

**Quantifizierung der Freisetzung und Aktivität des  
Signalfaktors BMP-2 zur Induktion der  
osteogenen Differenzierung**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von  
Laura Maria Burmeister, M. Sc.

2022

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Andrea Hoffmann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Behrens

Tag der Promotion: 04.02.2022

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Andrea Hoffmann für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe im Rahmen der interdisziplinären Forschergruppe „Gradierte Implantate“ durchführen zu dürfen, bedanken. Vielen Dank an Dich für die persönliche und hilfreiche Betreuung während der praktischen Arbeiten und im Prozess des Zusammenschreibens.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Behrens für die Übernahme des Koreferats und bei Prof. Dr. Thomas Scheper für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes sowie für die gute und wertvolle Zusammenarbeit in der Forschergruppe FOR2180.

Anika Hamm und Kirsten Elger danke ich für die immer hilfreiche Unterstützung bei den praktischen Arbeiten im Labor und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Auch Yvonne Roger, PhD, gebürt hierfür ein ganz besonderer Dank. Du hast mir immer mit Rat und Tat bei Fragen zur Versuchsplanung und den besten Herangehensweisen zur Seite gestanden und das nicht nur bei der Arbeit, sondern sogar schon bei der Fahrt dorthin. Vielen Dank an Herr Dr. Thilo Flörkemeier für die Entnahme und Bereitstellung der Knochenmarkproben.

Weiterhin danke ich allen Beteiligten der Forschergruppe „Gradierte Implantate“ für die angenehme Zusammenarbeit und den stets nützlichen Austausch. Insbesondere bedanken möchte ich mich hier bei Julius Sundermann für die gemeinsame Bearbeitung des Teilprojekts und die vielen, wenn auch manchmal chaotischen, aber am Ende doch hilfreichen, Gespräche. Danke an Bastian Quaas für die unermüdliche Bereitstellung des BMP-2-Nachschubs und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Zur Planung und Durchführung der Partikel-Experimente haben Alexandra Satalov und Steffen Sydow einen großen Teil beigetragen, vielen Dank dafür. Danke dir besonders, Alexandra, für den stetigen Austausch und die Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Danke an Monika, dass du eine inhaltlich für dich völlig unverständliche Arbeit auf Rechtschreibungs- und Grammatikfehler korrigiert hast.

Ebenso möchte ich meinen Eltern danken, dass sie immer an mich geglaubt haben, auch wenn es zwischendurch schwierig erschien. Ohne euch und eure Unterstützung hätte ich es nie so weit geschafft. Ebenso danke an dich, Lorenz, auch wenn du nur das „Ende“ miterlebt hast, war es vermutlich für dich am nervenaufreißendsten. Danke für deine Geduld, deinen positiven Zuspruch und deine  
Unterstützung.

## Zusammenfassung

Das Zystinknotenprotein Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) ist ein wichtiger Wachstumsfaktor in der Knochenbildung während der Embryonalentwicklung und spielt ebenso eine wichtige Rolle während der Knochenregeneration. In der Forschergruppe „Gradierte Implantate“ sollen neben BMP-2 zur Knochenregeneration auch der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  zur Knorpelzellendifferenzierung und Smad 8 L+MH2, ein modifizierter Transkriptionsfaktor, zur Sehnenzellbildung eingesetzt werden. Alle drei Signalfaktoren werden mithilfe von Nanopartikeln, die diese zeitlich gradiert abgeben, auf eine elektrogewebte Polycaprolacton-Fasermatte, welche das Basismaterial des Implantats darstellt, aufgebracht. Das entwickelte Implantat soll zur Reparatur von defekten Sehnen-Knochen-Übergängen eingesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf BMP-2 als osteoinduktives, implantatgebundenes Protein, sowie dessen Freisetzung und Aktivität. Dazu werden im ersten Teil der Arbeit Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung durchgeführt. Es wird gezeigt, dass das osteogene Potential von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC) stark spenderabhängig ist. So weisen von den getesteten 17 Spendern nur fünf die Merkmale einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung auf. Zusätzlich kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kombination der Faktoren  $\beta$ -Glycerophosphat, BMP-2 und Ascorbat-2-Phosphat am effektivsten die osteogene Differenzierung induziert.

Um bei den Freisetzungsuntersuchungen nur das bioaktive BMP-2 zu quantifizieren, wird in dieser Arbeit der BMP-Responsive-Element-Luciferase-Test genutzt, der sensitiver und schneller durchführbar ist als vergleichbare Verfahren wie z. B. der Alkalische Phosphatase Test. Der BMP-Responsive-Element-Luciferase-Test wurde in der hier vorliegenden Promotionsarbeit unter anderem auf die Durchführung im 96-Loch-Plattenformat optimiert und ermöglicht so einen höheren und schnelleren Messdurchsatz der unterschiedlichen Proben.

Für den Einsatz auf dem gradierten Implantat wird die Freisetzung und Aktivität von BMP-2 aus organischen und anorganischen Nanopartikeln untersucht. Dabei werden anorganische aminomodifizierte Partikel ( $\text{SiNH}_2$ ) und Aminohexylaminopropyl-modifizierte ( $\text{SiAHAP}$ ) nanoporöse Silica-Nanopartikel sowie organische acetylierte Chitosan/Tripolyphosphat-Partikel (CS(58)/TPP und CS(83)/TPP) und Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel untersucht. Da zunächst nachgewiesen werden kann, dass die eingesetzten Konzentrationen der Nanopartikel auf MSC nicht zytotoxisch wirken, wird untersucht, ob die mit BMP-2-beladenen Partikel *in vitro* Osteogenese induzieren. Hierbei zeigen insbesondere die anorganischen  $\text{SiNH}_2$  sowie die organischen Chitosan-Nanopartikel eine Induktion der osteogenen Differenzierung, die durch eine Hochregulation der untersuchten osteogenen Markergene Osteopontin, Integrin-binding Sialoprotein, Runt-related transcription factor 2 und Osteocalcin belegt wird.

**Stichworte:** Bone Morphogenetic Protein-2, gradiertes Implantat, osteogene Differenzierung, Freisetzung, Nanopartikel

## Abstract

Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), a cysteine knot protein, is an important growth factor for bone formation during embryogenesis as well as during bone regeneration and repair. In the DFG research unit „Graded implants“ three growth factors, including BMP-2 to induce bone regeneration, transforming growth factor  $\beta$  for chondrogenesis induction and Smad 8 L+MH2 to induce tendon regeneration are used. They are planned to be released in a timely manner by nanoparticles which are bound to a structured polycaprolacton fibre mat. The final implant is planned to be used for the repair of rotator cuff defects.

The main focus of this thesis is the quantification of the activity and release of BMP-2 as an osteoinductive implant-bound protein. To this purpose the first part of the thesis concentrates on osteogenic differentiation. It is shown that human mesenchymal stem cells (MSC) exhibit a strong donor-dependence regarding their osteogenic potential. Of the tested 17 donors only six exhibited signs of osteogenic differentiation. In addition, the combination of the factors  $\beta$ -glycerophosphate, BMP-2 und ascorbate-2-phosphate has proven to be the most efficient in induction of osteogenic differentiation.

To make sure the only bioactive BMP-2 is measured during release experiments the BMP-responsive-element-luciferase assay (BRE-Luc) was used. It has been shown to be more sensitive and faster than the alkaline phosphatase assay. The BRE-Luc Assay was optimized for measurement in 96-well plates ensuring the measurement of a higher number of probes at the same time.

Organic and inorganic nanoparticles can be used to release BMP-2 in the final implant. For this purpose, the release and activity of BMP-2 from these particles was analyzed. Inorganic aminomodified ( $\text{SiNH}_2$ ) und aminohexylaminopropyl-modified (SiAHAP) nanoporous silica nanoparticles and organic acetylated chitosane/tripolyphosphate (CS(58)/TPP and CS(83)/TPP) und alginate/poly-L-lysine-particles were used. All particles do not have cytotoxic effects on MSC and were further tested for their potential to induce osteogenesis *in vitro* when being loaded with BMP-2. Especially the inorganic  $\text{SiNH}_2$  as well as the organic chitosan particles showed an induction of osteogenic differentiation by upregulation of the osteogenic marker genes osteopontin, integrin-binding sialoprotein, runt-related transcription factor 2 and osteocalcin.

**Keywords:** Bone Morphogenetic Protein-2, graded implant, osteogenic differentiation, release experiments, nanoparticles

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	III
Zusammenfassung.....	IV
Abstract .....	V
Inhaltsverzeichnis.....	6
I. Abkürzungsverzeichnis.....	11
II. Abbildungsverzeichnis.....	14
III. Tabellenverzeichnis .....	17
1 Einleitung.....	18
1.1 Stammzellen .....	18
1.1.1 Mesenchymale Stammzellen.....	19
1.1.2 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.....	20
1.1.3 Osteogene Differenzierung .....	21
1.2 Bone Morphogenetic Protein-2.....	24
1.3 Bioaktivitätsnachweis von BMP-2 .....	25
1.4 Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen.....	27
1.4.1 Chronische Degeneration der Entese der Rotatorenmanschette und deren Reparatur	27
1.4.2 Entwicklung eines gradierten Implantats für Sehnen-Knochen-Verbindungen.....	29
2 Ziele dieser Arbeit .....	32
3 Methoden.....	33
3.1 Ethikerklärung .....	33
3.2 Zellkultur.....	33
3.2.1 Aufreinigung und Kultivierung von primären humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark .....	33
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von MSCs und Zelllinien.....	34
3.2.3 Kultivierung von primären Zellen und immortalisierten Zelllinien .....	35
3.2.4 Gelatinieren von Zellkulturplatten .....	35

3.2.5	Osteogene Differenzierung .....	35
3.2.6	Fixieren der Zellen für histologische Färbungen .....	37
3.2.7	Alizarinrot S-Färbung .....	37
3.2.8	Von Kossa-Färbung .....	38
3.2.9	Oil Red O-Färbung .....	38
3.2.10	Kolorimetrische Calcium- und Phosphationen-Bestimmung .....	39
3.2.11	Herstellung einer stabilen Reporterzelllinie .....	40
3.2.12	Reportergenassay zum Nachweis von bioaktivem BMP-2 .....	40
3.2.13	Alkalische-Phosphatase Nachweis .....	41
3.2.14	Proteinbestimmung .....	42
3.2.15	BrdU – Zellproliferationassay .....	43
3.2.16	Zytotoxizitätsassay MTT .....	44
3.3	Molekularbiologie .....	45
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturproben .....	45
3.3.1.1	RNA-Isolation mit Trizol .....	45
3.3.1.2	RNA-Isolation mit Qiagen RNeasy .....	45
3.3.2	DNase-Verdau und cDNA-Synthese .....	46
3.3.3	Semiquantitative Polymerasekettenreaktion .....	46
3.3.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	48
3.3.5	Semiquantitative Auswertung von DNA-Bandenintensitäten mittels ImageJ .....	48
3.3.6	Quantitative Real-Time-PCR .....	49
3.3.7	DNA-Sequenzierung .....	51
3.4	Biomaterialien .....	52
3.4.1	Herstellung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln .....	52
3.4.2	Herstellung von Chitosan/Tripolyphosphat bzw. Alginat/Poly-L-Lysin-Nanopartikeln .....	53
3.5	Datenanalyse und Statistik .....	53
4	Ergebnisse .....	54

4.1	Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung.....	54
4.1.1	Osteogenes Potential von mesenchymalen Stammzellen aus verschiedenen Spendern.....	54
4.1.2	Einfluss von Differenzierungsinduktoren .....	61
4.1.2.1	Einfluss unterschiedlicher Phosphatquellen .....	61
4.1.2.2	Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Konzentrationen der Induktionszutaten BMP-2 und Dexamethason.....	69
4.2	BMP-2 als Teil eines Implantats – Freisetzung, Lagerung & Aktivität .....	74
4.2.1	BMP-2 Aktivitätsnachweis.....	74
4.2.1.1	BRE-Luc- Plasmidnachweis in der C2C12-Zelllinie und Sequenzierung des Plasmids ...	74
4.2.1.2	BMP-Responsive Element-Luciferase-Assay: Etablierung .....	75
4.2.1.3	Kinetik zur Ermittlung des besten Messzeitpunkts .....	79
4.2.1.4	Einfluss von Phenolrot im Medium auf die Genauigkeit der Messergebnisse.....	81
4.2.1.5	Vergleich des Alkalische Phosphatase-Assays und des BRE-Luc-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2.....	82
4.2.1.6	Normalisierung der Messergebnisse des BRE-Luc-Assays.....	84
4.2.2	BMP-2 als osteoinduktives Biomolekül .....	86
4.2.2.1	Löslichkeitsuntersuchungen von BMP-2 .....	86
4.2.2.2	Sterilisation von BMP-2 .....	87
4.2.3	Organische und anorganische Nanopartikel und deren BMP-2 Freisetzung .....	89
4.2.3.1	Anorganische nanoporöse Silica-Nanopartikel .....	89
4.2.3.2	Organische Chitosan/Tripolyphosphat- und Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel .....	97
5	Diskussion.....	105
5.1	Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung.....	105
5.1.1	Osteogenes Potential von mesenchymalen Stammzellen aus verschiedenen Spendern .....	105
5.1.2	Einfluss von Differenzierungszutaten.....	108
5.1.2.1	Einfluss von unterschiedlichen Phosphatquellen.....	108



5.1.2.2	Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Konzentrationen der Induktionszutaten .....	110
5.2	BMP-2 als Teil eines Implantats – Freisetzung, Lagerung & Aktivität .....	112
5.2.1	BMP-2 Aktivitätsnachweis .....	112
5.2.1.1	BRE-Luc- Plasmidnachweis in den Zellen & Sequenzierung .....	112
5.2.2	BRE-Luc-Etablierung .....	113
5.2.2.1	Kinetik zur Ermittlung des besten Messzeitpunkts .....	114
5.2.2.2	Einfluss von Phenolrot im Medium auf die Genauigkeit der Messergebnisse.....	114
5.2.2.3	Vergleich des Alkalische Phosphatase-Assays und des BRE-Luc-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2.....	115
5.2.2.4	Normalisierung der Messergebnisse des BRE-Luc-Assays.....	116
5.2.3	BMP- 2 als osteoinduktives Biomolekül .....	116
5.2.3.1	Löslichkeitsuntersuchungen von BMP-2 .....	116
5.2.3.2	Sterilisation von BMP-2 .....	118
5.2.4	Organische und anorganische Nanopartikel und deren BMP-2 Freisetzung .....	119
5.2.4.1	Anorganische nanoporöse Silica-Nanopartikel .....	119
5.2.4.2	Organische Chitosan/Tripolyphosphat (TPP)- und Alginate/Poly-L-Lysin (PLL)-Partikel .....	124
6	Zusammenfassung und Ausblick .....	126
7	Literatur.....	130
A	Anhang.....	149
A.1	Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien .....	149
7.1.2	Geräte.....	149
A.1.2	Materialien .....	151
A.1.3	Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits.....	152
A.2	Spenderübersicht der mesenchymalen Stammzellen.....	154
A.3	Verwendete Primer .....	155
7.1.5	qRT-PCR Primer .....	155

7.1.6	Semiquantitative PCR-Primer .....	156
A.1	Zusätzliche Ergebnisse.....	158
7.1.6.2	Einfluss unterschiedlicher Phosphatquellen auf die osteogene Differenzierung .....	158
7.1.7	BRE-Luc-Kinetik 24-Loch-Platte .....	160
7.1.8	Löslichkeitsuntersuchungen von BMP-2 in verschiedenen Pufferlösungen .....	161
7.1.9	Sterilisation von BMP-2 .....	162
7.1.10	Anorganische nanoporöse Silica-Nanopartikel .....	163
7.1.11	Organische Chitosan/Tripolyphosphat- und Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel .....	165
	Publikationen.....	168
	Lebenslauf .....	169

## I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Alg/PLL	Alginat-Poly-L-Lysin
ALPL	Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase
ap2	Adipocyte-selective fatty acid binding protein
Asc	Ascobat-2-Phosphat
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (Osteocalcin)
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BRE-Luc	BMP-2-Responsive-Element Luciferase
c	Zellen
C/EBPa	CCAAT/Enhancer binding protein a
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col1α1	Kollagen Typ I, alpha 1
CS/TPP	Chitosan/Tripolyphosphat
CS58	Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 58 %
CS83	Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 83 %
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DEA	Diethanolamin
Dex	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	DesoxyNukleosidTriPhosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESC	Embryonale Stammzelle
et al.	Et alii (und weitere)
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glut 4	Glucose Transporter Typ 4
h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IBSP	Integrin-binding Sialoprotein

Id	Inhibitor of differentiation
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzelle
ISCT	International Society for Cellular Therapy
K	Kelvin
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
KM	Knochenmark
LP	Loch-Platte
M	Molar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MMP	Matrix Metalloproteasen
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MSC-GM	MSC-Expansionsmedium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.a.	Nicht auswertbar
n.d.	Nicht detektierbar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydroxyphosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NPSNP	nanoporöse Silica-Nanopartikel
ns	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
OP	Osteogenes Potential
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor $\gamma$
PSC	Pluripotente Stammzelle
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
RLB	Reporter Lysis Buffer
RLU	Relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
RPS29	Ribosomal Protein S29
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-related transcripton factor 2
sec	Sekunden
Si-AHAP	Propyl-NH-hexyl-NH <sub>2</sub> -modifizierten NPSNP
Si-NH <sub>2</sub>	Aminopropylsilyl-modifizierte NPSNP
SSP-1	Osteopontin
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung

TEOS	Tetraethylorthosilicat
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
T <sub>M</sub>	Annealing-Temperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TPP	Tripolyphosphat
U	Units
ü.N.	Über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
VE	Vollentsalzt
w/v	Gewicht/Volumen
ZK	Zellkultur
$\beta$ -GP	$\beta$ -Glycerophosphat

## II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Isolation, Expansion und Differenzierung von MSCs. ....	20
Abb. 2: Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.....	23
Abb. 3: BMP-2 Signalweg. ....	25
Abb. 4: BRE-Luc Reporter-Assay.....	26
Abb. 5: Schematische Darstellung der Rotatorenmanschette mit dem entstandenen Defekt. ....	27
Abb. 6: Schematische Darstellung einer direkten Entthese aus den vier ineinandergreifenden Zonen.	29
Abb. 7: Schematische Darstellung des gradierten Implantats. ....	31
Abb. 8: Auftrennung der Knochenmarksuspension nach der Zentrifugation auf dem Biocoll-Gradienten.....	34
Abb. 9: Enzymreaktion Alkalische Phosphatase.....	42
Abb. 10: Chemische Strukturen der DNA-Nukleoside Thymidin und BrdU. Strukturen adaptiert von Iball, 1966 (BrdU) [5] und Young, 1969 (Thymidin) [6]. ....	43
Abb. 11: Strukturformeln von MTT und farbigen Formazan.....	44
Abb. 12: Mechanismus der Taqman-Sonden während qRT-PCR. ....	50
Abb. 13: Alizarinrot S-Färbung von differenzierten MSCs verschiedener Spender. ....	56
Abb. 14: Quantitative Messung der Alizarinrot S-Färbung. ....	56
Abb. 15: von-Kossa-Färbung der MSCs von ausgewählten Spendern zur Untersuchung des osteogenen Potentials.....	57
Abb. 16: Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte der fixierten, putativ differenzierten Zellen zur Bestimmung des osteogenen Potentials. ....	59
Abb. 17: Morphologische Untersuchung der differenzierten MSCs von unterschiedlichen Spendern zur Untersuchung des osteogenen Potentials. ....	60
Abb. 18: Oil Red O-Färbung von ausgewählten Spendern zur Untersuchung des osteogenen Potentials.....	61
Abb. 19: Übersicht der in verschiedenen Kombinationen eingesetzten Differenzierungszutaten.....	62
Abb. 20: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 28 (MSC 61). ....	63
Abb. 21: Markerexpressionsbestimmung durch semiquantitative RT-PCR. ....	64
Abb. 22: Ergebnisse der qRT-PCR Genexpressionsanalyse nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Differenzierung mit unterschiedlich zusammengesetzten Differenzierungsmedien.....	66
Abb. 23: Calcium- und Phosphatbestimmung der osteogenen Differenzierungen mit unterschiedlichen Induktionszutaten.....	68
Abb. 24: Expression der osteogenen Markergene während des Konzentrationsvergleichs von BMP-2 und Dexamethason. ....	70
Abb. 25: Expression der adipogenen Markergene während des Konzentrationsvergleichs von BMP-2 und Dexamethason. ....	71
Abb. 26: Alizarinrot S-Färbung des Konzentrationsvergleichs zwischen BMP-2 und Dexamethason. .	72
Abb. 27: Calcium- und Phosphatbestimmung des Konzentrationsvergleichs zwischen BMP-2 und Dexamethason.....	73
Abb. 28: Sequenzvergleich Plasmid pGL3/BRE-Luc und publizierte Sequenz (Korchynskiy <i>et al.</i> ). ....	74
Abb. 29: Gelelektrophorese der cDNA aus den putativen Reporterzellen. ....	75
Abb. 30: Vergleich der Standardreihen zur Etablierung eines optimierten BRE-Luc-Assays. ....	76

Abb. 31: Einfluss von FCS auf die Signalstärke der Luziferase.....	77
Abb. 32: Auswirkung eines Waschschrattes auf die Signalschwankungen im BRE-Luc-Assay.....	78
Abb. 33: Messung der Luziferase-Aktivität nach Einfrieren der Überstände bei -20 °C im Vergleich zu frisch gemessenen Proben. ....	78
Abb. 34: Kinetik der BRE-Luc-Aktivität nach 1-48 h im 96-Loch-Platten-Format.....	80
Abb. 35: Einfluss von Phenolrot im Zellkulturmedium auf die Signalstärke des Signals im BRE-Luc-Assay.....	82
Abb. 36: Vergleich des Alkalische Phosphatase-Assays und des BRE-Luc-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2. ....	83
Abb. 37: Normalisierung der Messergebnisse des BRE-Luc-Assay durch Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode und BCA.....	84
Abb. 38: Bestimmung der DNA-Menge und der Zellzahl der BRE-Luc-Reporterzellen in einer 96-Loch-Platte mit Einfluss von BMP-2. ....	86
Abb. 39: Biologische Aktivität von BMP-2 bei verschiedenen pH-Werten und in verschiedenen Puffersystemen. ....	87
Abb. 40: Auswirkung der Sterilisation von BMP-2 auf die Bioaktivität. ....	88
Abb. 41: Zytotoxizitätsuntersuchungen von nanoporösen Silica-Nanopartikeln auf C2C12 BRE-Luc-Zellen und MSCs.....	91
Abb. 42: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von NPSNP auf C2C12 BRE-Luc-Zellen.....	92
Abb. 43: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von NPSNP auf MSC...	93
Abb. 44: Freisetzung von bioaktivem BMP-2 von NPSNP. ....	94
Abb. 45: Genexpression der Gene ID1 und ID3 nach einer 2-stündigen Inkubation von MSC mit SiAHAP-Partikeln +/- BMP-2.....	95
Abb. 46: Genexpressionsanalysen ausgewählter osteogener Markergene nach der osteogenen Differenzierung mit Silica-Nanopartikeln.....	96
Abb. 47: Zytotoxizitätsuntersuchungen von organischen CS/TPP und Alg/PLL-Nanopartikeln auf C2C12 BRE-Luc-Zellen und MSCs.....	98
Abb. 48: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von organischen Nanopartikeln auf C2C12 BRE-Luc-Zellen.....	99
Abb. 49: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von organischen Nanopartikeln auf MSC. ....	101
Abb. 50: Genexpressionsanalysen ausgewählter osteogener Markergene nach der osteogenen Differenzierung mit Chitosan-Nanopartikeln.....	103
Abb. 51: Genexpressionsanalysen ausgewählter osteogener Markergene nach der osteogenen Differenzierung mit Alginat/PLL-Nanopartikeln.....	104
Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse der Untersuchungen zum osteogenen Potential von MSCs unterschiedlicher Spender. ....	107
Abb. 52: Grafische Darstellung des BMP-Responsive Elements nach Korchynskyi <i>et al.</i> ....	112
Abb. 53: pH- und pufferabhängige Löslichkeit und thermische Stabilität von BMP-2.....	117
Abb. 54: Quantifizierung des an NPSNP adsorbierten BMP-2 mittels indirekter ELISA-Messung im Vergleich zur BRE-Luc-Messung. ....	122
Abb. A55: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 7 und Tag 14 (MSC 61).....	158

Abb. A56: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 28 (MSC 59).....	159
Abb. A57: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 21 (MSC 62).....	159
Abb. A58: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 28 (MSC 115).....	160
Abb. A59: BRE-Luc-Kinetik im 24-Lochplattenformat. ....	160
Abb. A60: BRE-Luc-Messung der für die Löslichkeitsuntersuchung von BMP-2 verwendeten Puffer.161	
Abb. A61: Konzentrationsbestimmung der sterilisierten BMP-2 Proben mittels NanoDropTM. ....	162
Abb. A62: Untersuchungen zum Effekt von MES-Puffer auf C2C12-Zellen.....	163
Abb. A63: Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit NPSNP. ....	164
Abb. A64: Alizarinrot S-Färbung der putativ mit NPSNP differenzierten Zellen nach 28 Tagen.....	165
Abb. A65: Alizarinrot S-Färbung der putativ mit organischen Chitosan/TPP und Alg/PLL differenzierten Zellen nach 28 Tagen.....	165
Abb. A66: Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit CS/TPP-Partikeln.....	166
Abb. A67: Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit Alg/PLL-Partikeln. ....	167



### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Benötigte Trypsin-Menge zur Zellablösung.....	35
Tabelle 2: Osteogenese-Basalmedien.....	36
Tabelle 3: Verwendete Zusätze zur Induktion der osteogenen Differenzierung (Endkonzentrationen). .....	36
Tabelle 4: Kalibrationsreihe Alizarinrot S.....	37
Tabelle 5: Eingesetzte Standardreihen für die Calcium- und Phosphatbestimmung.....	40
Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse der Untersuchungen zum osteogenen Potential von MSCs unterschiedlicher Spender. ....	107
Tabelle A7: Übersicht der verwendeten Geräte.....	149
Tabelle A8: Verwendete Materialien.....	151
Tabelle A9: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits.....	152
Tabelle A10: Übersicht der verwendeten MSC-Spender.....	154
Tabelle A11: Verwendete qRT-PCR Primer.....	155
Tabelle A12: Verwendete Primer semiquantitative PCR.....	156

# 1 Einleitung

## 1.1 Stammzellen

Stammzellen im Allgemeinen sind Zellen, die noch nicht auf ihre Funktion im Organismus determiniert sind und welche in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und zu differenzieren [1]. Sie weisen je nach Spezialisierungsgrad keine oder nur eine geringe Differenzierung auf. Hierbei unterscheidet man zwischen verschiedenen Arten von Stammzellen, die, je nach Entwicklungsstadium, eine unterschiedliche Potenz aufweisen:

Totipotente Stammzellen können in alle Zellen des Organismus und extraembryonales Gewebe differenzieren, also ein neues lebensfähiges Individuum formen. Die Zygote bis zur Morula (8-Zell-Stadium) bestehen aus totipotenten Zellen. Nach einiger Zeit entwickelt sich diese weiter in die Blastozyste, welche pluripotente Stammzellen (PSCs) enthält. PSCs können in alle Zellen der drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm) und der Keimbahn differenzieren, es handelt sich hierbei zum Beispiel um embryonale Stammzellen (ESCs). Ein weiteres Beispiel für pluripotente Stammzellen sind sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs), die künstlich aus somatischen Zellen hergestellt werden können [2]. Nach der weiteren Differenzierung pluripotenter Stammzellen in Zellen aus einem der drei Keimblätter werden diese zu multipotenten Stammzellen. Dazu gehören alle adulten Stammzellen: z. B. die hämatopoetischen Stammzellen, die mesenchymalen Stammzellen und die endodermalen und ektodermalen Stammzellen. Diese multipotenten Stammzellen können nur noch weiter in Zellen des entsprechenden Keimblattes differenzieren. So differenzieren hämatopoetische Stammzellen in die verschiedenen Zelltypen des Blutes, mesenchymale Stammzellen in Zellen der Muskeln, Knochen und Knorpel, aus endodermalen Stammzellen entstehen Zellen der Leber, des Darms und der Lunge und ektodermale Stammzellen differenzieren in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie der Epidermis. Sie sind in den jeweiligen Organen zu finden und dienen dazu, seneszente oder apoptotische Zellen zu ersetzen [3]–[5].

Oligopotente Stammzellen können nicht mehr in alle Zellen des jeweiligen Keimblatts differenzieren, nur noch in einige Zelltypen, wohingegen unipotente Zellen sich nur teilen können und aus ihnen kein neuer Zelltyp entstehen kann.

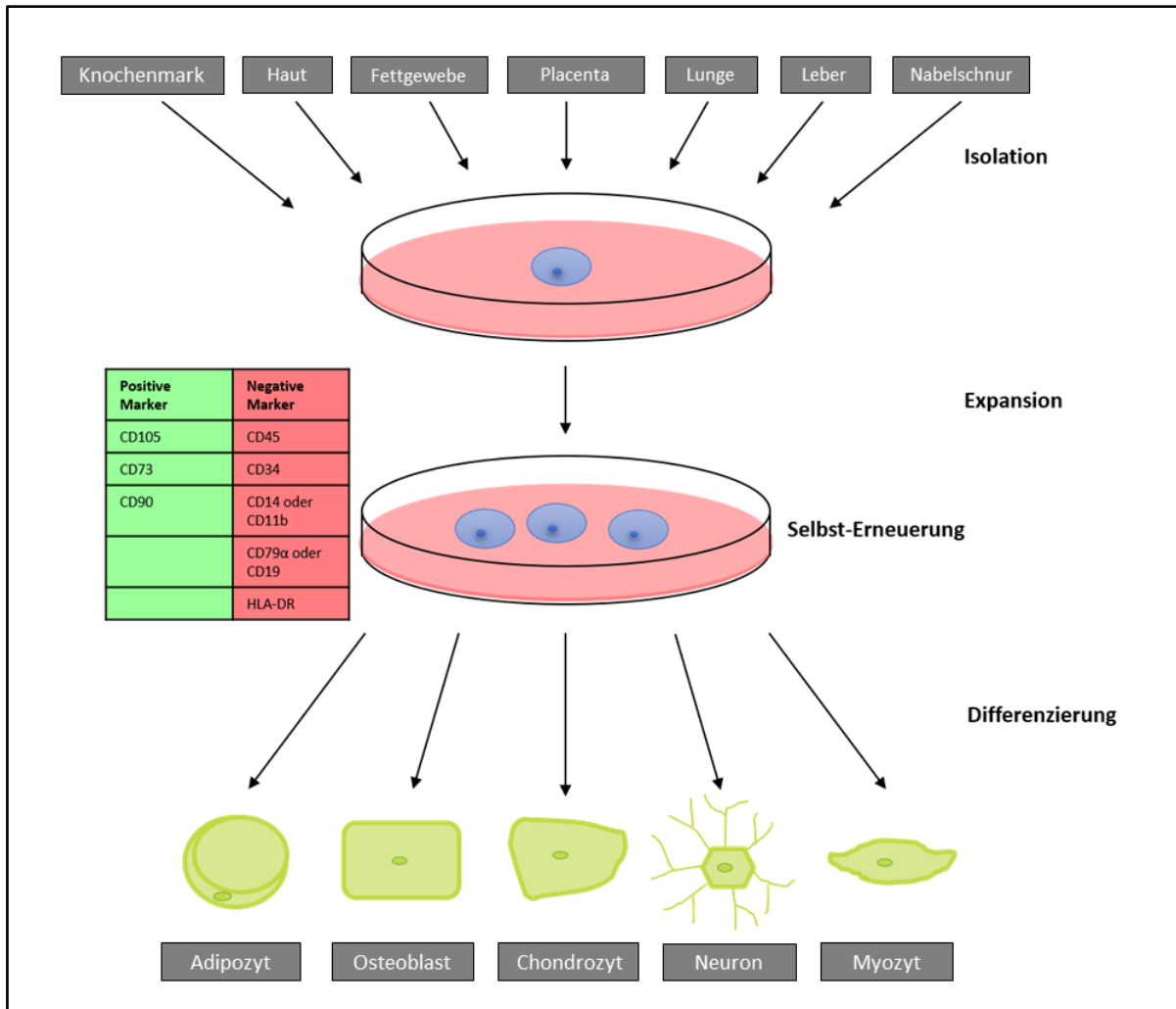
### 1.1.1 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen werden seit der ersten Veröffentlichung von Friedenstein *et al.* [6] im Jahr 1970 für eine Vielzahl von Forschungsthemen verwendet. Zum ersten Mal als mesenchymale Stammzellen benannt wurden sie aber erst 1991 von Arnold Caplan [7]. Nachdem zunächst mit aus dem Meerschweinchen und später mit aus der Ratte [8] isolierten Zellen gearbeitet wurde, ist nun auch bereits seit fast 30 Jahren das Protokoll zur Isolation und Expansion von humanen MSCs weitgehend unverändert etabliert [9].

MSCs können sehr einfach aus einer Vielzahl von Geweben isoliert werden, dazu gehören Knochenmark, Nabelschnur [10], Placenta, Fettgewebe [11], Lunge, Leber und Haut [12]. Aufgrund der unterschiedlichen Gewebequellen der MSCs wurden im Jahr 2006 von der „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) drei Mindestkriterien festgelegt, die eine Zelle erfüllen muss, um als mesenchymale Stammzelle bezeichnet zu werden [13].

1. MSC müssen unter Standard-Kulturbedingungen plastik-adhärenz sein.
2. MSCs müssen folgendes Oberflächenmarkerprofil aufweisen: CD105<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> sowie CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup> oder CD11b<sup>-</sup>, CD79α<sup>-</sup> oder CD19<sup>-</sup> and HLA-DR<sup>-</sup>.
3. In vitro muss die Differenzierung von MSCs in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten möglich sein.

Das letzte Kriterium beschreibt die Multipotenz der mesenchymalen Stammzellen. MSCs sind schon in diverse Gewebe differenziert worden, unter anderem Knorpel, Knochen, Sehnen, Ligamente und Fettgewebe [14], [15], dargestellt in Abb. 1.



**Abb. 1: Isolation, Expansion und Differenzierung von MSCs.** Mesenchymale Stammzellen können aus verschiedenen Geweben isoliert werden. Sie werden dann mittels entsprechender Oberflächenfaktoren charakterisiert und *in vitro* expandiert. Anschließend kann die Differenzierung in verschiedene Zellzweige erfolgen. Modifiziert nach Chen *et al.*, 2016 [16].

### 1.1.2 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Eines der Kriterien zur Definition von MSCs ist die Fähigkeit der Differenzierung in die osteogene, chondrogene und adipogene Zell-Linie. Um diese Differenzierung *in vitro* zu erzielen, werden die MSC mit entsprechenden Wachstumsfaktoren und Medienzusätzen in die gewünschte Differenzierungsrichtung gelenkt. Dabei unterscheidet man zwei Phasen der Differenzierung: die Determinierungs-Phase, in der die Zell-Linie festgelegt wird, und die terminale Differenzierungsphase, in der die Reifung der jeweiligen Zelltypen stattfindet [16], [17].

Chondrogene Differenzierung von MSCs wird durch die dreidimensionale Kultivierung der Zellen in Pellets sowie die Zugabe von Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) erzielt [18], [19]. Dabei zeigt sich die fortschreitende Differenzierung durch das Wachstum des dichter werdenden Pellets [20].

Außerdem werden die Markergene Kollagen Typ II, Typ IX und Aggrecan bei der Knorpelbildung exprimiert sowie die Biosynthese von Kollagen und Proteoglykanen angestoßen [19], [21]. Im Zuge der Differenzierung wird hier auch die extrazelluläre Matrix nach und nach degradiert, dies erfolgt unter anderem durch Matrix Metalloproteasen (MMP), zum Beispiel MMP13 [22].

Der Einsatz von bioaktiven dreidimensionalen Scaffolds bietet eine optimale Mikroumgebung für die Knorpelregeneration. So werden bereits Hydrogele [23] oder elektrogewebte Matten [24], [25] zur Kultivierung und Differenzierung von Chondrozyten eingesetzt.

Bei der adipogenen Differenzierung findet zunächst die Determinierung zu Präadipozyten statt, anschließend erfolgt die terminale Differenzierung zu Adipozyten. Diese weisen auch neue Funktionen im Vergleich zu den mesenchymalen Stammzellen auf wie die Lipid-Synthese und -Speicherung sowie die Produktion von Adipozyten-spezifischen Proteinen [26]. Die Induktion der Differenzierung in die adipogene Linie erfolgt durch die Zugabe von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat), Insulin und Glukokortikoiden [27]–[29]. Die im Zuge der Differenzierung exprimierten Schlüssel-Transkriptionsfaktoren Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) und CCAAT/Enhancer binding protein a (C/EBPa) führen zur Einleitung der Differenzierungskaskade, die in der terminalen Differenzierung der muren Adipozyten endet [30], [31]. Die Transkriptionsfaktoren PPAR $\gamma$  und C/EBPa induzieren die Expression von fast allen mit der Adipogenese verbundenen Genen. Dazu gehören Glycerophosphat-Dehydrogenase, Fettsäure-Synthase, Acetyl-CoA-Carboxylase, Malenzym, Glut 4 (Glucose Transporter Typ 4) und Ap2 (adipocyte-selective fatty acid binding protein) [32]. Während dieses Prozesses werden Lipid-Tröpfchen im Zytoplasma sichtbar, die mit der Zeit sehr groß werden.

Der Einsatz von Adipozyten und die Untersuchung der Adipogenese ist in vielen Forschungsgebieten von hoher Relevanz. Ein besonders großes Gebiet ist hier aber die Untersuchung von Fettleibigkeit und damit assoziiertem Diabetes Typ II [33].

### 1.1.3 Osteogene Differenzierung

Eine weitere Linie, in die MSC laut der Vorgaben der ISCT differenzieren können müssen, ist die osteogene Linie. Hier erfolgt zunächst die Determinierung der Zellen zu Osteoprogenitorzellen, welche dann weiter zu Osteoblasten und final zu Osteozyten differenzieren. Während der Differenzierung werden unter anderem durch die Regulation des Transkriptionsfaktors RUNX2 (Run-related transcription factor 2) die für die Osteogenese relevanten Gene aktiviert. RUNX2 ist ein Bestandteil des BMP (Bone Morphogenetic Protein) / TGF- $\beta$ -Signalwegs, der im nächsten Kapitel noch detaillierter beschrieben wird. BMP-2, BMP-4 und BMP-7 agieren via BMP-spezifische Smad-

Proteinen und induzieren so die Transkription von RUNX2 [34], [35]. Der Transkriptionsfaktor ist essentiell für die osteogene Differenzierung und kann bereits in den Osteoprogenitorzellen nachgewiesen werden [36]–[38].

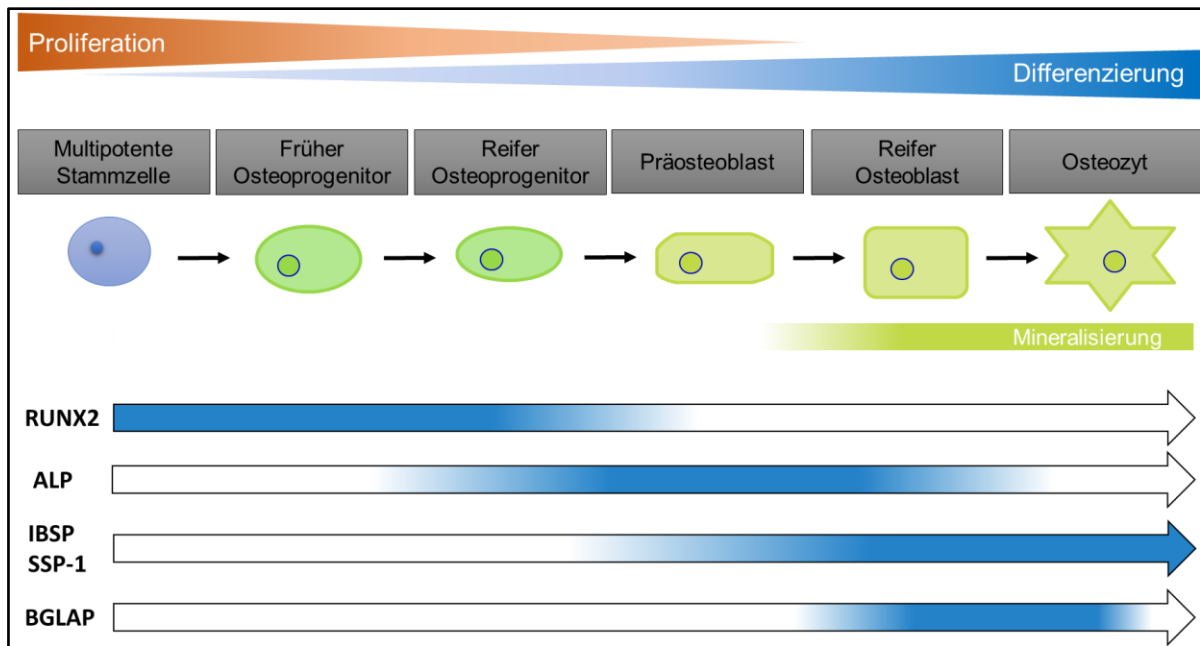
Zielgene des Transkriptionsfaktors sind unter anderem Osteocalcin, Col1 $\alpha$ 1 (Kollagen Typ I, alpha 1), IBSP (Integrin-binding Sialoprotein) und Osteopontin, die alle eine wichtige Rolle in der Osteogenese spielen [39]. Neben der Aktivierung der Zielgene wird RUNX2 auch eine antiproliferative Rolle in (Prä-) Osteoblasten zugeordnet [40], [41]. Nach der Aktivierung der entsprechenden Zielgene muss allerdings für die weitere Reifung der Knochenzellen die Expression von RUNX2 reduziert werden, somit ist der Transkriptionsfaktor im späteren Stadium der Differenzierung nicht mehr nachweisbar.

Als frühes Markergen wird die gewebeunspezifische Alkalische Phosphatase (ALPL) exprimiert. Ihre Expression kann in den reifen Osteoprogenitoren und Präosteoblasten nachgewiesen werden. Die Alkalische Phosphatase ist ein Zellmembran-gebundenes Protein [42], [43] und reguliert vermutlich die Adhäsion, Migration und Differenzierung der Osteoprogenitoren und Präosteoblasten [44]. Ihre Expression erfolgt vor der Expression der nicht kollagenen Matrix-Moleküle Osteopontin, Osteocalcin und IBSP [45]. Deren Expression beginnt erst im Stadium des (Prä-)Osteoblasten.

Hierbei werden Osteopontin (SSP-1), ein sekretiertes Phosphoglycoprotein, und Integrin-binding Sialoprotein (IBSP) sehr stark in Osteoblasten exprimiert [45], [46]. Der am spätesten exprimierte Marker, aber auch der als am spezifischsten geltende, ist Osteocalcin oder bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein (BGLAP). Das nicht-kollagene Protein wird ausschließlich in postmitotischen Osteoblasten exprimiert [47].

Die Mineralisierung von Knochen erfolgt in den reifen Osteoblasten durch die Ablagerung von Karbonat-Hydroxyapatit-Kristallen in der extrazellulären Matrix, die aus Kollagen Typ I und den vorher beschriebenen nicht-kollagenen Proteinen besteht [48], [49]. IBSP fungiert hier als Bindeglied und ermöglicht durch seine Bindung an die Kollagen-Matrix die Bildung von Hydroxyapatitkristallen [50], [51].

Ein Überblick der Abläufe und der jeweiligen Genexpressionen ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2: Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen.** Dargestellt ist der schematische zeitliche Ablauf der osteogenen Differenzierung. Außerdem sind die wichtigsten Wachstums- und Transkriptionsfaktoren und deren Expressionsmengen in chronologischer Reihenfolge der ersten Expression gezeigt (blau= hoch, weiß=niedrig). Hydroxyapatit lagert sich im Zuge der Mineralisierung ein. Modifiziert nach Owen *et al.*, 1990; Aubin, 1998; Bruderer *et al.*, 2014 [36], [52], [53].

*In vitro* erfolgt die Induktion der osteogenen Differenzierung durch die Zugabe von drei Faktoren. Wie oben beschrieben ist die Aktivierung bzw. Erhöhung der transkriptionellen Aktivität von RUNX2 essenziell für das Fortschreiten der Differenzierung. Dies kann zum einen mittels Zugabe des Glukokorticoids Dexamethason erfolgen, welches den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg aktiviert und somit für die Hochregulation der Proteinkinase Phosphatase-1 sorgt [54], [55], zum anderen sorgt BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein 2) ebenfalls für die Aktivierung von RUNX2. Der hier aktivierte Signalweg wird im nächsten Kapitel (1.2) noch genauer beleuchtet [56].

Um die Kollagen Typ-1 Fibrillenbildung zu ermöglichen, wird eine Vitamin C-Quelle benötigt. Dies kann zum Beispiel Ascorbinsäure oder das in Zellkultur stabilere Derivat Ascorbat-2-Phosphat (Asc) sein [57], [58]. Außerdem erhöht Ascorbinsäure die Expression der Alkalischen Phosphatase [59].

Da im Zuge der Mineralisierung Hydroxyapatit, ein Calcium-Phosphat, entsteht, ist auch eine externe Phosphatquelle nötig. Dazu wird in der Literatur häufig ein hydrolysierbares, phosphathaltiges Substrat wie  $\beta$ -Glycerophosphat ( $\beta$ -GP) verwendet [60]. Aber auch der Einsatz einer anorganischen Phosphatquelle wie Dinatriumhydrogenphosphat ist möglich [61]. Des Weiteren ist zu bedenken, dass die verwendeten Differenzierungsmedien in der Regel im Basalmedium schon 1 mM anorganisches Phosphat und 1,8 mM Calcium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) enthalten.

