributed to the multiple properties of MSCs. Static agglomeration methods are simple and feasible with respect to preliminary studies, yet these systems cannot guarantee the required amounts of beta cell spheroids. In contrast, stirred tank reactors (STR) are well characterized, offer good scalability, process monitoring and control, and have the potential to ensure spheroid production for cell therapies.

During this work, different systems for static agglomeration of beta cells and MSCs were investigated, and an image-based analysis of spheroids was established. This allowed the introduction of volume-based growth key parameters. Live/dead staining and determination of glucose-dependent insulin secretion were used to determine the quality of the spheroids. For the transfer of the static cultivation into a dynamic one, different small-scale systems were used. Shaking flasks are characterized by a homogeneous energy dissipation and were used to determine a minimum cell concentration and agglomerate strength. On this basis, a proof of concept was developed that uses the existing hydrodynamic forces in a STR to generate spheroids of defined size. Three different stirrer types were investigated to test this model.

The beta cell lines and MSCs showed differences in terms of their agglomeration behavior (speed, shape, and compaction). Nevertheless, the characteristics of the beta cells from 2D cultivations could be recognized within the spheroid cultivation, whereas the MSCs did not show volume increase as spheroids. Co-culturing the beta cells and MSCs at different cell ratios resulted in hybrid spheroids. Here, separation of the two cell types within the spheroids was observed. The MSCs were always found in the spheroid core or as clusters, whereas the beta cells formed the mantle of the spheroids. This separation of the two cell types could be due to differences in membrane proteins and resulting interfacial phenomena. Due to mass transfer limitation of the static cultivation systems, a necrotic spheroid core formed already after 24 h, which strongly limited the quality of the spheroids. This effect probably superimposed an influence of the MSCs. Under dynamic conditions, the beta cell lines and MSCs showed comparable agglomeration behavior as under static conditions, but the viability of the spheroids was continuously close to 100%. Shaking flasks allowed dynamic spheroid formation under turbulent fluid dynamics, which confirmed the anticipated behavior of reduced spheroid size with increasing power input. Furthermore, the agglomerate strength of the beta cell line INS-1 could be assessed, which was used to estimate the spheroid size in the STR. Finally, spheroid production was performed in a STR using 1 L working volume, process monitoring/control and three different stirrer types. This process yielded vital and functional beta cell spheroids with defined size in relevant amounts for cell replacement therapy regarding diabetes. Furthermore, the proof of concept could be confirmed for the INS-1 and needs to be validated with other cell types such as MSCs or iPSCs.

**KEY WORDS:** Beta cell lines, mesenchymal stem/stromal cells, spheroids, diabetes, stirred-tank reactor, cell replacement therapy

## Zusammenfassung

Die Anzahl an Diabetes erkrankten Menschen steigt jährlich rapide an. Diabetes Typ 1 tritt meist im juvenilen Alter ein und ist durch eine autoimmune Zerstörung der insulinproduzierenden Betazellen innerhalb der Langerhans-Inseln charakterisiert. Die Pathogenese der Typ-2-Diabetes beschreibt einen schleichenden Verlauf, der durch einen unvorteilhaften Lebensstil wie Rauchen, Übergewicht oder Bewegungsmangel begünstigt wird, bis hin zu einer Hyperinsulinämie, aufgrund eintretender Insulinresistenz. Der Verlust der Betazellen, beim Typ-1-Diabetes, kann durch eine Betazellersatztherapie kompensiert werden. Hierfür kommen Langerhans-Inseln von toten Spendern, insulinproduzierende Zellen generiert aus pluripotenten Stammzellen (iPSCs) oder humane Betazelllinien in Frage. Langerhans-Inseln bieten die höchste Funktionalität, sind jedoch nur in geringen Mengen zugänglich. Die Differenzierung von iPSCs zu insulinproduzierenden Zellen impliziert „unendliche“ Mengen an betazellähnlichen Zellen. Dieser Herstellungsprozess ist allerdings noch durch komplexe Differenzierungsprotokolle limitiert. Permanente humane Betazelllinien weisen ein hohes Expansionsvermögen auf, sind jedoch durch eine mangelnde glukoseabhängige Insulinsekretion gehemmt. Dennoch sind Betazelllinien, wie MIN6 (Maus) und INS-1 (Ratte) aus Nagetiermodellen mit robuster Funktionalität und Wachstum verfügbar und können als Modellzelllinie genutzt werden.

Aufgrund der nativen 3D Struktur der Langerhans-Inseln, führt eine Rekonstitution einer 3D Mikroumgebung in Form von Sphäroiden zur Verbesserung der Betazellfunktionalität. Ebenso wirkt sich die Kotransplantation oder Kokultivierung von Betazellen mit mesenchymalen Stammzellen (MSCs) positiv auf die Lebenszeit, Vitalität und Funktionalität der Betazellen aus. Dieser Effekt wird den vielfältigen Eigenschaften der MSCs zugeschrieben. Statische Agglomerationsmethoden sind simpel und praktikabel hinsichtlich von Voruntersuchungen. Dennoch können diese Systeme nicht die notwendigen Mengen an Betazellsphäroiden gewährleisten. Dem gegenüber sind Rührkesselreaktoren (STR) gut charakterisiert, bieten eine gute Skalierbarkeit, Prozessüberwachung und -kontrolle und besitzen das Potential die Sphäroidproduktion für Zelltherapien zu gewährleisten.

Während dieser Arbeit wurden verschiedene Systeme zur statischen Agglomeration von Betazellen und MSCs untersucht und eine bildbasierte Analyse der Sphäroide etabliert. Diese ermöglichte die Einführung volumenbezogener WachstumsKennzahlen. Mittels Lebend-/Tötfärbung und der Bestimmung der glukoseabhängigen Insulinsekretion wurde die Qualität der Sphäroide erfasst. Für den Transfer der statischen Kultivierung in eine dynamische Kultivierung wurden verschiedene *small-scale* Systeme verwendet. Schüttelkolben zeichnen sich durch eine homogene Leistungsdichte aus und dienen zur Bestimmung einer minimalen

Startzellkonzentration und der Agglomeratwiderstandskraft. Auf dieser Basis wurde ein *Proof-of-Concept* entwickelt, welches die bestehenden hydrodynamischen Kräfte in einem STR nutzt, um Sphäroide mit definierter Größe zu erzeugen. Zur Überprüfung dieses Modells wurden drei verschiedene Rührertypen untersucht.

Die Betazelllinien und MSCs wiesen Unterschiede hinsichtlich ihres Agglomerationsverhalten auf (Geschwindigkeit, Form, Verdichtung). Dennoch konnten die Eigenschaften der Betazellen aus 2D Kultivierungen innerhalb der Sphäroidkultivierung wiedererkannt werden, wohingegen die MSCs keine Volumenzunahme als Sphäroid aufwiesen. Die Kokultivierung der Betazellen und MSCs mit unterschiedlichen Zellverhältnissen resultierte in hybride Sphäroide. Hierbei konnte eine Separation der beiden Zelltypen innerhalb der Sphäroide beobachtet werden. Die MSCs waren stets im Sphäroidkern oder als Cluster vorzufinden, wohingegen die Betazellen den Mantel der Sphäroide bildeten. Diese Trennung der beiden Zelltypen kann durch Unterschiede der Membranproteine und die daraus resultierenden Grenzflächenphänomene begründet werden. Aufgrund von Stofftransportlimitierungen der statischen Kultivierungssysteme bildete sich bereits nach 24 h ein nekrotischer Sphäroidkern, der die Qualität der Betazellsphäroide massiv einschränkte. Dieser Effekt überlagerte wahrscheinlich einen Einfluss der MSCs. Unter dynamischen Bedingungen zeigten die Betazelllinien und MSCs ein vergleichbares Agglomerationsverhalten wie unter statischen Bedingungen, jedoch lag die Vitalität der Sphäroide konstant bei nahezu 100 %. Schüttelkolben ermöglichten eine dynamische Sphäroidbildung unter turbulenter Fluidodynamik und bestätigten das antizipierte Verhalten einer Sphäroidverkleinerung bei steigendem Leistungseintrag. Weiterhin konnte die Agglomeratwiderstandskraft der Betazelllinie INS-1 ermittelt werden, welche genutzt wurde, um die Sphäroidgröße im STR zu postulieren. Schließlich wurde die Sphäroidproduktion im STR mit 1 L Arbeitsvolumen, Prozessüberwachung /-kontrolle und drei verschiedenen Rührertypen durchgeführt. Dieser Prozess lieferte vitale und funktionale Betazellsphäroide mit definierter Größe in relevanten Mengen für die Zellersatztherapie hinsichtlich Diabetes. Des Weiteren konnte der *Proof-of-Concept* für die INS-1 bestätigt werden und benötigt nun die Validierung mit anderen Zelltypen wie MSCs oder iPSCs.