## 1.2 Bone Morphogenetic Protein-2

Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) gehört zur TGF- $\beta$ -Superfamilie, die insgesamt 33 Wachstumsfaktoren umfasst. Die BMPs wurden zunächst als *Bone inductive proteins* entdeckt, da diese aus demineralisierten Knochen gewonnen wurden und nachweislich einen positiven Einfluss auf das Knochenwachstum haben [62], [63]. Inzwischen sind 15 verschiedene BMPs in Säugetieren bekannt, die eine große Bandbreite an biologischen Effekten auf unterschiedlichste Zelltypen aufweisen. BMPs sind wichtige Morphogene während der Embryogenese und der weiteren Entwicklung. Sie beeinflussen das Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung [64]–[67]. Aber auch im späteren Verlauf zeigen BMPs Einfluss auf die Signalweiterleitung bei der Initiierung von Knochenreparatur, der Erhaltung von Gelenkstrukturen und den Gefäßumbau [64], [65], [68].

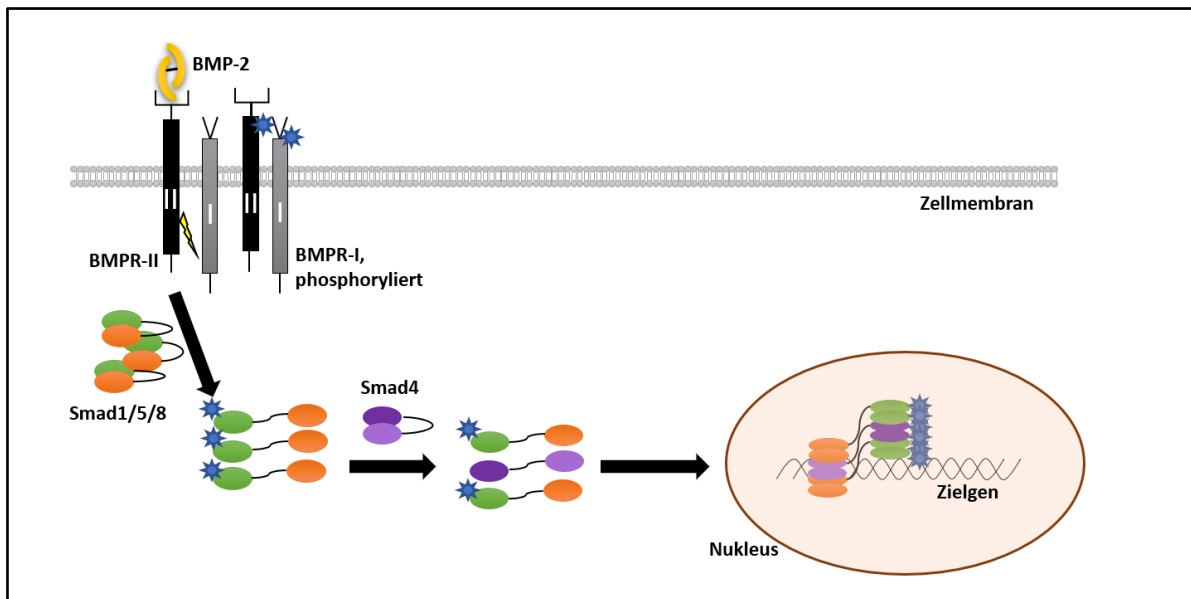
BMP-2 ist ein homodimeres Zysteinknotenprotein, dessen Monomere durch Disulfid-Brücken verbunden sind [69]. Es kann sich mittels Diffusion über einen Konzentrationsgradienten durch den Körper bewegen. Die Signalübertragung mittels BMP-2 kann sowohl über kanonische als auch nicht-kanonische Signalwege erfolgen.

Im kanonischen Signalweg bindet BMP-2 an den BMP-Rezeptor Typ II (BMPRII), der sich auf der Zellmembran befindet. Ist die Bindung erfolgt, bildet sich ein heterotetramerer Komplex mit dem BMP-Rezeptor Typ I (BMPRI) [70], [71]. Durch diese Komplexbildung wird BMPRI durch BMPRII transphosphoryliert und somit aktiviert. Dadurch können die im Zytoplasma befindlichen regulatorischen (R-) Smads phosphoryliert werden. Hierbei handelt es sich um Smad1, Smad5 und Smad8. Die aktivierten R-Smads komplexieren sich mit dem Co-Smad Smad4 und sind als Komplex in der Lage, in den Nukleus zu translozieren und dort als Transkriptionsfaktor zu fungieren [72], [73]. Hier erfolgt dann die Transkription der Zielgene (Abb. 3).

Es wurden diverse Zielgene von BMP identifiziert, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Differenzierung zu Osteoblasten exprimiert werden, und in drei Stufen je nach Zeitpunkt der Genantwort eingeteilt. Wie bei allen Genantworten finden sich hier Gene für eine sofortige frühe Antwort (*immediate early response genes*) (2 h nach der BMP-Stimulation), Gene für eine mittlere frühe Antwort (6 h nach Stimulation) und Gene für eine späte frühe Antwort (nach 24 h) [74]. Gene, die in die Signal-Weiterleitung involviert sind, gehören zu den unmittelbar früh antwortenden Genen, diese umfassen OASIS (Old Astrocyte Specifically Induced Substance), Prx2 (Peroxidase), TIEG (TGF- $\beta$  *Inducible Early Growth Response*), Snail und Id 1-3 (*Inhibitor of differentiation 1-3*). Die Id-Gene gelten auch als sehr wichtige Zielgene der BMP-Wachstumsfaktoren [75].



Die Gene, die in die Differenzierung von Osteoblasten involviert sind, gehören hingegen eher zu den mittel bis spät exprimierten Genen. BMP induziert diverse Gene, die mit der Differenzierung von MSCs in Osteoblasten assoziiert sind, zum Beispiel Runx2 und Osterix [76].



**Abb. 3: BMP-2 Signalweg.** Dargestellt ist der BMP-2 Signalweg, eingeleitet durch die Bindung von Homodimer BMP-2 an den BMP-Rezeptor Typ II (BMPR-II). Blaue Sterne zeigen Phosphorylierung. Modifiziert nach Granjeiro *et al.*, 2005 [77] und Wang *et al.*, 2014 [78].

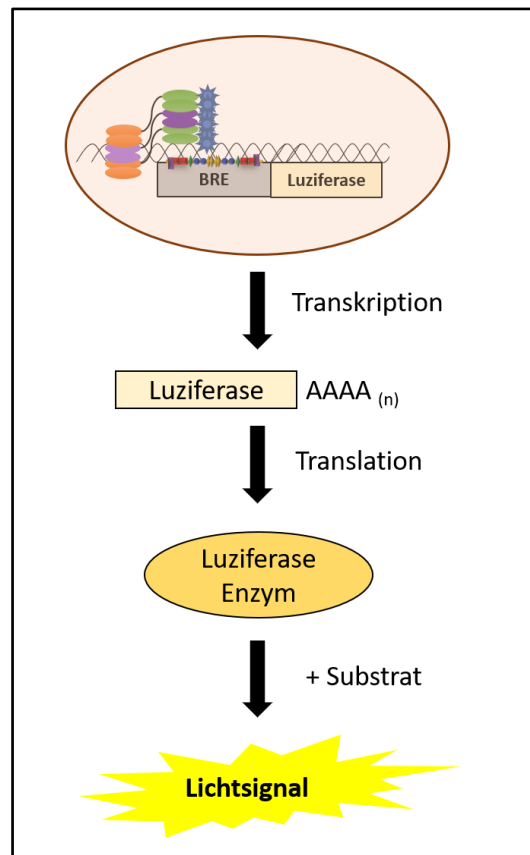
### 1.3 Bioaktivitätsnachweis von BMP-2

Der Nachweis von Proteinen kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Eine weit verbreitete Methode ist der ELISA (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*). Hier wird das Protein mittels spezifischer Antikörper detektiert und quantifiziert [79]. Auch für BMPs ist diese Methode bereits gut etabliert [80], [81]. Die Messmethode ist zwar sehr sensitiv, allerdings wird hier sowohl bioaktives als auch inaktives Protein nachgewiesen.

Um ausschließlich das bioaktive Protein nachzuweisen, werden daher häufig quantitative Bioassays verwendet. Für BMP-2 wird am häufigsten der Alkalische-Phosphatase (ALP) Assay verwendet. Hier wird mittels BMP-2 Zugabe die Induktion der Translation der Alkalischen Phosphatase eingeleitet und dann über eine Substrat-Reaktion des ALP-Enzyms auf die Bioaktivität des eingesetzten BMP-2 rückgeschlossen [82], [83]. Da hier zunächst das Enzym ALP synthetisiert werden muss, handelt es sich eine relativ langsame Antwort, welche 2-5 Tage dauert. Außerdem ist dieser Assay nicht sensitiv genug, um die geringe BMP-2-Konzentration in vielen biologischen Systemen zu untersuchen.

Ein weiterer Assay zur Quantifizierung von biologisch aktivem BMP-2 ist der sogenannte BRE-Luc-Assay. Dieser wurde zuerst von Korchynski *et al.* durchgeführt [84]. Sie haben das BMP-Responsive

Element (BRE) identifiziert, welches als Enhancer am Promotor von Id1 zu finden ist. Durch die Anbindung des Enhancers an das Luziferase Reportergen ist eine direkte Messung der biologischen Aktivität möglich. BMP-2 bindet an BMPR-II, wie in 1.2 beschrieben und durch die Bindung des Smad-Komplexes an das BRE erfolgt die Transkription und anschließende Translation der Luziferase. Durch Zugabe des Substrats, welches Luciferin enthält, erfolgt die Enzymreaktion und die entstehenden Lichtsignale können quantitativ bestimmt werden (Abb. 4) [85]. In den Studien von Korchynski und ten Dijke konnte außerdem gezeigt werden, dass der BRE-Luc Reporter ausschließlich von BMPs und nicht von TGF- $\beta$ , Aktivin oder Serum aktiviert wird und dadurch hervorragend als quantitativer Assay für biologisch aktives BMP eingesetzt werden kann [84].



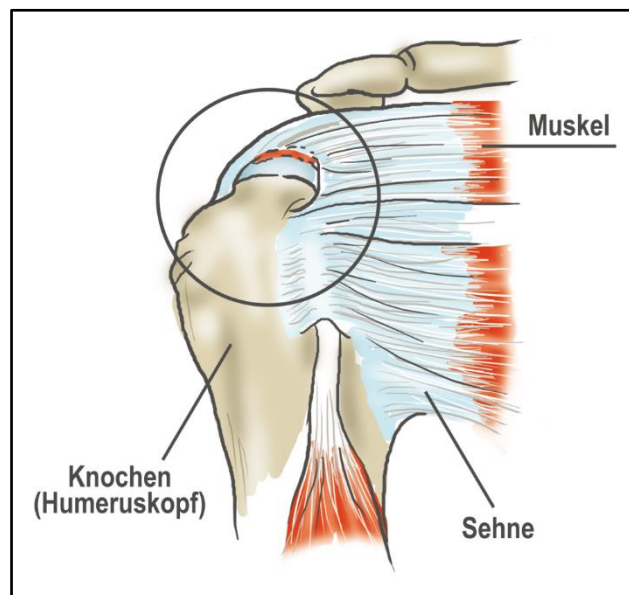
**Abb. 4: BRE-Luc Reporter-Assay.** Dargestellt ist die Bindung des Smad-Komplexes am BRE-Element und die somit induzierte Transkription und spätere Translation des Luziferase Enzyms, welches durch Substrat-Zugabe messbare Lichtsignale produziert. Schematische modifizierte Darstellung nach [84], [86].

## 1.4 Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Projektes in der Forschergruppe FOR2180 „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen“, die durch die DFG gefördert wird. Ziel dieser Forschergruppe ist es, ein gradiertes Implantat für den Sehnen-Knochen-Übergang an der Rotatorenmanschette zu entwickeln. Warum dies wichtig ist und welche Lösungsansätze hierzu verfolgt werden, wird im folgenden Kapitel beleuchtet.

### 1.4.1 Chronische Degeneration der Entthese der Rotatorenmanschette und deren Reparatur

Die direkten Entthesen, die Sehnen-Knochen-Übergänge an der Rotatorenmanschette, deren Funktion die Stabilisierung des Schultergelenks ist, sind häufig von Verletzungen betroffen. Durch körperlich anstrengende Tätigkeiten oder die kontinuierliche chronische Belastung bis ins höhere Alter treten immer wieder Risse auf. Insbesondere Personen, die älter als 80 Jahre sind, zeigen eine 40-80 %ige Wahrscheinlichkeit für Verletzungen an dieser Entthese (Abb. 5) [87]–[90]. Durch fehlende Heilungsprozesse im adulten Organismus im Vergleich zum Embryo kann hier keine natürliche Heilung dieses Risses erfolgen [91]. Chirurgische Eingriffe sind zwar möglich, weisen aber in vielen Fällen nicht die gewünschte Erfolgsquote auf. Durch die Muskel-Sehnen-Retraktion entstehen hier Defekte mit kritischer Größe, die nicht ohne extreme Spannung der Sehne repariert werden können. Dies hat häufig einen erneuten Riss der Naht zur Folge [92].

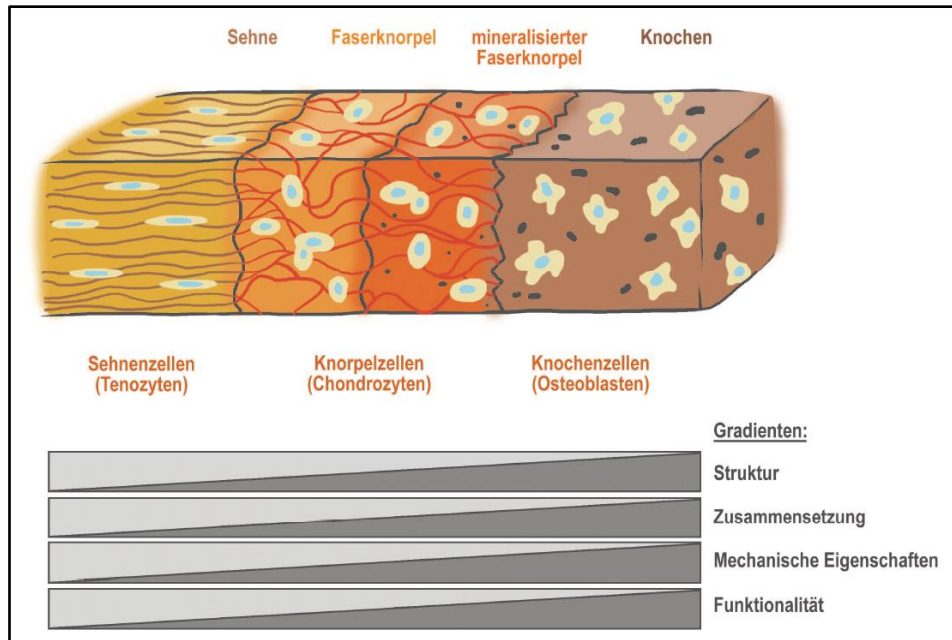


**Abb. 5: Schematische Darstellung der Rotatorenmanschette mit dem entstandenen Defekt.** Abbildung aus DFG-Vollantrag „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen, FOR2180“ [93].

Und selbst wenn die chirurgische Reparatur der Enthese auf die beschriebene Art gelingt, ist es den Patienten in der Regel nicht möglich, ihren ursprünglichen Bewegungsradius wiederzuerlangen [91].

Aus diesem Grund ist ein möglicher neuartiger Lösungsansatz der Einsatz von Implantaten, um einerseits die entstehende Lücke zwischen Sehne und Knochen zu füllen und andererseits die Regeneration der Enthese zu stimulieren. Da es sich hier um eine direkte Enthese handelt, die sich durch den graduellen Übergang von Sehne zu Knochen auszeichnet, ist dies allerdings eine besondere Herausforderung. Es handelt sich hierbei um den Übergang von fibröser Sehne zu unmineralisiertem Faserknorpel gefolgt von mineralisiertem Faserknorpel und der Anbindung an Knochen (Abb. 6) [94]. Die verschiedenen Gewebe unterscheiden sich in ihrer Struktur, ihrer Zusammensetzung und damit auch in ihren biomechanischen Eigenschaften und ihrer Funktionalität. Sehnenseitig sind die Kollagenfasern strukturiert ausgerichtet, wohingegen in der Knorpel- und Knochenzone keine Ausrichtung der Fasern zu beobachten ist. In den unterschiedlichen Zonen sind unterschiedliche Zelltypen (Tenozyten, Chondrozyten und Osteoblasten) zu finden sowie unterschiedliche Komponenten der Extrazellulärmatrix. Durch den Anstieg des Mineralgehalts durch Calciumphosphate ergibt sich in Richtung des mineralisierten Faserknorpels eine langsame Erhöhung der Steifigkeit.

Daher ist ein Implantat wünschenswert, welches die natürlichen Übergänge berücksichtigt. Bisher konnten solche Ansätze noch nicht zu Erfolgen führen, da hier entsprechende Charakteristika der natürlichen Übergänge fehlten bzw. nicht auf die unterschiedlichen Gradienten der Materialien geachtet wurde [95]–[98]. So sind bereits Implantate entwickelt und untersucht worden, die in den verschiedenen Zonen Materialien mit festgelegten Eigenschaften verwendet haben, aber keinen Gradienten integrierten oder bei Einbindung eines Gradienten diesen nur im Hinblick auf einen Parameter wie zum Beispiel dem Mineralgehalt entwarfen [95].



**Abb. 6: Schematische Darstellung einer direkten Enthese aus den vier ineinandergreifenden Zonen.** Kollagen I-(braun) und Kollagen II-(rot)-Fasern sind dargestellt. In der mineralisierten Faserknorpelzone setzt bereits eine Mineralisierung auf Basis von Calciumphosphat ein (kleine schwarze Punkte). In der Knochenzone ist die Mineralisierung stark ausgeprägt und enthält hier auch Kristalle (größere schwarze Punkte). Abbildung aus DFG-Vollantrag „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen, FOR2180“ [93].

#### 1.4.2 Entwicklung eines gradierten Implantats für Sehnen-Knochen-Verbindungen

Zur Entwicklung eines Implantats, welches als Brücke zwischen Sehne und Knochen fungieren kann und gleichzeitig möglichst nah an der ursprünglichen Physiologie bleibt, sind in der Forschergruppe mehrere ineinandergreifende Konzepte berücksichtigt worden. Um sowohl im Einsatz für den Patienten sicher als auch effizient und einfach in der Anwendung und Herstellung zu sein, handelt es sich um ein zellfreies Implantat, welches mit den endogenen Stammzellen des Patienten interagiert. Durch entsprechende Wachstumsfaktoren, die die Differenzierung der jeweiligen Zelltypen induzieren, wird hier ein biologischer Impuls gesetzt.

Hierbei wird zur Induktion der Sehnenzellendifferenzierung der modifizierte Transkriptionsfaktor Smad8 L+MH2 (Smad8 Linkerregion + Mad Homology Region 2) verwendet [99], [100]. Die Induktion der Chondrogenese erfolgt durch TGF- $\beta_3$ , da hier nachweislich ebenfalls narbenfreie Sehnenheilung induziert wird [21], [101] und die Osteogenese wird mittels BMP-2 induziert, welches ebenfalls die Wiederherstellung der Sehnen-Knochen-Verbindung im Allgemeinen stimuliert [102], [103].

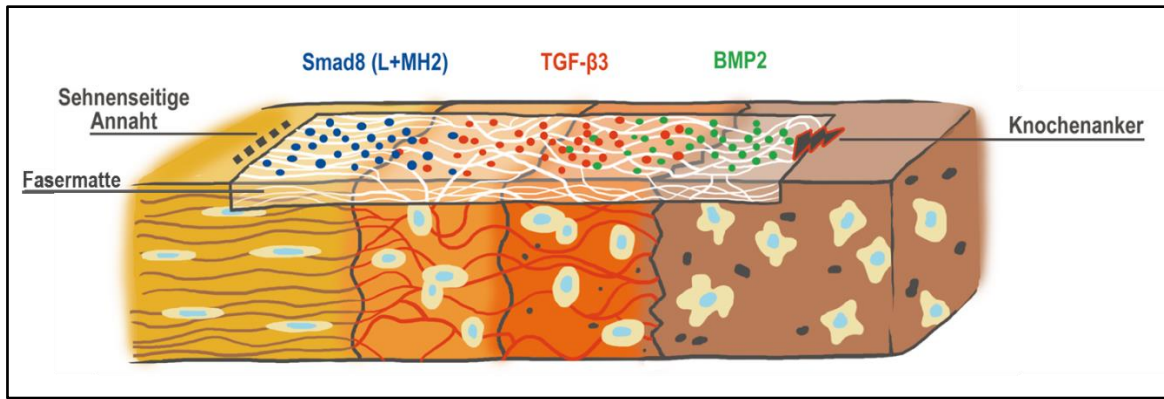
Um die Abgabe der Wachstumsfaktoren sowohl zeitlich als auch lokal festzulegen, werden Nanopartikel verwendet, die die entsprechenden Wachstumsfaktoren binden. Dazu werden sowohl

anorganische Silica-Nanopartikel als auch organische Polymerpartikel aus Chitosan/Tripolyphosphat (CS/TPP) oder Alginat-Poly-L-Lysin (Alg/PLL) verwendet.

Bei nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNP) handelt es sich um vielversprechende Trägermaterialien von biologischem Material, da diese durch ihre Modifizierbarkeit an die entsprechenden Faktoren angepasst werden können und ebenfalls als biokompatibel und biodegradierbar gelten [104]–[106]. Die in dieser Arbeit verwendeten NPSNP wurden von ALEXANDRA SATALOV und KAREN BESECKE aus dem Institut für Anorganische Chemie der Leibniz Universität Hannover hergestellt, modifiziert und zur Verfügung gestellt. Die Partikel lassen sich mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen modifizieren. So lässt sich Variabilität bei der Oberflächenladung und der Hydrophobizität erzielen, um unterschiedlichste Biomoleküle optimal an die NPSNP binden zu können.

Neben den anorganischen NPSNP wurden in dieser Arbeit auch organische Nanopartikel im Hinblick auf ihr BMP-2-Freisetzungsverhalten und ihr osteogenes Differenzierungspotential untersucht. Dabei handelt es sich zum einen um Chitosan/Tripolyphosphat (CS/TPP)-Partikel, die bereits in vorherigen Arbeiten erfolgreich für die Freisetzung von BMP-2 verwendet wurden [107], sowie Alginat-Poly-L-Lysin (Alg/PLL)-Partikel. Beide Partikelarten wurden von STEFFEN SYDOW (Institut für Technische Chemie, Technische Universität Braunschweig) hergestellt und zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um zu Nanopartikeln verarbeiteten Hydrogelen, die sich sehr gut als Freisetzungssystem für Signalproteine eignen [108]. Die verwendeten Nanopartikel sind biokompatibel und biodegradierbar [109] und eignen sich sehr gut für eine gezielte Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Es werden zwei unterschiedlich stark acetylierte Chitosane verwendet: CS(58) und CS(83).

Als Trägermaterial dienen biodegradierbare, elektrogewebene Fasermatten aus Polycaprolacton, die ebenfalls gradiert genutzt werden [110]. So werden sehnenseitig gerichtete Fasern und knochenseitig ungerichtete Fasern genutzt. Auf diese Weise werden in dem geplanten Implantat mehrere Gradienten der Freisetzung berücksichtigt: zeitliche und räumliche Freisetzung der entsprechenden Wachstumsfaktoren sowie die biomechanischen Eigenschaften der unterschiedlichen Gewebetypen (Abb. 7).



**Abb. 7: Schematische Darstellung des gradierten Implantats.** Die *in vivo* existierenden Gradienten (Abb. 6) werden hier durch Gradienten mit unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften sowie der räumlichen und zeitlichen Freisetzung von bioaktiven Proteinen nachgebildet. Die in der Abbildung dargestellten Nanopartikel repräsentieren die unterschiedlichen Anbindungs- und Freisetzungssysteme. Zur Fixierung des Implantats im Gewebe ist auf der Sehnen- und Knochen- seite eine Annaht vorgesehen, auf der Knochen- seite der Einsatz von Knochenankern. Abbildung aus DFG-Vollantrag „Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen, FOR2180“ [93].

## 2 Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im ersten Teil mit der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Hier sollen die optimalen Bedingungen zur Differenzierung ermittelt werden. Dies beinhaltet im ersten Schritt die Selektion der entsprechenden Spender, da hier aufgrund der Verwendung von primären Zellen wesentliche Spender-spezifische Unterschiede auftreten können. Im Folgenden werden die Differenzierungszutaten genauer betrachtet und selektiert. Insbesondere BMP-2 als zentraler Wachstumsfaktor soll in der praktischen Untersuchung auf seine Induktionskapazitäten hin untersucht werden.

Im zweiten Teil der Arbeit geht es speziell um BMP-2 als bioaktives, Implantat-gebundenes Protein. Zunächst erfolgt die Charakterisierung des Wachstumsfaktors sowie die Optimierung eines geeigneten Bioaktivitätsassays. Im letzten Teil wird die Freisetzung von BMP-2 aus organischen und anorganischen Nanopartikeln untersucht.



## **3 Methoden**

### **3.1 Ethikerklärung**

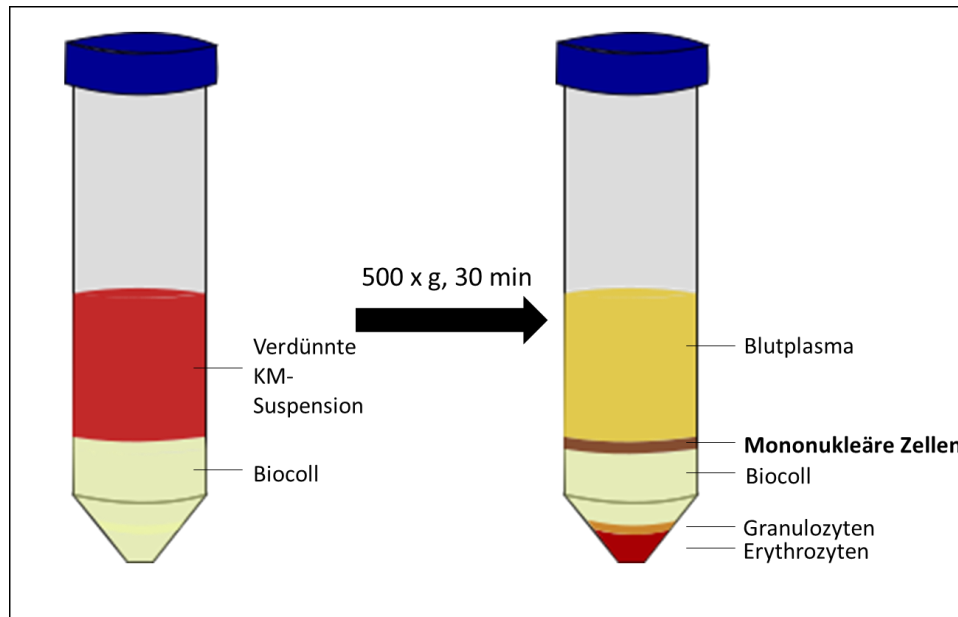
Für diese Arbeit werden humane Knochenmarkpräparationen von PatientInnen verwendet. Die Genehmigung des Ethik-Komitees der Medizinischen Hochschule Hannover liegt vor (Nr. 565-2009). Die Proben wurden bei orthopädischen Eingriffen von PatientInnen mit gutem Allgemeinzustand bzw. ohne Nebenerkrankungen außer Osteoarthritis entnommen. Von allen Spendern liegt eine schriftliche, informierte und freiwillige Zustimmung vor und persönliche Informationen wurden anonymisiert. Eine Liste der verwendeten Spender sowie deren Alter und Geschlecht befindet sich im Anhang (Tabelle A10).

### **3.2 Zellkultur**

Sämtliche Experimente mit humanen oder murinen Zellen werden an der Sicherheitswerkbank mit sterilem Material durchgeführt. Die Zellen werden alle bei 5 % CO<sub>2</sub> (Kohlenstoffdioxid), 85 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C inkubiert und regelmäßig durch lichtmikroskopische Beobachtung morphologisch überprüft.

#### **3.2.1 Aufreinigung und Kultivierung von primären humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark**

Alle in der Arbeit verwendeten primären humanen mesenchymalen Stammzellen (MSCs) werden aus Knochenmark (KM) isoliert. Dieses wird aus dem Hüftkopf gewonnen (zur Verfügung gestellt von DR. THILO FLOERKEMEIER, Annastift, MHH), mit 12.500 U Heparin versetzt (ca. 10 ml Knochenmark), um Gerinnung zu verhindern, und mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt. Die entnommenen Proben werden zunächst im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt und durch Resuspendieren gemischt. Die Suspension wird durch ein 100 µm Zellsieb filtriert und anschließend in einem konischen 50 ml-Röhrchen auf Biocoll (1/2 Volumen der Menge des verdünnten Knochenmarks) (Dichte 1,077 g/ml) geschichtet. Um einen Dichtegradienten zu erhalten, wird bei Raumtemperatur (RT) für 30 min und 500 x g ohne anschließendes Bremsen zentrifugiert [111].



**Abb. 8: Auftrennung der Knochenmarksuspension nach der Zentrifugation auf dem Biocoll-Gradienten.**

Die mononukleären Zellen (Abb. 8) werden mit einer Pasteurpipette abgenommen, mit 30 ml PBS gewaschen und anschließend bei 500 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in 10 ml MSC-Expansionsmedium (MSC-GM) resuspendiert und in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät. Um die mononukleären Zellen und Zelldebris zu entfernen, wird das Medium am nächsten Tag gewechselt und die Zellen werden bis zur Passagierung weiter kultiviert.

### 3.2.2 Einfrieren und Auftauen von MSCs und Zelllinien

Um Zellen einzufrieren, wird eine definierte Zellzahl (meist  $0,5 \cdot 10^6$  c pro Kryoröhrchen) bei 200 x g 5 min zentrifugiert und das Pellet wird in einem Gemisch aus 95 % FCS und 5 % DMSO (Dimethylsulfoxid) aufgenommen und kontrolliert zunächst im  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Ultratiefkühlschrank und dann in der  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Tiefkühltruhe eingefroren. Das kontrollierte Einfrieren erfolgt durch die Nutzung von einem Kryo-Einfriergerät mit einer Abkühlgeschwindigkeit von ca.  $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

Um eingefrorene Zellen wieder aufzutauen, werden diese möglichst schnell im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und in frisches geeignetes Medium in einer geeignet großen Zellkulturflasche gegeben. Wenn die Zellen adhärirt sind, nach ca. 2-4 h, wird das Medium gewechselt, um das DMSO und tote Zellen aus dem Medium zu entfernen. Als Alternative können die Zellen auch direkt nach dem Auftauen in 2-4 ml Medium aufgenommen werden und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert werden. Nun befindet sich das DMSO im Überstand, dieser wird entsorgt und das Zellpellet wird in frischem Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben.

### 3.2.3 Kultivierung von primären Zellen und immortalisierten Zelllinien

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 % werden Zellen (MSCs, C2C12 und C3H10T<sup>1/2</sup>) passagiert und mit einer Zelldichte von 2000 c/cm<sup>2</sup> oder einer für das Experiment geeigneten Menge wieder ausgesät. Um die Zellen abzulösen, wird zunächst das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit einer den Boden benetzenden Menge (Tabelle 1) Trypsin (1:250)/Ethylendiamintetraacetat (EDTA) (0,5 %/0,2 %) für ca. 5 min inkubiert. Das Ablösen der Zellen wird durch mikroskopische Kontrolle bestätigt. Die Enzymreaktion wird mit serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen werden in ein konisches Röhrchen überführt und mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt.

**Tabelle 1: Benötigte Trypsin-Menge zur Zellablösung.**

Größe der Zellkulturflasche (cm <sup>2</sup> )	Menge Trypsin/EDTA (ml)
25	1
75	2
175	3
300	5

### 3.2.4 Gelatinieren von Zellkulturplatten

Um eine bessere Anhaftung der Zellen, insbesondere während der Osteogenese, an die Zellkulturplatten und -flaschen zu gewährleisten, werden diese mit einer 2 % Gelatine B-Lösung (in ddH<sub>2</sub>O) beschichtet. Dazu werden 0,1 ml/cm<sup>2</sup> von der autoklavierten 2 %igen Gelatine B-Lösung auf die Wachstumsfläche gegeben und mindestens eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird das Zellkulturgefäß zweimal mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung mit PBS überschichtet bei 4 °C gelagert.

### 3.2.5 Osteogene Differenzierung

Um Zellen osteogen zu differenzieren, werden in dieser Arbeit verschiedene Methoden und Medienzusammensetzungen verwendet, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Osteogene Differenzierung wurde hauptsächlich mit den primären MSCs durchgeführt, aber auch mit Zelllinien wie C2C12-Zellen. Hier unterscheiden sich die Zusammensetzungen der Basalmedien (Tabelle 2).

**Tabelle 2: Osteogenese-Basalmedien.**

MSC	90 %	DMEM FG0415
	10 %	FCS
	25 mM	HEPES
	1 %	Penicillin/Streptomycin
<hr/>		
C2C12	Expansionsmedium s. Anhang	

Des Weiteren werden verschiedene Zusätze benötigt, um eine osteogene Differenzierung zu induzieren: eine Phosphatquelle, die von organischen oder anorganischen Stoffen bereitgestellt werden kann, Vitamin C, um die Kollagenfibrillenbildung anzuregen, und ein Faktor zur Aktivierung der osteogenen Signalwege (BMP-2 oder Dexamethason) (Tabelle 3). In dieser Arbeit werden unterschiedliche Rezepturen zur Induktion der osteogenen Differenzierung untersucht, welche im Ergebnisteil genauer beschrieben werden.

**Tabelle 3: Verwendete Zusätze zur Induktion der osteogenen Differenzierung (Endkonzentrationen).**

Phosphatquelle	10 mM	$\beta$ -Glycerophosphat
	3 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$
<hr/>		
Vitamin C-Quelle	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Ascorbinsäure
	50 $\mu\text{M}$	Ascorbat-2-Phosphat
<hr/>		
Osteogene Signalinduktion	10 – 100 nM	Dexamethason
	50 – 200 ng/ml	BMP-2

Die Zellen werden zunächst mit einer Zelldichte von 5000 c/cm<sup>2</sup> ausgesät und bis zur Konfluenz ca. 3 - 4 Tage wachsen gelassen. Dann wird mit dem entsprechenden Osteogenese-Medium die Differenzierung eingeleitet. Je nach Versuchsziel werden im Verlauf der Differenzierung RNA-Proben und Zellextrakte gewonnen und/oder Zellen für anschließende histologische Färbungen fixiert.

### 3.2.6 Fixieren der Zellen für histologische Färbungen

Zur anschließenden histologischen Färbung werden die Zellen fixiert. Dazu werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min mit 4 % PFA (Paraformaldehyd) in TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung) fixiert (500 µl für ein Loch einer 6-Loch-Platte). Nach Ende der Inkubationszeit werden die Zellen 3 x mit TBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung mit TBS gelagert.

### 3.2.7 Alizarinrot S-Färbung

Um Calciumionen kolorimetrisch nachzuweisen, wird die Alizarinrot S-Färbung durchgeführt. Diese basiert auf dem Prinzip, dass das eingesetzte Alizarinrot S (Natriumalizarinsulfonat) einen Chelat-Komplex mit den Calciumionen formt und sich dabei die Farbe von Kupferbraun zu Rot verändert [112].

Zur Durchführung der Färbung werden die zuvor mit PFA fixierten Zellen zunächst dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Dann wird 1 ml einer 1 % (w/v) Alizarin Rot-Lösung (pH 4,2) für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Anschließend wird zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und der gefärbte Zellrasen wird fotografisch dokumentiert.

Zur Quantifizierung der Färbung kann eine Zelllyse mit einer 10 % Essigsäure / 20 % Methanol-Lösung durchgeführt werden. Die Lösung wird 45 min auf den Zellen inkubiert, anschließend wird die Zellschicht in 1,5 ml Eppendorf Gefäße transferiert, 30 sec gevortext und 10 min bei 85 °C erhitzt. Nach einer 5-minütigen Abkühlphase auf Eis werden die Proben 10 min bei 20.000 x g zentrifugiert und somit von Zelltrümmern befreit. Zur Kalibration wird eine Standardreihe definierter Mengen Alizarinrot S (Tabelle 4) verwendet. Es wird die Optische Dichte (OD) bei 405 nm bestimmt.

**Tabelle 4: Kalibrationsreihe Alizarinrot S.**

Alizarinrot S (mM)	1 % (w/v) Alizarinrot S Lösung	ddH <sub>2</sub> O
2,08	50 µl	950 µl
1,04	500 µl der 2,08 mM Lösung	500 µl
0,52	500 µl der 1,04 mM Lösung	500 µl
0,26	500 µl der 0,52 mM Lösung	500 µl
0,13	500 µl der 0,26 mM Lösung	500 µl

0

0  $\mu$ l500  $\mu$ l

### 3.2.8 Von Kossa-Färbung

Bei der von Kossa-Färbung werden die Anionen von Calcium-Salzen, wie Carbonat, Phosphat, Oxalat, Sulfat, Chlorid oder Sulfocyanid gefärbt. Bei den hier zu analysierenden Zellen, die putativ osteogen differenzieren, handelt es sich hauptsächlich um Hydroxyapatit, also Calciumphosphat. Hierbei werden die Calcium-Ionen des Salzes durch Silber-Ionen ersetzt und es entsteht Silberphosphat. Durch Lichteinfluss wird das Silberphosphat fotochemisch abgebaut und es lässt sich ein metallischer Silberniederschlag beobachten.

Die Zellen werden zunächst mit 5 % (w/v) Silbernitratlösung für 30 min bei RT gefärbt. Anschließend wird 2 - 3x mit vollentsalztem (VE-) Wasser gewaschen und zur Reduktion des Silbers 1 min mit 1 % Pyrogallol gefärbt. Nach erneutem Waschen (2-3x) mit VE-Wasser wird 5 min mit 5 % Natriumthiosulfat gefärbt, um die Silberfärbung zu fixieren. Die Zellen werden mit H<sub>2</sub>O gewaschen und können bei Bedarf mit Kernechtrot für 10 min gegengefärbt werden. Da hier die Zellfärbung sofort dokumentiert wird, ist kein Eindeckeln nötig.

### 3.2.9 Oil Red O-Färbung

Für den histologischen Nachweis einer adipogenen Differenzierung werden die gebildeten Fetttröpfchen auf den Zellen mittels Oil Red O angefärbt. Es handelt sich hierbei um einen fettlöslichen, rot färbenden Azofarbstoff [113].

Zur Herstellung der Färbelösung werden zunächst 300 mg vom Oil Red O-Pulver in 100 ml 99 % Isopropanol gelöst. Anschließend werden 3 Teile dieser Stammlösung mit 2 Teilen dH<sub>2</sub>O gemischt und 10 min ruhen gelassen, um eine 0,18 %ige Lösung herzustellen. Im letzten Schritt wird diese Arbeitslösung noch mit einem Faltenfilter filtriert und sollte innerhalb von 2 h aufgebraucht werden.

Für die Färbung der fixierten Zellen werden diese zunächst einmal mit H<sub>2</sub>O und einmal mit 60 % Isopropanol für 2-5 min gewaschen. Dann wird die Oil Red O-Arbeitslösung auf die Zellen gegeben und für 20 min inkubiert. Nach erfolgreicher Färbung werden die Zellen mehrmals mit Leitungswasser gewaschen, bis sich dieses nicht mehr rot verfärbt. Bis zur Dokumentation werden die Zellen mit H<sub>2</sub>O bedeckt gelagert.

### 3.2.10 Kolorimetrische Calcium- und Phosphationen-Bestimmung

Für die Bestimmung und genauere Quantifizierung der Calcium- und Phosphationen, die sich im Laufe der osteogenen Differenzierung akkumulieren und durch Biomineralisation zu Hydroxyapatit kristallisieren, werden die Zellen zunächst mit 4 % PFA in TBS 30 min bei RT fixiert. Anschließend werden sie mit 600 µl einer 1 M HCl-Lösung und mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst und bei 37 °C und 500 rpm für 48 h geschüttelt, um die Zellextrakte zu gewinnen. Die Trennung von Debris erfolgt durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 20.000 x g. Die Überstände können dann bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert werden.

Die Analyse der Calciumionen erfolgt mit einem kolorimetrischen Assay (Total Calcium LiquiColor) bei dem, anders als im Herstellerprotokoll angegeben, eine Standardreihe zur Normierung der Ergebnisse genutzt wird (Tabelle 5). Alle anderen Schritte erfolgen wie vom Hersteller vorgegeben. Zusammenfassend werden jeweils vom Standard und von den Zellextrakten in Duplikaten 2 µl in eine 96-Loch-Platte gegeben. Die Proben müssen ggf. vorher noch in ddH<sub>2</sub>O verdünnt werden. Das Working Reagent, bestehend aus gleichen Teilen Color und Base, wird 15 min vor der Verwendung angesetzt und inkubiert. Dann werden 200 µl des Working Reagents auf die Proben gegeben und mindestens 1 min inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 550 nm bestimmt. Anhand der mitgeführten Standardreihe kann nun die Konzentration der Calciumionen berechnet werden.

Die Quantifizierung der Phosphationen erfolgt ebenfalls mittels kolorimetrischem Nachweis (QuantiChrom Phosphate Assay Kit). Auch hier erfolgt der Abgleich der Ergebnisse über eine Standardreihe (Tabelle 5). Es werden jeweils 50 µl des Standards und der Proben in Duplikaten in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit 100 µl Reagent für 30 min und eine Absorptionsmessung bei 620 nm.

Die Ergebnisse beider Messungen werden in µM angegeben und der Quotient aus Calcium und Phosphat sollte idealerweise 1,65 betragen [114], da dies dem Quotienten der beiden Ionen in Hydroxyapatit in humanem Knochen entspricht.

**Tabelle 5: Eingesetzte Standardreihen für die Calcium- und Phosphatbestimmung.**

Calcium-Standardreihe ( $\mu\text{M}$ )	Phosphat-Standardreihe ( $\mu\text{M}$ )
24,95	30
19,96	25
12,48	20
7,49	15
4,99	10
2,5	5
0	0

### 3.2.11 Herstellung einer stabilen Reporterzelllinie

Die im Folgenden beschriebene Reporterzelllinie zum Nachweis von bioaktivem BMP-2 wurde bereits vor einigen Jahren mittels Transfektion der murinen C2C12-Zelllinie hergestellt [115]. Dazu wurden C2C12-Zellen sowohl mit dem BRE-Luc-Reporterplasmid [84] als auch mit einem Selektionsplasmid pAG60, welches ein G418 (Geneticin)-Resistenzgen enthält, mit DOSPER™ nach Herstellerangaben transfiziert. Die Selektion erfolgte mit 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418, wobei positive Klone gepickt und klonal expandiert wurden, um eine stabile Zelllinie zu erzeugen.

### 3.2.12 Reportergenassay zum Nachweis von bioaktivem BMP-2

Zum Nachweis und zur Quantifizierung von aktivem BMP-2 kommt der BRE-Luc-Test (BMP-Responsive-Element-Luziferase-Test) zum Einsatz (siehe 3.2.11). Hier wird unter Zuhilfenahme eines Reportergensystems aktives BMP-2 in Konzentrationen von 1  $\text{ng}/\text{ml}$  – 500  $\text{ng}/\text{ml}$  nachgewiesen [116].

Die Durchführung erfordert zunächst die Aussaat der Zelllinie in eine 24-Loch-Platte mit einer Zelldichte von 35.000 c/Well. Die Zellen werden hier ohne G418 im Medium ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen, die nach ca. 4 h abgeschlossen ist, werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 500  $\mu\text{l}/\text{Loch}$  serumfreiem Medium über Nacht weiter kultiviert. Am nächsten Tag werden sowohl die zu testenden Proben als auch eine Kalibrationsreihe verschiedener bekannter BMP-2-Konzentrationen auf die Zellen gegeben und für weitere 24 h inkubiert.



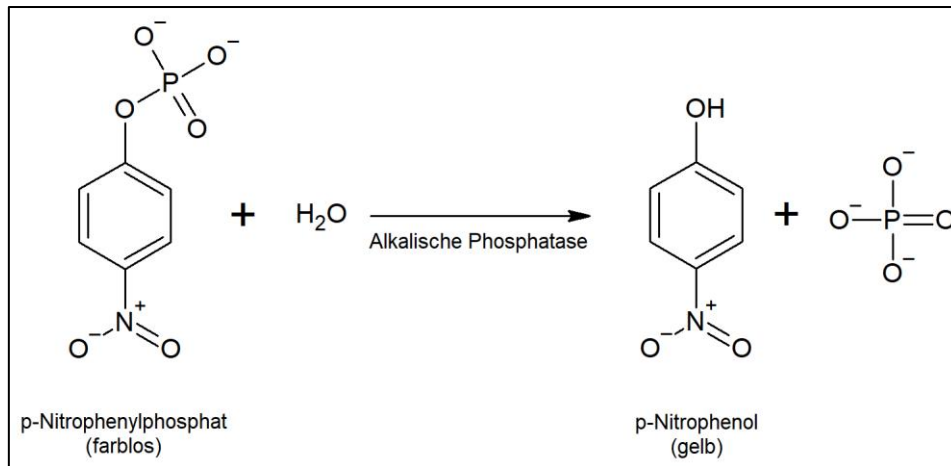
Für die Messung werden die Zellen nun gewaschen und mit 70 µl Reporter Lyse Puffer 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden die Zellen abgeschabt und 10 min bei 21.000 x g und 4 °C zentrifugiert. 7,5 µl des lysierten Überstandes werden in Dreifachbestimmung in einer weißen 96-Loch-Platte mit 25 µl SteadyGlo Luciferase Substrat versetzt, 5 min inkubiert und vermessen. Die Lumineszenz-Messung erfolgt mit einer Integrationszeit von einer Sekunde bei einer Sensitivität von 135 RLU/sec.

Als Alternative zu dem Standardprotokoll wird in dieser Arbeit auch die Messung in 96-Loch-Platten durchgeführt. Diese Methode eignet sich für Proben, deren Zytokompatibilität für die Zellen bereits zuvor untersucht wurde. Sie ist weniger zeitintensiv und bietet aufgrund der Reduktion der Arbeitsschritte ebenfalls eine geringere Abweichung zwischen den Messwerten.

Hier werden die Zellen mit einer Zelldichte von 6.500 c/Well in einer sterilen weißen 96-Loch-Platte ausgesät. Die Aussaat erfolgt, wie oben beschrieben, ebenfalls in Medium ohne Antibiotika. Auch hier werden die Zellen nach Adhärenz mit PBS gewaschen und weiter in 100 µl/Loch serumfreiem Medium ü.N. kultiviert. Es werden jeweils 100 µl/Loch vom Standard und den Proben auf die Zellen gegeben und die Messung erfolgt ebenfalls nach 24 h. Hierzu werden 100 µl SteadyGlo Luciferase Substrat (enthält sowohl den Lysepuffer, als auch das benötigte Substrat) in jedes Loch gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation werden die lysierten Zellen nochmal resuspendiert und die Lumineszenz-Messung erfolgt mit einer Integrationszeit von einer Sekunde bei einer Sensitivität von 135 RLU/sec.

#### 3.2.13 Alkalische-Phosphatase Nachweis

Das Enzym Alkalische Phosphatase (nichtgewebespezifische Isoform, ALPL) ist ein wichtiger Biomarker für osteogen differenzierte Zellen. Aber auch als Aktivitätsnachweis für BMP-2 wird seine Bestimmung häufig angewandt [117]. ALPL ist ein ubiquitäres Enzym, welches die Hydrolyse von Phosphatestern bei einem pH von 3 katalysiert. Die meistgenutzte Methode, um die Enzymaktivität nachzuweisen, ist die Umwandlung von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol, welches gelb ist und somit photometrisch detektiert werden kann (Abb. 9).



**Abb. 9: Enzymreaktion Alkalische Phosphatase.**

Für den Assay werden  $3 \times 10^4$  C2C12 Zellen oder  $1,3 \times 10^4$  MSCs pro Well einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nach Adhärenz (ca. 2 - 4 h) wird das Medium zu 100  $\mu$ l 2 % FCS-haltigem Medium gewechselt und die Zellen werden ü.N. darin inkubiert. Die zu untersuchenden Proben werden auf die Zellen gegeben und diese werden für weitere 3 oder 7 Tage inkubiert. Für die Messung der ALPL-Aktivität wird zunächst das Medium abgesaugt und mit 150  $\mu$ l PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit 110  $\mu$ l ALP-Puffer (0,1 M Glycin pH 9,6, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>) + 1 % Igepal CA-630 für 1 h bei RT lysiert. Nach der Lyse wird 5 min bei 1000 x g zentrifugiert und 100  $\mu$ l des Überstands werden in eine neue Mikrotiterplatte gegeben. Es werden 100  $\mu$ l 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat hinzugegeben und die Platte wird für 15 min bei RT inkubiert. Abschließend erfolgt eine Absorptionsbestimmung bei 405 nm.

### 3.2.14 Proteinbestimmung

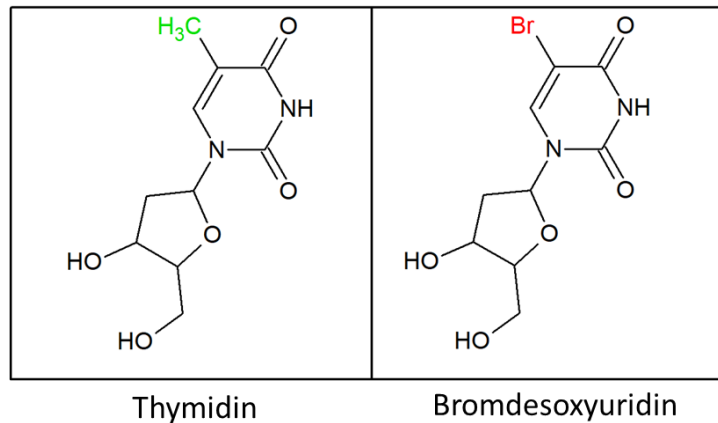
Um die Gesamtproteinmenge der Zelllysate zu bestimmen, wird die Proteinbestimmung nach Bradford angewandt. Der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 (CBBG) bildet in saurer Lösung mit kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen Komplexe. Durch diese Komplexbildung mit Proteinen wird der Farbstoff in seiner blauen, unprotonierten, anionischen Sulfonatform stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich von 420 nm auf 595 nm [118].

Als Standard wird BSA verwendet und eine Kalibrationsreihe von 0 - 250  $\mu$ g/ml im Verdünnungsmedium der Proben angesetzt.

Die zu vermessenden Proben werden jeweils 1:10 verdünnt und sowohl die Proben als auch die Kalibrationsreihe werden in Dreifachbestimmung vermessen. Es werden jeweils 10  $\mu$ l der Proben und 200  $\mu$ l des Bradford-Reagenzes in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Die Platte wird 30 min bei RT inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm bestimmt wird.

### 3.2.15 BrdU – Zellproliferationsassay

Zur Quantifizierung der Zellproliferation wird der BrdU-ELISA angewendet. Dabei wird Bromdesoxyuridin (BrdU), ein chemisches Analog des Nucleosids Thymidin, während der Zellteilung in neu synthetisierte DNA-Stränge anstelle von Thymidin inkorporiert (Abb. 10). Nach einer teilweisen Denaturierung der doppelsträngigen DNA kann das BrdU immunchemisch detektiert werden.



**Abb. 10: Chemische Strukturen der DNA-Nucleoside Thymidin und BrdU.** Strukturen adaptiert von Iball, 1966 (BrdU) [5] und Young, 1969 (Thymidin) [6].

Zur Durchführung des Assays werden zunächst Zellen, hier C2C12 BRE-Luc, mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  c/Well in 100  $\mu$ l Zellkultur-Medium in einer 96-Loch-Platte ausgesät, inklusive der nötigen Wells für die Kontrollen ohne Zellen und ohne Zugabe vom BrdU-Reagenz. Nach dem Anhaften der Zellen (2 h) werden jeweils 100  $\mu$ l vom Testreagenz (BMP-2 in verschiedenen Konzentrationen) hinzugegeben. Nach 2 h werden 20  $\mu$ l BrdU-Reagenz (1x verdünnt in Zellkultur-Medium) in die entsprechenden Wells gegeben. Die Zellen werden nun für weitere 22 h inkubiert. Die lange Inkubation mit dem BrdU-Reagenz verringert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, sie muss allerdings für jeden Zelltyp neu etabliert werden.

Anschließend werden die Zellen fixiert. Dazu wird zunächst das Medium abgenommen und anschließend 200  $\mu$ l/Well der Fixierungslösung hinzugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Die Fixierungslösung wird entfernt und die Platte wird auf einem Papiertuch vorsichtig trocken geklopft. Nach 3-maligem Waschen mit dem 1x in dH<sub>2</sub>O-verdünntem Waschpuffer werden 100  $\mu$ l/Well vom anti-BrdU-Detektions-Antikörper auf die Platte gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (3x) werden 100  $\mu$ l/Well des Peroxidase Goat anti-mouse IgG Konjugates für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird erneut dreimal mit 1x Waschpuffer und einmal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Es wird mit 100  $\mu$ l/Well TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) Substrat für 30 min bei RT

im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird mit weiteren 100  $\mu\text{l}$ /Well Stop-Lösung (1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gestoppt und die optische Dichte wird bei 450 nm mit der Referenzwellenlänge 550 nm gemessen.

### 3.2.16 Zytotoxizitätsassay MTT

In dieser Arbeit wird mit anorganischen und organischen Nanopartikeln gearbeitet, die Wachstumsfaktoren freisetzen sollen. Um die Zytotoxizität dieser Partikel zu ermitteln, wird der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-basierte „CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ von Promega verwendet [119]. Bei diesem Test wird eine gebrauchsfertige Färbelösung, die MTT enthält, zu den Zellen gegeben. Während der Inkubationszeit setzen mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen das Tetrazolium in das gelb gefärbte Formazan Produkt um (Abb. 11) [120], [121].

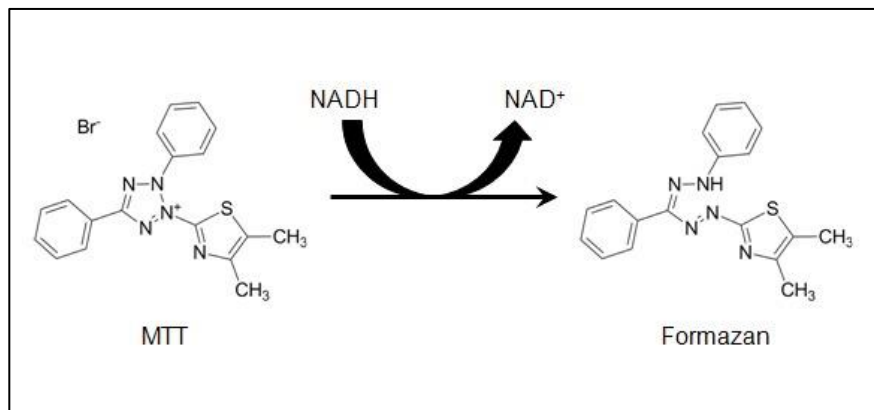


Abb. 11: Strukturformeln von MTT und farbigen Formazan.

Für den Assay werden zunächst Zellen (MSCs oder C2C12 BRE-Luc) mit einer Zelldichte von 1750 c/Well in eine 96-Loch-Platten ausgesät. Nachdem die Zellen adhärirt sind, werden die Nanopartikel in den zu testenden Konzentrationen hinzugegeben. Die Zellen werden für 24 h, 3 d und 7 d inkubiert. 4 h vor dem jeweiligen Messzeitpunkt werden 15  $\mu\text{l}$  Färbelösung zu den Zellen gegeben und diese weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden 100  $\mu\text{l}$  Solubilisierungslösung/Stop Mix zu den Zellen gegeben, um das gebildete Formazan in Lösung zu bringen und die Reaktion zu stoppen. Nach 1 h Inkubationszeit wird der Inhalt der Wells noch einmal gut gemischt und anschließend wird die Absorption bei 570 nm gemessen. Als Referenzwellenlänge werden 630 nm gewählt.

### 3.3 Molekularbiologie

#### 3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturproben

##### 3.3.1.1 RNA-Isolation mit Trizol

Um RNA zu weiteren Analysen aus Zellen zu isolieren, werden diese zunächst gewaschen und anschließend mit 600 µl (6-Loch-Platten (LP)) TriReagent lysiert. Dieses Lysat wird bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur RNA-Isolierung werden 60 µL 3-Brom-1-Chlorpropan zugegeben und über Kopf sorgfältig gemischt. Anschließend wird bei 4 °C, 15 min und 20.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 300 µl Isopropanol dazugegeben, invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die RNA durch Zentrifugation 4 °C, 30 min, 20.000 x g pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das RNA-Pellet wird mit 80 % eiskaltem Ethanol gewaschen und ein weiteres Mal für 15 min bei 4 °C und 20.000 x g zentrifugiert. Das Ethanol wird entfernt und das Pellet entweder bei RT oder 37 °C getrocknet und in 20 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Um Sekundärstrukturen aufzulösen, erfolgt ein Löseschritt für 10 min bei 60 °C. Anschließend wird die Konzentration photometrisch oder mittels NanoDrop® gemessen. Die isolierte RNA wird bei -80 °C gelagert.

##### 3.3.1.2 RNA-Isolation mit Quiagen RNeasy

Eine zweite Methode zur RNA-Isolation ist die Säulenaufreinigung mittels RNeasy Kit von Quiagen. Die Isolierung erfolgt wie vom Hersteller angegeben und wird hier kurz beschrieben. Die Zellen werden mit RLT-Puffer lysiert (600 µl für ein Loch einer 6-LP). Die Lysate werden entweder sofort weiter prozessiert oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Es wird 1 Volumen 70 % Ethanol zum Lysat gegeben, gut gemischt und bis zu 700 µl des Gemischs werden in eine RNeasy Mini Spin-Säule überführt (Schritt kann wiederholt werden) und für 15 s bei  $\geq 8000$  x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. 350 µl RW1 Puffer werden auf die RNeasy-Säule gegeben und für 15 s bei  $\geq 8000$  x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. 10 µl DNase I Stocklösung werden mit 70 µl RDD Puffer vorsichtig gemischt und für 15 min bei RT auf die Säulenmembran gegeben. Anschließend werden 350 µl RW1 Puffer dazugegeben und für 15 s bei  $\geq 8000$  x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. 500 µl RPE Puffer werden auf die Säule gegeben, es wird 15 s bei  $\geq 8000$  x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Es werden erneut 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und für 2 min bei  $\geq 8000$  x g zentrifugiert. Zur Trocknung der Membran wird die RNeasy-Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben und bei höchster

Geschwindigkeit (21.000 x g) für 1 min zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues 1,5 ml Auffanggefäß überführt und 30 µl RNase-freies Wasser werden direkt auf die Säulenmembran gegeben. Anschließend wird bei  $\geq 8000$  x g für 1 min zentrifugiert. Die Konzentration der eluierten RNA wird bestimmt und diese wird bis zur weiteren Verwendung bei  $-80$  °C gelagert.

### 3.3.2 DNase-Verdau und cDNA-Synthese

Zur Analyse bestimmter Markergene erfolgt die Transkription der mRNA in cDNA. Es werden zwischen 200 ng und 1 µg RNA verwendet, abhängig von der Ausgangskonzentration der eingesetzten RNA. Die RNA wird so mit dH<sub>2</sub>O verdünnt, dass sich ein Endvolumen von 10 µl ergibt. Für RNA, die mittels Trizol-Aufreinigung isoliert wurde (siehe 3.3.1.1), wird vor der cDNA-Synthese noch ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wird 1 µl 10x Reaction-Puffer und 1 µl DNase I dazugegeben und der DNase-Verdau erfolgt für 30 min bei 37 °C. Anschließend werden 1 µl 50 mM EDTA zur Deaktivierung der DNase und 1 µl oligo(dT)<sub>18</sub> Primer (100 µM) hinzugeben, gemischt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Im letzten Schritt werden 4 µl 5x Reaktions-Puffer, 1 µl RiboLock *RNase-Inhibitor*, 2 µl dNTPs und 1 µl RevertAid Reverse Transkriptase, eine rekombinante M-MuLV Reverse Transkriptase, zu dem Gemisch gegeben. Die Transkription erfolgt 5 min bei 25 °C, 60 min bei 42 °C. Ein abschließender Schritt für 5 min bei 70 °C stellt eine Inaktivierung des Enzyms sicher.

Für den Nachweis und die Quantifizierung der spezifischen Markergene werden entweder eine semiquantitative oder eine quantitative 'real-time' PCR (Polymerasekettenreaktion) benutzt. Beide werden im Folgenden beschrieben.

### 3.3.3 Semiquantitative Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur spezifischen Amplifizierung eines definierten DNA-Abschnittes. Als Ausgangsmaterial dient eine geringe Menge doppelsträngiger DNA (Template-DNA). Dabei amplifiziert eine verwendete thermostabile DNA-Polymerase den komplementären Strang ausgehend von zwei kurzen (20 - 40 bp) Oligonukleotiden (Primer), die spezifisch an die Template-DNA binden und dadurch den gewünschten Bereich flankieren. Diese PCR-Reaktion beginnt zunächst mit einem Denaturierungs-Schritt, bei dem die doppelsträngige DNA bei 94 °C in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen wird. Anschließend folgt die Anlagerung der spezifischen Primer an die vorliegenden Einzelstränge. Dieser Schritt, das Annealing, erfolgt bei Temperaturen zwischen 50 °C und 70 °C. Die genauen Temperaturen richten sich dabei nach den Schmelztemperaturen der eingesetzten Primer.

Die 3'-OH-Enden der Primer werden im letzten Schritt von der DNA-Polymerase bei 72 °C verlängert. Die Dauer dieses Vorgangs hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments sowie von der Prozessivität der eingesetzten Polymerase ab. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Taq-Polymerase® liegt die Elongationszeit bei 1000 bp / 60 sec.

Durch die mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte (30-35 x) wird das gewünschte Fragment exponentiell vermehrt. Folgendes Programm wird für die PCR verwendet:

94 °C 1:30 min

94 °C	0:20 min	} 30 – 35 Zyklen
T <sub>M</sub> °C	0:20 min	
72 °C	1000 bp = 1:00 min	

72 °C 15:00 min

15 °C Pause

Die Annealing-Temperatur (T<sub>M</sub>) ergibt sich aus den jeweiligen Schmelztemperaturen der Forward- und Reverse-Primer (Tabelle A12). Diese werden zunächst einzeln berechnet (T<sub>M</sub>(F); T<sub>M</sub>(R)) und anschließend gemittelt:

$$T_M(F,R) = 34 * \frac{G + C}{A + G + C + T} + 67,5 - \frac{395}{A + G + C + T} - 10 \quad (1)$$

$$T_M = \frac{T_M(F) + T_M(R)}{2} \quad (2)$$

Dabei stehen A, C, G und T für die Basen der DNA Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Die tatsächlich angewandten Annealingtemperaturen können geringfügig von den berechneten Werten abweichen.

Trotz des Einsatzes der gleichen Menge RNA für die cDNA-Synthese kann die erhaltene cDNA-Menge zwischen den Proben variieren. Aus diesem Grund wird zunächst ein Abgleich mit einem Housekeeping-Gen wie Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthin-Guanin-

Phosphoribosyltransferase (HPRT) oder Aktin  $\beta$  durchgeführt. Diese Gene werden konstitutiv exprimiert und sind nicht vom Zellzyklus, Differenzierung oder anderen metabolischen Veränderungen betroffen. Anhand dieser Gene wird die Menge der eingesetzten cDNA für den Markergenvergleich angeglichen. Diese ist in der Regel 10-mal höher als die eingesetzte Menge cDNA für den Housekeeping-Gen-Abgleich, da die Markergene meist in geringerer Menge exprimiert werden.

Das Pipettierschema für diesen Abgleich sieht wie folgt aus:

10,5 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
4,0 $\mu$ l	5x-GoTaq-Polymerase-Puffer
2,0 $\mu$ l	25 mM MgCl <sub>2</sub>
0,4 $\mu$ l	dNTP (10 mM)
1 $\mu$ l	Forward Primer
1 $\mu$ l	Reverse Primer
0,1 $\mu$ l	GoTaq-Polymerase
1 $\mu$ l	cDNA (1:100 oder 1:1000 verdünnt)

### 3.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden abhängig von ihrer Größe auf ein 1 % oder 2 % Agarose-Gel aufgetragen. Um die DNA sichtbar zu machen, wird ein Farbstoff mit in das Gel gegeben, der bei Bindung an DNA grüne Fluoreszenz emittiert (Serva DNA Stain Clear G, 4  $\mu$ l in 100 ml Agarose). Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wird ein Marker (100 bp oder 1 kb) mitgeführt. Das Agarose-Gel wird bei einer Spannung von 120 V ca. 30 min laufen gelassen und die Bandendokumentation erfolgt dann mittels UV-Illuminator bei 530 nm. Zur semiquantitativen Auswertung der Bandenintensitäten kann die Software ImageJ verwendet werden.

### 3.3.5 Semiquantitative Auswertung von DNA-Bandenintensitäten mittels ImageJ

Zunächst wird die Datei mit dem Gelbild geöffnet und das Bild wird mittels „Edit – invert“ invertiert, was zu einer Umwandlung in ein 8 bit-Bild führt. Als Nächstes wird mittels der Rechteck-Funktion die erste Bande ausgewählt, dabei muss darauf geachtet werden, dass dieses weder so groß ist, dass

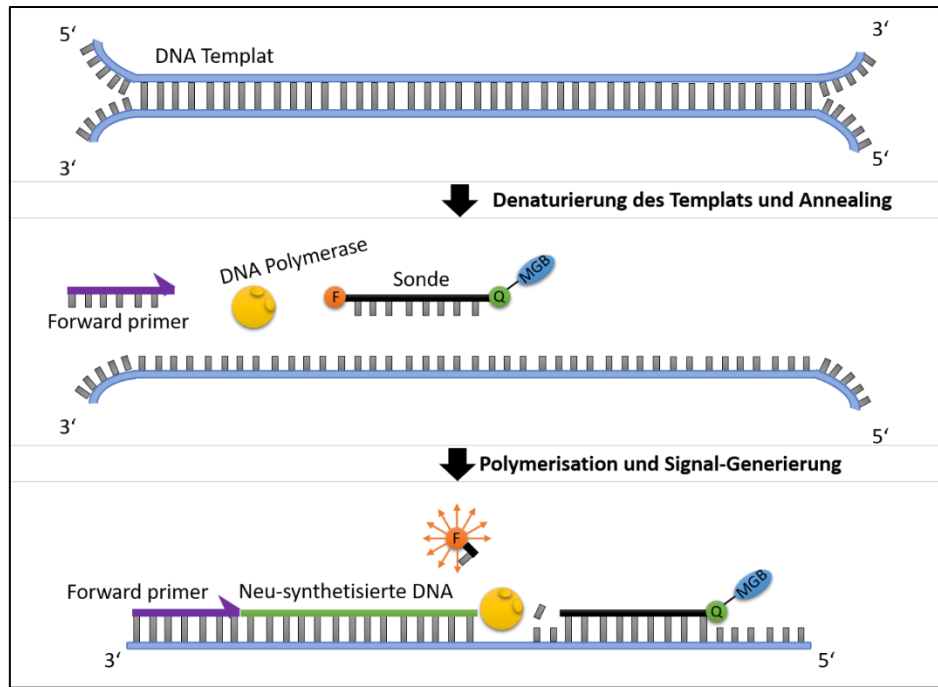


weitere Banden hineinragen, noch so klein, dass nicht die komplette Bande erfasst werden kann. Durch Drücken der „1“ oder Auswählen des „Select First Lane“-Befehls wird diese Bande als erste ausgewählt. Jede weitere Bande wird durch Verschieben des ersten Rechtecks auf die nächste Bande und durch anschließendes Drücken der „2“ oder Auswählen des Befehls „Select Next Lane“ ausgewählt. Wenn alle gewünschten Banden ausgewählt wurden, „3“ oder den Befehl „Plot Lanes“ verwenden. Es öffnet sich ein Fenster, in dem alle Densitogramme der ausgewählten Banden untereinander angezeigt werden. Aus diesen Kurven wird jeweils das Integral berechnet, welches bei höheren Bandenintensitäten größer ist und so zur semiquantitativen Bestimmung genutzt werden soll.

#### 3.3.6 Quantitative Real-Time-PCR

Bei der quantitativen real-time PCR kann die Menge eines spezifischen Gens quantitativ ermittelt werden. Das Grundprinzip basiert auf der konventionellen PCR, jedoch wird hier in jedem durchlaufenen Zyklus ein Fluoreszenzfarbstoff in die amplifizierte DNA eingebaut, der quantitativ gemessen werden kann. So kann in Echtzeit die Amplifikation des jeweiligen DNA-Fragments verfolgt werden.

Zunächst wird die doppelsträngige cDNA denaturiert. Während dieses Schrittes wird das Signal des Fluoreszenzfarbstoffes am 5'-Ende der AppliedBiosystems™ TaqMan™-Sonde durch den MGB (*minor groove binder*)-nichtfluoreszierenden Quencher am 3'-Ende der Sonde unterdrückt. Im nächsten Schritt erfolgt das Annealing der Primer und der Sonde an die spezifischen Ziel-Sequenzen. Die Taq-Polymerase beginnt einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Bei Erreichen der TaqMan-Sonde spaltet die endogene 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase diese und trennt so den Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher (Abb. 12). So werden in jedem Zyklus mehr Farbstoff-Moleküle freigesetzt und die Fluoreszenzintensität ist somit proportional zum synthetisierten Genprodukt.



**Abb. 12: Mechanismus der Taqman-Sonden während qRT-PCR.** Modifiziert nach [122].

Die Amplifikation des Zielgens kann somit in einer Kurve dargestellt werden, die ein exponentielles Wachstum aufweist. Mittels eines relativ gewählten Schwellenwerts, der für alle analysierten Gene gleich ist, kann die Zykluszahl ermittelt werden, an dem dieser für die jeweilige Probe erreicht ist. Dieser Wert wird als  $C_t$ -Wert bezeichnet und ist umgekehrt proportional zur vorhandenen Genmenge. Bei der Verwendung von Taqman-Assays wird dieser Wert zusätzlich noch durch einen Referenzfarbstoff (ROX™) normalisiert [122].

Für die Berechnung der relativen Genexpressionsunterschiede wird die  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode angewandt. Die Herleitung der Formel wird im Folgenden erläutert:

Die grundlegende Gleichung zur exponentiellen Amplifikation einer PCR lautet:

$$X_n = X_0 * (1 - E_x)^n \quad (3)$$

Dabei ist  $X_n$  die Anzahl der Zielmoleküle der Genamplifikation nach einer bestimmten Zykluszahl  $n$ .  $X_0$  ist hierbei die initiale Zahl der Zielmoleküle und  $E_x$  bezeichnet die Effizienz der Zielgenamplifikation. Eine Effizienz von 1 würde bedeuten, dass alle Moleküle mit jedem Zyklus verdoppelt werden. Diese Annahme kann als wahr angesehen werden, wenn das Amplikon nicht größer als 150 bp ist und die  $Mg^{2+}$ -Konzentration im Reaktionsansatz optimiert ist. Dies ist bei der Verwendung von Taqman-Assays der Fall. Dabei ergibt sich folgende Formel:

$$\frac{X_N(\text{Kontrolle})}{X_N(\text{Behandlung})} = (1 + E)^{-\Delta\Delta C_t} \quad (4)$$

Die Kontrolle ist hier die unbehandelte, experimentelle Kontrolle. Dabei ist

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{Behandlung}) - \Delta C_t(\text{Kontrolle}) \quad (5)$$

und

$$\Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{Referenzgen}) \quad (6)$$

Beim Referenzgen handelt es sich um das Housekeeping-Gen, welches schon bei der semiquantitativen PCR erläutert wurde (3.3.3). So ergibt sich als sogenannter *fold change*, die relative Genexpression, in Bezug zur unbehandelten Kontrolle die in dieser Arbeit angewandte Formel:

$$\text{Fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (7)$$

### 3.3.7 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA aus Plasmiden oder transkribierter RNA wird zunächst eine PCR mit dem entsprechenden Sequenzierprimer in folgendem Ansatz durchgeführt:

6  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

4  $\mu\text{l}$  5x Puffer

2  $\mu\text{l}$  Ready Mix v1.1

4  $\mu\text{l}$  Primer 0,8  $\mu\text{M}$

4  $\mu\text{l}$  DNA 0,2 g/l

Die PCR wird mit folgendem Programm durchgeführt:

96 °C	00:30 min	} 25 Zyklen
50 °C	00:15 min	
60 °C	04:00 min	

---

15 °C    Pause

Nach der PCR werden die Sequenzierproben mittels der Centri Pure MINI Desalt Z-50 Säule aufgereinigt. Dazu wird die Säule 15 min bei RT äquilibriert und dann kurz gevortext, um Luftblasen zu entfernen. Die Säule wird mit Auffanggefäß bei 1000 x g für 2 min zentrifugiert und der Durchfluss wird verworfen. 400 µl dH<sub>2</sub>O werden auf die Säule gegeben und erneut bei 1000 x g 2 min zentrifugiert. Das Auffanggefäß und dessen Inhalt werden verworfen. Die PCR-Probe wird auf die Säule gegeben und es wird mit dem Sammelgefäß bei 1000 x g 2 min zentrifugiert. 5 µl des aufgereinigten PCR-Produkts werden mit 25 µl dH<sub>2</sub>O versetzt und im Insitut für Mikrobiologie der Medizinischen Hochschule Hannover sequenziert.

### **3.4 Biomaterialien**

#### **3.4.1 Herstellung von nanoporösen Silica-Nanopartikeln**

In dieser Arbeit werden organische und anorganische Nanopartikel verwendet. Bei den anorganischen Nanopartikeln handelt es sich um nanoporöse Silica-Nanopartikel (NPSNP). Diese wurden von ALEXANDRA SATALOV und KAREN BESECKE (Institut für Anorganische Chemie, Leibniz Universität Hannover) zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Partikel werden zunächst Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) (3,16 g, 8,67 mmol) und Diethanolamin (DEA) (0,23 g, 2,19 mmol) in 75 ml hochreinem Wasser und 13,4 ml Ethanol abs. gelöst und für 30 min bei 40 °C gerührt. Anschließend wird tröpfchenweise TEOS (Tetraethylorthosilicat) (8,56 ml, 36,63 mmol) zur tensidischen Lösung hinzugegeben. Diese Lösung wird 2 h gerührt, um ein weißes Präzipitat zu generieren. Die Lösung wird zentrifugiert, mehrere Male mit hochreinem Wasser und Ethanol abs. gewaschen und ü.N. bei 60 °C getrocknet. Um das organische Material zu entfernen, wird das getrocknete Produkt bei 550 °C für 5 h und einer Heizrate von 1 K/min kalziniert [123].

Um funktionelle Gruppen an die Oberfläche der NPSNP anzubringen, wird eine adaptierte Post-Grafting-Technik angewandt [124]. Dazu werden die kalzinierten NPSNP (500 mg) zunächst in 20 ml Toluol dispergiert. Dann werden (3-Aminopropyl)trimethoxysilane (125 µl, 0,53 mmol) und 1,8-Diazabicyclo [5.4.0]undec-7-ene (DBU) (75 µl, 0,50 mmol) hinzugefügt, um Aminopropylsilyl-modifizierte NPSNP (Si-NH<sub>2</sub>) zu synthetisieren. Die Suspension wird anschließend auf 80 °C erhitzt und für 2 h gerührt. Die entstandene Partikellösung wird zentrifugiert und mit hochreinem Wasser und Ethanol abs. gewaschen und ü.N. bei 60 °C getrocknet.

Zur Herstellung der Propyl-NH-hexyl-NH<sub>2</sub>-modifizierten NPSNP (Si-AHAP) wird das gleiche Protokoll durchgeführt, wobei hier N-(6-aminohexyl)aminopropyltrimethoxysilan (191 µl, 0,7 mmol) und DBU (75 µl, 0,50 mmol) zu den kalzinierten NPSNP (500 mg) gegeben wird [125].

#### 3.4.2 Herstellung von Chitosan/Tripolyphosphat bzw. Alginat/Poly-L-Lysin-Nanopartikeln

Die in dieser Arbeit eingesetzten organischen Nanopartikel werden von STEFFEN SYDOW (Institut für Technische Chemie, Technische Universität Braunschweig) hergestellt. Zur Herstellung der Chitosan/Tripolyphosphat (TPP) Partikel wird 1 mg/ml gereinigtes Chitosan in 0,1 % (v/v) Essigsäure gelöst. Es wird jeweils Chitosan mit einem Deacetylierungsgrad von 58 % (CS58) oder 83 % (CS83) verwendet. Das TPP wird in Millipore Wasser mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Nach dem Lösungsprozess wird das TPP zügig mit der Chitosan-Lösung im Verhältnis 1:3 gemischt. Dieser Prozess resultiert in definierte Nanopartikel, deren Partikelgrößen und Zeta-Potential direkt nach der Synthese analysiert werden [107].

Des Weiteren werden Alginat/Poly-L-Lysin Partikel hergestellt. Dazu werden ebenfalls eine 1 mg/ml Alginat-Lösung und eine 1 mg/ml Poly-L-Lysin-Lösung in Millipore Wasser hergestellt. Die beiden Lösungen werden ebenfalls gemischt, allerdings im Verhältnis 1:4 [126].

### 3.5 Datenanalyse und Statistik

Zur Auswertung wurde GraphPad Prism 7 verwendet. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt und wie folgt angegeben:

ns oder keine Angabe	P > 0,05
*	P ≤ 0,05
**	P ≤ 0,01
***	P ≤ 0,001
****	P ≤ 0,0001

Lichtmikroskopische und fluorezenzmikroskopische Bilder wurden mit BioVoxel ImageJ oder CellSense Standard 1.16 (Olympus) bearbeitet.

## **4 Ergebnisse**

Der Fokus dieser Arbeit liegt sowohl auf der Freisetzung und Aktivität von BMP-2 aus Nanopartikeln, die im späteren Verlauf auf die PCL-Fasermatten aufgebracht werden sollen, als auch auf der Bestimmung der optimalen Menge von BMP-2, um eine osteogene Differenzierung einzuleiten. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse dieser Arbeit in zwei Abschnitte aufgeteilt. Abschnitt 4.1 beschäftigt sich mit der osteogenen Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen inklusive der Untersuchungen zu osteogenem Potential und Einfluss verschiedener Differenzierungszutaten und deren Konzentration. Im Abschnitt 4.2 dieser Arbeit wird BMP-2 als bioaktives, implantatgebundenes Protein betrachtet. Insbesondere werden hier der Bioaktivitätsnachweis wie auch die Freisetzung des Proteins aus organischen und anorganischen Nanopartikeln beleuchtet.

### **4.1 Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung**

Im Rahmen der Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung wurden zunächst geeignete MSC-Spender identifiziert und anschließend die optimale Zusammensetzung von Differenzierungszutaten ermittelt. Diese Untersuchungen waren notwendig, da sich im frühen Verlauf der Arbeiten und aus Publikationen zeigte, dass nicht alle Spender von MSC über ein ausreichendes osteogenes Potential verfügen [9], [127], [128]. Erst nach dem Auffinden von geeigneten Spendern konnten weitere Parameter wie die geeignete Zusammensetzung und Konzentration der verschiedenen eingesetzten Differenzierungsreagenzien ermittelt werden. Zusätzlich wurden so Erkenntnisse über die *in-vitro*-Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen ermittelt.

#### **4.1.1 Osteogenes Potential von mesenchymalen Stammzellen aus verschiedenen Spendern**

In den dieser Dissertation vorangegangenen experimentellen Arbeiten hatten sich wiederholt Unstimmigkeiten bei der Differenzierung von primären mesenchymalen Stammzellen in die osteogene Richtung gezeigt. Da dies insbesondere für die Untersuchung der Aktivität von Wachstumsfaktoren und der Freisetzung von Nanopartikeln essenziell ist, wurde zunächst das osteogene Potential der Stammzellen von unterschiedlichen Spendern betrachtet.

Um das Ausmaß und die Reproduzierbarkeit der osteogenen Differenzierung von MSC unterschiedlicher Spender zu untersuchen, wurden 17 Spender im Hinblick auf ihr osteogenes Potential untersucht. Dies wurde in drei Etappen durchgeführt: In den ersten beiden wurde nach

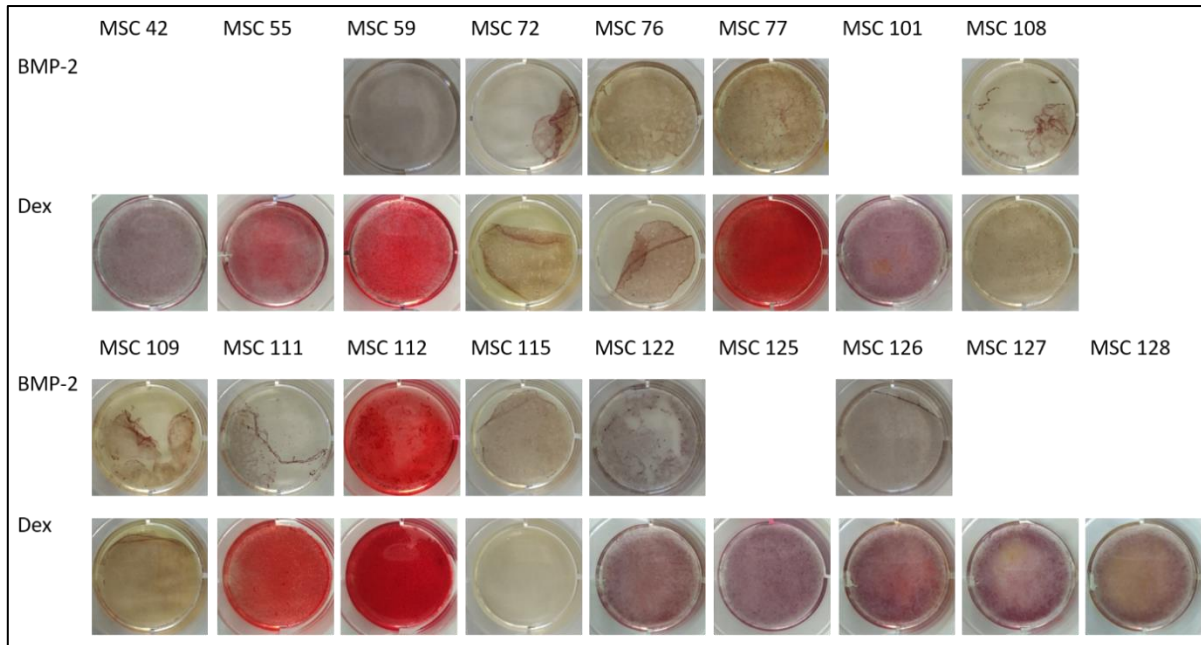
positiven Ergebnissen gescreent und in der dritten wurde eine Reproduktion dieser Ergebnisse angestrebt. Im Folgenden werden die Ergebnisse aller drei Versuche gebündelt dargestellt.

Die Zellen der untersuchten Spender wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und für 21 Tage unter Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Ascorbat-2-Phosphat und 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat sowie alternativ 100 nM Dexamethason oder 200 ng/ml BMP-2 differenziert. Damit wurden, wie in der Einleitung (1.1.3) erwähnt, die in der Literatur am meisten etablierten Differenzierungszutaten gewählt [57]–[60]. In folgenden Experimenten wurde anstelle von Dexamethason die Zugabe von 200 ng/ml BMP-2 (rekombinant human aus *E.coli*) untersucht. Da dieser Wachstumsfaktor im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Schlüsselrolle spielt und bereits als osteoinduktiver Wachstumsfaktor bekannt ist [76], war es essenziell, Spender zu identifizieren, die ein hohes osteogenes Potential nach Induktion mit BMP-2 aufweisen.

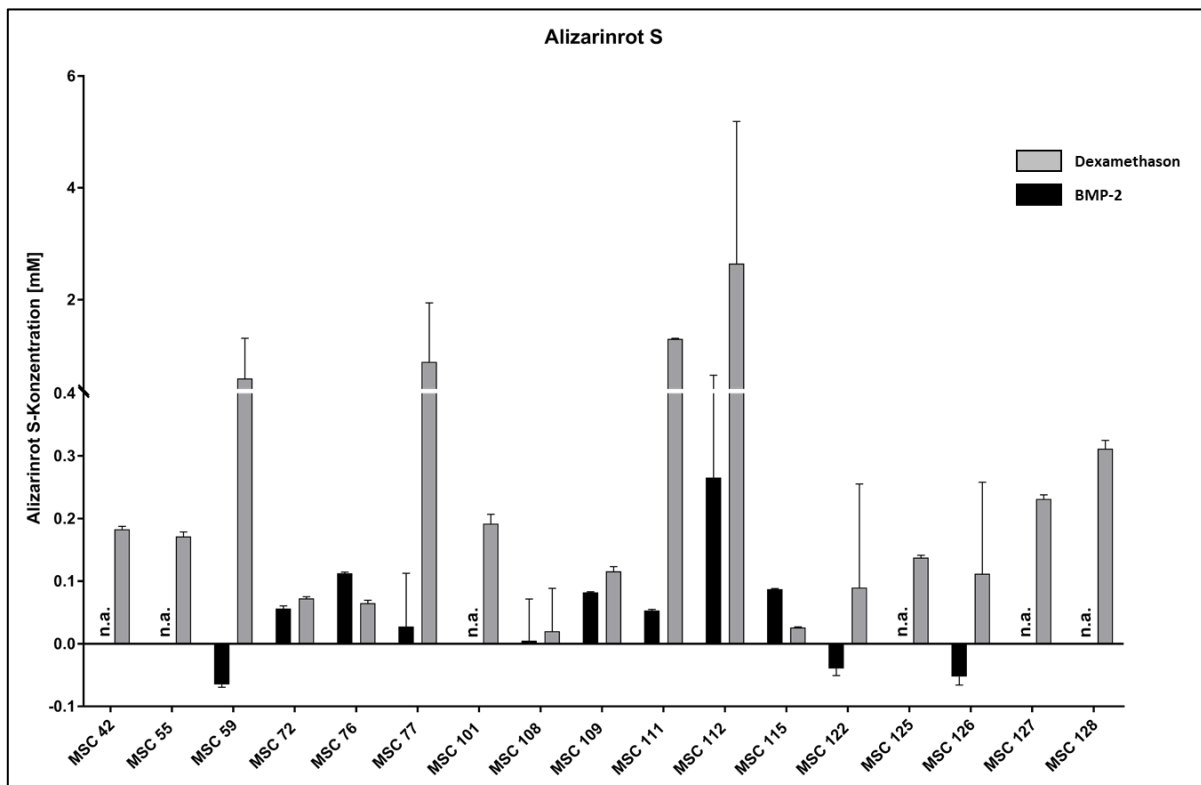
Die Zellen wurden nach 21 Tagen fixiert und mittels Alizarinrot S und von Kossa-Färbung gefärbt, um Calcium- bzw. Phosphat-Ionen nachzuweisen (Abb. 13). Dabei fiel auf, dass die fixierten Zellen sich trotz vorsichtiger Behandlung teilweise ablösten (MSC 72 BMP-2, MSC 76 Dex, MSC 111 BMP-2). Aus diesem Grund konnte hier nicht genau festgestellt werden, ob die Färbung tatsächlich negativ war oder sich die Zellstruktur durch das Ablösen nur so verändert hatte, dass keine positive Färbung mehr möglich war.

Außerdem ist deutlich erkennbar, dass in den Differenzierungsansätzen mit Dexamethason mehr calciumhaltige Ablagerungen mittels der Alizarinrot S-Färbung nachzuweisen waren als mit BMP-2 im Differenzierungsmedium (MSC 55, MSC 59, MSC 77, MSC 111, MSC 112). BMP-2 wirkte nur bei Patient 112 eine positive Alizarinrot S-Färbung. Bei einigen anderen Spendern (MSC 101, MSC 122, MSC 125, MSC 126, MSC 127) konnte eine sehr schwache Färbung nachgewiesen werden.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 13: Alizarinrot S-Färbung von differenzierten MSCs verschiedener Spender.** Dargestellt sind die 17 getesteten MSC-Spender und die Alizarinrot S-Färbung nach 21 Tagen Differenzierung mit Dexamethason oder BMP-2. Die fehlenden Konditionen wurden nicht untersucht.

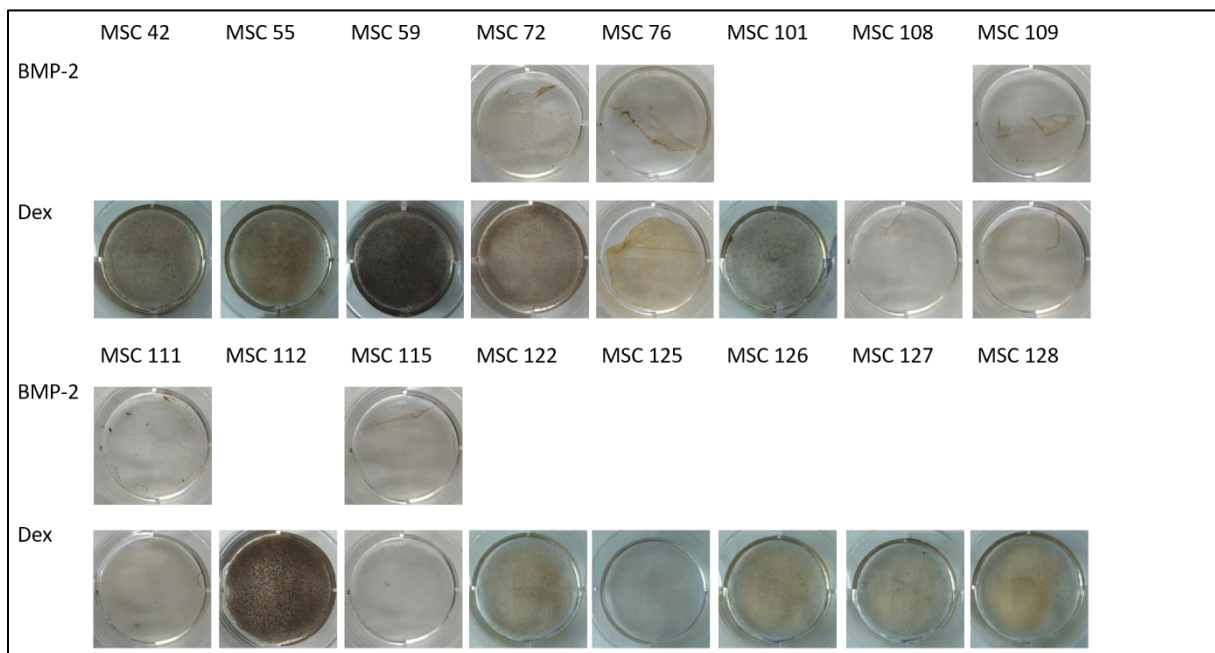


**Abb. 14: Quantitative Messung der Alizarinrot S-Färbung.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (n=3). n.a. = nicht auswertbar.



Zusätzlich zur optischen Beurteilung der Alizarinrot S-Färbung wurde die Färbung mittels einer Absorptionsbestimmung quantifiziert (Abb. 14). Hier bestätigt sich der optische Eindruck, dass die Intensität der Färbung bei den Differenzierungsansätzen mit Dexamethason stärker ausfällt. Insbesondere die Spender MSC 59, MSC 77, MSC 111 und MSC 112 weisen hier sehr starke Calcium-Ablagerungen von bis zu 2 mM auf.

Als zweite kolorimetrische Methode wurde die von-Kossa-Färbung durchgeführt. Diese ist ebenfalls eine Methode, Calciumphosphat-Ablagerungen auf den differenzierten Zellen nachzuweisen, die, ähnlich Hydroxyapatit, während der Knochenzellendifferenzierung angereichert werden. Hierbei reagiert das Reagenz mit dem Phosphat-Rest der Calciumphosphat-Verbindung und bietet somit eine ergänzende Methode des Nachweises der erfolgreichen osteogenen Differenzierung. Hier wurden ebenfalls alle Zell-Spender untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 15: von-Kossa-Färbung der MSCs von ausgewählten Spendern zur Untersuchung des osteogenen Potentials.** Dargestellt sind die 17 getesteten MSC-Spender und die von Kossa-Färbung nach 21 Tagen Differenzierung mit Dexamethason oder BMP-2. Die fehlenden Konditionen wurden nicht untersucht.