**SCHLAGWORTE:** Betazellen, mesenchymale Stammzellen, Sphäroide, Diabetes, Rührkesselreaktor, Zelltherapie

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Erklärung .....	II
Abstract .....	III
Zusammenfassung .....	V
Inhaltsverzeichnis .....	VII
Publikationen und Konferenzteilnahmen .....	X
Glossar .....	XII
1. Einleitung .....	1
2. Zielsetzung .....	2
3. Theoretischer Hintergrund .....	4
3.1. Geeignete Zellen für eine Diabetes-Zelltherapie müssen funktional und in großen Mengen verfügbar sein .....	4
3.2. Eine dreidimensionale Kultivierung imitiert die <i>in vivo</i> Bedingungen .....	6
3.3. Mesenchymale Stammzellen können Betazellen beeinflussen .....	7
3.4. Anforderungen an den Herstellungsprozess für Betazellsphäroide .....	9
3.5. Statische Agglomerationsverfahren sind limitiert .....	10
3.6. Rührkesselreaktoren bieten eine Grundlage zur großtechnischen Produktion von Betazellsphäroiden .....	13
3.7. Grundlagen für eine dynamische Sphäroidproduktion .....	17
3.8. Die Fluidodynamik innerhalb dynamischer Systeme kann genutzt werden, um Sphäroide mit definierter Größe herzustellen .....	18
3.9. Kolmogorovs Theorie der isotropen Turbulenz liefert ein Modell zur Beschreibung der Fluidodynamik im STR .....	19
4. Material und Methoden .....	26
4.1. Materialien, Chemikalien und Geräte .....	26
4.1.1. Betazellen und mesenchymale Stammzellen .....	26
4.1.2. Zellkulturrelevante Materialien .....	27
4.2. Kultivierungen .....	29
4.2.1. Kulturmedien und Supplementierung .....	29
4.2.2. Statische Kultivierung als <i>Monolayer</i> zur Bestimmung relevanter Wachstums Kennzahlen .....	29
4.2.3. Statisch kultivierte Sphäroide als Mono- und Kokultur .....	31
4.2.4. Dynamische Agglomeration in <i>small-scale</i> Systemen .....	31
4.2.5. Erzeugung von Betazell-Sphäroiden im Rührkesselreaktor (STR) .....	32
4.3. Analytische Methoden .....	34
4.3.1. Glukoseabhängiges Insulinsekretions-Assay .....	34
4.3.2. MSC-relevante Oberflächenmarker .....	34