Die Differenzierung mit Dexamethason insbesondere bei den Spendern MSC 59 und MSC 112 weist eine starke Silberfärbung auf. Da nicht alle Zellen für die Differenzierung mit BMP-2 zur Verfügung standen, ist die Aussagekraft eingeschränkt; allerdings zeigt keiner der getesteten Spender ein positives Signal in der von-Kossa-Färbung.

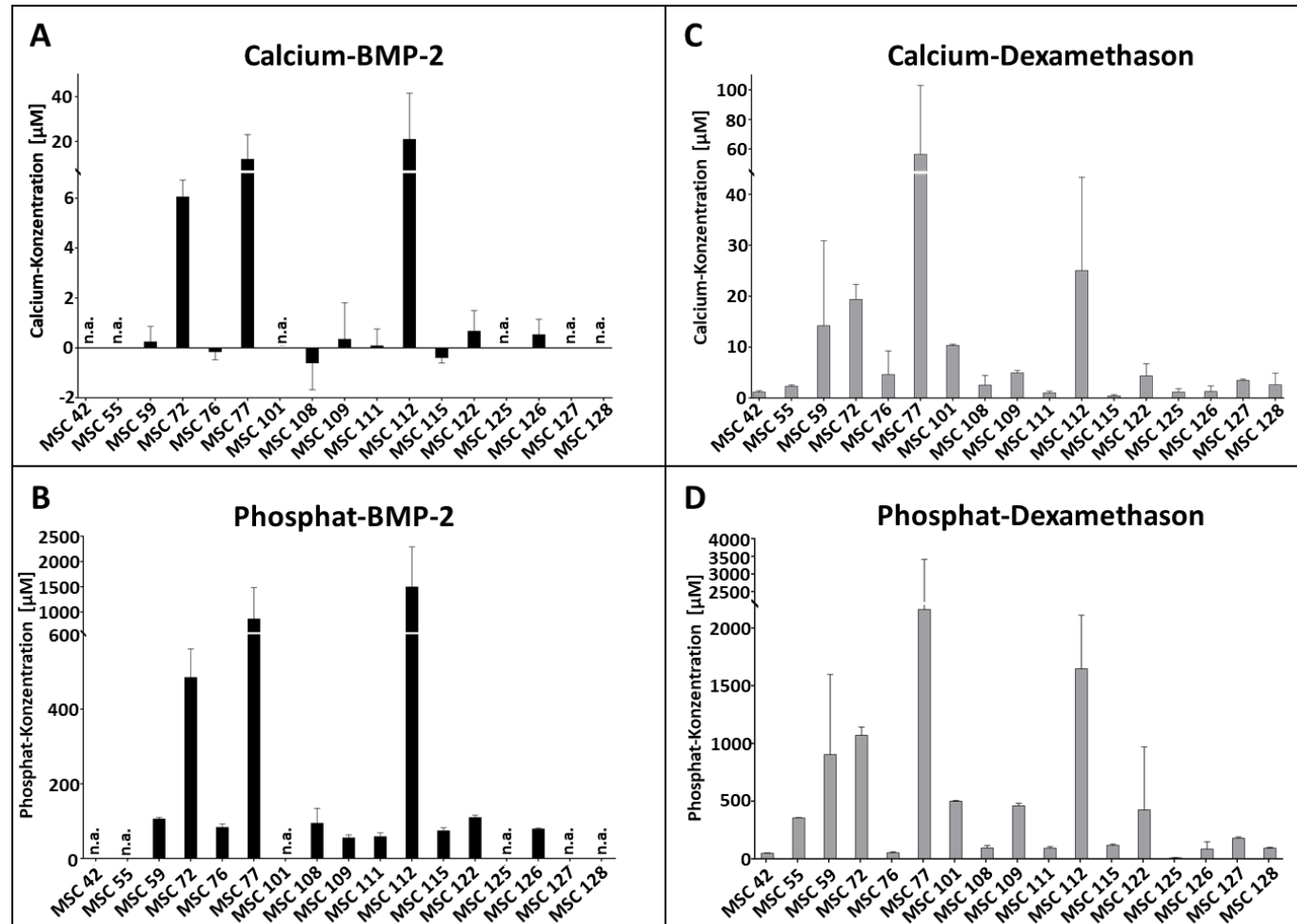
Als weiterer unabhängiger Calcium- und Phosphatnachweis wurden die Extrakte der fixierten Zellen nach osteogener Differenzierungskultur kolorimetrisch vermessen. Dieser Schritt wurde durchgeführt, da sich während der vorherigen Färbemethoden Unstimmigkeiten zeigten (z. B. MSC 125 mit Dexamethason positiv für Alizarinrot S, aber negativ bei von-Kossa-Färbung) und diese nicht immer reproduzierbar für alle Spender durchgeführt werden konnten. Ein kolorimetrischer Nachweis eignet sich daher als zweite Methode, die Kalzifizierung der fortschreitend differenzierenden Zellen zu untersuchen. Hierbei ist die genauere Quantifizierung und somit ebenfalls die Ermittlung des Verhältnisses zwischen Calcium und Phosphat und der anschließende Vergleich zum natürlich vorkommenden Hydroxyapatit möglich.

Die Ergebnisse dieser Bestimmungsmethode sind in Abb. 16 gezeigt.

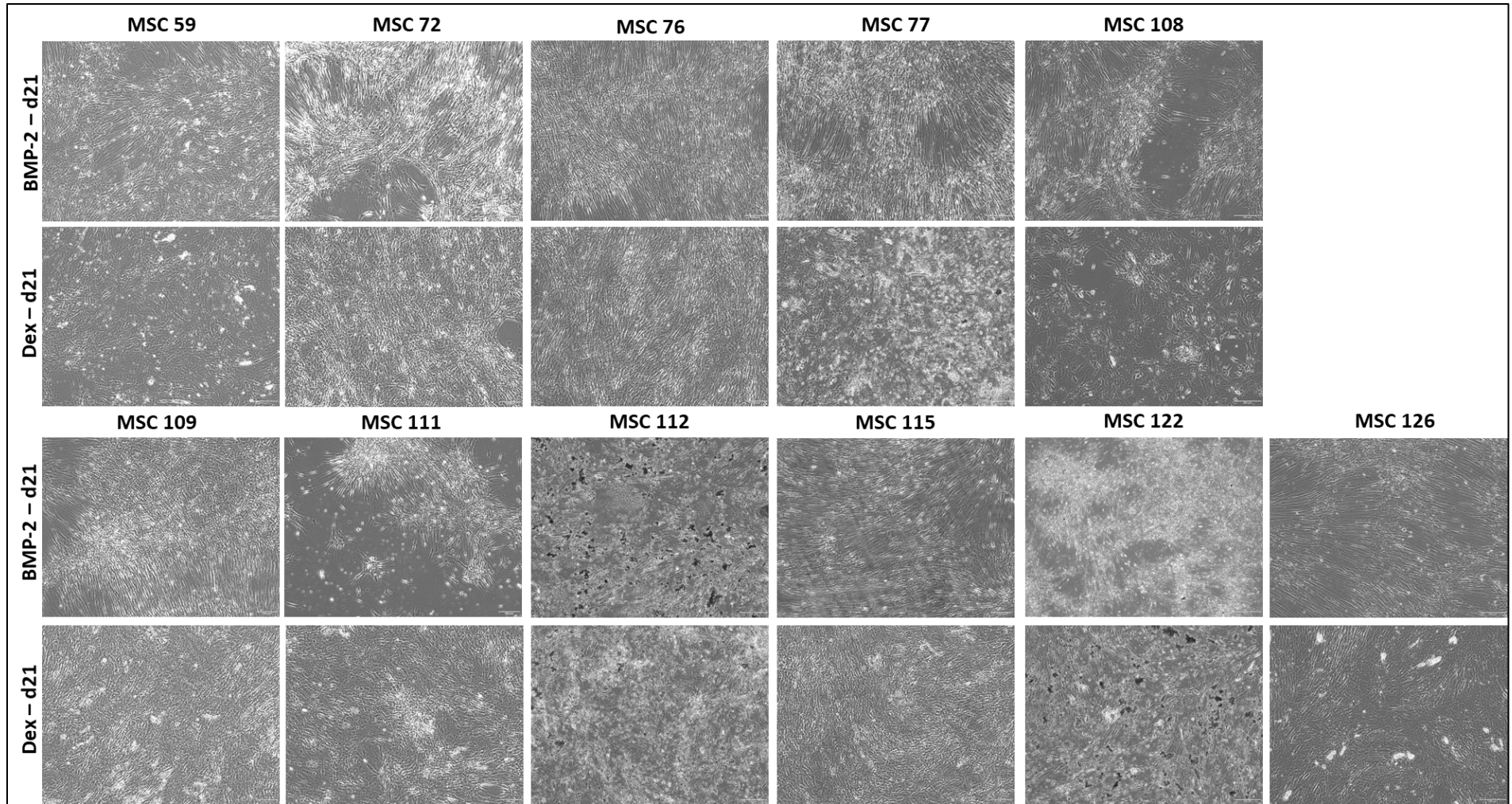
Die Ergebnisse zeigen, dass sich sowohl mehr Calcium als auch mehr Phosphat während der Differenzierung mit Dexamethason in den Zellen anreichern. Hier sind besonders die Spender MSC 59, MSC 72, MSC 77 und MSC 112 diejenigen, welche die größte Menge an Calciumphosphat produzieren. Trotz der geringeren Calciumphosphat-Produktion sind die Unterschiede bei der Differenzierung mit BMP-2 ausgeprägter. Hier zeichnen sich ebenfalls die Spender MSC 72, MSC 77 und MSC 112 als positiv ab.

Zusätzlich wurden die Zellen jede Woche mikroskopiert und morphologisch dokumentiert (Abb. 17). Diese Dokumentation bestätigte die teilweise schon makroskopisch sichtbaren stellenweise abgelösten Zellen. Es entstanden einige Löcher im Zellrasen, die dann von neuen Zellen ausgefüllt wurden, die sich langgestreckter ausbreiteten. Außerdem zeigten sich Bläschen auf den Zellen, bei denen es sich evtl. um Fettbläschen handeln könnte. Um dieser Vermutung weiter nachzugehen, wurde zusätzlich mit einigen differenzierten Zellen eine Oil Red O-Färbung (ORO-Färbung) durchgeführt (Abb. 18).

Hier zeigt sich bei allen untersuchten Spendern nach der Differenzierung mit Dexamethason ein vermehrtes Auftreten von Fettbläschen, die durch die Färbung rot eingefärbt sind.

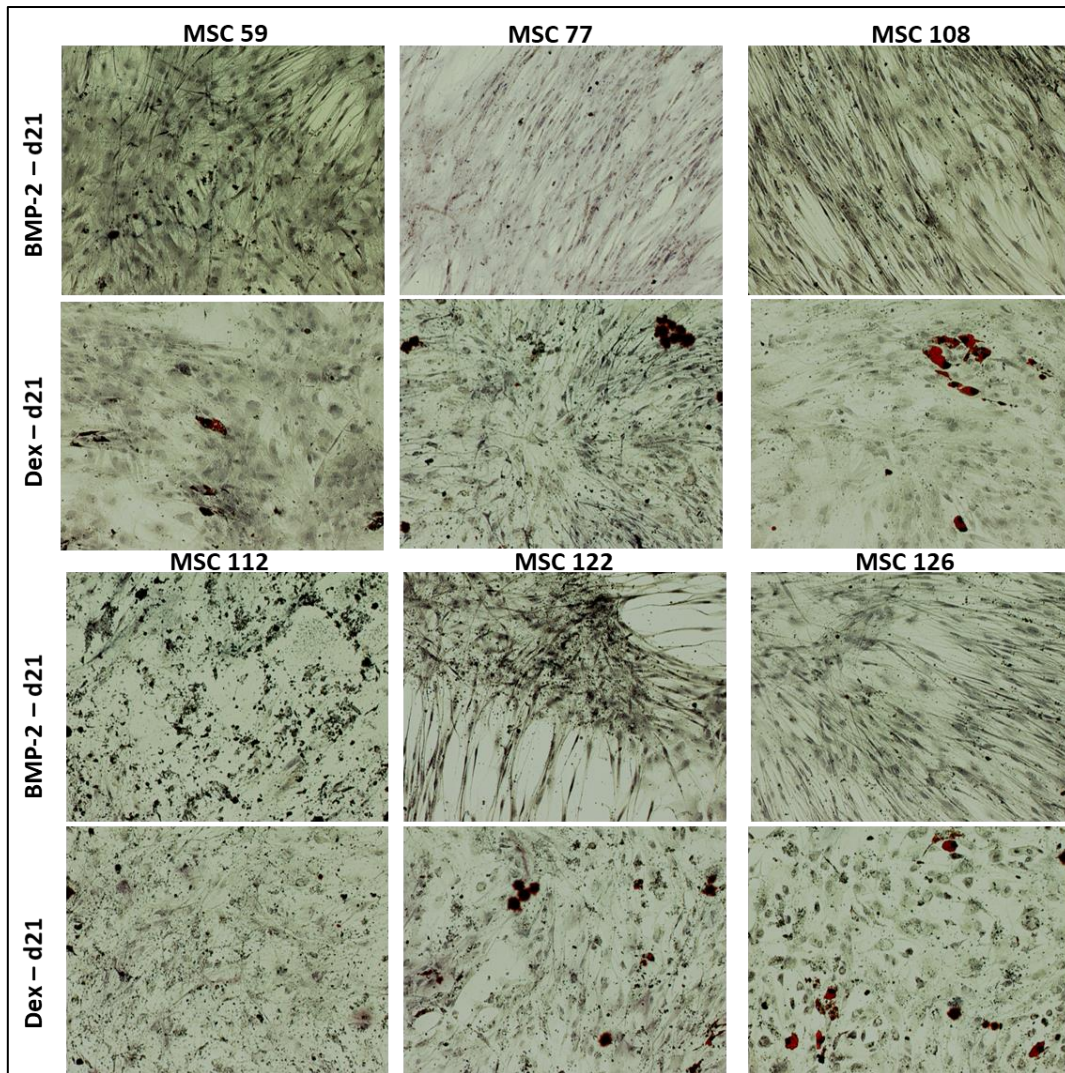


**Abb. 16:** Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte der fixierten, putativ differenzierten Zellen zur Bestimmung des osteogenen Potentials. Gezeigt sind die Ergebnisse nach der 28-tägigen Differenzierung der MSC aus 17 verschiedenen Spendern, jeweils mit BMP-2 (Calciumbestimmung in  $\mu\text{M}$  (A), Phosphatbestimmung in  $\mu\text{M}$  (B)) und mit Dexamethason (Calciumbestimmung in  $\mu\text{M}$  (C), Phosphatbestimmung in  $\mu\text{M}$  (D)). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $n=3$ ), n.a.= nicht auswertbar.



**Abb. 17: Morphologische Untersuchung der differenzierten MSCs von unterschiedlichen Spendern zur Untersuchung des osteogenen Potentials.** Hier sind die Ergebnisse der MSC der 17 Donoren nach 21 Tagen der Differenzierung in der mikroskopischen Betrachtung dargestellt.





**Abb. 18: Oil Red O-Färbung von ausgewählten Spendern zur Untersuchung des osteogenen Potentials.** Bei den Zellen der Spender, die bereits durch mikroskopische Betrachtung scheinbare Fettbläschen auf dem Zellrasen zeigten, wurde eine Oil Red O-Färbung durchgeführt. Die Ergebnisse sind hier nach 21 Tagen Differenzierung und in 10facher Vergrößerung gezeigt.

#### 4.1.2 Einfluss von Differenzierungsinduktoren

Zur Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in osteogene Vorläuferzellen werden induzierende Faktoren benötigt. Diese beinhalten eine Phosphatquelle, eine Vitamin C-Quelle zur Aktivierung der Kollagen-Fibrillenbildung und einen Signalinduktor zu Aktivierung der osteogenen Signalwege. Der Einfluss dieser verschiedenen Induktionszutaten wird im nächsten Abschnitt näher beleuchtet.

##### 4.1.2.1 Einfluss unterschiedlicher Phosphatquellen

In einer früheren Arbeit [61] wurde der Einfluss der Phosphatquelle während der osteogenen Differenzierung untersucht. Dabei wurde bisher nicht die Überprüfung in Kombination mit BMP-2 als

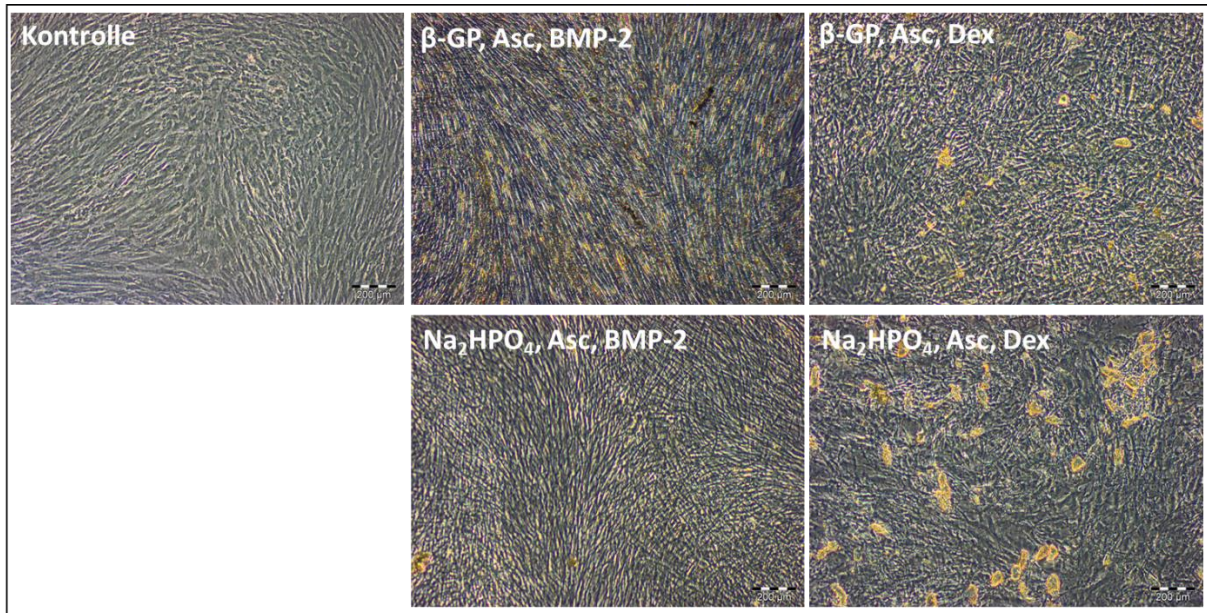
Signal-Induktor überprüft. Daher wurden hier verschiedene Kombinationen von Induktionszutaten untersucht (Abb. 19). Es wurde zum einen erneut der variierende Einfluss von Dexamethason und BMP-2 als Signalinduktoren zur osteogenen Differenzierung betrachtet. Außerdem wurde eine anorganische (3 mM Natriumdihydroxyphosphat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) mit einer organischen Phosphatquelle (10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat,  $\beta$ -GP) verglichen, um die beste Kombination an Induktionszutaten für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung von MSC zu ermitteln.

<b>A: Kontrolle</b> Medium ohne Zusätze	
<p><b>B: Osteogenes Medium</b> <b><math>\beta</math>-GP, ASC, BMP-2</b> + 10mM <math>\beta</math>-Glycerolphosphat (<math>\beta</math>-GP) + 50<math>\mu</math>M Ascorbat-2 Phosphat (ASC) + 200ng/ml BMP-2</p>	<p><b>D: Osteogenes Medium</b> <b><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>, ASC, Dex</b> + 3mM Natriumdihydroxyphosphat (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>) + 50<math>\mu</math>M Ascorbat-2 Phosphat (ASC) + 100nM Dexamethason (Dex)</p>
<p><b>C: Osteogenes Medium</b> <b><math>\beta</math>-GP, ASC, Dex</b> + 10mM <math>\beta</math>-Glycerolphosphat (<math>\beta</math>-GP) + 50<math>\mu</math>M Ascorbat-2 Phosphat (ASC) + 100nM Dexamethason (Dex)</p>	<p><b>E: Osteogenes Medium</b> <b><math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>, ASC, BMP-2</b> + 3mM Natriumdihydroxyphosphat (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>) + 50<math>\mu</math>M Ascorbat-2 Phosphat (ASC) + 200ng/ml BMP-2</p>

**Abb. 19: Übersicht der in verschiedenen Kombinationen eingesetzten Differenzierungszutaten.**

Es wurden MSC von vier verschiedenen Spendern mit den vier verschiedenen Kombinationen der Induktionszutaten sowie einer Kontrolle ohne Induktionszutaten für 28 Tage kultiviert. Dabei wurden sowohl RNA-Proben zur Ermittlung der Genexpression nach Tag 7, 14, 21 und 28 genommen als auch die morphologischen Unterschiede mittels Durchlichtmikroskopie festgehalten. Exemplarisch werden hier die Ergebnisse mit der Zellpräparation MSC 61 nach Tag 28 (Abb. 20) dargestellt. Alle weiteren Abbildungen befinden sich im Anhang (Abb. A55, Abb. A56, Abb. A57, Abb. A58).





**Abb. 20: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 28 (MSC 61).** Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Bilder nach einer Differenzierung mit den verschiedenen, in den Bildern beschrifteten, Differenzierungszutaten nach 28 Tagen.

Abb. 20 zeigt den Fortschritt der osteogenen Differenzierung nach 28 Tagen. Es ist deutlich zu erkennen, dass alle Konditionen dicht gewachsene Zellschichten aufweisen, wobei die Zelldichte bei der Kontrolle am wenigsten komprimiert erscheint.

Außerdem sind bei allen untersuchten Bedingungen mehr oder weniger stark ausgeprägte gelbliche Ablagerungen zu erkennen. Diese sind am prominentesten bei der Kombination  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Asc}/\text{Dex}$  vorzufinden, gefolgt von  $\beta\text{-GP}/\text{Asc}/\text{Dex}$  und  $\beta\text{-GP}/\text{Asc}/\text{BMP-2}$ . Nahezu keine Ablagerungen finden sich bei der Differenzierung mit  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{Asc}/\text{BMP-2}$ .

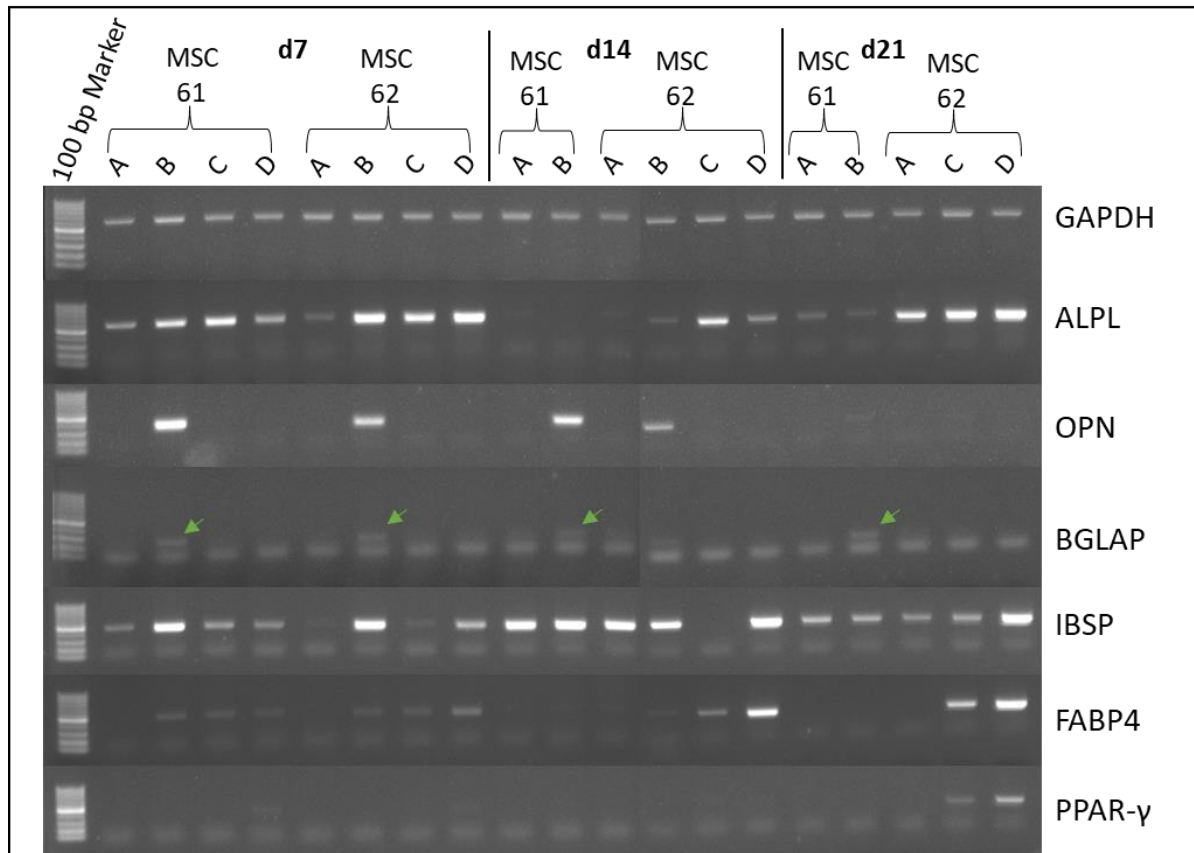
Im folgenden Schritt wurden Genexpressionsanalysen von für die osteogene Differenzierung wichtigen Genen durchgeführt. Diese wurden im ersten Schritt semiquantitativ (Abb. 21) und in einem erneuten Versuchsdurchlauf mittels qRT-PCR (Abb. 22) durchgeführt.

Abb. 21 zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR. Dabei wurden neben den für die osteogene Differenzierung bekannten Markergenen ALPL, OPN, BGLAP und IBSP betrachtet.

Zusätzlich wurden die Markergene der adipogenen Differenzierung FABP4 und PPAR- $\gamma$  untersucht, da eine BMP-2-abhängige Adipogenese beschrieben ist [129].

Der GAPDH-Abgleich zeigt die vergleichbare Expression des Housekeeping-Gens und ermöglicht so eine zuverlässige Interpretation der folgenden Genexpressionsergebnisse.

Die Ergebnisse einiger fehlender Konditionen (MSC 61: d14+d21 C+D, MSC 62: d21 D) sind durch das vorzeitige Ablösen des Zellrasens vor dem geplanten Versuchsende begründet.



**Abb. 21: Markerexpressionsbestimmung durch semiquantitative RT-PCR.** Dargestellt sind die Ergebnisse nach 7, 14 und 21 Tagen Differenzierung mit den verschiedenen Kombinationen der Differenzierungszutaten (A: Kontrolle; B:  $\beta$ -GP, Asc, BMP-2; C:  $\beta$ -GP, Asc, Dex; D:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Asc, Dex; E:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Asc, BMP-2). Zur besseren Sichtbarkeit wurde die Zielbande von BGLAP mit grünen Pfeilen markiert. Abbildung zusammengesetzt aus den Aufnahmen von zwei gleichzeitig durchgeführten Agarose-Gelelektrophoresen.

Bei der Genexpression von ALPL findet eine nahezu kontinuierliche Genexpression über alle Zeitpunkte und alle Konditionen statt, einschließlich der Kontrollkondition A. OPN wird hauptsächlich mit der Kondition B zu Tag 7 und Tag 14 exprimiert. Auch BGLAP (mit grünen Pfeilen markiert) wird, wenn auch nur schwach, nur bei Kondition B exprimiert, dies aber über alle Zeitpunkte hinweg. IBSP wird als frühes Markergen bei Kondition B an Tag 7 exprimiert, mit fortschreitender Zeit der Differenzierung wird allerdings IBSP auch in der Kontrollgruppe exprimiert.

Die Markergene für die adipogene Differenzierung FABP4 und PPAR- $\gamma$  werden vom Spender MSC 62 an Tag 14 und 21 bei den Konditionen C und D exprimiert.



Um die Validität der erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen, wurde das Experiment mit drei verschiedenen MSC-Spendern (MSC 59, MSC 61, MSC 115) und den vier unterschiedlich zusammengesetzten Differenzierungsmedien wiederholt. Zur besseren Quantifizierung wurde die Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR durchgeführt (Abb. 22).

Für diesen Versuchsaufbau wurden die Markergene der jeweiligen Differenzierungen einzeln analysiert und anschließend die Ergebnisse der drei MSC-Präparationen gemittelt.

Die Analyse der Genexpression zeigt eine 50-fache Erhöhung der ALPL-Expression bei der Induktionskombination Dex/ $\beta$ -GP/Asc über den Verlauf bis Tag 21, wobei an Tag 21 die Genexpression bei allen Konditionen um den Faktor 50 im Vergleich zur Kontrolle erhöht ist.

BGLAP wird hauptsächlich bei den Konditionen mit BMP-2 exprimiert und die Genexpression steigt über den Verlauf der Differenzierung zu den verschiedenen Messzeitpunkten bis Tag 21 immer weiter an.

Bereits ab Tag 7 bis zu Tag 21 wird IBSP mit BMP-2 im Differenzierungsmedium nach oben reguliert. Auch OPN weist eine 100-fach erhöhte Genexpression bei der Kombination aus BMP-2 und  $\beta$ -GP im Vergleich zur Kontrolle und den anderen untersuchten Konditionen auf.

Ebenso wie ALPL weisen auch BGLAP, IBSP und OPN an Tag 21 mit allen Differenzierungskonditionen eine sehr stark erhöhte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle auf.

Als weiteres Mittel zur Untersuchung einer erfolgreich verlaufenen osteogenen Differenzierung wurde der Hydroxyapatitgehalt in Form einer kolorimetrischen Calcium- und Phosphatbestimmung an Tag 28 der Differenzierung ermittelt (Abb. 23).

Sowohl der Calcium- als auch der Phosphatgehalt der Matrix der differenzierten Spender ist bei Zugabe von  $\beta$ -Glycerophosphat deutlich erhöht im Vergleich zur Kontrolle und den Konditionen mit der anorganischen Phosphatquelle. Aber auch die Zugabe von  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  führt zu einer signifikanten Erhöhung der Calcium- und Phosphatkonzentration im Vergleich zur Kontrolle.

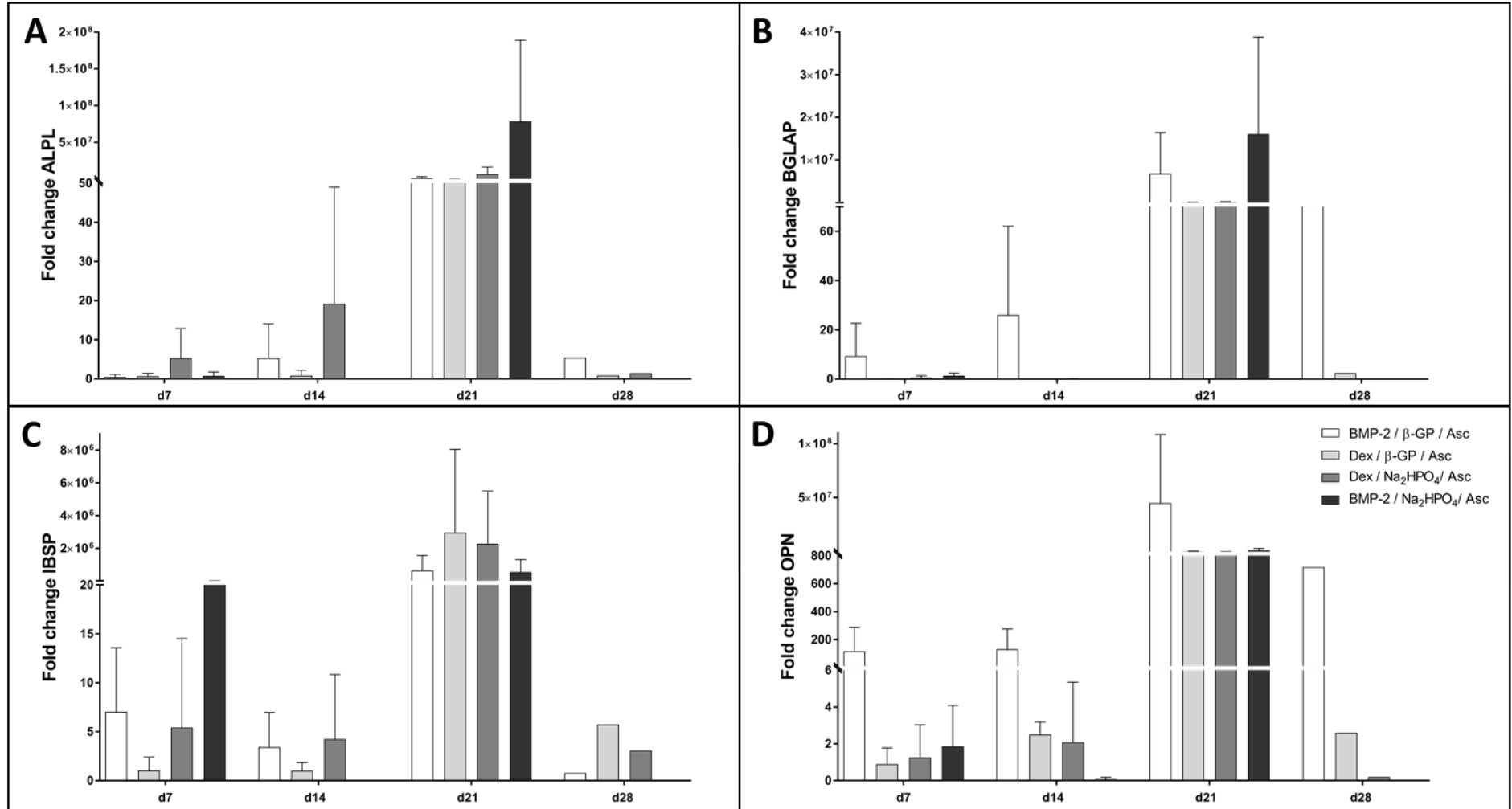
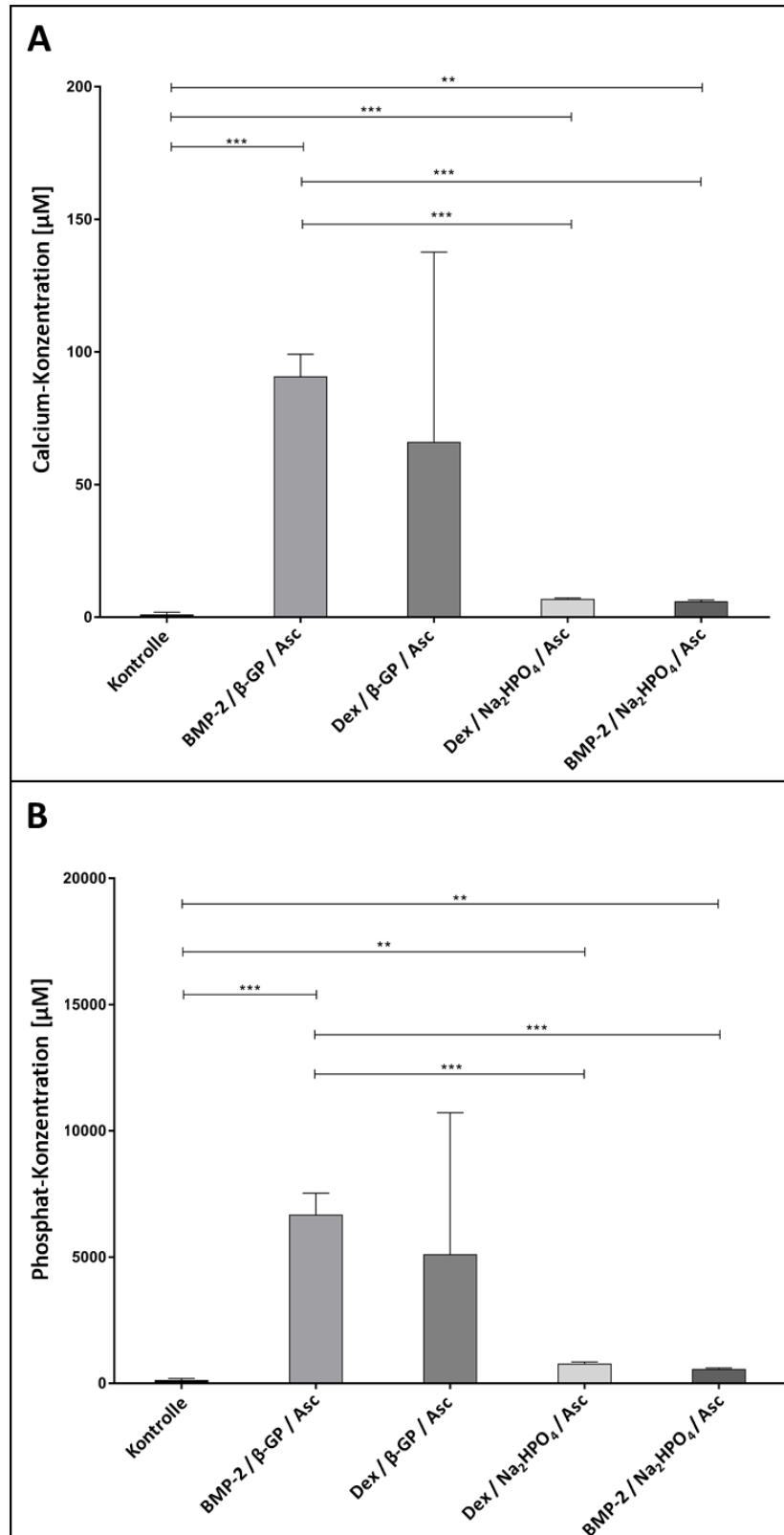


Abb. 22: Ergebnisse der qRT-PCR Genexpressionsanalyse nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Differenzierung mit unterschiedlich zusammengesetzten Differenzierungsmedien. Genexpressionsveränderungen im Vergleich zur Kontrolle ohne Differenzierungszutaten für die osteogenen Markergene ALPL (A), BGLAP (B), IBSP (C) und OPN (D). Dargestellt sind die

Ergebnisse von 3 Differenzierungsversuchen (MSC 59, MSC 61 und MSC 115) als Mittelwert mit Standardabweichung. Die Daten wurden auf die jeweilige Expression des Housekeeping-Gens bezogen.



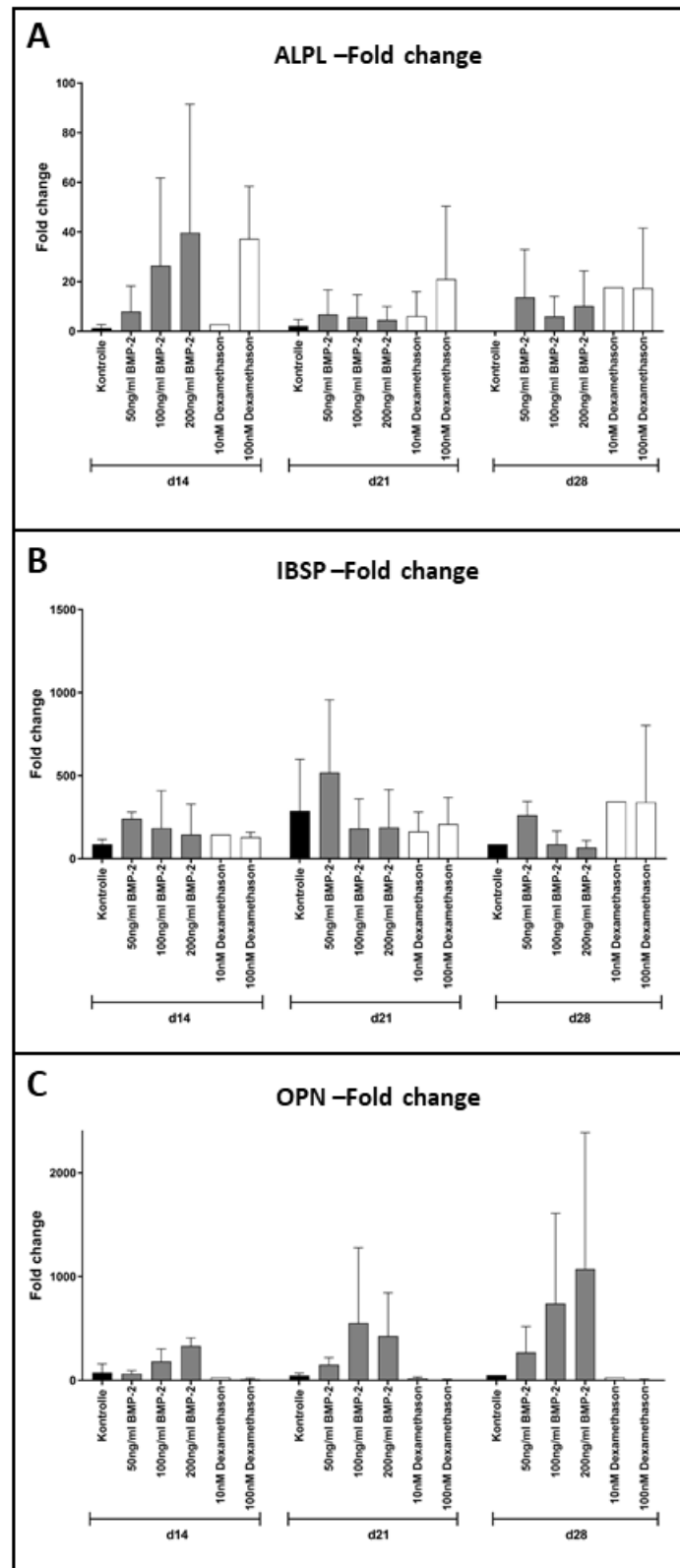
**Abb. 23: Calcium- und Phosphatbestimmung der osteogenen Differenzierungen mit unterschiedlichen Induktionszutaten.**

(A) zeigt die Ergebnisse der kolorimetrischen Calcium-Bestimmung, in (B) sind die Ergebnisse der Phosphat-Bestimmung dargestellt. Gezeigt sind die gemittelten Ergebnisse von 3 Differenzierungsversuchen (Ergebnisse für MSC 59, MSC 61 und MSC 115 gemittelt) an Tag 28 der Differenzierung mit den jeweiligen Standardabweichungen.

#### 4.1.2.2 Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Konzentrationen der Induktionszutaten BMP-2 und Dexamethason

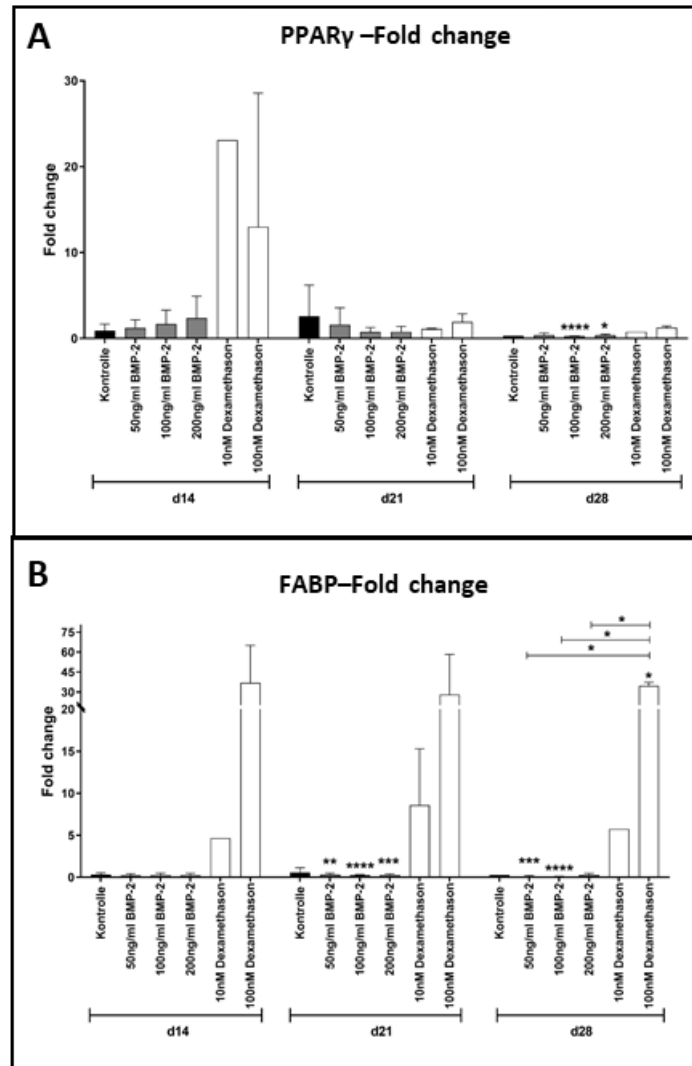
Im Rahmen der Forschergruppe sind die genaue Ermittlung der Konzentration und der Zugabezeitpunkt von BMP-2 für eine zuverlässige osteogene Differenzierung besonders relevant. Trotz der Tatsache, dass in der Literatur häufig 200 ng/ml BMP-2 verwendet werden, kann auch eine geringere Konzentration zur Induktion der Osteogenese ausreichen, außerdem kann eine zu hohe Konzentration von BMP-2 *in vivo* zu Ödemen, ektopischer Knochenformung und Nervenwurzelirritationen führen [130]–[132]. Um diese Effekte zu untersuchen, wurden verschiedene BMP-2-Konzentrationen (50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml) mit verschiedenen Konzentrationen Dexamethason (10 nM und 100 nM) verglichen. Hierbei zeigte sich, dass eine Zugabe von 200 ng/ml BMP-2 zum Differenzierungsmedium die höchste Genexpression im Vergleich zu den Kontrollen der osteogenen Markergene ALPL, IBSP und OPN hervorruft, die dann mit sinkender BMP-2-Konzentration sukzessive abnimmt (Abb. 24). Dexamethason zeigt beim Einsatz einer 100 nM-Lösung eine um den Faktor 40 erhöhte Expression von ALPL. Außerdem ist die Expression der adipogenen Markergene FABP und PPAR $\gamma$  um das 12-fache bzw. das 30-fache erhöht (Abb. 25).

#### 4. Ergebnisse



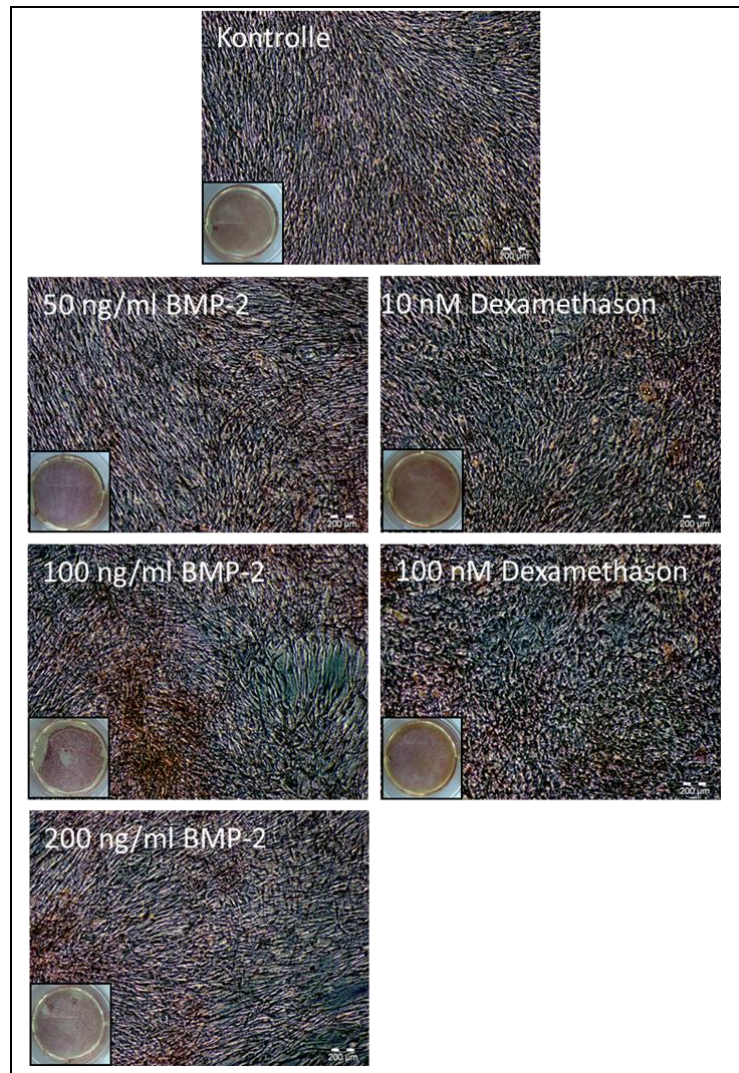
**Abb. 24: Expression der osteogenen Markergene während des Konzentrationsvergleichs von BMP-2 und Dexamethason.** Gezeigt ist jeweils die Genexpression von ALPL (A), IBSP (B) und OPN (C) nach Tag 14, 21 und 28 der osteogenen Differenzierung. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 Spendern (MSC 77, MSC 111, MSC 112) als Mittelwert mit Standardabweichung.

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 25: Expression der adipogenen Markergene während des Konzentrationsvergleichs von BMP-2 und Dexamethason.** Gezeigt ist jeweils die Genexpression von PPAR $\gamma$  (A) und FABP (B) nach Tag 14, 21 und 28 der osteogenen Differenzierung. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 Spendern (MSC 77, MSC 111, MSC 112) als Mittelwert mit Standardabweichung.

Auch in diesem Versuch wurde die Calcium- und Phosphatkonzentration der unterschiedlichen Konditionen sowohl mittels Alizarinrot S (Abb. 26) als auch mittels des kolorimetrischen Nachweisverfahrens für Calcium und Phosphat (Abb. 27) ermittelt.



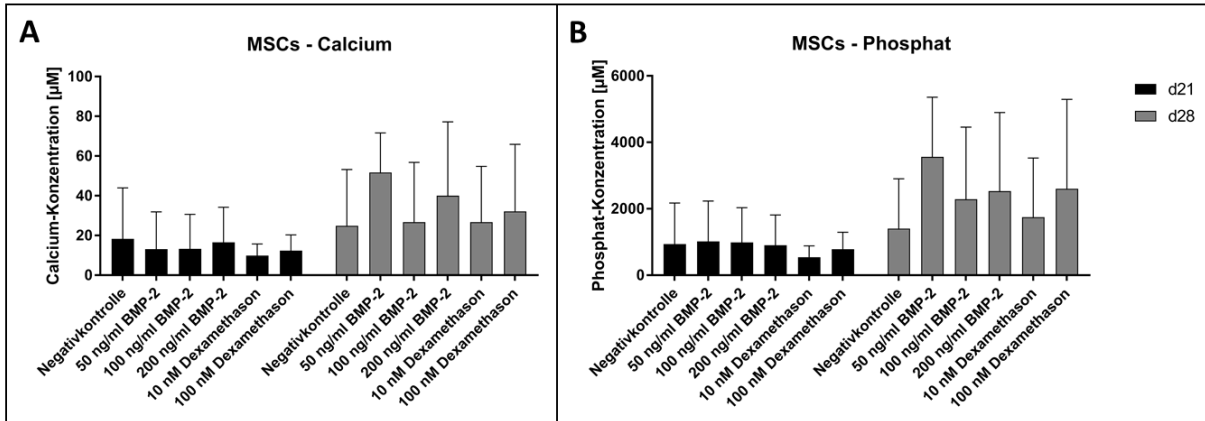
**Abb. 26: Alizarinrot S-Färbung des Konzentrationsvergleichs zwischen BMP-2 und Dexamethason.** Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen der Alizarinrot S-Färbung sowie die makroskopische Betrachtung der kompletten Wells.

Makroskopisch zeigt die Färbung mit Alizarinrot S keine signifikanten Unterschiede beim Einsatz der unterschiedlich konzentrierten Induktoren für die Osteogenese oder zur Kontrolle (Abb. 26). Die mikroskopische Betrachtung der eingefärbten Zellschicht zeigt einige dunklere Areale beim Einsatz von 100 ng/ml und 200 ng/ml BMP-2 sowie 10 nM Dexamethason.

Auch die Analyse des Calcium- und Phosphatgehalts der verschiedenen Proben lässt keine eindeutige Aussage zu. Außer der Tatsache, dass sich der Calcium- und Phosphatgehalt mit von Tag 22 zu Tag 28 fortschreitender Osteogenese bei nahezu allen Proben verdoppelt hat, kann aufgrund der hohen Standardabweichung der verschiedenen Versuchsbedingungen keine weitere Aussage getroffen werden.



## 4. Ergebnisse



**Abb. 27: Calcium- und Phosphatbestimmung des Konzentrationsvergleichs zwischen BMP-2 und Dexamethason.** Gezeigt ist jeweils die Bestimmung des Calciumgehalts in den Zellextrakten (A) bei den Differenzierungen mit verschiedenen Mengen BMP-2 und Dexamethason sowie die entsprechende Grafik zur Darstellung des Phosphatgehalts (B).

## 4.2 BMP-2 als Teil eines Implantats – Freisetzung, Lagerung & Aktivität

### 4.2.1 BMP-2 Aktivitätsnachweis

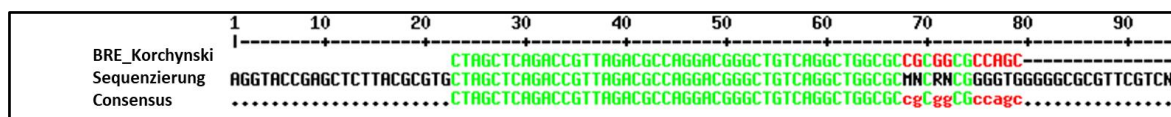
Um die Bioaktivität von BMP-2 nachzuweisen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Es kann eine Differenzierung durchgeführt werden, um Zellen in die osteogene Linie zu differenzieren. Da diese Methode allerdings sehr zeitintensiv und, wie vorher in dieser Arbeit gezeigt (4.1.1), nicht immer erfolversprechend ist, werden hier zwei andere Methoden angewandt.

Alkalische Phosphatase gilt als eines der Zielgene von BMP-2 und ein entsprechender Enzymnachweis wird in der Literatur häufig zum Bioaktivitätsnachweis eingesetzt [133]–[135].

Als weiterer Bioaktivitätsnachweis wird in dieser Arbeit der sogenannte BRE-Luc-Assay (BMP-Responsive-Element-Luziferase-Assay) verwendet, der ebenfalls häufig in der Literatur genutzt wird und als Hauptnachweisverfahren in dieser Arbeit dient. Für beide Nachweismethoden sind unterschiedliche Inkubationszeiten und Nachweisgrenzen bekannt, die hier noch einmal für die eigene Anwendung evaluiert und bestätigt werden.

#### 4.2.1.1 BRE-Luc- Plasmidnachweis in der C2C12-Zelllinie und Sequenzierung des Plasmids

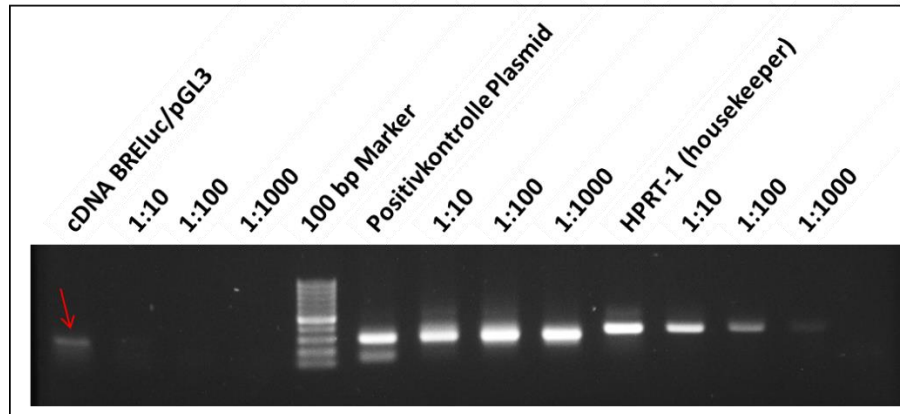
Das verwendete Plasmid, welches das BMP-Responsive-Element enthält, wurde zuvor von Korchynskyi *et al.* [84] beschrieben. Da die Zelllinie, welche dieses Plasmid überexprimiert, längere Zeit nicht mehr verwendet wurde, wurde das beschriebene Konstrukt aus dem genannten Paper mit dem vorhandenen Plasmid in der verwendeten Zelllinie verglichen (Abb. 28). Hierbei zeigt sich, dass etwas mehr als die Hälfte der publizierten Sequenz mit derjenigen im vorliegenden Plasmid identisch ist.



**Abb. 28: Sequenzvergleich Plasmid pGL3/BRE-Luc und publizierte Sequenz (Korchynskyi *et al.*).** Dargestellt ist die von Korchynskyi *et al.* publizierte Sequenz des Reporterplasmids (obere Zeile), die aus den Reporterzellen isolierte Plasmidsequenz (mit plasmidspezifischen Primern ermittelt, mittlere Zeile) und der Vergleich beider Sequenzen (untere Zeile). Die übereinstimmenden Basen sind in grün dargestellt und abweichende in rot.

Um die Expressionsstärke des Plasmids in den putativen Reporterzellen nachzuweisen, wurde eine PCR mit der isolierten RNA, die in cDNA umgeschrieben wurde, durchgeführt (Abb. 29). Die Expression des Plasmids ist nur sehr gering und nur in der unverdünnten Variante nachweisbar. Sowohl die Positivkontrolle, die aus dem reinen Plasmid besteht, als auch das Housekeeping-Gen

HPRT-1 sind bereits bei einer 1:1000 Verdünnung auf dem gelelektrophoretischen Foto nachweisbar. Nachdem der Nachweis des Plasmids in den C2C12-Zellen erfolgt war, wurde der Reportergentest im Folgenden für die Arbeiten in der Forschergruppe etabliert und optimiert.

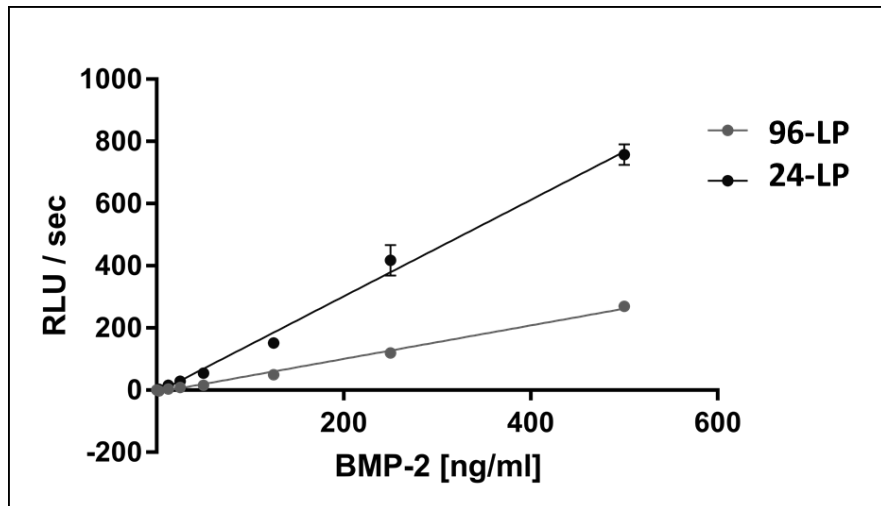


**Abb. 29: Gelelektrophorese der cDNA aus den putativen Reporterzellen.** Nach der RNA-Isolation wurde diese in cDNA umgeschrieben und in unverdünnter Form, sowie in 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung mittels PCR amplifiziert. Als Positiv-Kontrolle wurde das reine Plasmid in den gleichen Verdünnungen verwendet.

#### 4.2.1.2 BMP-Responsive Element-Luciferase-Assay: Etablierung

Um die Bioaktivität von BMP-2 nachzuweisen, wird in dieser Arbeit hauptsächlich der BRE-Luc-Assay verwendet. Dieser wurde im Laufe der Arbeit optimiert, um einen höheren Probendurchsatz durch den Einsatz von 96-Loch-Platten zu ermöglichen.

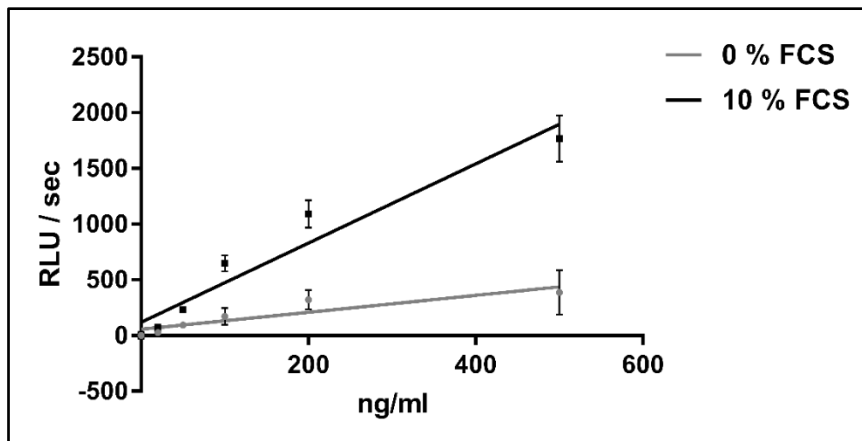
Da hier alle Ergebnisse dargestellt sind, ist immer angegeben, mit welchem Format die jeweilige Untersuchung durchgeführt wurde. Im Rahmen der Etablierung wurde die 24-LP-Methode mit der 96-LP-Methode verglichen. Dabei zeigte sich, dass mit beiden Methoden eine lineare Standardreihe erzielt werden kann (Abb. 30). Die gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) waren bei der Messung mit der 24-LP-Methode ca. 3-mal höher. Dennoch zeigte sich, dass die Standardabweichungen der einzelnen Messwerte mit der 96-LP-Methode wesentlich geringer sind.



**Abb. 30: Vergleich der Standardreihen zur Etablierung eines optimierten BRE-Luc-Assays.** Dargestellt sind die Messwerte des BRE-Luc-Assays mit der 24-LP-Methode (Regressionsgerade:  $y=1,551x-8,652$ ,  $R^2=0,9942$ ) und der 96-LP-Methode (Regressionsgerade:  $y=0,5386x-7,409$ ,  $R^2=0,9945$ ) für BMP-2-Konzentrationen von 2,5 – 500 ng/ml. Dargestellt sind die Ergebnisse einer Doppelbestimmung.

Der Gehalt von fötalem Kälberserum (FCS) im Zellkulturmedium kann ebenfalls Einfluss auf die Signalstärke der Luziferase im Reporterassay zum Nachweis von bioaktivem BMP-2 haben. FCS enthält viele verschiedene Proteine, die für die Kultivierung von Zellen *in vitro* notwendig sind. Da in dieser Arbeit auch Freisetzungspuren und andere Proben aus Experimenten untersucht werden sollen, die FCS oder andere Proteine beinhalten, welche ggf. die erhaltenen Ergebnisse beeinflussen könnten, wurde der Einfluss von FCS auf die Standardreihe des Assays untersucht. Dazu wurden die Reporterzellen wie gewohnt ausgesät und nach der Anhaftung (ca. 4 h) wurde ein Mediumwechsel mit FCS-haltigem (10 %) oder FCS-freiem Medium (0 %) durchgeführt. Dann erfolgte die Weiterbehandlung nach Protokoll bis zur Luziferase-Messung.

Dabei zeigte sich, dass sowohl mit 10 % FCS als auch mit 0 % FCS im Zellkulturmedium eine zuverlässige lineare Standardreihe ermittelt werden konnte (Abb. 31).



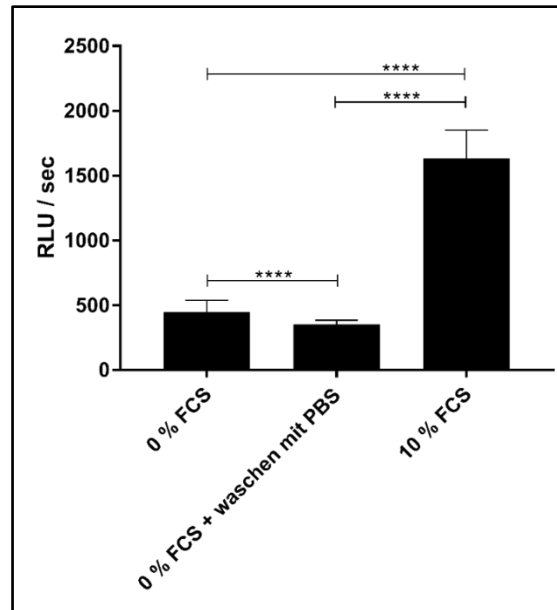
**Abb. 31: Einfluss von FCS auf die Signalstärke der Luziferase.** Hier wurden jeweils die Standardreihen von 2,5 – 500 ng/ml BMP-2 nach einer 24-stündigen Inkubationszeit in FCS-haltigem (Regressionsgerade 10%:  $y=3,555x+209,5$ ;  $R_2=0,9375$ ) oder FCS-freiem Medium (Regressionsgerade 0%:  $y=0,7609x+68,28$ ;  $R_2=0,8242$ ) miteinander verglichen. Es erfolgte eine Bestimmung von  $n=6$  im 24-Loch-Platten-Format.

Da die Kultivierung der Zellen zunächst in 10 % FCS-haltigem Medium stattfindet und dieses erst nach der Adhäsion der Zellen aus dem Medium entfernt wird, wurde zusätzlich untersucht, wie ein zusätzlicher Waschschrift sich auf das Luziferase-Signal auswirkt.

Dazu wurde der oben beschriebene Versuch wiederholt und zusätzlich die Option eines Waschschrifts nach der Adhäsion der Zellen in die Versuchsplanung mit aufgenommen.

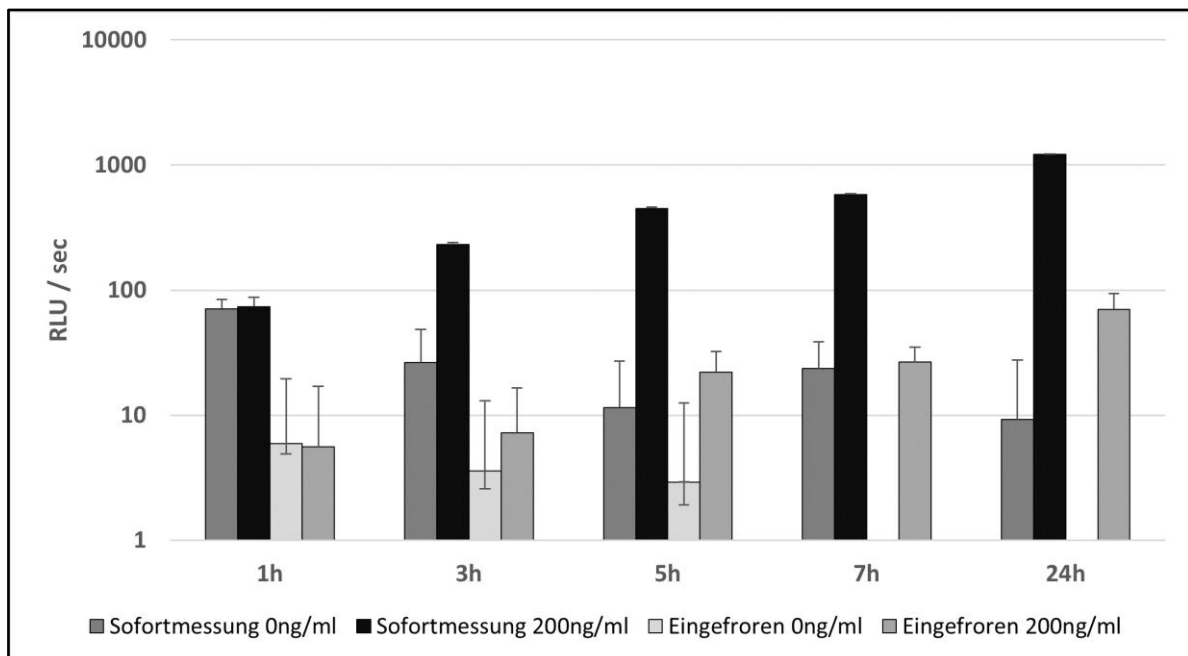
Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass zwischen den Proben, die einen zusätzlichen Waschschrift unterlaufen sind, und den nicht gewaschenen Proben eine signifikante Abweichung der RLU/sec auftritt. Außerdem hat sich die Standardabweichung der gewaschenen Proben halbiert (Abb. 32).

#### 4. Ergebnisse



**Abb. 32: Auswirkung eines Waschschrilles auf die Signalschwankungen im BRE-Luc-Assay.** Dargestellt sind die Ergebnisse des BRE-Luc-Assays nach der Messung der Proben. Es wurden jeweils 200 ng/ml BMP-2 entweder in 0 % FCS kultiviert (n=36), in 0 % FCS nach einem Waschschrille mit PBS (n=24) oder in 10 % FCS (n=36) kultiviert bis zum Messzeitpunkt.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nach einem Einfrieren der Lysate wurde ebenfalls untersucht. Dabei zeigte sich, dass dies zu einem erheblichen Signalverlust der gemessenen Luziferase-Aktivität (in RLU/sec) führt (Abb. 33).



**Abb. 33: Messung der Luziferase-Aktivität nach Einfrieren der Überstände bei -20 °C im Vergleich zu frisch gemessenen Proben.** Es wurden jeweils 2 identische Proben mit Dreifachbestimmung der Luziferase-Aktivität gemessen.

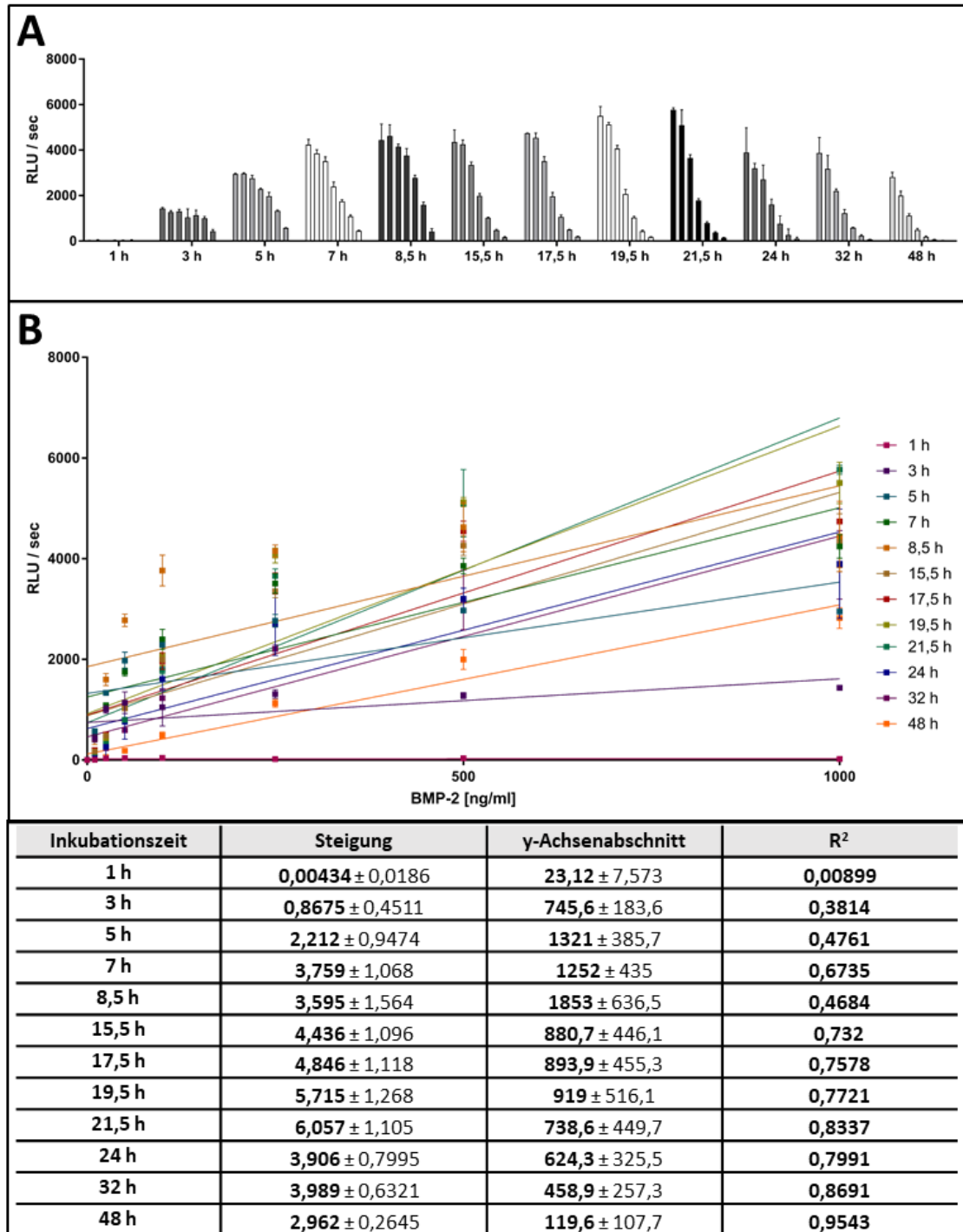
### 4.2.1.3 Kinetik zur Ermittlung des besten Messzeitpunkts

Da durch das BMP-2 zunächst der Signalweg aktiviert werden muss (Abschnitt 1.2 und 1.3), um den ID1-Promotor zu aktivieren, wurde mittels einer kinetischen Untersuchung ermittelt, nach welchem Inkubationszeitraum die Luziferase-Messung der BMP-2-Proben die höchsten Messergebnisse liefert und somit optimal ist.

Dafür wurde sowohl im 24 Loch-, als auch im 96 Loch-Platten-Format eine Kinetik durchgeführt. Die Zellen wurden gleichzeitig ausgesät und mit BMP-2 induziert. Die Messung erfolgte nach den angegebenen Zeitpunkten (Abb. 34). Die Trends der Ergebnisse sind im 24- und 96-Loch-Platten Format vergleichbar, daher sind hier nur die Ergebnisse aus der 96-Loch-Platten-Messung dargestellt. Die Ergebnisse der 24 LP-Methode finden sich im Anhang (Abb. A59). Es zeigte sich, dass schon nach einer Inkubationszeit von 3 h ein Signal der Luziferase zu messen ist. Die Unterschiede der verschiedenen gemessenen Konzentrationen sind hier allerdings noch nicht deutlich unterscheidbar, was auch an den nicht-linearen Regressionen deutlich wird.

Allerdings verdreifacht sich das Luziferase-Signal in den nächsten Stunden und erreicht sein Maximum nach etwa 17-24 h. Eine längere Inkubationszeit führt zu einer erneuten Reduktion des gemessenen Signals.

#### 4. Ergebnisse

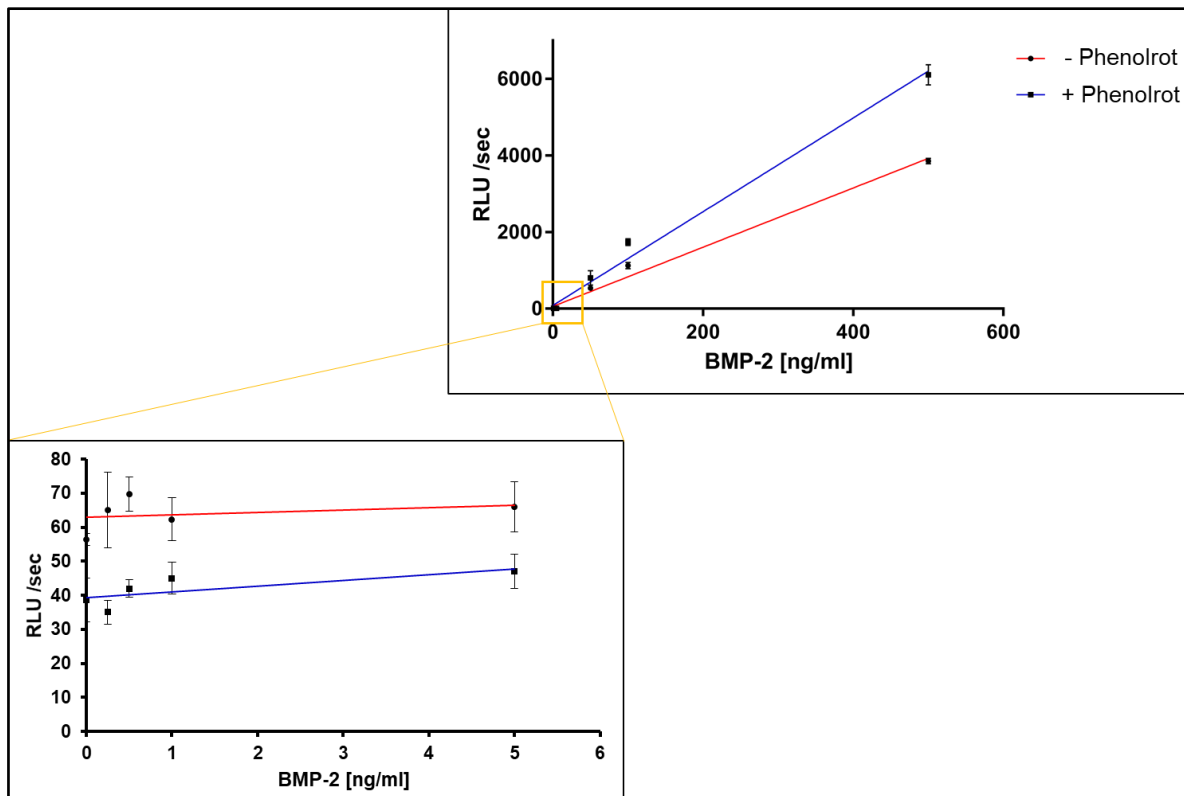


**Abb. 34: Kinetik der BRE-Luc-Aktivität nach 1-48 h im 96-Loch-Platten-Format.** Die Messung erfolgte in Dreifachbestimmung im 96-Loch-Platten-Format. Es wurden jeweils Standardreihen von 10-1000 ng/ml BMP-2 miteinander verglichen. Diese sind hier als Balkendiagramm zur besseren Einschätzung der Signalstärke (A) und als Messpunkte mit dazugehöriger Regressionsgeraden und deren Steigung, y-Achsenabschnitt und R<sub>2</sub>-Wert (B) dargestellt.



### 4.2.1.4 Einfluss von Phenolrot im Medium auf die Genauigkeit der Messergebnisse

Es wird postuliert, dass Medium ohne Phenolrot einen Effekt auf die Genauigkeit der Luziferase-Messung haben kann. Insbesondere einige Hersteller von Luziferase-Assay Reagenzien empfehlen den Einsatz von Phenolrot-freien Medien [136], [137]. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit sich die Standardkurven zwischen Zellkulturmedium mit und ohne Phenolrot unterscheiden. Dazu wurden die Reporterzellen während des gesamten Versuchszeitraums jeweils mit Basalmedium (DMEM) mit oder ohne Phenolrot kultiviert. Als Standardreihe wurden BMP-2-Konzentrationen zwischen 0,25 und 500 ng/ml eingesetzt. Hier wurde weiterhin untersucht, inwiefern sich die Sensitivität des Assays beim Einsatz von phenolrotfreiem Medium verbessert. Die Ergebnisse sind in Abb. 35 dargestellt. Die Standardreihe, die im phenolrothaltigen Medium gemessen wurde, weist insbesondere beim Einsatz vom 500 ng/ml BMP-2 eine 1,5-fache Signalverstärkung (3855 RLU/sec zu 6107 RLU/sec) auf. Aber auch die geringeren BMP-2-Konzentrationen liefern höhere RLU-Werte. Im Bereich der kleinen Konzentrationen zwischen 0,25 und 5 ng/ml BMP-2 können keine wesentlichen Unterschiede der Messwerte gezeigt werden.



**Abb. 35: Einfluss von Phenolrot im Zellkulturmedium auf die Signalstärke des Signals im BRE-Luc-Assay.** Dargestellt sind die Ergebnisse des Vergleichs einer Standardreihe mit BMP-2 (0,25 – 500 ng/ml), die jeweils in phenolrothaltigem Medium (Regressionsgerade:  $y=12,24x-80,02$ ,  $R^2=0,9922$ ) und in phenolrotfreiem Medium (Regressionsgerade:  $y=7,732x+55,97$ ,  $R^2=0,9904$ ) gemessen wurde. In der zweiten vergrößerten Abbildung sind die kleineren Messwerte von 0,25 – 5 ng/ml noch einmal detailliert dargestellt. Der Versuch wurde mit  $n=3$  durchgeführt.

#### 4.2.1.5 Vergleich des Alkalische Phosphatase-Assays und des BRE-Luc-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2

Zum Bioaktivitätsnachweis von BMP-2 gibt es unterschiedliche Methoden. Eine weit verbreitete Methode ist der Alkalische Phosphatase-Assay. Neben dem in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten BRE-Luc-Assay wird dieser ebenfalls häufig in der Literatur zum Nachweis der Bioaktivität vom BMP-2 angewandt. Der Assay basiert auf dem Prinzip der Aktivierung der alkalischen Phosphatase durch BMP-2. Zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms wird das farblose p-Nitrophenylphosphat zu den Zellen gegeben, welches dann von der alkalischen Phosphatase in p-Nitrophenol umgewandelt wird. Anschließend wird die Absorption des Produkts bei 450 nm photometrisch bestimmt.

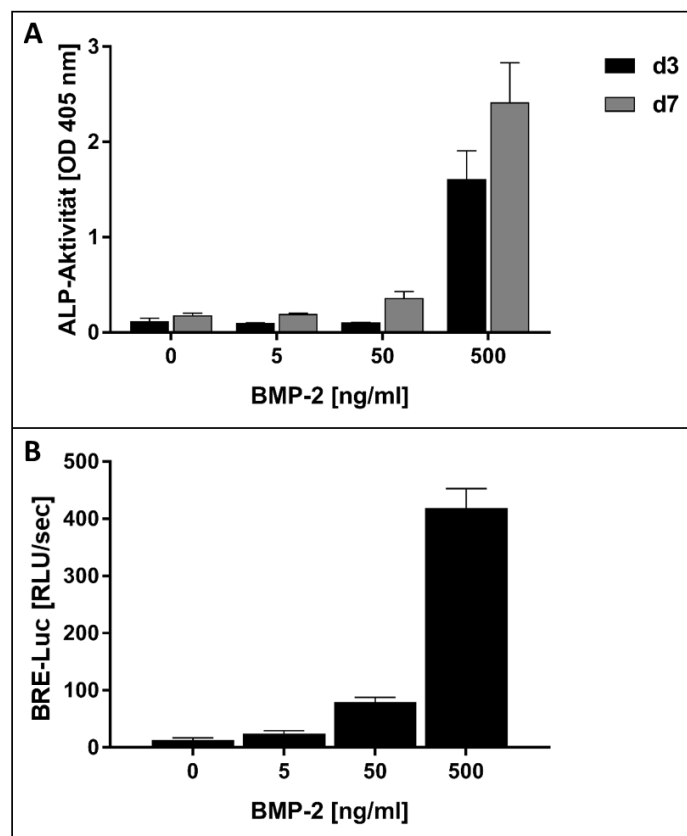
Da es sich bei der BRE-Luc-Reporterzelllinie um eine C2C12-Zelllinie handelt, wurde diese zum Vergleich der Aussagen beider Assays verwendet. Außerdem wurden jeweils die gleichen Konzentrationen der identischen Charge BMP-2 für den Vergleich der beiden Assays genutzt. Beide

Assays wurden parallel begonnen und jeweils nach dem im Methodenteil dieser Arbeit beschriebenen Protokoll ausgeführt (Abschnitt 3.2.12 und 3.2.13).

Bei der Messung der ALP-Aktivität nach BMP-2 Zugabe wurde an zwei Zeitpunkten gemessen, an Tag 3 und an Tag 7. Nach 3-tägiger Inkubation ist bei den Zellen, denen 0-50 ng/ml BMP-2 zugesetzt wurden, kein Signal messbar. Bei Zugabe von 500 ng/ml BMP-2 ist eine OD [450 nm] von 1,6 messbar.

Nach 7-tägiger Inkubation ist die OD [450 nm] auf 2,4 gestiegen. Bei 50 ng/ml BMP-2 ist eine OD [450 nm] von 0,36 messbar. Die Werte von 0 ng/ml und 5 ng/ml liegen bei ca. 0,2 (Abb. 36, A).

Die BRE-Luc-Messung wurde, wie im Protokoll beschrieben, nach 24 h durchgeführt und ausgewertet. Hier wurde bei 0 ng/ml BMP-2 der Wert 12,8 RLU/sec gemessen. Dieser steigt bereits bei Zugabe von 5 ng/ml auf 24 RLU/sec. 50 ng/ml BMP-2 erzielen einen Wert von 79,1 RLU/sec und nach der Zugabe von 500 ng/ml BMP-2 konnte ein Wert von 418,5 RLU/sec gemessen werden.



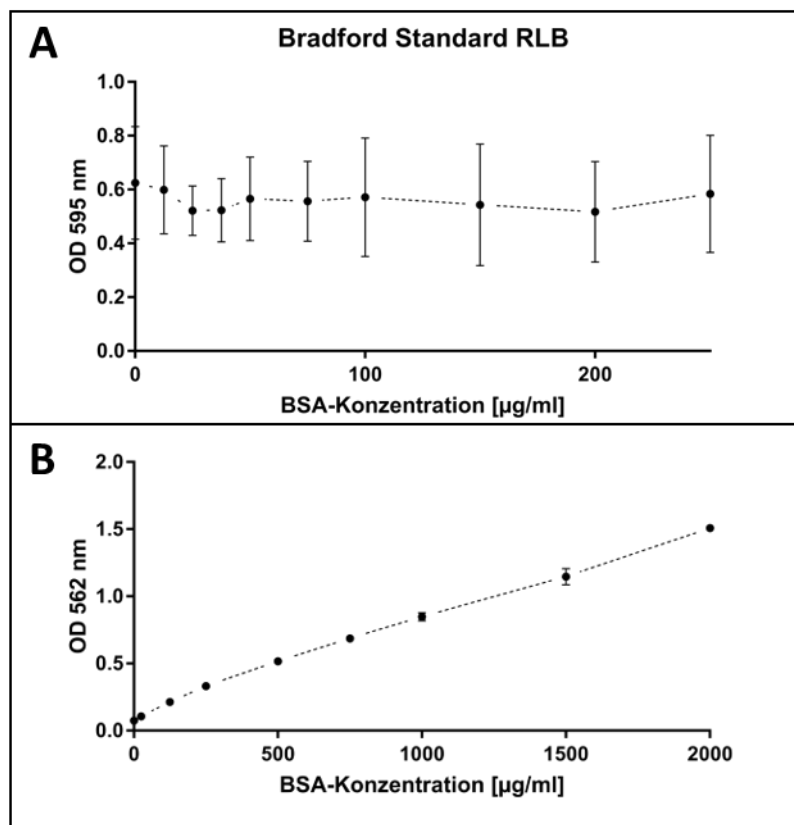
**Abb. 36: Vergleich des Alkalische Phosphatase-Assays und des BRE-Luc-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2.** Dargestellt sind die Ergebnisse des Alkalische Phosphatase-Assay (A) nach 3 und 7 Tagen Inkubation der verschiedenen Konzentrationen BMP-2. Es wurden C2C12 Zellen verwendet und der Assay wurde in Dreifachbestimmung

durchgeführt. Die Ergebnisse des BRE-Luc-Assays sind in (B) gezeigt. Hier wurden zwei biologische Replikate in Dreifachbestimmung vermessen und 24 h inkubiert.

#### 4.2.1.6 Normalisierung der Messergebnisse des BRE-Luc-Assays

Die ermittelten Messergebnisse müssen normalisiert werden, um biologische Schwankungen wie z. B. proliferationsbedingt unterschiedliche Zellmengen bei längeren Inkubationszeiträumen berücksichtigen zu können. Da in der Zelllinie kein Dual-Luciferase System [138] etabliert ist, muss diese Normalisierung mittels der Proteinkonzentration oder der Zellzahl erfolgen. Daher wurden verschiedene Methoden getestet, um eine Normalisierung der Messergebnisse zu ermöglichen.

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration in den Lysaten, die bei der Messung im 24-Loch-System erzeugt werden, wurde sowohl der Bradford-Proteinassay als auch der BCA-Proteinassay als mögliches Normalisierungssystem untersucht. Als Proteinstandard wurde hier BSA in unterschiedlichen Konzentrationen im Lysepuffer (Reporter Lysis Buffer-RLB) gelöst. Dabei konnte im Bradford-Assay keine Standardreihe generiert werden. Die im BCA-Assay erzeugte Standardreihe wies Linearität auf und das Bestimmtheitsmaß betrug 0,995 (Abb. 37).

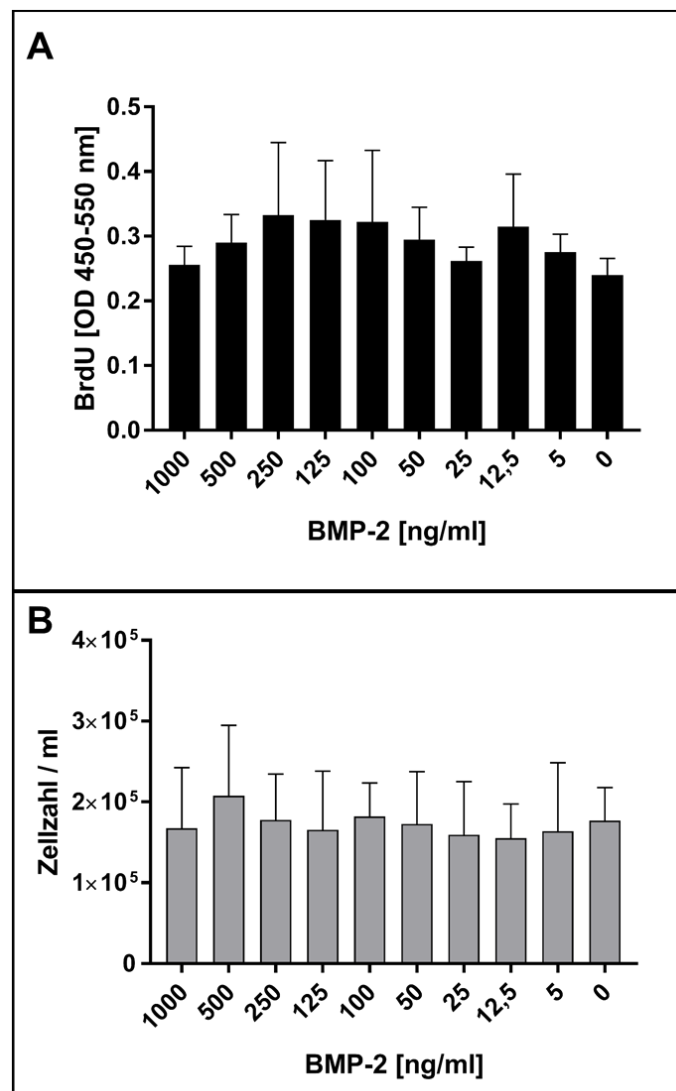


**Abb. 37: Normalisierung der Messergebnisse des BRE-Luc-Assay durch Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode und BCA.** Dargestellt sind die jeweiligen Standardreihen, die sich durch die Messung im Bradford-Assay (A) und mittels des

#### 4. Ergebnisse

BCA-Assays (B) im Reporter Lysis Buffer des Luziferase System ergaben. Regressionsgerade in (B) (nicht dargestellt):  $y = 0,0007x + 0,1342$ ,  $R^2 = 0,995$ .