4.3.3.	Mixed Lymphocyte Reaction.....	34
4.3.4.	Langzeitfärbungen für die Kokultivierung von Betazellen und Stammzellen.....	36
4.3.5.	Lebend-/Totfärbung von Sphäroiden.....	36
4.3.6.	Bildbasierte Sphäroidanalyse (Cytation3).....	37
4.4.	Statistische Analyse.....	40
5.	Ergebnisse und Diskussion.....	41
5.1.	Die statische Kultivierung von Betazellen und MSCs konnte als <i>Monolayer</i> (2D), Sphäroid (3D) und in Kokultur (2D/3D) etabliert werden.....	43
5.1.1.	Die traditionelle <i>Monolayer</i> -Kultur von Betazellen und MSCs wurde zur Charakterisierung und als Referenz verwendet.....	44
5.1.1.1.	Morphologie.....	45
5.1.1.2.	Wachstum.....	46
5.1.1.3.	Funktionalität der Betazellen.....	48
5.1.1.4.	Funktion der MSCs.....	49
5.1.2.	Die statische Kokultivierung in Form eines <i>Monolayer</i> .....	51
5.1.3.	Die statische 3D Kultivierung zeigte Unterschiede zwischen den einzelnen Betazelllinien und den hMSCs.....	54
5.1.3.1.	Morphologie und Agglomeration.....	55
5.1.3.2.	Sphäroidwachstum.....	57
5.1.3.3.	Sphäroidvitalität.....	59
5.1.3.4.	Sphäroidfunktionalität.....	62
5.1.4.	Die statische 3D Kokultivierung führte zur Bildung von hybriden Sphäroiden.....	64
5.1.4.1.	Morphologie und Agglomeration als hybride Sphäroide.....	64
5.1.4.2.	Wachstum der hybriden Sphäroide.....	66
5.1.4.3.	Separation der verschiedenen Zelltypen.....	67
5.1.4.4.	Vitalität der hybriden Sphäroide.....	68
5.1.4.5.	Einfluss der MSCs auf die Funktionalität der Betazellen.....	69
5.1.5.	Fazit und Zusammenfassung der statischen Kultivierungsmethoden.....	70
5.2.	Dynamische Kultivierungsmethoden von Sphäroiden als Basis für eine großtechnische Produktion.....	72
5.2.1.	Mikroträger-basierende Prozesse sind der Standard zur großtechnischen Expansion von adhären Zellen.....	73
5.2.2.	Systeme wie Wellplatten und Spinnerflaschen geben einen ersten Einblick in die dynamische Agglomeration.....	76
5.2.3.	Schüttelkolben bieten eine homogene Durchmischung.....	79
5.2.3.1.	Arbeitsbereich der Startzellkonzentration.....	82
5.2.3.2.	Arbeitsbereich für den Leistungseintrag.....	83
5.2.3.3.	Die Agglomeratwiderstandskraft.....	85
5.3.	Die dynamische Kokultivierung im Schüttelkolben.....	87

---

5.4.	Rührkesselreaktoren zur dynamischen Produktion von Betazellsphäroiden von definierter Größe.....	89
5.4.1.	Einfluss des Rührerdesigns auf die Sphäroidproduktion .....	89
5.4.1.1.	Größenverteilung der Sphäroide.....	92
5.4.1.2.	Auswirkung spezifischer Rührereigenschaften auf die Sphäroidbildung.....	94
5.4.2.	Die Agglomeratwiderstandskraft stellt ein wichtiges Kriterium dar.....	96
5.4.3.	Die Auswirkungen der hydrodynamischen Kräfte auf die Betazellsphäroide .....	98
5.4.3.1.	Prozessüberwachung - <i>Online Monitoring</i> .....	99
5.4.3.2.	Vitalität der Sphäroide produziert im STR .....	100
5.4.3.3.	Funktionalität der Sphäroide produziert im STR.....	102
5.4.3.4.	Ausbeute des STR-Prozesses .....	103
5.4.4.	Fazit und Zusammenfassung.....	105
6.	Ausblick .....	107
	Referenzen.....	109
	Anhang .....	122
	Abbildungsverzeichnis.....	128
	Tabellenverzeichnis.....	132

## Publikationen und Konferenzteilnahmen

### Publikationen

**Florian Petry**, Tobias Weidner, Peter Czermak and Denise Salzig. 2018. Three-Dimensional Bioreactor Technologies for the Cocultivation of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Beta Cells. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2018/2547098>.