Da sich durch die Verwendung des Assays im 96-Loch-Format keine Möglichkeit mehr bietet, die Lysate der Zellen für die Luziferase Messung und für die Bestimmung der Proteinkonzentration zu verwenden, da diese nicht abgenommen werden müssen, wurden hier der DNA-Gehalt und die Zellzahl der verschiedenen Wells zur Normierung der Ergebnisse verwendet. Zur Ermittlung des DNA-Gehalts diente der BrdU-Assay. Außerdem wurde eine manuelle Zählung der Zellen durchgeführt. Da unter Umständen auch die Zugabe von BMP-2 einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen haben kann, wurden die Untersuchungen unter Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen BMP-2 durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass DNA-Gehalt bzw. Zellzahl in allen Proben unabhängig von der BMP-2 Konzentration konstant bleiben (Abb. 38).



**Abb. 38: Bestimmung der DNA-Menge und der Zellzahl der BRE-Luc-Reporterzellen in einer 96-Loch-Platte mit Einfluss von BMP-2.** Dargestellt sind die Ergebnisse der BrdU-Messung (A) und der manuellen Zellzählung (B) der BRE-Luc-Reporterzellen. Es wurden jeweils 6 Wells pro Konzentration (0-1000 ng/ml BMP-2) untersucht.

### 4.2.2 BMP-2 als osteoinduktives Biomolekül

Im Rahmen der Forschergruppe „Gradierte Implantate“ soll BMP-2 als eines von drei Molekülen an Nanopartikel angebunden, auf eine PCL-Fasermatte aufgebracht und aus den Nanopartikeln freigesetzt werden (siehe 1.4.2). Aus diesem Grund ist es wichtig zu verstehen, wie sich das Protein verhält, wenn sich die Umgebungsbedingungen wie pH-Wert, Salzgehalt oder Temperatur ändern. Natürlich ist dies final bei der Einbringung des fertigen Implantats in den Menschen wichtig, aber auch in Vorversuchen in Tiermodellen oder bei der Untersuchung der Freisetzung des Proteins aus den Trägermaterialien. Es müssen geeignete Bedingungen gefunden werden, um eine spätere Quantifizierung der Freisetzung und Aktivität des Proteins möglich zu machen. Dazu wurden in dieser Arbeit grundlegende Untersuchungen durchgeführt.

#### 4.2.2.1 Löslichkeitsuntersuchungen von BMP-2

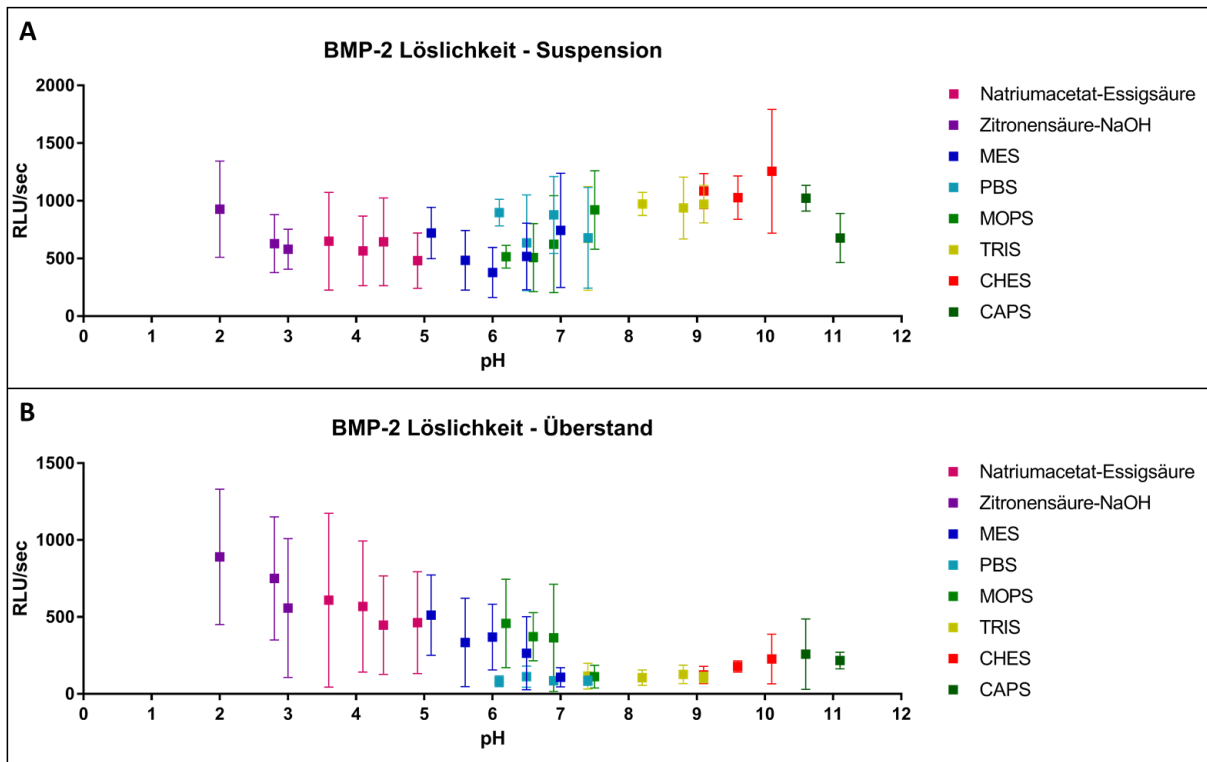
Proteine besitzen, abhängig von ihrer Struktur und ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften, bei unterschiedlichen pH-Werten eine unterschiedliche Löslichkeit. Bei extremen pH-Werten neigen sie dazu, auszufallen und zu aggregieren. Daher wurde das Verhalten von BMP-2 in unterschiedlichen Puffersystemen mit verschiedenen pH-Werten untersucht. Diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit BASTIAN QUAAS und wurden bereits publiziert [139]. Hier wird hauptsächlich auf die Bioaktivität der Proben eingegangen.

Zur Analyse des Verhaltens von BMP-2 wurden 25 µg/ml des Proteins jeweils über Nacht in den jeweiligen Puffersystemen inkubiert. Die entsprechenden Proben wurden jeweils als Proteinsuspension vermessen. Außerdem wurden alle Proben für 15 min bei 17.000 x g zentrifugiert, um eventuelle Aggregate zu sedimentieren. Von diesen Proben wurde jeweils der Überstand vermessen. Es erfolgte die Messung der BMP-2 Bioaktivität mit dem BRE-Luc-Assay. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 dargestellt.

Die Bioaktivitätsbestimmung der verschiedenen BMP-2-Suspensionen zeigt, dass sich in jeder Pufferlösung und bei jedem pH-Wert bioaktives BMP-2 nachweisen lässt.

Bei der Messung der Überstände ist nur bis pH 7 bioaktives BMP-2 nachzuweisen. Die relativen Lichteinheiten und damit die Proteinaktivität verringern sich allerdings von pH 2 bis pH 7 stetig. Bei pH-Werten größer als 7 ist nahezu kein bioaktives BMP-2 mehr nachzuweisen. Lediglich bei pH 10,5

ist ein geringer Anstieg der Löslichkeit zu verzeichnen, der sich durch einen Anstieg der Luziferase-Aktivität auf ca. 250 RLU/sec darstellt.



**Abb. 39: Biologische Aktivität von BMP-2 bei verschiedenen pH-Werten und in verschiedenen Puffersystemen.** Die Abbildungen zeigen jeweils die Messwerte der BRE-Luc-Messung der Suspensionen (A) und der Überstände (B) bei verschiedenen pH-Werten von pH 2 bis pH 11 in unterschiedlichen Puffersystemen (Natriumacetat-Essigsäure, Zitronensäure-NaOH, MES, PBS, MOPS, TRIS, CHES, CAPS). Es handelt sich hier um die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

Es wurden ebenfalls die Puffer ohne BMP-2 untersucht, um eine Störung der Messung durch den Einfluss des Puffers auszuschließen. Diese Ergebnisse finden sich im Anhang (Abb. A60). Hier war allerdings nur ein Hintergrundrauschen messbar und keine Luziferase-Aktivität nachzuweisen.

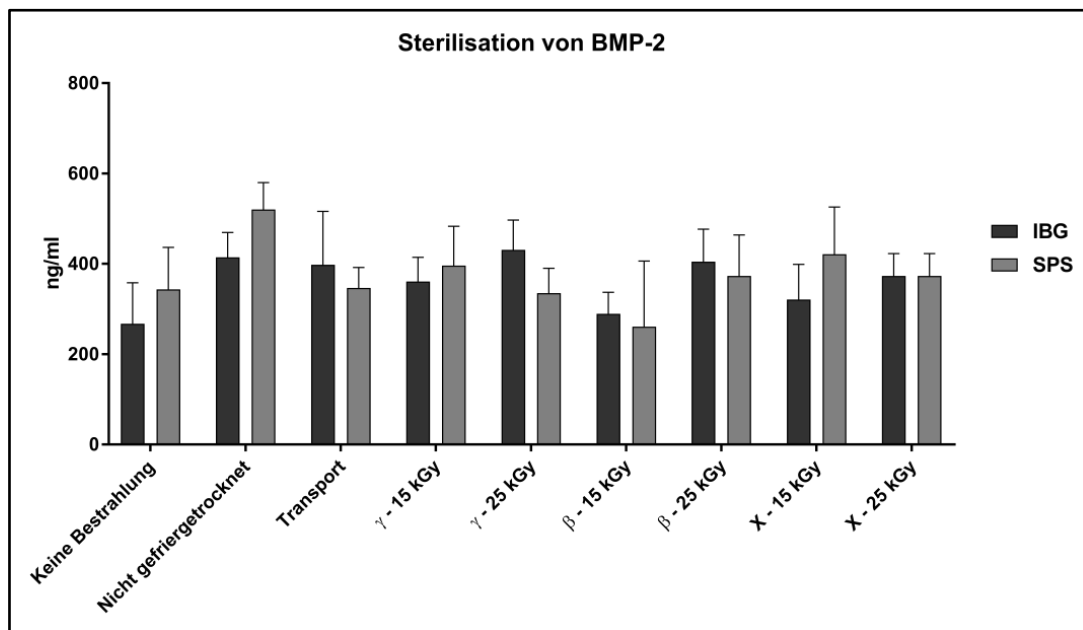
#### 4.2.2.2 Sterilisation von BMP-2

Das fertige Implantat muss vor der Implantation nach den Regelungen der DIN EN ISO 14937 sterilisiert werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, inwieweit Strahlensterilisation mit unterschiedlichen Strahlungen und unterschiedlichen Dosen einen Einfluss auf die Bioaktivität von BMP-2 hat. Es wurden jeweils 400 ng/ml BMP-2 für die Bestrahlung von JULIUS SUNDERMANN (Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Technische Universität Braunschweig) gefriergetrocknet und dann mit verschiedenen Strahlungsdosen (15 kGy oder 25 kGy) und -arten ( $\gamma$ -Strahlung,  $\beta$ -Strahlung und Röntgenstrahlung (X)) sterilisiert. Nach der Sterilisation wurden die

Proben mit dH<sub>2</sub>O resolubilisiert und es wurde die Bioaktivität mittels BRE-Luc-Assay sowie die Proteinkonzentration mittels NanoDrop 2000 ermittelt.

Aufgrund zu geringer Konzentration der Proteinlösung lieferte die Messung der Proteinkonzentration keine aussagekräftigen Ergebnisse (Anhang: Abb. A61).

Die Ergebnisse der Bioaktivitätsmessung sind in Abb. 40 dargestellt. Neben den zu untersuchenden Proben wurden ebenfalls Kontrollen mitgeführt, um den möglichen Einfluss der Lyophilisation oder der Bestrahlung genau festlegen zu können. Dabei wurde der Einfluss der Lyophilisation („Keine Bestrahlung“) als auch der Einfluss des Transports der lyophilisierten Proben („Transport“) untersucht. Zusätzlich wurden auch Proben von nicht lyophilisiertem und nicht sterilisiertem Protein mitgeführt („Nicht gefriergetrocknet“). Für diese Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Kryoschutz-Lösungen verwendet: IBG und SPS. Es zeigt sich, dass bei allen vermessenen Proben bioaktives Protein nachzuweisen ist. Dabei schwanken die Werte hier zwischen 267 ng/ml (Keine Bestrahlung, IBG) und 520 ng/ml (Nicht gefriergetrocknet, SPS).



**Abb. 40: Auswirkung der Sterilisation von BMP-2 auf die Bioaktivität.** Es wurden jeweils 400 ng/ml BMP-2 lyophilisiert und dann mit den jeweils angegebenen Strahlungsarten und -dosen sterilisiert. Anschließend wurde das lyophilisierte Protein wieder resuspendiert und die Bioaktivität mittels BRE-Luc vermessen. Hier sind die sich auf der mitgeführten Standardreihe ermittelten Konzentrationen bioaktiven Proteins dargestellt. Bei IBG und SPS handelt es sich um zwei unterschiedliche Kryoschutz-Lösungen. Kontrollen n=12, Bestrahlungen n=18.



### 4.2.3 Organische und anorganische Nanopartikel und deren BMP-2 Freisetzung

Im Rahmen der Forschergruppe „Gradierte Implantate“ sollen Nanopartikel auf eine PCL-Fasermatte aufgebracht werden, welche dann gradiert die Wachstumsfaktoren freisetzen sollen. Die eingebrachten Nanopartikel sollen eine Differenzierung in Knochen-, Knorpel- und Sehnenzellen induzieren. Für diesen Schritt ist es zunächst wichtig, dass die eingebrachten Nanopartikel keine zytotoxische Wirkung auf die körpereigenen Zellen haben. Um dies zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Zytotoxizitätsuntersuchungen mit MSCs durchgeführt. Außerdem wurde auch der Einfluss auf die Zelllinie C2C12 BRE-Luc untersucht, da im nächsten Schritt untersucht wurde, ob das abgegebene BMP-2 weiterhin bioaktiv ist. Im letzten Schritt der *in vitro* Untersuchungen wurden mit BMP-2 beladene Partikel auf deren osteoinduktive Wirkung untersucht, indem eine osteogene Differenzierung über vier Wochen durchgeführt wurde. Sowohl die Zytotoxizitätsuntersuchungen als auch die Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung wurden mit der MSC 112 durchgeführt.

Da sowohl mit anorganischen nanoporösen Silica-Nanopartikeln (NPSNP) als auch und mit organischen Chitosan/Tripolyphosphat (CS/TPP)- und Alginat/Poly-L-Lysin (Alg/PLL)-Partikeln gearbeitet wurde, wird in den folgenden Kapiteln zunächst auf die anorganischen und dann auf die organischen Partikel genauer eingegangen.

#### 4.2.3.1 Anorganische nanoporöse Silica-Nanopartikel

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Funktionalisierungen der anorganischen NPSNP (beschrieben in 1.4.2) untersucht, welche sich bereits in Voruntersuchungen als geeignet herausstellten [125]. Im Folgenden werden die unfunktionalisierten Partikel (SiOH), aminomodifizierte Partikel (SiNH<sub>2</sub>) und NPSNP modifiziert mit einer Aminohexylaminopropyl-Gruppe (SiAHAP) miteinander verglichen.

Um Folgeexperimente reproduzierbar durchführen zu können, wurde zunächst die Zytotoxizität der NPSNP in der Zellkultur untersucht. Da hier sowohl Experimente zur osteogenen Differenzierung von MSCs als auch Bioaktivitätsuntersuchungen mit den C2C12 BRE-Luc-Zellen durchgeführt werden sollten, wurde die Zytotoxizität bei beiden Zelltypen untersucht.

Dazu wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 5000 c/cm<sup>2</sup> in einer 96-Loch-platte ausgesät. Nach der Anhaftung der Zellen (nach ca. 4 h) wurden die jeweiligen NPSNP in den entsprechenden Konzentrationen (0 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml) für jeweils 24 h, 3 Tage oder 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde ein MTT-Assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durchgeführt, um die Zellviabilität zu ermitteln. Dazu wurden jeweils die Zellen ohne Nanopartikel-Zugabe als 100 % viabel angenommen.

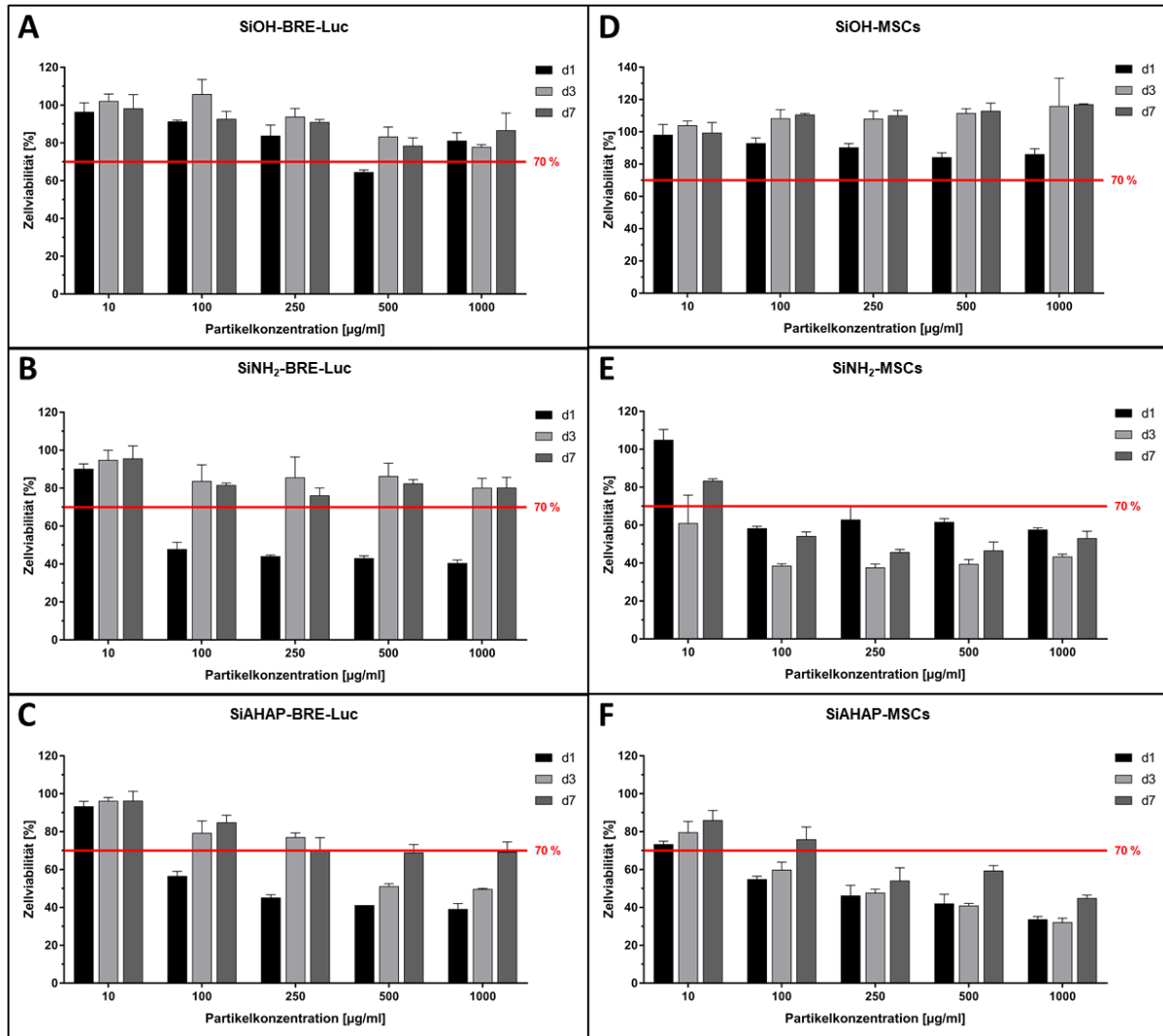
Da laut DIN EN ISO 10993-5 [140] eine gemessene Zellviabilität von >70 % als mäßig toxisch gilt, wurde dieser Grenzwert hier in den Ergebnissen zur besseren Orientierung markiert (horizontale rote Linie). In Abb. 41 sind alle Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt. Die SiOH-Partikel weisen sowohl für die C2C12 BRE-Luc-Zellen (Abb. 41A) als auch für die MSCs (Abb. 41B) bei allen Konzentrationen eine hohe Zellviabilität auf. Lediglich bei der Zugabe von 500 µg/ml zu den C2C12-Zellen beträgt die Zellviabilität nach einem Tag 65 %. An Tag 3 und Tag 7 ist dieser Wert wieder höher als 70 %.

Die Si-NH<sub>2</sub>-Partikel zeigen außer bei der Zugabe von 10 µg/ml bei allen höheren NP-Konzentrationen eine stark reduzierte Zellviabilität der C2C12-Zellen zwischen 40 % (1000 µg/ml) und 48 % (100 µg/ml) an Tag 1. Dieser Wert erhöht sich bei allen Konzentrationen an Tag 3 und ebenfalls an Tag 7, hier liegt die Viabilität immer bei ca. 80 %. Die Zugabe der Partikel auf MSCs hat einen größeren Effekt auf die Zellviabilität. Diese ist hier bei allen Proben und zu allen Zeitpunkten deutlich reduziert und liegt zwischen 37 % (250 µg/ml, Tag 3) und 63 % (250 µg/ml, Tag 1). Lediglich die Zugabe der geringsten Partikelkonzentration von 10 µg/ml weist an Tag 1 eine Viabilität von 105 % und an Tag 7 eine Viabilität von 83 % auf.

Die Zugabe der Si-AHAP Partikel resultiert sowohl bei den C2C12 BRE-Luc-Zellen als auch bei den MSC in einer hohen Zellviabilität von 73 % (MSC, Tag 1) bis 86 % (BRE-Luc, Tag 7) bei Einsatz einer Partikelkonzentration von 10 µg/ml. Bei Zugabe höherer Konzentrationen der Partikel sinkt die Viabilität der Zellen an Tag 1 auf unter 55 %. Dies ist bei den MSCs auch an Tag 3 noch bei allen Konzentrationen der Fall. Hier steigt an Tag 7 die Viabilität der Zellen, auf die 100 µg/ml Partikel gegeben wurden, auf 76 %.

Bei der Untersuchung der C2C12 BRE-Luc-Zellen an Tag 3 steigt im Vergleich zu Tag 1 die Zellviabilität bei Zugabe von 100 µg/ml Si-AHAP-Partikel und 250 µg/ml Partikel auf 79 % bzw. 77 %. Bei Zugabe von 500 µg/ml bzw. 1000 µg/ml der Partikel ist an Tag 7 ein Anstieg auf 69 % Zellviabilität zu verzeichnen.

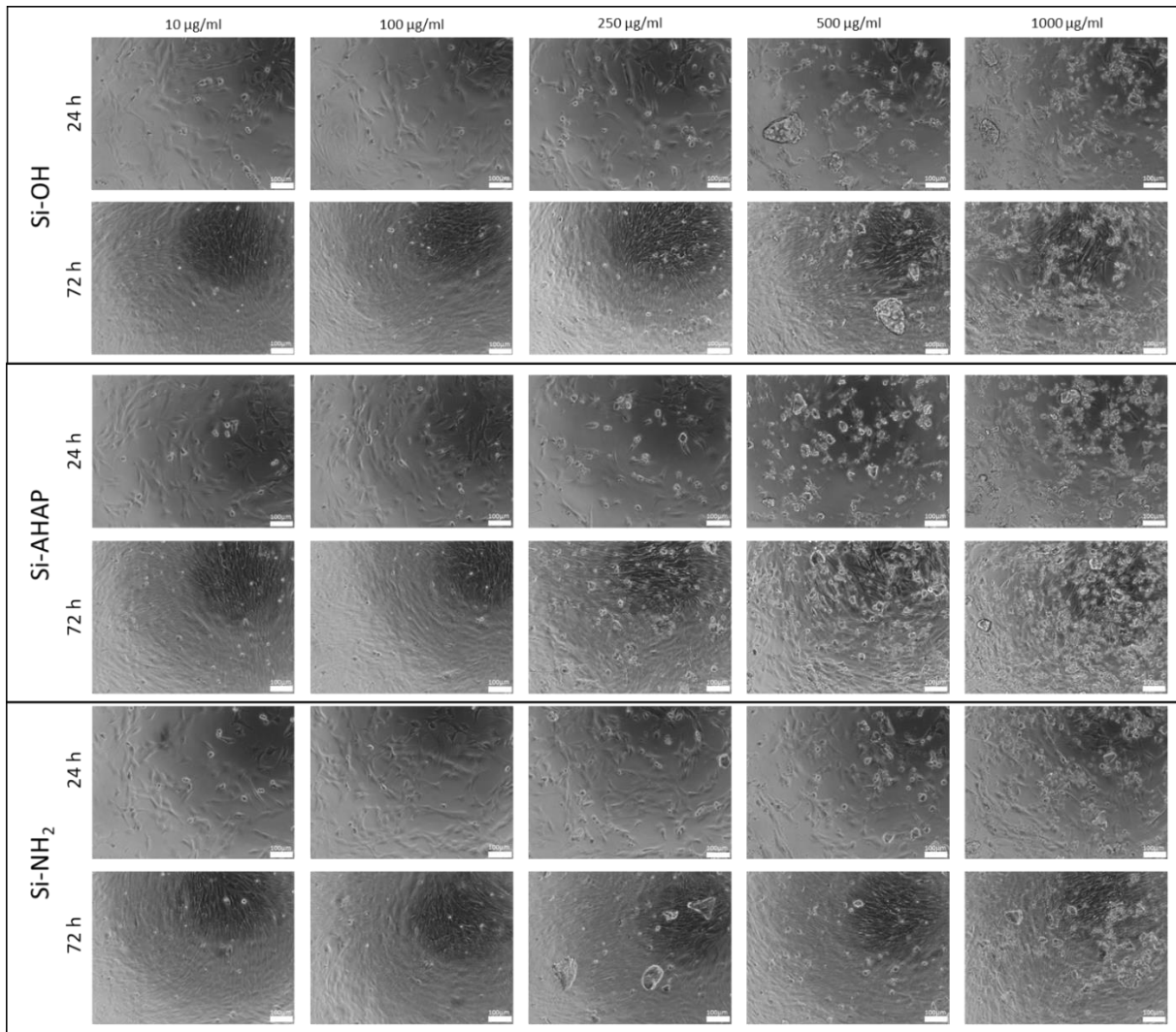
## 4. Ergebnisse



**Abb. 41: Zytotoxizitätsuntersuchungen von nanoporösen Silica-Nanopartikeln auf C2C12 BRE-Luc-Zellen und MSCs (MSC 112).** Dargestellt sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung mittels MTT nach 1, 3 und 7 Tagen. Es wurden unterschiedlich modifizierte NPSNP (A&D: SiOH, B&E: SiNH<sub>2</sub>, C&F: SiAHAP) auf BRE-Luc-Zellen (A-C) und MSCs (D-F) untersucht. Die Messung erfolgte als n=3, gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung.

Um die Ergebnisse des kolorimetrischen MTT-Assays zu validieren, wurden ebenfalls lichtmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen NPSNP auf den C2C12 BRE-Luc-Zellen und den MSCs nach 24 h und nach 72 h aufgenommen.

## 4. Ergebnisse



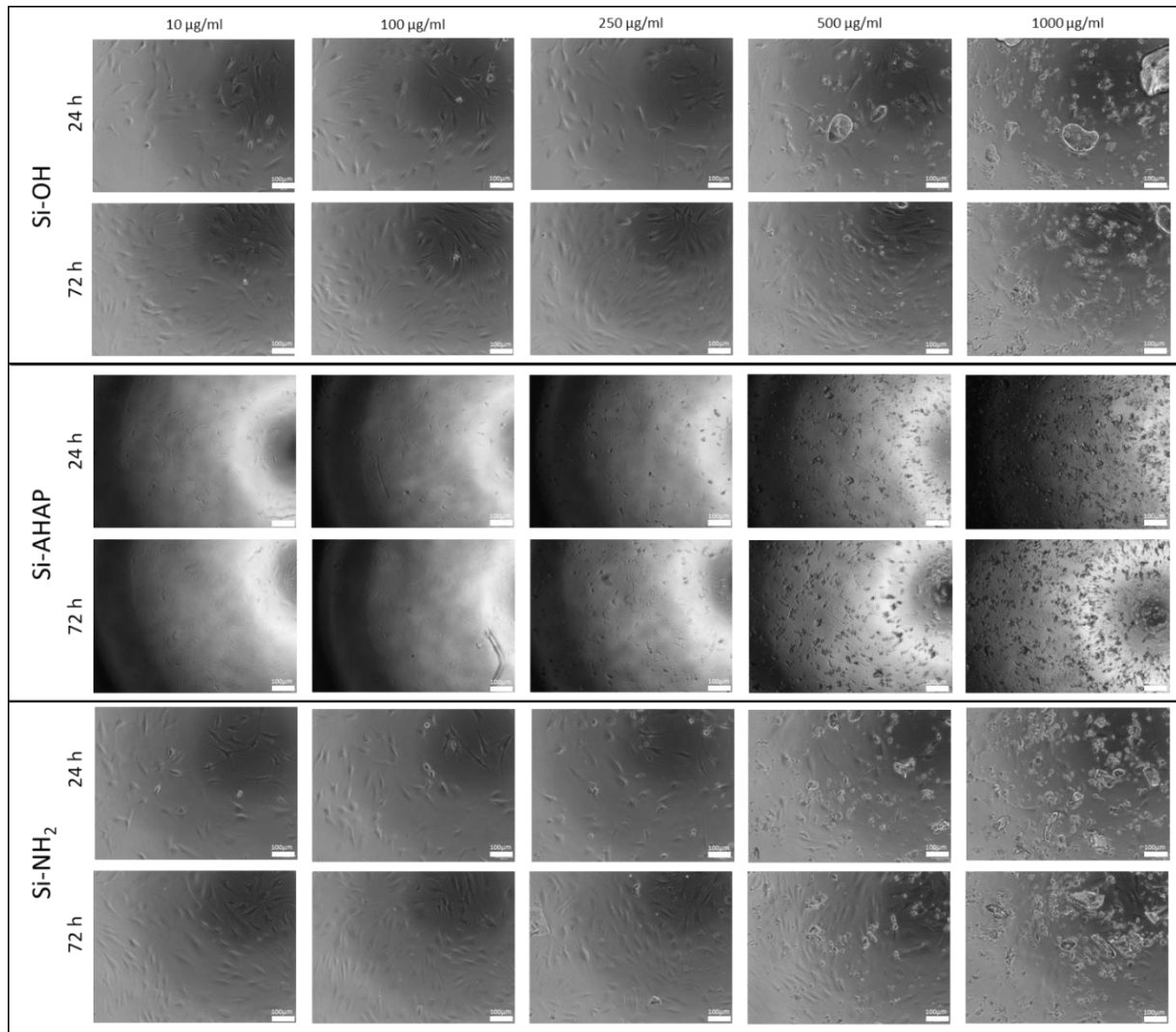
**Abb. 42: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von NPSNP auf C2C12 BRE-Luc-Zellen.**

Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von C2C12 BRE-Luc-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml) der drei unterschiedlichen modifizierten NPSNP (Si-OH, Si-AHAP, Si-NH<sub>2</sub>) behandelt wurden. Die Aufnahmen wurden nach 24 h und 72 h gemacht. Der Maßstab beträgt 100 µm.

In Abb. 42 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der BRE-Luc-Viabilitätsuntersuchungen mit den unmodifizierten und den modifizierten NPSNP dargestellt. Dabei zeigt sich zum einen eine Aggregation der Nanopartikel, insbesondere bei höheren Konzentrationen von 500 bzw. 1000 µg/ml. Insbesondere die Si-AHAP und Si-NH<sub>2</sub>-Partikel weisen sehr große Aggregate auf. Zum anderen nimmt mit steigender Partikelkonzentration die Zelldichte ab.

Ähnliche Beobachtungen können ebenfalls bei den Untersuchungen mit den mesenchymalen Stammzellen gemacht werden (Abb. 43), wobei hier das Zellwachstum bei steigender Nanopartikelkonzentration noch stärker inhibiert wird.

## 4. Ergebnisse

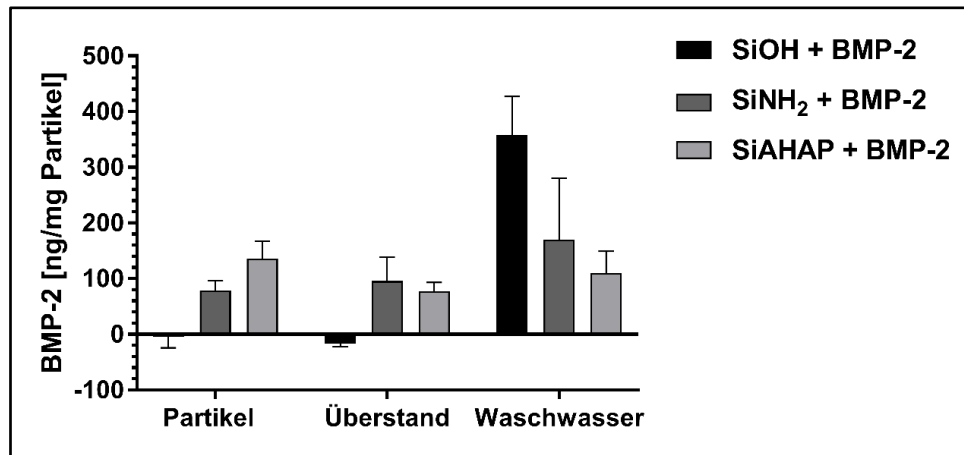


**Abb. 43: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von NPSNP auf MSC (MSC 112).** Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von MSC, die mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml und 1000 µg/ml) der drei unterschiedlichen modifizierten NPSNP (Si-OH, Si-AHAP, Si-NH<sub>2</sub>) behandelt wurden. Die Aufnahmen wurden nach 24 h und 72 h gemacht. Der Maßstab beträgt 100 µm.

Um zu untersuchen, ob der MES-Puffer, in dem die NPSNP gelöst sind, einen zytotoxischen Effekt auf die Zellen hat, wurden unterschiedliche Verdünnungen des Puffers im Zellkulturmedium untersucht. Dabei zeigte sich, dass sogar bei hohen Konzentrationen des MES-Puffers - einer 1:1 Verdünnung - die Zellen keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle aufweisen (Abb. A62).

Da die Beladung der Silica-Partikel nur indirekt mittels ELISA ermittelt werden kann, indem das nicht gebundene BMP-2 im Beladungsmedium vermessen wird, wurde in dieser Arbeit die direkte Beladung der Partikel mittels BRE-Luc-Assay untersucht. Dazu wurden jeweils 500 µg/ml NPSNP auf die C2C12 Zellen gegeben. Als Kontrolle wurde ebenfalls der Überstand und das Waschwasser des

Waschschrittes mit vermessen. Dieser Test diente zur Untersuchung, ob an Partikel gebundenes BMP-2 ebenfalls mittels BRE-Luc-Assay vermessen werden kann (Abb. 44).

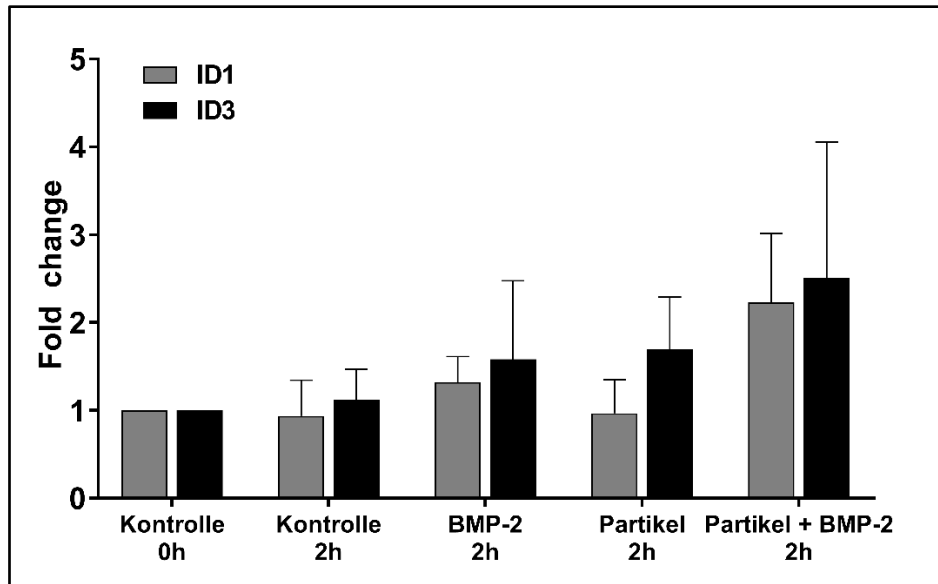


**Abb. 44: Freisetzung von bioaktivem BMP-2 von NPSNP.** Es wurde die mittels Bioaktivitätsmessung (BRE-Luc) die Menge an gebundenem BMP-2 an den Partikeln (SiOH, SiNH<sub>2</sub> und SiAHAP) sowie die im Überstand und im Waschwasser vorhandene Menge quantifiziert (n=3).

Die Untersuchungen zeigen, dass sich auf den unmodifizierten NPSNP am wenigsten BMP-2 befindet, nahezu 0 ng/mg. Dafür ist eine sehr hohe Menge im Waschwasser dieser Partikel zu finden. Die aminomodifizierten Partikel zeigen eine Beladung von ca. 80 ng/mg Partikel und auf den AHAP-modifizierten Partikeln sind ca. 120 ng/mg BMP-2 nachweisbar. Die Mengen, die sich im Überstand und im Waschwasser der zuletzt erwähnten Partikel befinden, sind allerdings nahezu genauso hoch, wie die auf den Partikeln gebundenen Mengen BMP-2.

Da die Bindung von BMP-2 an die SiAHAP-Partikel am effektivsten funktionierte (siehe 5.2.4.1), wurden weitere funktionelle Untersuchungen mit diesen Partikeln durchgeführt.

Im BRE-Luc-Assay wird der Promotor des ID1-Gens, eines *Immediate Early Gens*, verwendet, um einen schnellen Aktivitätsnachweis zu erzielen. Neben ID1 ist auch ID3 ein sogenanntes *Immediate Early Gen*, welches kurze Zeit nach der Inkubation mit BMP-2 exprimiert wird [141]. Daher wurde vor der Durchführung einer zeitintensiven Differenzierung zunächst die Aktivierung des ID1 und des ID3 Gens nach einer Inkubation von 2 h mit den Si-AHAP-Partikeln betrachtet. Dazu wurden MSC in einer 6-Loch-Platte mit einer Zelldichte von 3000 c/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz (4 Tage) wurden 250 µg Si-AHAP-Partikel beladen mit 200 ng/ml BMP-2 auf die Zellen gegeben und für 2 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die RNA der Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und anschließend die Genexpression der beiden *Immediate Early-Genes* betrachtet. Als Kontrollen wurden reines Zellkulturmedium, Partikel ohne BMP-2-Beladung und BMP-2 in löslicher Form verwendet.

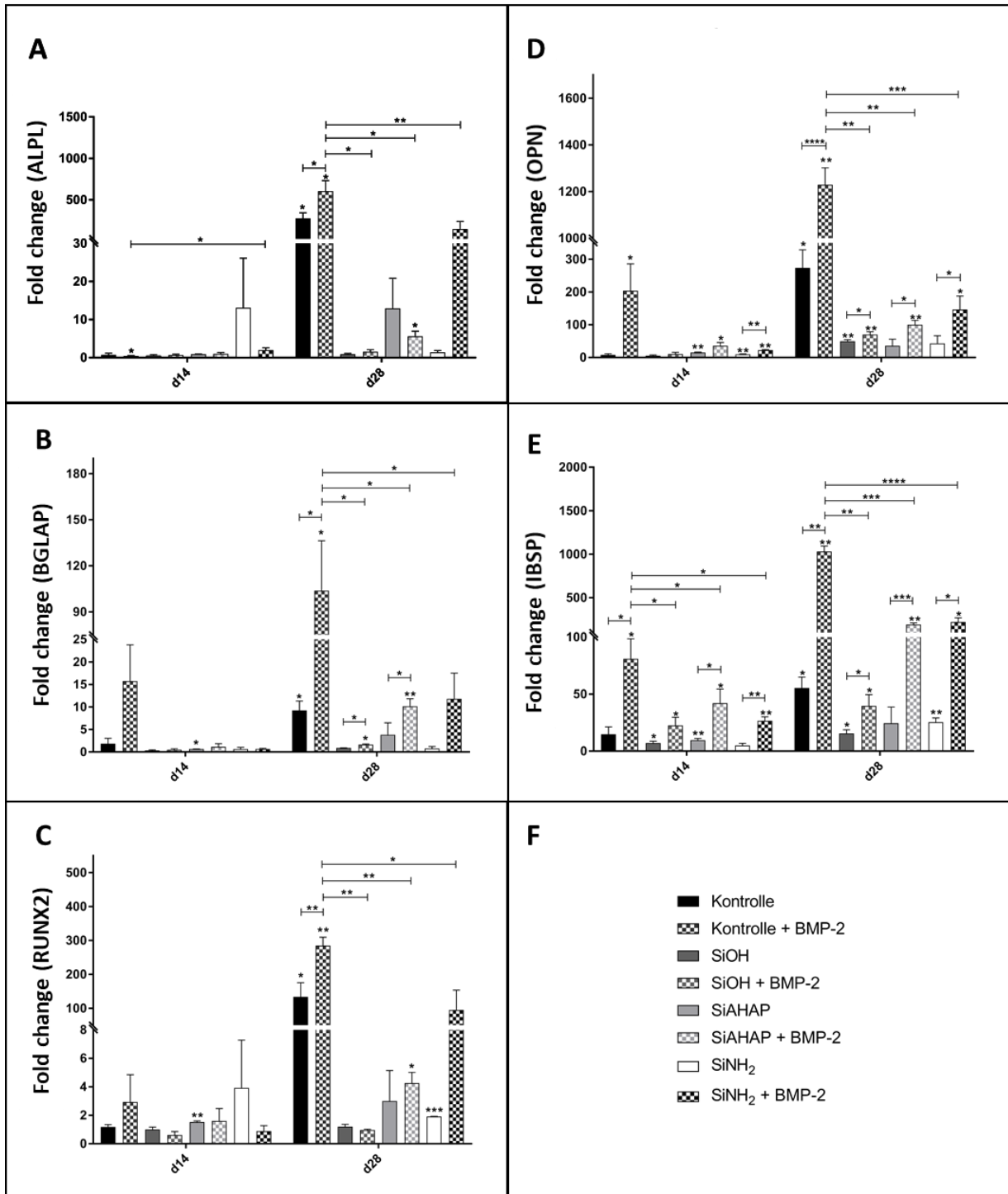


**Abb. 45: Genexpression der Gene ID1 und ID3 nach einer 2-stündigen Inkubation von MSC mit SiAHAP-Partikeln +/- BMP-2.** Dargestellt sind die auf die unstimulierte Kontrolle (0 h gleich 1 gesetzt) normalisierten *fold-changes* der Genexpressionen von ID1 und ID3 nach 2-stündiger Inkubation mit MSC 61. Gezeigt sind die Mittelwerte aus 3 Messungen mit Standardabweichungen.

Sowohl die ID1- als auch die ID3-Genexpression verändert sich bei den unterschiedlichen Konditionen nicht signifikant. Die Genexpression beider Gene zeigt keine Veränderung bei der Kontrolle nach 2-stündiger Inkubation (*Fold change*: ID1=0,94; ID3=1,12). Die Genexpression von ID1 erhöht sich auf einen *fold change* von 1,32 bei Zugabe von 200 ng/ml BMP-2 zum Medium, die Zugabe von mit BMP-2 beladenen Partikeln führt zu einem *fold change* von 2,51. Der Verlauf der Genexpression von ID3 ist ähnlich. Die Zugabe von BMP-2 führt zu einer Erhöhung der Expression von 1,58. Die Zugabe der unbeladenen Partikel führt zu einer Expressionserhöhung von 1,69. Bei Zugabe von mit BMP-2-beladenen SiAHAP-Partikeln erhöht sich die Genexpression um 2,51 (Abb. 45).

Zur weiteren Untersuchung dieses positiven Trends und im Hinblick auf das Anwendungsziel der Forschergruppe wurde mit den vorher beschriebenen drei Partikelsorten eine Differenzierung für 28 Tage mit MSCs (MSC 112) durchgeführt. Anschließend wurde die Genexpression der osteogenen Markergene sowie die Calcium- und Phosphatproduktion mittels Alizarinrot S-Färbung und der kolorimetrischen Bestimmung analysiert.

Die Messung der Calcium- und Phosphatmenge mittels kolorimetrischer Messung sowie die Alizarin-Rot S-Färbung zum Nachweis von Calcium in der Zellmatrix konnten keine eindeutigen Ergebnisse liefern (siehe Abb. A63 und Abb. A64). Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen sind in Abb. 46 dargestellt. Hier wurden die Expressionsstärken der Gene jeweils in Relation zu Tag 0 der Differenzierung als *fold change* dargestellt.



**Abb. 46: Genexpressionsanalysen ausgewählter osteogener Markergene nach der osteogenen Differenzierung mit Silica-Nanopartikeln.** Dargestellt sind die ermittelten *fold changes* der Genexpression zur Kontrolle, die ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren kultiviert wurde. Es wurden die Expressionen der Gene ALPL (A), BGLAP (B), RUNX2 (C), OPN (D) und IBSP (E) nach 14 und nach 28 Tagen analysiert. In F ist die Legende dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=3 mit Standardabweichungen, die Signifikanzen sind durch Sterne gekennzeichnet.

Die Analyse der Genexpression nach der osteogenen Differenzierung mit Silica-Nanopartikeln ergab sehr stark schwankende Expressionsstärken. Dabei sind dennoch signifikante Unterschiede zu



vermerken: Die Kontrolle ohne Partikel weist an Tag 14 eine signifikante Steigerung der Genexpression von OPN (-BMP-2=9, +BMP-2=204) und IBSP (-BMP-2=15, +BMP-2=81) auf. An Tag 28 sind ebenfalls erhöhte Genexpressionen von BGLAP (-BMP-2=9, +BMP-2=104), RUNX2 (-BMP-2=134, +BMP-2=285), OPN (-BMP-2=274, +BMP-2=1229) und IBSP (-BMP-2=55, +BMP-2=1031) zu erkennen. ALPL zeigt bei der Kontrolle an Tag 28 eine signifikante Hochregulation der Genexpression (-BMP-2=275, +BMP-2=605), jedoch nicht bei den getesteten Silica-Nanopartikeln.

Die Untersuchung der SiOH-Partikel ergab signifikante Änderungen der Genexpression von BGLAP (-BMP-2=0,92, +BMP-2=1,64), OPN (-BMP-2=50, +BMP-2=70) und IBSP (-BMP-2=16, +BMP-2=40) beim Vergleich von unbeladenen zu mit BMP-2 beladenen Partikeln an Tag 28. Wesentlich höhere Steigerungen konnten bei den SiAHAP-Partikeln bei IBSP an Tag 14 (-BMP-2=10, +BMP-2=42) und Tag 28 (-BMP-2=25, +BMP-2=193), sowie bei BGLAP an Tag 28 (-BMP-2=3,82, +BMP-2=10,15) und OPN an Tag 28 (-BMP-2=36, +BMP-2=100) gemessen werden. Die Analyse der SiNH<sub>2</sub>-Partikel ergab Steigerungen der Genexpression mit den BMP-2 beladenen Partikeln an Tag 14 und Tag 28 sowohl bei OPN (d14: -BMP-2=10, +BMP-2=22, d28: -BMP-2=43, +BMP-2=146) als auch beim IBSP (d14: -BMP-2=5, +BMP-2=27, d28: -BMP-2=25, +BMP-2=221).

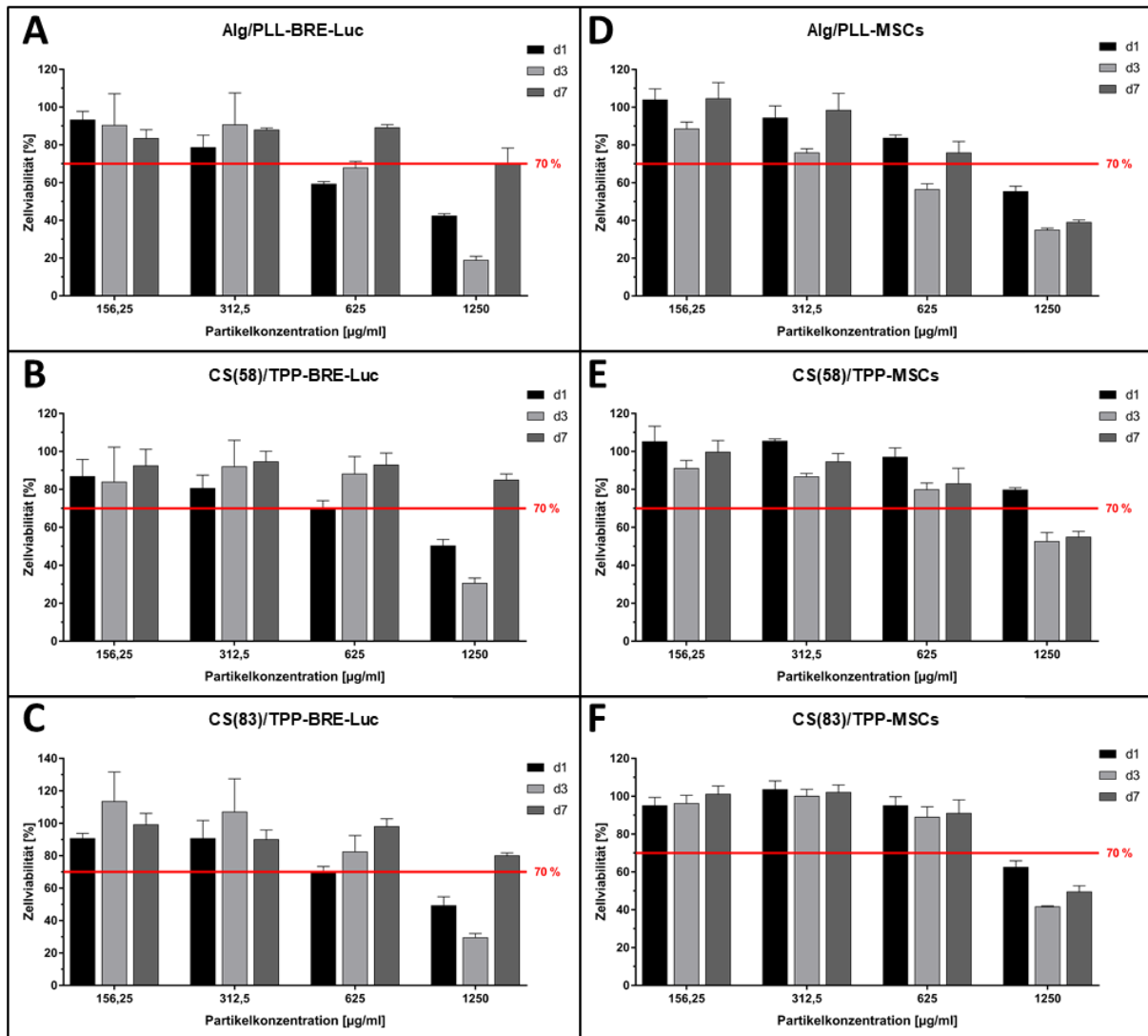
#### 4.2.3.2 Organische Chitosan/Tripolyphosphat- und Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel

Analog zu den NPSNP wurde zunächst die Zytotoxizität der organischen Chitosan/Tripolyphosphat (CS/TPP)-Partikel sowie der Alginat-Poly-L-Lysin (Alg/PLL)-Partikel in der Zellkultur untersucht. Um sowohl Experimente zur osteogenen Differenzierung von MSC als auch Bioaktivitätsuntersuchungen mit den C2C12 BRE-Luc-Zellen durchführen zu können, wurde die Zytotoxizität mit beiden Zelltypen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 5000 c/cm<sup>2</sup> in einer 96-LP ausgesät. Nach der Anhaftung der Zellen (nach ca. 4 h) wurden die jeweiligen Nanopartikel in den entsprechenden Konzentrationen (0 µg/ml, 156,25 µg/ml, 312,5 µg/ml, 625 µg/ml, 1250 µg/ml) für jeweils 24 h, 3 Tage oder 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde ein MTT-Assay durchgeführt, um die Zellviabilität zu ermitteln. Dazu wurden jeweils die Zellen ohne Nanopartikel-Zugabe als 100 % viabel angenommen.

Da laut DIN EN ISO 10993-5 [140] eine gemessene Zellviabilität von >70 % als mäßig toxisch gilt, wurde dieser Grenzwert hier in den Ergebnissen zur besseren Orientierung dargestellt. In Abb. 47 sind alle Ergebnisse der Untersuchungen abgebildet. Dabei sind die Konzentrationen 156,25 µg/ml und 312,5 µg/ml der Alg/PLL-Partikel weder für die C2C12 BRE-Luc-Zellen noch für die MSC zytotoxisch. Im Test der MSC sind 625 µg/ml auch an Tag 1 noch tolerierbar, die Zellviabilität sinkt aber an Tag 3 auf 57 %. An Tag 7 ist sowohl bei den C2C12 BRE-Luc-Zellen als auch bei den MSCs wieder ein Anstieg der Zellviabilität von 625 µg/ml der Alg/PLL-Partikel über 70 % zu verzeichnen.

#### 4. Ergebnisse

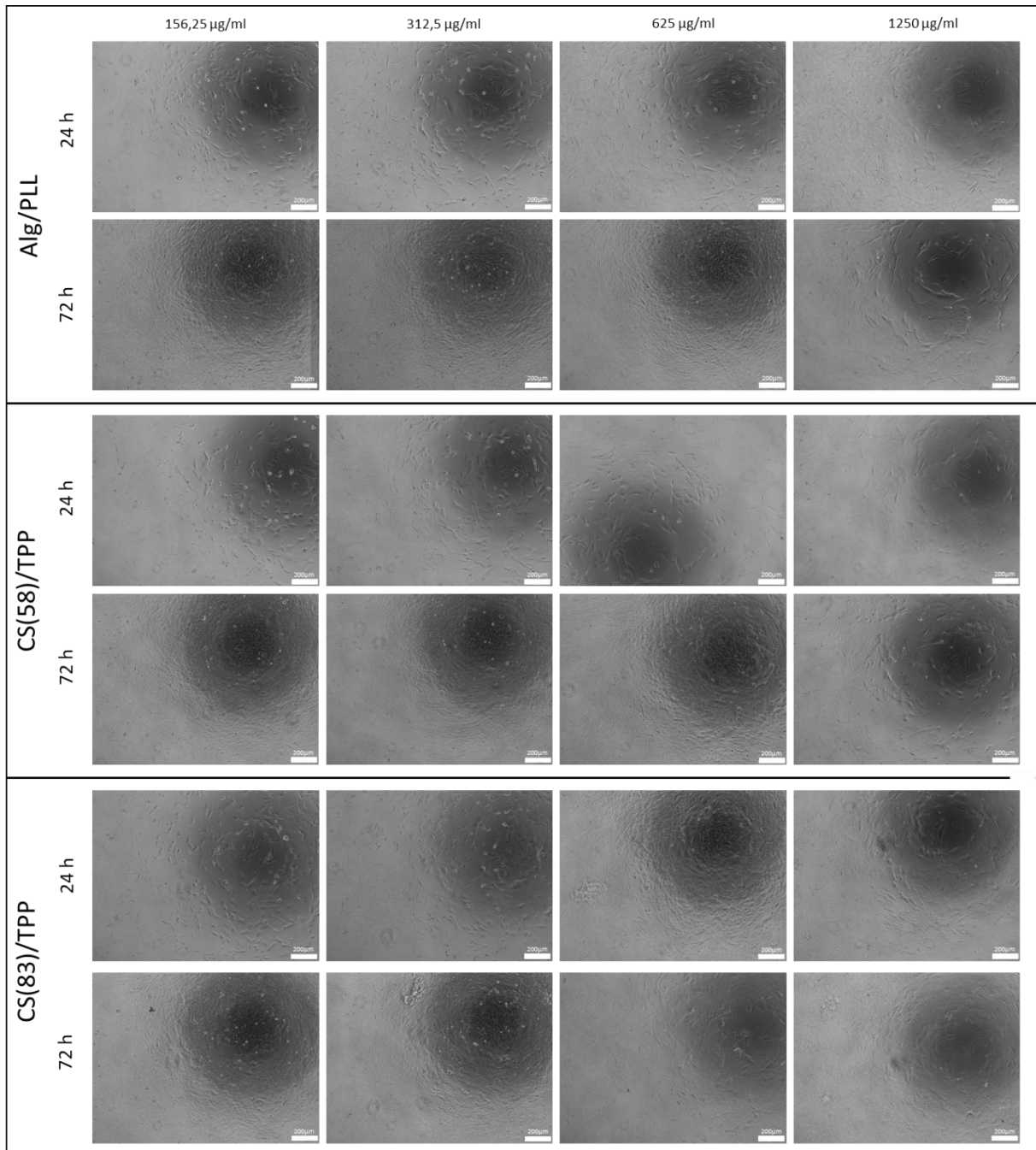
Die CS(58)/TPP-Partikel sind beim Test mit den BRE-Luc-Zellen bis 625 µg/ml nicht zytotoxisch, mit den MSCs an Tag 1 auch noch mit einer Konzentration von 1250 µg/ml nicht. Die Zellviabilität sinkt hier an Tag 3 und Tag 7 auf 53 % bzw. 55 %. Auch die CS(83)/TPP-Partikel zeigen bis 625 µg/ml keine zytotoxischen Effekte bei den C2C12 BRE-Luc-Zellen und den MSCs.



**Abb. 47: Zytotoxizitätsuntersuchungen von organischen CS/TPP und Alg/PLL-Nanopartikeln auf C2C12 BRE-Luc-Zellen und MSCs (MSC 112).** Dargestellt sind die Ergebnisse der Zytotoxizitätsmessung mittels MTT nach 1, 3 und 7 Tagen. Es wurden Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel (A&D) sowie unterschiedlich acetylierte Chitosan/Tripolyphosphat-Partikel (B&E: CS(58)/TPP, C&F: CS(83)/TPP) auf BRE-Luc-Zellen (A-C) und MSCs (D-F) untersucht. Die Messung erfolgte als n=3, gezeigt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung.

Um die Ergebnisse des kolorimetrischen MTT-Assays zu validieren, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der unterschiedlichen Partikel auf den C2C12 BRE-Luc-Zellen und den MSCs nach 24 h und nach 72 h aufgenommen.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 48: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von organischen Nanopartikeln auf C2C12 BRE-Luc-Zellen.** Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von C2C12 BRE-Luc-Zellen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen (156,25 µg/ml, 312,5 µg/ml, 625 µg/ml und 1250 µg/ml) der drei unterschiedlichen organischen Nanopartikel (Alg/PLL, CS(58)/TPP, CS(83)/TPP) behandelt wurden. Die Aufnahmen wurden nach 24 h und 72 h vorgenommen.

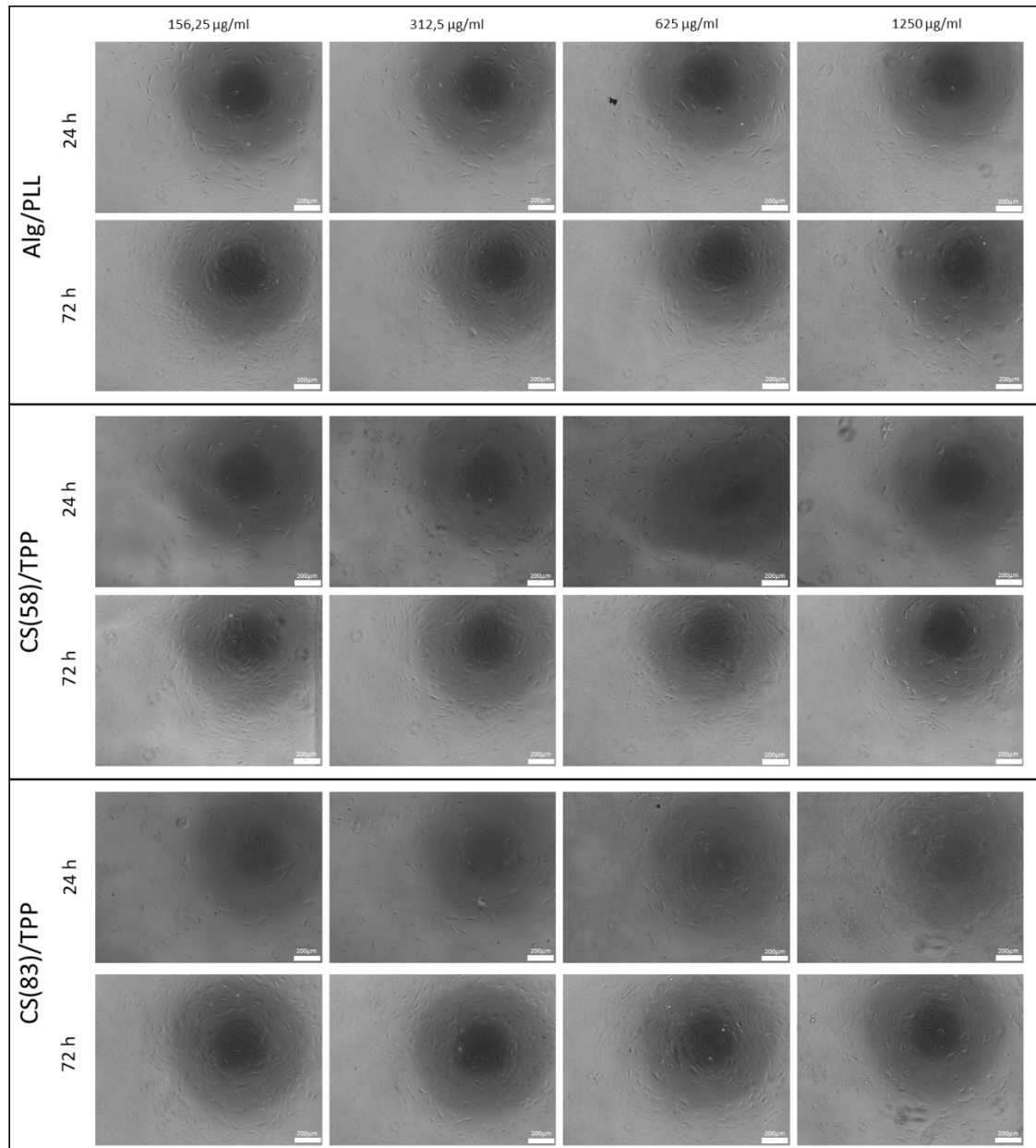
In Abb. 48 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der BRE-Luc-Viabilitätsuntersuchungen mit den organischen Nanopartikeln dargestellt. Die optische Analyse zeigt einen allgemeinen Anstieg der Zellzahl nach 72 h. Die Kultivierung mit 1250 µg/ml führt nach 72 h zu einer geringeren Zellzahl. Dies ist auch bei den Chitosan-Nanopartikeln zu beobachten. Hier sind auch nach 24 h bei den CS(58)/TPP-

Partikeln bei einer Konzentration von 625 µg/ml und 1250 µg/ml weniger Zellen zu sehen. Ähnlich ist die Beobachtung bei den CS(83)/TPP-Partikeln. Es sind nach 24 h bei einer Konzentration von 1250 µg/ml und nach 72 h bei 625 µg/ml und 1250 µg/ml weniger Zellen zu erkennen. Grundsätzlich sehen aber alle sichtbaren Zellen gesund aus.

Ähnliche Beobachtungen können ebenfalls bei den Untersuchungen mit den mesenchymalen Stammzellen gemacht werden (Abb. 49). Hier scheint die Zellzahl im Allgemeinen geringer als bei den C2C12 BRE-Luc-Zellen zu sein.

Analog zu den anorganischen Nanopartikeln wurde auch mit den Chitosan-Nanopartikeln ein funktionaler Test zur Freisetzung von BMP-2 verrichtet. Hierzu wurde eine vierwöchige osteogene Differenzierung von MSC 112 durchgeführt. Getestet wurden die drei verschiedenen Nanopartikel jeweils mit BMP-2 beladen oder unbeladen. Ebenfalls wurde lösliches BMP-2 sowie eine Medienkontrolle mitgeführt. Zum Nachweis von alkalischer Phosphatase wurde ebenfalls ein Nachweis über zytochemische Färbung durchgeführt. Außerdem wurden der Calcium- und Phosphatgehalt der extrazellulären Matrix mittels Alizarinrot S und colorimetrisch der Calcium- und Phosphatgehalt gemessen. Leider waren diese Ergebnisse uneindeutig und werden in dieser Arbeit nicht weiter besprochen. Sie sind aber im Anhang (Abb. A65, Abb. A66, Abb. A67) zu finden. Zusätzlich wurden wiederum Genexpressionsanalysen für bekannte Markergene für die Osteogenese durchgeführt.

## 4. Ergebnisse



**Abb. 49: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zytotoxizitätsuntersuchungen von organischen Nanopartikeln auf MSC.** Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von MSC (MSC 112), die mit unterschiedlichen Konzentrationen (156,25 µg/ml, 312,5 µg/ml, 625 µg/ml und 1250 µg/ml) der drei unterschiedlichen organischen Nanopartikel (Alg/PLL, CS(58)/TPP, CS(83)/TPP) behandelt wurden. Die Aufnahmen wurden nach 24 h und 72 h gemacht.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen sind in Abb. 50 dargestellt. Es werden jeweils die *fold changes* zu der Kontrolle von Tag 0 beschrieben. Hier ergeben sich beim Vergleich der jeweilig gepaarten Konditionen mit und ohne BMP-2 hauptsächlich signifikante Unterschiede bei der Kontrolle mit löslichem BMP-2. An Tag 14 ist ein Anstieg der Genexpression von IBSP zwischen der Kontrolle (14,8) und der mit BMP-2-behandelten Probe (80,9) zu erkennen. An Tag 28 sind diese signifikanten Unterschiede auch bei ALPL (-BMP-2=275, +BMP-2=605), OPN (-BMP-2=273, +BMP-

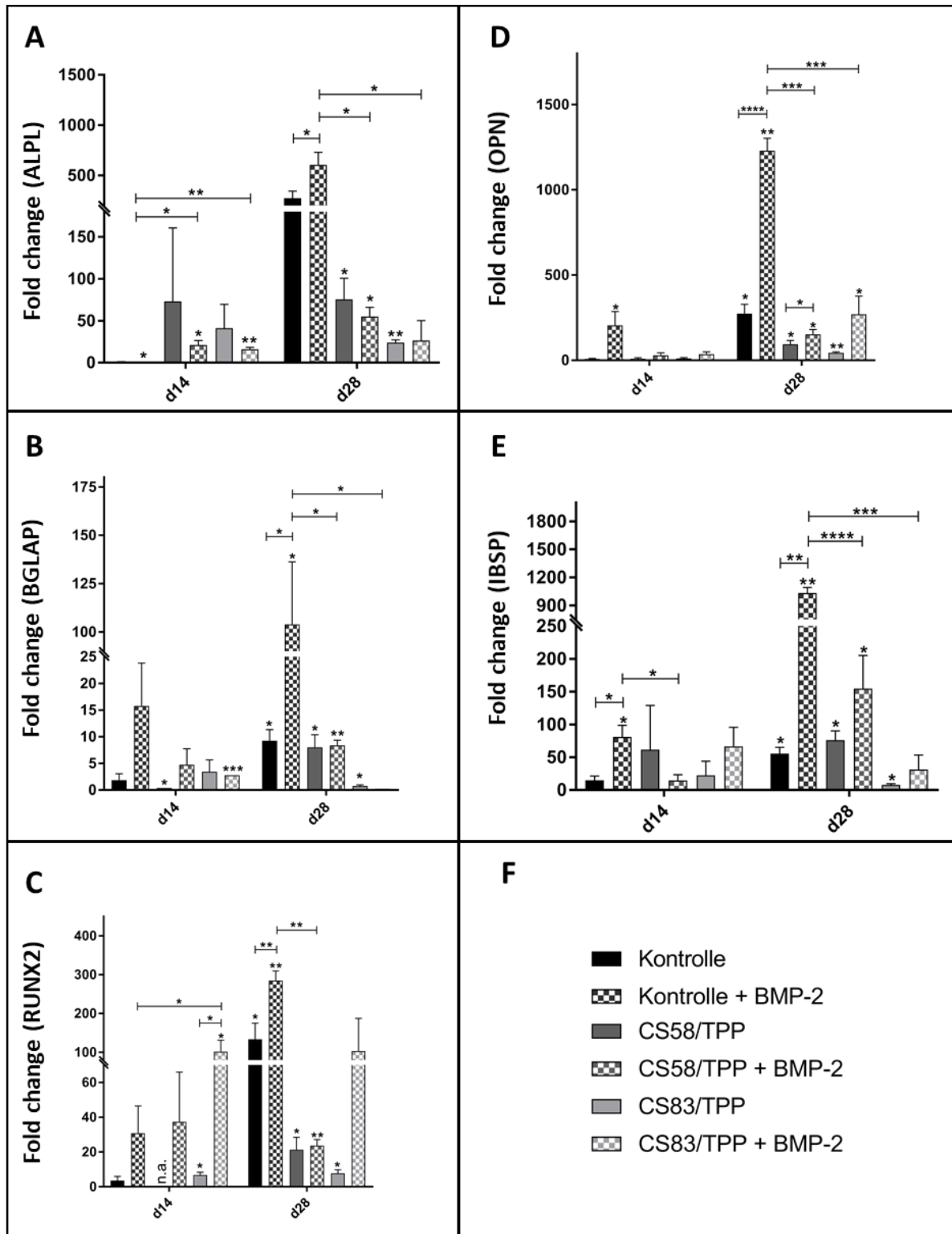
2=1229), BGLAP (-BMP-2=9, +BMP-2=104), IBSP (-BMP-2=55, +BMP-2=1031) und RUNX2 (-BMP-2=134, +BMP-2=285) zu sehen. Die untersuchten Nanopartikel zeigen wenige signifikante Änderungen in der Genexpression. An Tag 14 ist bei CS(83)/TPP eine signifikant erhöhte Expression von RUNX2 bei den mit BMP-2 beladenen Partikeln (102) im Gegensatz zu den unbeladenen Partikeln (6,8) zu sehen. Aber auch bei ALPL, IBSP und OPN ist ein Trend zu einer höheren Genexpression der mit BMP-2-beladenen Partikel zu erkennen.

Die mit BMP-2-beladenen CS(53)/TPP-Partikel zeigen einen signifikanten Anstieg der OPN-Expression an Tag 28 (-BMP-2=94, +BMP-2=153), aber auch hier sind bei OPN, BGLAP, IBSP und RUNX2 leicht erhöhte Genexpressionen beim Einsatz von BMP-2 zu erkennen.

Entsprechende Untersuchungen zur Veränderung der Genexpression nach 14- bzw. 28-tägiger Kultivierung wurden auch mit den Alg/PLL-Nanopartikeln durchgeführt. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse nach der quantitativen Real-Time-PCR sind in Abb. 51 dargestellt.

Hier sind bei den beiden Genen OPN und RUNX keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den unbeladenen Kontrollen und den mit BMP-2-beladenen Nanopartikeln zu ermitteln. Die Expression von IBSP ist sowohl an Tag 14 (Kontrolle = 6,6, BMP-2 = 23) als auch an Tag 28 (Kontrolle = 26, BMP-2 = 129) erhöht.

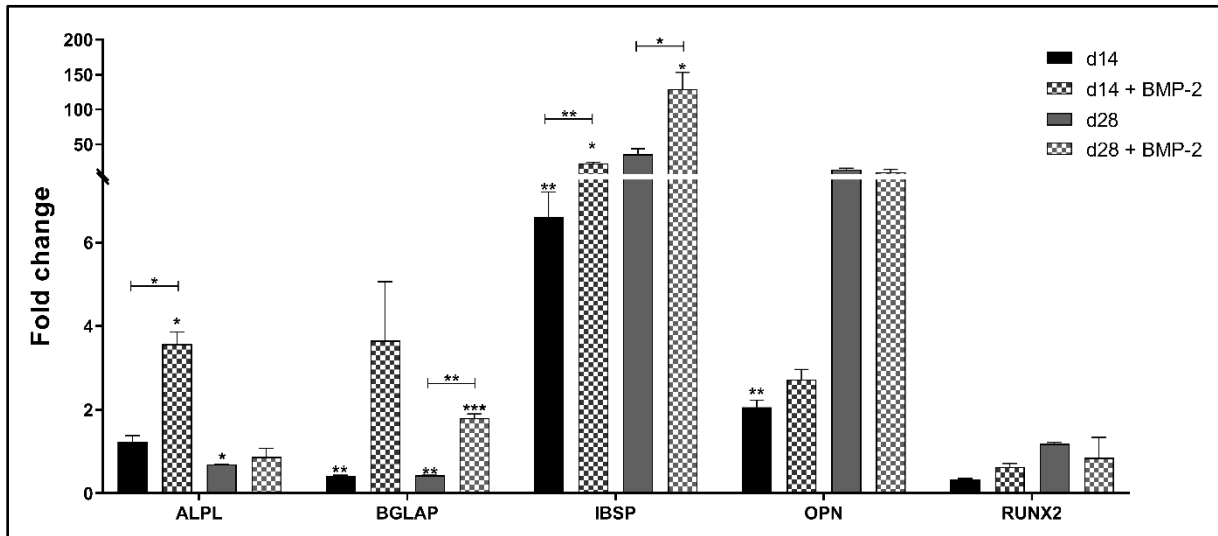
Die veränderten Genexpressionen von ALPL und BGLAP weisen allgemein sehr geringe Werte auf. Hier sind dennoch Unterschiede zu erkennen. So unterscheiden sich an Tag 14 (Kontrolle = 1,23, BMP-2 = 3,57) die Expressionen von ALPL leicht voneinander. An Tag 28 sind diese wieder reduziert (Kontrolle = 0,69, BMP-2 = 0,87). Auch die BGLAP-Expression von den BMP-2-beladenen Alg/PLL-Partikeln ist an Tag 14 höher (3,65) als die der Kontrolle (0,42). An Tag 28 ist dieser Unterschied etwas geringer (Kontrolle = 0,43, BMP-2 = 1,8).



**Abb. 50: Genexpressionsanalysen ausgewählter osteogener Markergene nach der osteogenen Differenzierung mit Chitosan-Nanopartikeln.** Dargestellt sind die ermittelten *fold changes* der Genexpression zur Kontrolle, die ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren kultiviert wurde. Es wurden die Expressionen der Gene ALPL (A), BGLAP (B), RUNX2 (C), OPN (D) und IBSP (E) nach 14 und nach 28 Tagen analysiert. In F ist die Legende dargestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus  $n=3$  Proben mit Standardabweichungen. In A – E sind die Abweichungen zwischen den Kontrollen und den BMP-2

## 4. Ergebnisse

enthaltenen Proben (durch Balken) sowie die Abweichungen zu Tag 0 (durch einzelne statistische Signifikanzen) dargestellt.



**Abb. 51: Genexpressionsanalysen ausgewählter osteogener Markergene nach der osteogenen Differenzierung mit Alginat/PLL-Nanopartikeln.** Dargestellt sind die ermittelten Genexpressionsveränderungen (*Fold change*) im Vergleich zur Kontrolle, die ohne Zugabe von Differenzierungsfaktoren kultiviert wurde. Es wurden die Expressionen der Gene ALPL, BGLAP, IBSP, OPN und RUNX2 nach 14 und nach 28 Tagen analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus  $n=3$  mit Standardabweichungen. Die statistische Signifikanz ist durch den p-Wert angegeben. Hier sind die Abweichungen zwischen den Kontrollen und den BMP-2 enthaltenden Proben (durch Balken) sowie die Abweichungen zu Tag 0 (durch einzelne Sterne) dargestellt.



## 5 Diskussion

In dieser Arbeit werden im ersten Teil die osteogene Differenzierung der MSCs von verschiedenen Spendern sowie der Einfluss unterschiedlicher Differenzierungszutaten auf die Qualität der Differenzierung untersucht. Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Freisetzung und den biologischen Nachweis von BMP-2. Hierbei wird der Fokus auf die spätere Einbindung des Wachstumsfaktors in das Implantat für die Rotatorenmanschette gesetzt.

Die ermittelten Ergebnisse wurden im vorherigen Kapitel beschrieben und werden im Folgenden im Hinblick auf bereits veröffentlichte Erkenntnisse auf deren Relevanz und Anwendbarkeit genauer beleuchtet. Insbesondere für die Weiterführung der Arbeiten in der Forschergruppe „Gradierte Implantate“ helfen diese Erkenntnisse zielführende Ergebnisse zu erzielen.

### 5.1 Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung

#### 5.1.1 Osteogenes Potential von mesenchymalen Stammzellen aus verschiedenen Spendern

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit genauer beschrieben (4.1.1), wurden Zellen von 17 Spendern im Hinblick auf ihr osteogenes Potential untersucht. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um das Ausmaß und die Reproduzierbarkeit der osteogenen Differenzierung von MSCs unterschiedlicher Spender zu beurteilen.

Um das grundsätzliche osteogene Potential zu bestimmen, wurden die in der Literatur am häufigsten verwendeten Faktoren zur Einleitung der osteogenen Differenzierung verwendet: 100 nM Dexamethason oder 200 ng/ml BMP-2 sowie in allen Fällen 50 µM Ascorbat-2-Phosphat und 10 mM β-Glycerophosphat.

Zum Nachweis der erfolgreichen Differenzierung wurden die differenzierten Zellen nach 21 Tagen fixiert und gefärbt, um mittels der Alizarinrot S- und der von Kossa-Färbung jeweils den Calcium- und den Phosphatgehalt der differenzierten Zellen nachzuweisen. Einige der Zellschichten lösten sich während des Färbeprozesses allerdings ganz oder teilweise ab, was eine weitere Analyse unmöglich machte. Die Analyse der übrigen Zellen wies eine sehr geringe Quote an positiv gefärbten Zellen auf. Bei der Differenzierung mit BMP-2 zeigte nur ein Spender (MSC 112) eine positive Alizarinrot S-Färbung, mit Dexamethason vier Spender (MSC 59, MSC 77, MSC 111, MSC 112). Andere Spender zeigten eine schwache rote Färbung. Hier handelt es sich entweder um Artefakte, die durch Färbung von Zelldebris entstanden sind, oder eine bisher weniger weit vorangeschrittene Differenzierung. Diese Unterscheidung lässt sich mit den bekannten Informationen nicht weiter treffen.

Die Bildung von Calciumphosphat konnte mittels der von Kossa-Färbung nur bei den Spendern MSC 59 und MSC 112, die 21 Tage mit Dexamethason differenziert wurden, bestätigt werden.

Als zweite unabhängige Methode wurden die Extrakte der Zellen durch ein kolorimetrisches Nachweisverfahren erneut im Hinblick auf den Calcium- und Phosphatgehalt analysiert. Dabei bestätigten sich einige der zuvor ermittelten Zellpräparationen als Bildner von Hydroxyapatit, und zwar die Zellen der Spender MSC 59, MSC 72, MSC 77 und MSC 112.

Da Dexamethason in Kombination mit anderen Zytokinen ebenfalls die adipogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen einleitet [142], ist die Beobachtung von Fettbläschen auf den Zellen einiger Spender, die durch die Oil Red O-Färbung bestätigt wurde, naheliegend. Es wurde bereits bestätigt, dass das Schicksal der Differenzierung der Zellen in Abhängigkeit bestimmter Faktoren entschieden wird [143]. Die genaue epigenetische Untersuchung der Unterschiede zwischen den Chargen, die sich eher in die adipogene, und denen, die sich eher in die osteogene Differenzierung bewegen, führte aber in Rahmen dieser Arbeit zu weit und sollte in nachfolgenden Arbeiten noch genauer untersucht werden.

Alle im Ergebnisteil dargestellten Ergebnisse wurden in Tabelle 6 zur besseren Übersicht noch einmal zusammengestellt. Hier wurden die jeweils als positiv befundenen Testergebnisse farbig hervorgehoben. Alle weißen Felder bedeuten also, dass kein positives Testergebnis erzielt wurde. Die unterschiedlichen Intensitäten der Farben zeigen z.B. die Intensität der Färbung, zum Beispiel wies Spender 112 eine besonders starke Alizarinrot S-Färbung auf, Spender 59 eine mittelstarke und Spender 55 noch eine schwache Färbung.

Tabelle 6: Übersicht der Ergebnisse der Untersuchungen zum osteogenen Potential von MSCs unterschiedlicher Spender.

Donor #	Passage bei Aussaat	Geschlecht	Alter	Alizarinrot S-Färbung	Von Kossa-Färbung	Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung	ORO-Färbung
42	5	weiblich	42				
55	5	männlich	36				
59	6	männlich	52				
72	6	weiblich	69				
76	4	weiblich	74				
77	4	weiblich	81				
101	4	weiblich	45				
108	3	männlich	60				
109	3	männlich	63				
111	3	männlich	79				
112	4	weiblich	76				
115	4	männlich	79				
122	3	weiblich	72				
125	3	weiblich	71				
126	3	männlich	?				
127	3	weiblich	48				
128	4	weiblich	41				

Obwohl sowohl mit der Alizarinrot S- als auch mit der von Kossa-Färbung und dem kolorimetrischen Nachweis Calcium-Ionen auf unterschiedliche Weise nachgewiesen werden, können hier nicht immer alle drei Assays übereinstimmend den Fortschritt der osteogenen Differenzierung dokumentieren. Spender 72, zum Beispiel, weist keine positive Alizarinrot S-Färbung auf, zeigt aber bei der Durchführung mittels von Kossa-Färbung eine leicht erhöhte Anlagerung von Silberionen und der kolorimetrische Nachweis von Calcium-Ionen in Zellextrakten ergibt 6  $\mu\text{M}$  bei der Differenzierung mit BMP-2 und ca. 20  $\mu\text{M}$  mit Dexamethason. Im Vergleich zu vorherigen Untersuchungen, bei denen der kolorimetrische Nachweis von Calcium genutzt wurde, handelt es sich hierbei um geringe Werte, in Schäck *et al.* konnten bis zu 12 mM Calcium nachgewiesen werden [61].

Da die Genexpression grundsätzlich schneller abläuft als die nachfolgende Proteinbiosynthese, sollte diese in weiteren Versuchen ebenfalls analysiert werden.

Es scheint so, als ob die Geschwindigkeit der osteogenen Differenzierung von Spender zu Spender variiert. Einige Zellen sind nach 21 Tagen noch in einer früheren Phase der Differenzierung, während der die bekannten Markergene einer frühen Differenzierung, ALPL und IBSP, nachzuweisen wären, wohingegen andere Chargen bereits kleine Mengen Hydroxyapatit produzieren und die frühen Markergene nicht mehr nachzuweisen wären.

Aufgrund der bei der Durchführung der Arbeit erzielten Erkenntnisse, weisen die Zellen aller untersuchten Spender keine gleich hohe Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung auf. Von den 17 untersuchten Spendern sind nur die Zellpräparationen von fünf Spendern für die Untersuchungen zum Einfluss auf die osteogene Differenzierung geeignet (MSC 59, MSC 72, MSC 76, MSC 111 und MSC 112).

Um den genaueren Hintergründen weiter auf den Grund zu gehen, sind weitere Analysen im Hinblick auf die Genexpression während der Differenzierung sowie zu den epigenetischen Unterschieden der einzelnen Spender notwendig.

### 5.1.2 Einfluss von Differenzierungszutaten

#### 5.1.2.1 Einfluss von unterschiedlichen Phosphatquellen

Aufbauend auf früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde in diesem Teil der Arbeit erneut der unterschiedliche Einfluss von Dexamethason und BMP-2 als Signalinduktoren zur osteogenen Differenzierung betrachtet. Außerdem wurde eine anorganische (3 mM Natriumdihydroxyphosphat,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) mit einer organischen Phosphatquelle (10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat) verglichen, um die

beste Kombination an Induktionszutaten für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung von MSCs zu ermitteln.

Der Vergleich der verschiedenen Bedingungen wurde durch lichtmikroskopische Bilder festgehalten. Dabei zeigte sich bei allen Konditionen eine erhöhte Zelldichte, die wesentlich ausgeprägter in den induzierten Differenzierungsansätzen als in den nicht induzierten Kontrollen war. Weiterhin sind bei allen Konditionen Ablagerungen zu finden, die am häufigsten bei der Kombination Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Asc/Dex auftreten, gefolgt von β-GP/Asc/Dex und β-GP/Asc/BMP-2. Nahezu keine Ablagerungen finden sich bei der Differenzierung mit Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Asc/BMP-2.

Bei diesen Ablagerungen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um extrazelluläre Matrix oder um Hydroxyapatit, welches im Laufe der Differenzierung von den sich gebildeten Osteoblasten abgegeben wird. Um diese Annahme zu bestätigen, wurden die Extrakte der Zellen gewonnen, um aus diesen den Calcium- und Phosphatgehalt zu ermitteln. Diese kolorimetrische Analyse des Calcium- und Phosphatgehalts bestätigt diese Beobachtung, dass sich hier Hydroxyapatit eingelagert hat. In der Literatur wird das Verhältnis von Calcium zu Phosphat bei Hydroxyapatit in humanem Knochen mit einem Wert von 1,63-1,67 [144] angegeben. In den eigenen Untersuchungen liegt dieses Verhältnis je nach Kondition bei 0,3-1,1. Es spricht dafür, dass hier die osteogene Differenzierung noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Obwohl eine vollständige Vergleichbarkeit zwischen der *in vivo*- und *in vitro*-Situation nicht garantiert werden kann, müssen hier weitere Untersuchungen zur Mineralisierung unternommen werden, um die Gründe für diese Abweichungen besser zu verstehen.

Um die Ergebnisse der Differenzierung noch besser beurteilen zu können, wurde eine Analyse der Genexpression sowohl semiquantitativ als auch quantitativ durchgeführt. Hier zeigte sich eine frühe Expression von ALPL an Tag 7 gefolgt von einer starken Expression von IBSP und OPN bei der Kombination der Differenzierungszutaten BMP-2/ β-GP/Asc. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass insbesondere diese Kombination zu einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung inklusive der gewünschten Genexpression führt.

Zieht man alle ermittelten Ergebnisse dieser Arbeit in Betracht, hat die organische Phosphatquelle β-Glycerophosphat in Kombination mit BMP-2 den effektivsten Einfluss auf die osteogene Differenzierung. In der zuvor erschienenen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe wurde die anorganische Phosphatquelle Natriumdihydroxyphosphat in Kombination mit Dexamethason als geeignet beschrieben [61]. Allerdings wurden in dieser Publikation auch nur die beiden Phosphatquellen miteinander verglichen und kein Vergleich zwischen Dexamethason und BMP-2

vorgenommen. Da in dieser Arbeit beide Kombinationen untersucht wurden, lässt sich schlussfolgern, dass eine Kombination aus BMP-2 und  $\beta$ -Glycerophosphat eine erfolgreichere osteogene Differenzierung induziert als die Kombination aus Dexamethason und Natriumdihydroxyphosphat.

Da bereits im vorherigen Teil dieser Arbeit das unterschiedliche osteogene Potential verschiedener Spender von MSC festgestellt wurde, muss man auch hier betrachten, ob es spenderspezifische Unterschiede gibt. Dafür wäre es allerdings nötig, geeignete Strategien zu finden, da eine Vielfalt zellulärer Prozesse hierfür infrage kommt. Mit einer genaueren Kenntnis spenderspezifischer Unterschiede könnten sodann bessere Strategien für eine *in vitro*-Differenzierung der Zellen entwickelt werden.

### 5.1.2.2 Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Konzentrationen der Induktionszutaten

Wie auch schon in 5.1.1 beschrieben, zeigt sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten der starke Einfluss von Dexamethason auf die adipogene Differenzierung der MSC. Die ermittelten Ergebnisse zeigen, dass sich der Einsatz von Dexamethason als Differenzierungszutat sehr stark auf die Expression der adipogenen Markergene FABP und PPAR $\gamma$  auswirkt und im Gegensatz zu BMP-2 nur einen sehr geringen positiven Einfluss auf die Expression der osteogenen Markergene zu haben scheint. Unter Umständen ist die hier eingesetzte Menge zu hoch, um die Zellen in eine osteogene Linie zu differenzieren. Diese Annahme wird auch durch eine neue Publikation von Elena Della Bella *et al.* bestätigt, sie zeigt, dass eine geringere Konzentration von Dexamethason (10 nM) die Markerexpression von IBSP und BGLAP verstärkt und gleichzeitig zu einer geringeren Konzentration von Adiponektin, einem weiteren Markergen für Adipogenese, führt. Weiterhin wird hier postuliert, dass, obwohl auch eine kurzzeitige Zugabe am Anfang der Differenzierung schon vorteilhafter für die Zellen ist, ein vollständiges Ersetzen von Dexamethason durch andere Strategien oder Faktoren die orthopädische Forschung wesentlich verbessern würde. Dabei sind insbesondere Faktoren nötig, die die Expression von SOX9 herunterregulieren, aber dabei die Hochregulation der PPAR $\gamma$ -Expression nicht induzieren [145]. Für folgende Experimente sollte auch die Untersuchung von geringeren Dexamethasonkonzentrationen in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz dazu zeigt BMP-2 bereits in einer Konzentration von 100 ng/ml einen positiven Einfluss auf die Osteogenese, weil hier bereits eine erhöhte Genexpression von ALPL an Tag 14 und OPN an Tag 21 zu beobachten ist. Die optimale Genexpression ist allerdings eher durch den Einsatz einer 200 ng/ml konzentrierten Lösung gewährleistet. Diese Konzentration wurde daher auch im zweiten Teil dieser Arbeit für die Freisetzungsexperimente als Kontrolle eingesetzt.

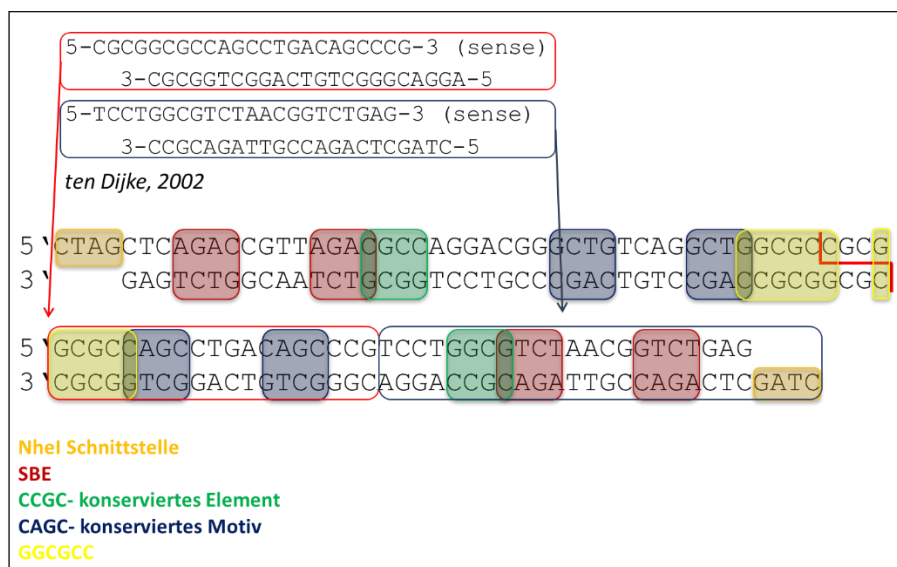
Wie bereits zuvor beschrieben sind die Genexpression, die Bildung und der mögliche Nachweis von Hydroxyapatit zeitlich versetzte Ereignisse. Dies erklärt die Tatsache, dass bei diesem Experiment weder durch histologische noch durch kolorimetrische Färbungen Hydroxyapatit nachgewiesen werden konnte. Auch hier müssen weitere Untersuchungen erfolgen, die den Einfluss einer längeren Differenzierungsphase auf die Bildung von Hydroxyapatit genauer beleuchten.