Jan Barezai, **Florian Petry**, Jan Zitzmann, Peter Czermak and Denise Salzig. 2020. Bioprocess Development for Human Mesenchymal Stem Cell Therapy Products. *New Advances on Fermentation Processes*. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.90029>.

Jan Barezai, **Florian Petry**, Peter Czermak, Denise Salzig. 2021. Process design for human mesenchymal stem cell products in stirred-tank bioreactors. *Cell Culture Engineering and Technology*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-79871-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-79871-0_10).

**Florian Petry**, Denise Salzig. 2021. Impact of bioreactor geometry on mesenchymal stem cell production in stirred-tank bioreactors. *Chemie Ingenieur Technik*. <https://doi.org/10.1002/cite.202100041>.

**Florian Petry**, Denise Salzig. 2021. Large-Scale Production of Size-Adjusted  $\beta$ -Cell Spheroids in a Fully Controlled Stirred-Tank Reactor. *Processes by MDPI: Special Issue "Bioprocess Systems Engineering Applications in Pharmaceutical Manufacturing"*. <https://doi.org/10.3390/pr10050861>.

**Florian Petry**, Denise Salzig. 2021. The cultivation conditions affect the aggregation and functionality of  $\beta$ -cell lines alone and in co-culture with mesenchymal stromal/stem cells. *Engineering in Life Science*. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100168>.

### Konferenzteilnahmen

**Florian Petry**, Peter Czermak, Denise Salzig. 3D Cell Culture (Dechema), Freiburg, Deutschland, 2018: 3D co-cultivation of beta cells and mesenchymal stromal/stem cells for diabetes therapy (Poster).

**Florian Petry**, Peter Czermak, Denise Salzig. 18th European Congress on Biotechnology (ECB), Genf, Schweiz, 2018: Development of co-cultivation concepts for beta cells and mesenchymal stromal cells to produce functional beta cell spheroids (Vortrag).

**Florian Petry**, Peter Czermak, Denise Salzig. 257th American Chemical Society (ACS) National Meeting, Orlando, Florida, USA, 2019: Co-cultivation: A powerful tool for insulin-producing beta cell manufacturing (Vortrag).

**Florian Petry**, Peter Czermak, Denise Salzig. European Society Animal Cell Technology (ESACT), Kopenhagen, Dänemark, 2019: Hybrid Agglomeration of Insulin-Producing Beta Cells and Stem Cells (Poster).

**Florian Petry**, Peter Czermak, Denise Salzig. 3D Cell Culture: Models, Applications & Translation (Dechema), Freiburg, Deutschland, 2021: Manufacturing of functional hybrid beta cell and mesenchymal stem cell spheroids for transplantation or drug testing (Vortrag).

### **Rechte und Genehmigungen**

Die Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit, die bei den Verlagen Hindawi, IntechOpen, Wiley und MDPI publiziert wurden, unterliegen der „*open access Creative Commons CC BY 4.0 license*“. Somit liegen die Rechte dieser Publikationen beim Autor und können im Rahmen dieser Arbeit uneingeschränkt verwendet werden. Die Veröffentlichungen, die bei den Verlagen Wiley (Journal: Chemie Ingenieur Technik, Lizenznummer: 5413631439271) und Springer (Journal: Cell Culture Engineering and Technology, Lizenznummer: 5413640294083) erschienen sind, wurden für die Verwendung in dieser vorliegenden Arbeit freigegeben.

## Glossar

### Symbole

$A_{\text{ges}}$	[m <sup>2</sup> ]	Gesamtfläche
$A_{\text{grün}}$	[m <sup>2</sup> ]	grüne Fläche
$A_{\text{rot}}$	[m <sup>2</sup> ]	rote Fläche
$Z$	[-]	Zirkularität
$C_{\text{Agg}}$	[N m <sup>-2</sup> ]	Agglomeratwiderstandskraft
$C_{\text{B}}$	[-]	Rührerabstand vom Boden (engl. <i>bottom clearance</i> )
$C_{\text{Glu/Lak}}$	[mol L <sup>-1</sup> ]	Glukose-/ Laktatkonzentration
$D_{\text{T}}$	[m]	Durchmesser des Bioreaktortanks
$d_{32}$	[m]	Sauterdurchmesser
$d_{\text{R}}$	[m]	Rührerdurchmesser
$d_{\text{Sph}}$	[m]	Sphäroiddurchmesser
$d_{\text{Zelle}}$	[m]	Durchmesser Einzelzelle
$E_{\text{Bind}}$	[J]	Bindungsenergie
$E_{\text{Kin}}$	[J]	kinetische Energie des Fluids
$F_{\text{ad}}$	[N]	zellspezifische Adhäsionskraft
$F_{\text{Ex}}$	[-]	Expansionsfaktor
$H_{\text{L}}$	[m]	Flüssigkeitshöhe im Bioreaktor
$h_{\text{R}}$	[m]	Rührerhöhe
$h_{\text{R,Boden}}$	[m]	Rührereinbauhöhe (vom Boden bis Rührermitte)
$k_{\text{Zelle}}$	[-]	Zelldissoziationskonstante
$m$	[kg]	Masse des Fluids
$n$	[s <sup>-1</sup> ]	Rührerdrehfrequenz
$Ne$	[-]	Newtonzahl
$N_{\text{js}}$	[s <sup>-1</sup> ]	min. Rührergeschwindigkeit für Suspension
$O_{\text{Sph}}$	[m <sup>2</sup> ]	Sphäroidoberfläche
$P$	[kg m <sup>2</sup> s <sup>-3</sup> ]	Rührerspezifische Leistungseintrag
$P_{\text{Sph}}$	[-]	Porosität des Sphäroids
$Re$	[-]	Reynoldszahl
$t_{\text{D}}$	[h]	min. Verdopplungszeit

$t_{D,Vol}$	[d <sup>-1</sup> ]	min. Volumenverdopplungszeit
$t_z$	[s]	Zirkulationszeit
$q_s$	[mol Zelle <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]	Substratverbrauchsrate bzw. Metabolitproduktionsrate
$u$	[m s <sup>-1</sup> ]	Fluktuationsgeschwindigkeit
$u_{tip}$	[m s <sup>-1</sup> ]	Rührerspitzen­geschwindigkeit (engl. <i>tip speed</i> )
$V_{Ex}$	[-]	volumenbezogener Expansionsfaktor
$V_{grün}$	[ $\mu\text{m}^3$ ]	grünes Volumen (= vitales Zellvolumen)
$V_L$	[m <sup>3</sup> ]	Arbeitsvolumen
$V_R$	[m <sup>3</sup> ]	durch den Rührer beanspruchtes Volumen
$V_{rot}$	[ $\mu\text{m}^3$ ]	rotes Volumen (= totes Zellvolumen)
$V_{Sph}$	[m <sup>3</sup> ]	Sphäroidvolumen
$X_{Zelle}$	[Zellen mL <sup>-1</sup> ]	Zellkonzentration
$Y_{Lak/Glu}$	[g Lak g <sup>-1</sup> Glu <sup>-1</sup> ]	Ausbeutekoeffizient (engl. <i>yield</i> )

### Griechische Symbole

$\alpha$	[-]	Exponent zur Berechnung von $C_{Agg}$
$\gamma$	[s <sup>-1</sup> ]	Scherrate
$\varepsilon$	[W m <sup>-3</sup> ]	spezifische Energiedissipation
$\bar{\varepsilon}$	[W m <sup>-3</sup> ]	mittlere Energiedissipation
$\varepsilon_{lok}$	[W m <sup>-3</sup> ]	lokale Energiedissipation
$\varepsilon_{max}$	[W m <sup>-3</sup> ]	max. Energiedissipation
$\eta_L$	[kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	dynamische Viskosität
$\Lambda_0$	[m]	max. Wirbelgröße
$\lambda$	[m]	kleinster existierender Wirbel (Kolmogorov Länge)
$\sigma_Z$	[N m <sup>-2</sup> ]	hydrodynamische Zugspannung
$\sigma_S$	[N m <sup>-2</sup> ]	hydrodynamische Scherspannung
$\tau_L$	[N m <sup>-2</sup> ]	laminarer Scherstress
$\tau_T$	[N m <sup>-2</sup> ]	turbulenter Scherstress
$\delta_{Sph}$	[N m <sup>-1</sup> ]	Pseudo-Oberflächenspannung des Sphäroids
$\mu_{max}$	[h <sup>-1</sup> ]	max. Wachstumsrate
$\mu_{Vol}$	[d <sup>-1</sup> ]	max. volumenbezogene Wachstumsrate
$\nu_L$	[m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> ]	kinematische Viskosität
$\rho_L$	[kg m <sup>-3</sup> ]	Fluid­dichte

**Abkürzungen**

3-SPB	Schrägblattrührer (engl. <i>3-segment pitched blade stirrer</i> )
ALX	Alloxan
AT	Fettgewebe (engl. <i>adipose tissue</i> )
BM	Knochenmark (engl. <i>bone marrow</i> )
CD	Unterscheidungsgruppen (engl. <i>cluster of differentiation</i> )
CFDA	grüner Langzeitfarbstoff (Carboxyfluorescein Diacetate)
CNTF	ziliäre neurotrophe Faktor (engl. <i>ciliary neurotrophic factor</i> )
CQA	kritische Qualitätsattribute (engl. <i>critical quality attributes</i> )
DAH	differenzielle Adhäsionshypothese (engl. <i>differential adhesion hypothesis</i> )
DITH	differenzielle Grenzflächenspannungshypothese (engl. <i>differential interfacial tension hypothesis</i> )
DO	gelöster Sauerstoff (engl. <i>dissolved oxygen</i> )
EDCF	Energie Dissipation Zirkulation Funktion (engl. <i>energy dissipation circulation function</i> )
ELISA	Enzymgebundener Immunosorbent-Assay (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EVs	extrazelluläre Vesikel
EZM	extrazelluläre Matrix
FDA	„Food and Drug Administration“
FKS	fötales Kälberserum
FI	Rührerpumpleistung (engl. <i>flow number</i> )
GAIA	glukoseabhängiges Insulinsekretions-Assay
GMP	Gute Herstellungspraxis (engl. <i>good manufacturing practice</i> )
IEQ	Islet Äquivalent (engl. <i>islet equivalent</i> )
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-6	Interleukin-6
iPSCs	induzierte pluripotente Stammzellen
MCP-1	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (engl. <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion (engl. <i>mixed lymphocyte reaction</i> )
MSCs	mesenchymale Stammzellen
PBMCs	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

---

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
Pdx-1	Pankreas Duodenal Homebox-1 (engl. <i>pancreatic and duodenal homebox 1</i> )
RWVR	Reaktor mit rotierender Wandung (engl. <i>rotating wall vessel reactor</i> )
SCID	schwerer kombinierter Immundefekt (engl. <i>severe combined immunodeficient</i> )
SI	Stimulations Index
STDV	Standardabweichung
STR	Rührkesselreaktor (engl. <i>stirred tank reactor</i> )
STZ	Streptozotocin
TCS	turbulenter Kollisionschweregrad (engl. <i>tubulent collision severity</i> )
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TMP-1	Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen (engl. <i>tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> )
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
UC	Nabelschnur (engl. <i>umbilical cord</i> )
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VPD	violetter Langzeitfarbstoff (engl. <i>violet proliferation dye</i> )