## 5.2 BMP-2 als Teil eines Implantats – Freisetzung, Lagerung & Aktivität

### 5.2.1 BMP-2 Aktivitätsnachweis

#### 5.2.1.1 BRE-Luc- Plasmidnachweis in den Zellen & Sequenzierung

Das ursprüngliche DNA-Plasmid wurde der Arbeitsgruppe von den Herstellern zur Verfügung gestellt und daher zunächst nicht in seiner Qualität hinterfragt. In der hier vorgelegten Arbeit wurde nunmehr eine Sequenzierung vorgenommen. Bei dieser Sequenzierung ergab sich eine Diskrepanz mit der von den Herstellern veröffentlichten Sequenz, die in der folgenden Abbildung noch einmal dargestellt ist (Abb. 52). Das in unserer Arbeitsgruppe verwendete Plasmid enthält nur eine Hälfte der beschriebenen palindromischen Sequenz und wird nur sehr gering in den verwendeten Zellen exprimiert. Dies ist in den Ergebnissen durch die Sequenzierung und die PCR dargestellt (4.2.1.1).



**Abb. 52: Grafische Darstellung des BMP-Responsiven Elements nach Korchynskiy *et al.*.** Dargestellt ist die Struktur des BRE-Luc-Elements, wie es im Paper beschrieben ist, zur Veranschaulichung in grafischer Form und mit farbiger Legende.

Da die im Folgenden erzielten Ergebnisse zeigen, dass die Durchführung des Assays in der aktuellen Form dennoch funktioniert, wurden die Zellen mit dem enthaltenen Plasmid so in dieser Arbeit verwendet.

Parallel dazu wurde eine Gensynthese in Auftrag gegeben, mit dem Ziel, das in der Publikation beschriebene Element komplett nachzubauen und eine neue Zelllinie zu etablieren. Unsere Erwartung war es, durch eine exaktere Nachbildung des BRE-Elements ein noch sensitiveres Nachweisverfahren entwickeln zu können. Leider stellte sich sowohl die Gensynthese als auch die darauffolgende Klonierung als sehr schwierig dar. Die genauen Schwierigkeiten während der



Synthese wurden vom Hersteller nicht weiter benannt. Allerdings lässt sich vermuten, dass sich aufgrund der in Abb. 52 dargestellten palindromischen Sequenz eine Haarnadelstruktur bildet, die eine weitere Addition von Basen bzw. nachfolgend die weitere Handhabung einschließlich Klonierung als sehr herausfordernd gestaltet, da diese Strukturen das fehlerfreie Ablesen von DNA durch Polymerasen erschweren oder verhindern [146], [147].

Da sich hier auch nach wiederholten Bemühungen keine zufriedenstellenden Ergebnisse produzieren ließen, wurde dieses Projekt in der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt.

### 5.2.2 BRE-Luc-Etablierung

Der BRE-Luc-Assay, der bereits seit einigen Jahren für den Bioaktivitätsnachweis von BMP-2 genutzt wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit so etabliert, dass mehr Proben gleichzeitig und vergleichbarer miteinander gemessen werden können. Hierzu wurde der Assay neu auf ein 96-Loch-Platten-Format ausgelegt und einige der Reagenzien sowie Schritte in den Methoden angepasst.

Naheliegender ist der Befund, dass die gemessenen RLU-Werte bei der Durchführung des Assays im 24-Loch-Platten-Format deutlich höher sind. Hier werden mehr Zellen, die das BRE-Luc-Plasmid enthalten, und mehr Luziferase-Substrat eingesetzt. Dadurch erhöht sich der gemessene relative Wert der Lichteinheiten erheblich.

Dennoch zeigt sich bei der Durchführung mit der 96-Loch-Platten-Methode eine reduzierte Standardabweichung für die Standardreihe mit definierten BMP-2-Mengen. Diese wird bereits deutlich, wenn man nur die Doppelbestimmung betrachtet. Dies ist unter anderem durch die veränderte Methodik zu begründen. Bei der Messung im 24-Loch-Platten-Format werden die Proben lysiert, in Eppendorf-Gefäße überführt, zentrifugiert und anschließend in einer 96-LP vermessen. Bei der Durchführung der Messung mit der 96-LP-Methode erfolgt die Lyse und die anschließende Messung der Luziferase-Aktivität in der gleichen Platte. Somit werden Pipettierungenauigkeiten und weitere äußere Einflüsse maßgeblich reduziert.

FCS bzw. dessen Bestandteile haben ebenfalls einen großen Einfluss auf den BRE-Luc-Assay. Eine Durchführung des Assays mit Benutzung von 10 % FCS-haltigem Medium ist zwar möglich, führt aber zu einem weit höheren Basalwert, welches zu Abweichungen insbesondere im kleinen Konzentrationsbereich führen kann. Das liegt daran, dass hier das FCS einen höheren Messwert als das im Medium befindliche BMP-2 hervorruft und die Messung damit verfälscht.

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, wie wichtig ein zusätzlicher Wachschrift bei der Durchführung des Assays ist, da insbesondere Reste von FCS, die ungleichmäßig auf die

verschiedenen Proben verteilt auftreten können, große Streuungen im Luziferase-Signal und damit den erhaltenen Meßwerten hervorrufen.

Weiterhin wurde betrachtet, inwiefern das Einfrieren einen Einfluss auf die Luziferase-Aktivität hat. Dabei zeigte sich ein erheblicher, fast vollständiger Signalverlust bei der Messung der zuvor eingefrorenen Proben. Eine sofortige Messung der Proben ist also unabdinglich, da durch das Einfrieren der Proben keine zuverlässigen Messergebnisse mehr erzielt werden können.

### 5.2.2.1 Kinetik zur Ermittlung des besten Messzeitpunkts

Der BRE-Luc-Assay beruht auf der Aktivierung des ID1-Promotors, welches nachfolgend zur Transkription und Translation des Luziferase-Gens führt. Dies ist ein biologischer Vorgang, der einige Stunden in Anspruch nimmt. Wann genau der beste Zeitpunkt ist, um die Messung durchzuführen, wurde in diesem Versuchsteil untersucht.

Die RNA-Expression von *Id1* konnte bei der Untersuchung von C2C12-Zellen bereits 1 h nach der Behandlung mit BMP-2 nachgewiesen werden [82]. Die Proteinexpression von Id1 konnte bereits nach 4 h erwiesen werden [148]. Hierbei handelt es sich allerdings um eine qualitative Beobachtung der Proteinexpression, bei der keine Unterschiede in der Expressionshöhe zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht wurden.

Auch in unserem Assay kann bereits nach 3-stündiger Inkubation mit den BRE-Luc-Reporterzellen ein Luziferase-Signal gemessen werden. Dieses ist allerdings noch sehr schwach und insbesondere die klare Eingrenzung der verschiedenen Konzentrationen BMP-2 ist zu einem so frühen Zeitpunkt noch nicht möglich. Die höchsten Messsignale wurden nach 17-24h gemessen, hier ist es sehr gut möglich, eine Gerade mittels linearer Regression durch die verschiedenen Messpunkte zu legen und auf diese Weise eine Standardreihe zu erhalten, mit Hilfe dieser die Konzentrationen der eingesetzten Proben ermittelt werden können.

Daher wurden alle Messungen nach 17-24-stündiger Inkubation mit den Testsubstanzen durchgeführt. Selbstverständlich wurde hier darauf geachtet, dass die Messung aller zu einem Experiment gehörenden Proben nach der gleichen Inkubationszeit erfolgte.

### 5.2.2.2 Einfluss von Phenolrot im Medium auf die Genauigkeit der Messergebnisse

Phenolrot im Zellkulturmedium hat bei einigen anderen Assays Auswirkungen auf das Messergebnis. Insbesondere bei der Anwendung mit Fluoreszenzmessungen gibt es interessante Beobachtungen, die ein erhöhtes Hintergrundsignal beim Einsatz von Phenolrot-haltigem Medium messen [149]. Aus

diesem Grund wurde hier ebenfalls untersucht, inwiefern Phenolrot auf die Messergebnisse des BRE-Luc-Assays Einfluss nimmt.

Der Vergleich der Messergebnisse mit und ohne Phenolrot im Medium zeigt, dass die Kurve ohne Phenolrot einen steileren Verlauf aufweist, außerdem sind insbesondere im hohen Konzentrationsbereich die gemessenen relativen Lichteinheiten insgesamt höher als bei der Messung mit phenolrothaltigem Medium. Dennoch zeigt die lineare Regression aus den Messpunkten bei beiden Standardreihen eine sehr gute Anpassungsgüte, welche durch das Bestimmtheitsmaß, das bei beiden Regressionen bei  $>0,99$  liegt, gezeigt wird. Ebenfalls wird bei der Betrachtung der kleineren Konzentrationen von BMP-2 deutlich, dass auch hier die gemessenen RLU/sec so gering sind, dass keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Messmethoden festgestellt werden können. Die Anwesenheit von Phenolrot im Medium führt hier sogar zu einem höheren Signal. Diese Erkenntnis zeigt, dass durch Verzicht auf Phenolrot keine Erhöhung der Sensitivität erzielt werden kann. Der BRE-Luc-Assay kann im Allgemeinen zwischen einer BMP-2-Konzentration von ca. 5 ng/ml bis 1000 ng/ml zuverlässige Messergebnisse liefern.

#### **5.2.2.3 Vergleich des Alkalische Phosphatase-Assays und des BRE-Luc-Assays zur Bestimmung der biologischen Aktivität von BMP-2**

Zum Vergleich der verschiedenen Verfahren zum Bioaktivitätsnachweis von BMP-2 wurden hier die Ergebnisse aus dem Alkalische Phosphatase-Assay und dem BRE-Luc-Assay miteinander verglichen. Beide Assays sind sehr gut geeignet, um die Bioaktivität von BMP-2 nachzuweisen, allerdings beruhen die beiden Assays auf unterschiedlichen Prinzipien. Während der BRE-Luc-Assay auf der Aktivierung eines Promotors eines frühen Antwortgens (Id1) von BMP-2 basiert, ist beim Alkalische Phosphatase-Assay die Transkription des Alkalische Phosphatase-Gens sowie die anschließende Translation in das entsprechende Enzym als BMP-2-Antwort notwendig, um ein Signal zu generieren.

Dementsprechend ergibt sich bereits ein zeitlicher Unterschied. Wie an den Ergebnissen sichtbar wird, liefert der ALP-Assay erst nach 7 Tagen zufriedenstellende Ergebnisse, wohingegen der BRE-Luc-Assay bereits nach 24 h ausgewertet werden kann.

Außerdem unterscheiden sich die beiden Assays in der Sensitivität. Mittels BRE-Luc-Assay können BMP-2-Mengen von minimal 5 ng/ml noch nachgewiesen werden. Der ALP-Assay hingegen erfordert mindestens 50 ng/ml, um eine zuverlässige Quantifizierung von BMP-2 zu ermöglichen.

Aufgrund einer Publikation wurde in dieser Arbeit in einigen Experimenten untersucht, inwiefern eine sensitivere Ausführung des ALP-Assay machbar ist [150]. Hier konnte allerdings kein Erfolg verzeichnet werden. Da der BRE-Luc-Assay sich als zeitsparender und sensitiver erwies und für die

Arbeiten zur Verfügung stand, wurden die essenziellen Untersuchungen, wie sie auch im zweiten Teil dieser Arbeit beschrieben werden, ausnahmslos mit dem BRE-Luc-Assay durchgeführt.

#### 5.2.2.4 Normalisierung der Messergebnisse des BRE-Luc-Assays

Um die Vergleichbarkeit der gemessenen BMP-2-Konzentrationen zu gewährleisten und ebenfalls zu verdeutlichen, dass die ausgesäte Zellzahl reproduzierbar ist, wurden verschiedene Methoden zur Normalisierung der Messergebnisse verwendet.

Da bei der Durchführung der 24-LP-Methode des BRE-Luc-Assays Zelllysate hergestellt werden, von denen nicht das komplette Volumen für die Luziferase-Messung benötigt wird, bietet sich eine Untersuchung des Proteingehalts als Normalisierungsmethode an.

Hierzu wurden zwei unterschiedliche Methoden betrachtet, die Bradford-Methode und die BCA-Proteinbestimmung. Es wurde der Proteinstandard BSA im Lysepuffer aufgelöst und daraus eine Konzentrationsreihe hergestellt. Dann wurden die jeweiligen Proteinbestimmungsverfahren durchgeführt.

Wie in den Ergebnissen dargestellt (4.2.1.6) konnte nur mit der BCA-Methode eine lineare Standardreihe erzeugt werden. Mit der Bradford-Methode konnte kein BSA im RLB nachgewiesen werden. Die Inhaltsstoffe des Reporter Lysis Buffer sind nicht bekannt, allerdings enthalten Zelllyse-Puffer in der Regel Detergenzien wie Triton-X, Tween oder SDS, die dabei helfen, Proteine in löslicher Form freizusetzen. Diese alkalischen Detergenzien können einen Einfluss auf den Bradford-Assay haben. Dies wurde bereits von Marion M. Bradford beobachtet [118].

### 5.2.3 BMP- 2 als osteoinduktives Biomolekül

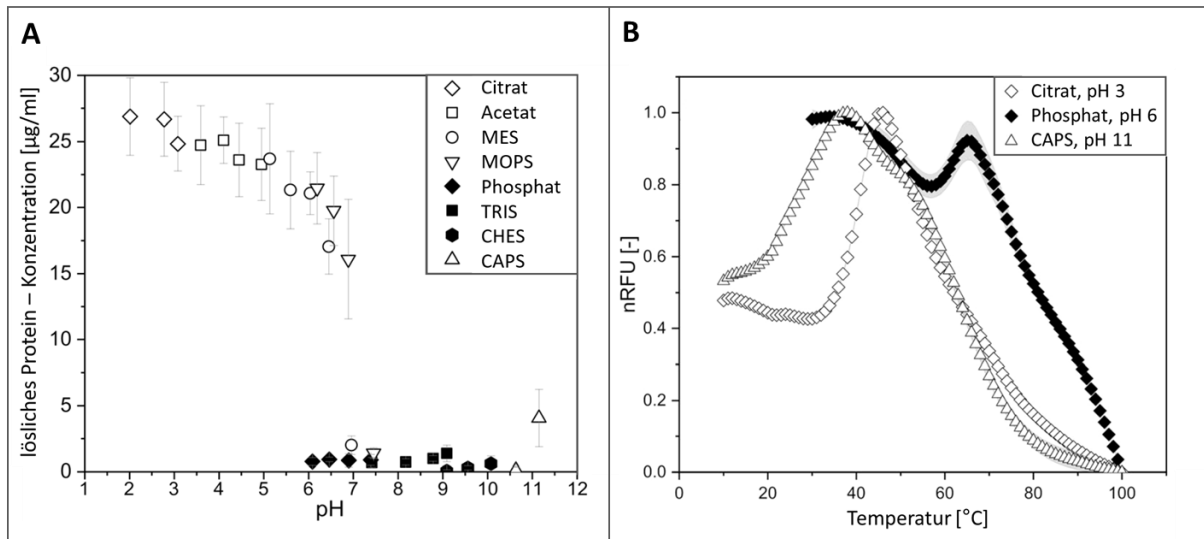
#### 5.2.3.1 Löslichkeitsuntersuchungen von BMP-2

Im Rahmen der Untersuchungen zur Stabilität und biologischen Aktivität von BMP-2 aus *E.coli* wurden in Zusammenarbeit mit BASTIAN QUAAS (Institut für Technische Chemie, Leibniz Universität Hannover) Löslichkeitsuntersuchungen mit BMP-2 in verschiedenen Puffersystemen und bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Neben den in dieser Arbeit näher beleuchteten Bioaktivitätsmessungen (Abb. 39) wurden in der Publikation ebenfalls Analysen zur Löslichkeit und Stabilität mittels dynamischer Lichtstreuung, Thermal Shift Assay und intrinsischen Fluoreszenzmessungen durchgeführt.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Löslichkeit von BMP-2 nicht nur vom pH-Wert, sondern auch vom Puffertyp abhängig ist. Bei einem pH-Wert zwischen pH 2 und pH 5 ist BMP-2 in allen Puffern löslich, wohingegen sich bei pH 6 und pH 7 eine Abhängigkeit vom Puffer zeigt.

Während das Protein im Phosphatpuffer bereits unlöslich ist, löst es sich noch in MES- und MOPS-Puffer. Diese pufferabhängige Löslichkeit ist dadurch begründet, dass es sich bei MOPS und MES um zwitterionische Puffer handelt und der Phosphatpuffer divalente Anionen enthält. Diese vernetzen sich mit den BMP-2 Dimeren, was zur Präzipitation des Proteins führt [139].

Ab einem pH-Wert 7 bilden sich in allen Puffersystemen Präzipitate. Allerdings findet sich hier auch eine Ausnahme. Bei pH 11 ist teilweise lösliches Protein nachweisbar (Abb. 53A).



**Abb. 53: pH- und pufferabhängige Löslichkeit und thermische Stabilität von BMP-2.** (A) Es wurde BMP-2 in 50 mM MES (pH 5) in den dargestellten Puffern zu einer Endkonzentration von 25 µg/ml verdünnt. Die Menge an löslichem BMP-2 wurde nach Über-Nacht-Inkubation bestimmt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung (n=3-5). (B) Temperatur-abhängige SYPRO-Orange Fluoreszenz von löslichem BMP-2 unter saurem (Citrat, pH 3), präzipitiertem BMP-2 bei neutralem (Phosphat, pH 6) und teilweise löslichem BMP-2 unter basischen Konditionen (CAPS, pH 11). Die RFUs in jedem Experiment wurden normalisiert, indem der höchste Wert auf 1 gesetzt wurde (nRFU). Modifiziert nach Quaas *et al.*, 2019 [139].

Neben der Löslichkeit von BMP-2 bei unterschiedlichen pH-Werten wurde ebenfalls die thermische Stabilität der Aggregate untersucht. Dabei zeigte sich, dass die BMP-2-Präzipitate im Phosphatpuffer bei pH 6 die größte Stabilität aufweisen und eine Denaturierung des Proteins erst bei 62 °C erfolgt, wohingegen die Denaturierung schon bei 41 °C bei pH 3 und bei 32 °C bei pH 11 erfolgt (Abb. 53B).

Neben der weiterhin vorhandenen Bioaktivität und der höheren Stabilität der BMP-2-Präzipitate konnte in der Arbeit von Quaas *et al.* ebenfalls gezeigt werden, dass die Proteinpräzipitate nach einer Resuspension in MES-Puffer (pH 5) zu 85-98 % wieder resolubilisiert werden konnten.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen die hohe Bereitschaft von BMP-2, Aggregate zu formen. Bisher wurden insbesondere bei der Anwendung in der biopharmazeutischen Forschung besondere

Anstrengungen unternommen, diese Aggregatbildung zu unterbinden [151]. Die hier gezeigten Ergebnisse und insbesondere die Tatsache, dass die stabileren und dennoch bioaktiven Protein-Präzipitate mit geeignetem Puffer und pH-Wert (MES, pH 5) wieder in ihre ursprüngliche Form resolubilisiert werden können, kann insbesondere bei der Entwicklung von Proteinpräparaten in der klinischen Forschung Innovation ermöglichen.

### 5.2.3.2 Sterilisation von BMP-2

Der Einflusses von Strahlensterilisation auf die Bioaktivität von BMP-2 und die damit verbundenen eventuellen Probleme bei der Sterilisation des gesamten Implantats wurden dies in dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse, die in 4.2.2.2 dargestellt sind, machen deutlich, dass die Strahlensterilisation keinen Einfluss auf die Bioaktivität von BMP-2 hat. In der Literatur wird häufig  $\gamma$ -Strahlung eingesetzt. Diese hat sich als sehr effektive Sterilisationsmethode von biologischen Geweben bewährt und wird außerdem insbesondere bei Wirkstoffabgabesystemen wie PLGA-Nanopartikeln oder Poly- $\epsilon$ -Caprolacton Nanosphären erfolgreich eingesetzt [152]–[154]. Da sowohl BMP-2 als auch TGF- $\beta$  und Smad8 L+MH2 im Zuge der Arbeit der Forschergruppe FOR2180 an Nanopartikel gebunden werden sollen, muss die endgültige Sterilisationsmethode für alle Komponenten funktionieren und wird so bei jedem weiteren Schritt untersucht.

Weiterhin wurden hier die eher geringen Strahlendosen von 15 kGy und 25 kGy untersucht, da sich in der Vergangenheit gezeigt hat, dass diese Dosen keine oder geringe negative Einflüsse auf die Knochenbildung haben. Diese Untersuchungen wurden bereits mit BMP-2, welches auf einem Polyelektrolyt-Multilayer-Film geladen wurde, und mit demineralisierten Knochen durchgeführt. Hier wurden unterschiedliche Strahlendosen von 15 kGy bis 50 kGy miteinander verglichen und deren Effekte auf die Knochenzellendifferenzierung mittels ALP-Assay oder ektopischer Knochenbildung untersucht. Dabei stellt sich in beiden Studien heraus, dass es dosis-abhängige Effekte der Strahlensterilisation auf die Knochenbildung gibt, die bis 25 kGy noch vertretbar sind (Reduzierungen um ca. 25 %). Allerdings zeigte sich, dass eine Strahlendosis von 50 kGy für dieses Anwendungsgebiet zu hoch ist, da hier eine starke Reduktion des gewünschten biologischen Effekts zu beobachten ist [154], [155].

## 5.2.4 Organische und anorganische Nanopartikel und deren BMP-2 Freisetzung

Im Rahmen der Forschergruppe FOR2180 sollen geeignete Carrier für die drei Wachstumsfaktoren BMP-2, TGF- $\beta$  und SMAD8 L+MH2 gefunden werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl anorganische nanoporöse Silica-Nanopartikel als auch organische Chitosan/Tripolyphosphat (CS/TPP)- und Alginat/Poly-L-Lysin (Alg/PLL)-Partikel bezüglich ihres Freisetzungsverhaltens von BMP-2 untersucht.

Die Ergebnisse werden in den folgenden beiden Abschnitten diskutiert.

### 5.2.4.1 Anorganische nanoporöse Silica-Nanopartikel

Diese Arbeit behandelt primär BMP-2 als Wachstumsfaktor in der osteogenen Differenzierung und den Nachweis der Bioaktivität des Wachstumsfaktors. Dazu wurden entsprechende Nanopartikel, die als Carrier des Wachstumsfaktors in Frage kommen, auf Zytotoxizität und die erfolgreiche Freigabe eines bioaktiven Wachstumsfaktors untersucht. Als anorganische Kandidaten wurden in vorherigen Arbeiten bereits die unfunktionalisierten Partikel (SiOH), aminomodifizierte Partikel (SiNH<sub>2</sub>) und NPSNP modifiziert mit einer aminohexylaminopropyl-Gruppe (SiAHAP) identifiziert [125]. Aus diesem Grund wurden diese umfangreicher analysiert.

Zunächst wurde im Rahmen einer Zytotoxizitätsuntersuchung festgestellt, welche Konzentrationen der Nanopartikel für primäre MSC und C2C12 BRE-Luc-Zellen weiterhin eine zufriedenstellende Zellviabilität gewährleisten.

Die Untersuchung der SiOH-Partikel zeigte den geringsten Einfluss auf die Zellviabilität der Zellen. Hier ist eine Unterschreitung des Richtwerts nur an Tag 1 auf den C2C12-BRE-Luc-Zellen zu beobachten (65%).

Die Ergebnisse der anderen beiden Partikel-Modifikationen sind deutlich schlechter in Bezug auf die Zellviabilität. Hier ist an Tag 1 lediglich die geringste Konzentration 10  $\mu\text{g/ml}$  noch im vertretbaren Bereich. Allerdings steigen die Viabilitätswerte an Tag 3 und 7 bei beiden Zelltypen wieder an. Hier wird allerdings auch deutlich, dass die gemessenen Viabilitäten mit den MSC immer geringer sind als mit den BRE-Luc-Zellen.

Es ist nicht verwunderlich, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedlich stark auf die Zugabe von Substanzen reagieren. Insbesondere beim Vergleich einer primären Zelle und einer Zelllinie ist zu erwarten, dass die primären Zellen empfindlicher auf äußere Einflüsse reagieren. Dennoch ist es wichtig festzuhalten, dass auch hier eine Erholung der Zellen, die sich als Wiederaufnahme des Zellzyklus mit Proliferation darstellt, an den späteren Kultivierungstagen stattfindet und diese nicht nach der Exposition der Nanopartikel absterben.

Die Menge an reduziertem MTT ist proportional zu der metabolischen Aktivität der Zellen, was auf die Zellviabilität schließen lässt. Die Zugabe von NPSNP zu den Zellen, die sich auf die Zellschicht legen, kann hier aber zwei unterschiedliche Effekte hervorrufen: Einerseits könnten die Zellen durch die Schicht an Nanopartikeln eine verringerte Nährstoffzufuhr durch das Zellkulturmedium erhalten, da die Oberfläche der Zellen durch die Nanopartikel minimiert wird [156]. Dies führt zu einer verringerten metabolischen Aktivität. Andererseits kann die Zugabe von Fremdfaktoren in die Zellkultur eine Stressreaktion in den Zellen auslösen, die sich als erhöhte metabolische Aktivität äußert [157]. Aus diesem Grund wurden hier die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Zellen genutzt, um den Einfluss der NPSNP auf die Zellen genauer zu untersuchen. Die Aufnahmen bestätigen die zuvor im MTT-Assay gemessenen Daten in Bezug auf die Zellviabilität. Des Weiteren sind insbesondere bei Zugabe von größeren Mengen, 500 µg/ml und 100 µg/ml, der SiNH<sub>2</sub>- und SiAHAP-Partikel sehr viele Aggregate der Nanopartikel zu erkennen, wobei sich diese dennoch gleichmäßig über die Zellschicht verteilen. Die Aggregate korrelieren mit reduzierten Zellzahlen in den entsprechenden Wells. Eine hohe Anzahl an Nanopartikeln, kann, wie auch schon oben beschrieben, die Nährstoff- und Sauerstoffzufuhr behindern und führt daher zu einem reduzierten Zellwachstum. Diese Beobachtungen können sowohl bei den C2C12 BRE-Luc-Zellen als auch bei den MSC gemacht werden, wobei die primären Zellen, wie auch schon bei der Messung mit dem MTT-Assay, eine höhere Sensitivität aufweisen und die Zellzahl viel stärker reduziert ist. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen dieser Arbeit wurde mehr auf die funktionellen Eigenschaften der beladenen Partikel eingegangen. Hierzu wurde zunächst die Effektivität der Beladung der unterschiedlichen Partikelarten untersucht.

Da die Beladung der Silica-Partikel nur indirekt mittels ELISA ermittelt werden kann, indem das nicht gebundene BMP-2 im Beladungsmedium vermessen wird, wurde in dieser Arbeit die direkte Beladung der Partikel mittels BRE-Luc-Assay untersucht. Dazu wurden jeweils 5 mg NPSNP in einer 5 µg/ml BMP-2/MES-Lösung inkubiert und jeweils 500 ng/ml Partikel auf die C2C12-Zellen gegeben. Als Kontrollen wurden der Überstand und das Waschwasser des Waschschruttes mit vermessen, um zu untersuchen, inwieweit an Partikel gebundenes BMP-2 ebenfalls mittels BRE-Luc-Assay vermessen werden kann (Abb. 44). Die Messung zeigte, dass die unmodifizierten SiOH-Partikel nahezu kein aktives BMP-2 gebunden haben. Dies lässt sich auf die vermutlich schwachen Interaktionen zwischen den Wasserstoffbindungen der Silanol-Gruppen der Silica-Nanopartikel und BMP-2 zurückführen. Trotz der positiv geladenen Bindetasche, der Cavity I, die als Heparin-Bindestelle im BMP-2-Dimer postuliert ist [69], scheinen die Wasserstoffbinde-Wechselwirkungen keinen großen Einfluss auf die Adsorption von BMP-2 an die Partikel zu haben.



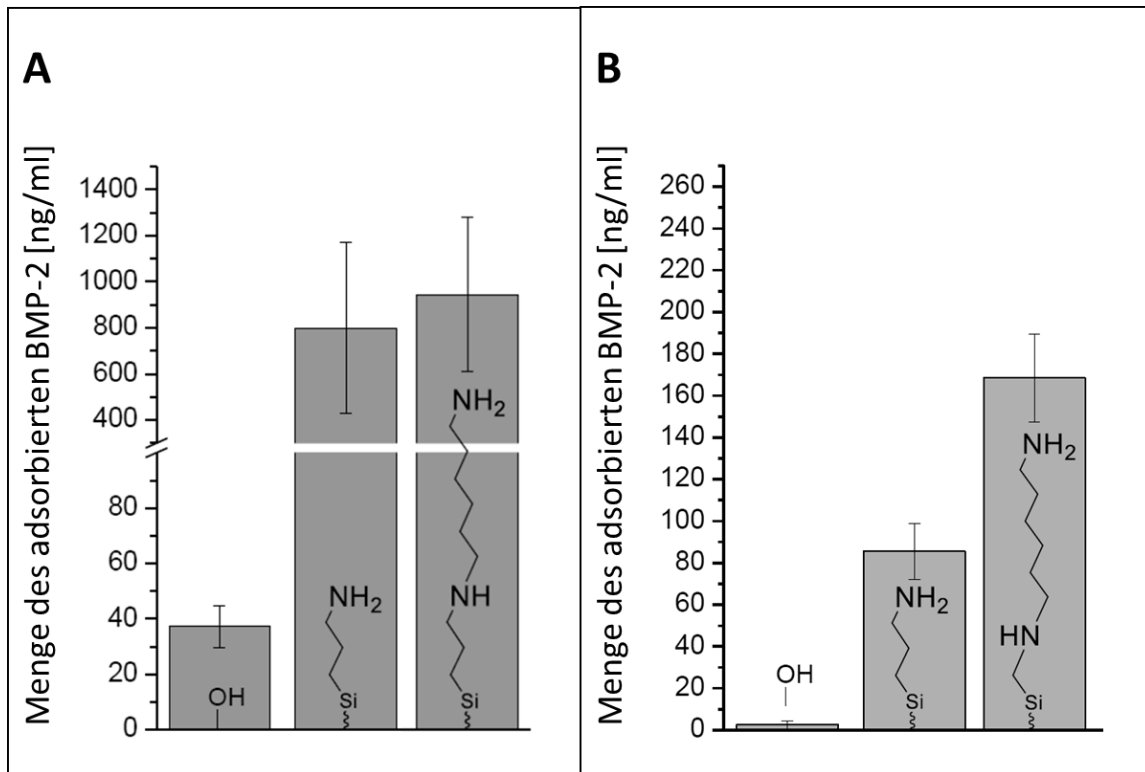
An den NPSNP mit positiv geladenen Stickstoffgruppen, SiNH<sub>2</sub> und SiAHAP, konnten ca. 80 ng/mg bzw. ca. 120 ng/mg BMP-2 mittels BRE-Luc-Assay nachgewiesen werden. Die höhere Adsorptionsrate vom BMP-2 an diesen Partikeln spricht für mögliche elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Stickstoffgruppen und den negativ geladenen Regionen an der Spitze und in der Mitte der konkaven Seite des BMP-2-Dimers, die sogenannte Cavity II. Es handelt sich hierbei um die mögliche Bindestelle für einen der beiden BMP-2-Rezeptoren [125].

Wie zuvor erwähnt, wurden die hier ermittelten Ergebnisse mit denen des ELISA verglichen. Dieser wurde von A.SATALOV durchgeführt und ist in Abb. 54 dargestellt. Auch bei dieser Messung ist die geringste der gemessenen Mengen an BMP-2 37 ng/mg an die unmodifizierten Nanopartikel gebunden. Die beiden anderen modifizierten NPSNP zeigen eine wesentliche höhere Adsorptionsrate von BMP-2, nämlich zwischen 800 ng/mg und 900 ng/mg.

Somit wird hier deutlich, dass die im ELISA gemessenen Werte deutlich höher sind als die im BRE-Luc-Assay ermittelten. Dies wird primär daran liegen, dass im BRE-Luc Assay nur biologisch aktives BMP-2 gemessen wird. Denaturiertes oder durch den Rezeptor nicht zugängliches Protein kann hier nicht erfasst werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass lediglich ein geringer Anteil des partikelgebundenen Proteins tatsächlich biologisch aktiv ist.

Um zu untersuchen, welchen Effekt partikelgebundenes BMP-2 auf die osteogene Differenzierung von MSCs hat, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Vor der eigentlichen Untersuchung der osteogenen Differenzierung wurde hier der Effekt auf die Expression der sogenannten *Immediate Early Gene* Id1 und Id3 untersucht. Hierbei handelt es sich um molekulare Schalter-Gene, die für negativ regulierende Transkriptionsfaktoren kodieren. Durch diese Transkriptionsfaktoren wird die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in andere Richtungen außer der Osteogenese blockiert [158], [159]. Da die vorher untersuchten Si-AHAP Partikel eine kontinuierliche BMP-2-Abgabe zeigten (Abb. 44), wurden diese in diesem Experiment verwendet.



**Abb. 54: Quantifizierung des an NPSNP adsorbierten BMP-2 mittels indirekter ELISA-Messung im Vergleich zur BRE-Luc-Messung.** (A) Indirekte ELISA-Messung durchgeführt von ALEXANDRA SATALOV. (B) BRE-Luc Messung der gleichen Proben. Abbildung modifiziert aus Dissertation A.Satalov [125].

Es wurde nach 2 h die Genexpression von Id1 und Id3 ermittelt. Hierzu wurden Kontrollen ohne BMP-2 jeweils mit löslichem BMP-2 und partikelgebundenem BMP-2 verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 dargestellt. Auch wenn hier keine signifikanten Änderungen an der Genexpression ermittelt werden konnten, ist dennoch sichtbar, dass die Genexpression nach 2-stündiger Inkubation mit partikelgebundenem BMP-2 höher ist als die mit löslichem BMP-2. Ebenfalls ist zu sehen, dass die nicht beladenen Partikel eine Genexpression, die mit der von löslichem BMP-2 ausgelösten Genexpression vergleichbar ist, induzieren. Die Beobachtung, dass auch unbeladene Silica-Partikel einen positiven Einfluss auf die osteogene Differenzierung haben können, ist nicht neu. Diese wurde bereits in Yang *et al.* [160] publiziert. Außerdem ist bekannt, dass die Differenzierung durch die Freisetzung von Silicium durch die lysosomale Degradation der Partikel in den Zellen positiv beeinflusst wird. Dies wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen thematisiert [161]–[164].

Dennoch wird dieser Effekt durch die Anbindung von funktionalen Faktoren wie BMP-2 noch verstärkt, wie unsere Beobachtungen beim Vergleich der Genexpression von Id1 und Id3 zwischen löslichem und partikelgebundenem BMP-2 zeigen. BMP-2 neigt zur Aggregation, dies wurde in Quaas *et al.* [139] tiefergehend thematisiert. Die verwendeten Si-AHAP (Propyl-NH-hexyl-NH<sub>2</sub>)-Partikel weisen durch ihr hohes Zeta-Potential bei pH 7 eine hohe kolloidale Stabilität auf [125]. Durch die

Bindung vom BMP-2 an die Partikel kann so mehr vom Wachstumsfaktor mit den Zellen interagieren, da sich hier weniger Aggregate bilden können.

Wie zuvor beschrieben, ist die Durchführung einer osteogenen Differenzierung als funktionelle Untersuchung sehr relevant. Dazu wurden die zuvor als am geeignetsten erscheinenden NPSNP-Modifikation untersucht: Si-AHAP und Si-NH<sub>2</sub>. Des Weiteren wurden ebenfalls die unmodifizierten SiOH-Partikel untersucht. Alle Partikel wurden in der Osteogenese mit MSC unbeladen und mit BMP-2 beladen untersucht. Außerdem wurde ebenfalls der osteogene Effekt von löslichem BMP-2 als Positivkontrolle betrachtet. Als Analyse sollten neben der Untersuchung der Genexpression von relevanten Markergenen ebenfalls die Ablagerung von Kalziumphosphat untersucht werden. Dies geschah mithilfe eines kolorimetrischen Nachweises von Calcium und Phosphat als Bestandteile der extrazellulären Matrix und durch die Färbung mit Alizarinrot S. Die dabei erzielten Ergebnisse konnten nicht ausgewertet werden, da die Messungen und Färbungen sehr uneindeutig waren (siehe dazu um Anhang Abschnitt 7.1.10). Die namensgebende Porosität der NPSNP macht eine aussagekräftige Färbung bzw. kolorimetrische Messung unmöglich. Insbesondere bei der Färbung mit Alizarinrot S ist deutlich zu erkennen, dass der Farbstoff von den Partikeln aufgenommen wird. Trotz mehrerer Wasch- und Zentrifugationsschritte konnten hier keine zu verwertenden Ergebnisse erzielt werden.

Dennoch erzielte die Analyse der Genexpression einige aussagekräftige Ergebnisse. Mittels statistischer Auswertung wurde hier untersucht, welche Veränderung der Genexpression zwischen BMP-2-haltigem Differenzierungsmedium und BMP-freier Kontrolle zu signifikanten Änderungen führte. Die Differenzierung wurde über 28 Tage durchgeführt und es wurden jeweils die Genexpressionen an Tag 14 und an Tag 28 ermittelt. Die genauen Werte sind in 4.2.3.1 beschrieben.

Der Vergleich der Expressionsergebnisse aus der Differenzierung mit den verschiedenen Silica-Nanopartikeln und der Kontrolle zeigte eine erhöhte Expression RUNX2 und ALPL an Tag 28 bei der partikelfreien Kontrolle und den Si-NH<sub>2</sub>-Partikeln. Sowohl der Transkriptionsfaktor RUNX2 als auch die Alkalische Phosphatase werden im Laufe der osteogenen Differenzierung eher in der frühen Phase bei der Differenzierung zu Präosteoblasten exprimiert [36], [52], [53]. Diese hohen Expressionsunterschiede können bei den Si-OH- und Si-AHAP-Partikeln nicht beobachtet werden. Hier scheint die osteogene Differenzierung wesentlich schneller voranzuschreiten. Diese Beobachtung bestätigt sich durch die hohen Expressionsunterschiede bei BGLAP an Tag 28 bei diesen beiden Partikelsorten.

Wie schon vorher beschrieben, sorgt die Bindung von BMP-2 an die Partikel dafür, dass das Protein wesentlich weniger aggregiert. Die Partikel ermöglichen eine kontinuierliche Abgabe des Proteins an die Zellen und die geringen Mengen BMP-2, die hier kontrolliert abgegeben werden, sorgen durch den räumlichen Abstand ebenfalls für weniger Aggregation. Dadurch kann mehr BMP-2 an die entsprechenden Rezeptoren binden und so für einen schnelleren Ablauf der osteogenen Differenzierung sorgen. Außerdem werden hier über den Zeitraum von vier Wochen im Laufe der Zeit immer kleinere Mengen BMP-2 abgegeben. So zeigen die Freisetzungsraten bei Si-OH nur in den ersten 7 Tagen eine Freisetzung von 0,9 ng/mg BMP-2 pro Tag, bei Si-NH<sub>2</sub> sind es in den ersten 7 Tagen 10 ng/mg BMP-2 pro Tag, in der zweiten Woche noch 1 ng/mg BMP-2 pro Tag. Si-AHAP zeigt über einen Freisetzungszeitraum von 14 Tagen eine kontinuierliche Freisetzungsrate von 2,7 ng/mg BMP-2 pro Tag (vgl. dazu Freisetzungsdaten aus Dissertation von A. Satalov [125]), wohingegen immer die gleiche Menge von löslichem BMP-2 (200 ng/ml) in das Zellkulturmedium gegeben wird. Zwar degradiert über den Inkubationszeitraum auch das lösliche BMP-2 in der Zellkultur, dennoch sind gerade im späteren Verlauf der Differenzierung die zugesetzten Mengen wesentlich höher als bei der Freisetzung aus den Nanopartikeln. In einer Studie mit MSC aus adipösem Gewebe wurde gezeigt, dass bereits eine 15-minütige Inkubation der Zellen mit BMP-2 zu einer Aktivierung der osteogenen Differenzierungskaskade führt [165]. Eine weitere Studie zeigt, dass die alleinige kontinuierliche Verabreichung von BMP-2 zum Zellkulturmedium zwar zu einer erhöhten Expression von ALP führt, aber die Mineralisierung der Matrix hier eher schwach ist [166]. Um herauszufinden, ob die Differenzierung hier nur langsamer verläuft oder pausiert bzw. ob andere Effekte die unterschiedliche Genexpression beeinflussen, müssen noch weitere Analysen durchgeführt werden. Es sollten ebenfalls konzentrations- und zeitabhängige Studien zur Gabe von löslichem Protein durchgeführt werden. Außerdem ist es für die endgültige Analyse und Schlussfolgerung zu den geeignetsten Partikeln unabdingbar, Analysen zur Matrixmineralisierung durchzuführen.

### 5.2.4.2 Organische Chitosan/Tripolyphosphat (TPP)- und Alginat/Poly-L-Lysin (PLL)-Partikel

Es gibt bereits mehrere Publikationen, in denen auf Chitosan-Beschichtungen immobilisiertes BMP-2 erfolgreich als osteoinduktive Beschichtung verwendet wurde. Hier wurden in *in vivo*-Experimenten die osteoinduktiven Eigenschaften von Chitosan in Verbindung mit BMP-2 gezeigt [107], [167], [168]. Aus diesem Grund wurde auch in dieser Arbeit dieser Effekt genauer untersucht. Neben den beiden unterschiedlich stark acetylierten Chitosan/Tripolyphosphat-Partikel CS(58)/TPP und CS(83)/TPP wurden ebenfalls Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel [169], [170] betrachtet. Nanogele aus diesen Partikeln wurden bereits erfolgreich für Experimente zur zeitlichen Abgabe von Wirkstoffen und Zellverkapselungen verwendet [171], [172]. Außerdem haben wir im Rahmen der Forschergruppe

FOR2180 bereits Untersuchungen zur chondrogenen Differenzierung mit TGF- $\beta_3$  beladenen Chitosan-Partikeln durchgeführt [173].

Wie auch schon mit den anorganischen Nanopartikeln wurden hier zunächst Studien zur Zytotoxizität der Nanopartikel sowohl mit primären mesenchymalen Stammzellen als auch mit der Zelllinie C2C12 BRE-Luc durchgeführt. Während die beiden Chitosan-Partikelarten erst ab einer Konzentration von 1250  $\mu\text{g/ml}$  zytotoxische Effekte auf die beiden Zellarten zeigen, sind die Alg/PLL-Partikel bereits ab 312,5  $\mu\text{g/ml}$  für die C2C12 BRE-Luc-Zellen und ab 625  $\mu\text{g/ml}$  für die MSCs zytotoxisch. Da sich das Zellwachstum bei einer Partikelkonzentration von 625  $\mu\text{g/ml}$  nach sieben Tagen wieder normalisiert, wurden in den folgenden Differenzierungsexperimenten jeweils 500  $\mu\text{g/ml}$  Partikel eingesetzt.

Die Analyse der Genexpressionsdaten nach 14 Tagen und nach 28 Tagen zeigte sowohl bei der Kontrolle als auch bei den beiden verschiedenen Chitosan/Tripolyphosphat-Partikeln eine osteogene Differenzierung mit BMP-2, welches sich durch den Anstieg der Markergenexpression von Osteopontin, Integrin-bindung Sialoprotein, RUNX2 und BGLAP kennzeichnete. Allerdings war auch die Expression dieser Gene bei der Kontrolle ohne Zugabe von Nanopartikeln und BMP-2 höher als die anderen Kontrollen in vorherigen Experimenten.

Möglicherweise haben die Chitosan-Nanopartikel einen leicht inhibierenden Effekt auf den Ablauf der Differenzierung. Außerdem ist der Effekt der mit BMP-2 beladenen Partikel geringer als der vom reinen BMP-2. Das liegt womöglich an der Konzentration des BMP-2. In der Kontrolle wurde BMP-2 bei jedem Mediumwechsel manuell in der gleichen Konzentration zugegeben, wohingegen die Chitosan-Partikel unterschiedliche Menge BMP-2 während des gesamten Differenzierungszeitraums freigeben. In der physiologischen Umgebung ist eine langsame Abgabe des Wachstumsfaktors vorteilhaft, da bei einer zu hohen Menge an BMP-2 ein hohes Risiko von ektopischer Knochenformation besteht.

Die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen mit der Alg/PLL-Partikellösung in Kombination mit BMP-2 zeigte einen wesentlich geringeren Effekt auf die Expression der osteogenen Markergene.

Auch bei den Untersuchungen mit TGF- $\beta_3$  in Kombination mit den organischen Nanopartikeln zur Induktion der chondrogenen Differenzierung induzierten die Alg/PLL-Partikel eine weniger stark ausgeprägte Differenzierung als die verwendeten Chitosan-Partikel [173].

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Quantifizierung der Freisetzung und Aktivität des Signalfaktors BMP-2 zur Induktion der osteogenen Differenzierung. Dabei gliedert sich die Arbeit in zwei Abschnitte: Der erste Teil beschäftigt sich mit den Untersuchungen zur osteogenen Differenzierung, der zweite Teil konzentriert sich auf die Funktion von BMP-2 als osteoinduktives und implantatgebundenes Biomolekül.

Obwohl die osteogene Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* häufig zur Untersuchung von experimentellen Fragestellungen eingesetzt wird, gibt es eine Reihe von Herausforderungen. In dieser Arbeit wurden zunächst Untersuchungen zum osteogenen Potential verschiedener Donoren von MSC durchgeführt, da sowohl die Literatur als auch eigene Erfahrungen gezeigt haben, dass sich die Zellen unterschiedlicher Knochenmarkspender unterschiedlich gut osteogen differenzieren lassen. Aus wissenschaftlicher Neugier und aufgrund des Bedarfs nach einer Auswahl geeigneter Zellpräparationen für die folgenden Versuche wurden daher Zellen von 17 Spendern mit den aus der Literatur bekannten Induktionszutaten Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbat-2-Phosphat für 28 Tage osteogen differenziert. Um den Fortschritt der Differenzierung zu bestimmen, wurden sowohl Genexpressionsanalysen der osteogenen Markergene IBSP, BGLAP, ALPL, RUNX2 und OPN durchgeführt als auch die Calcium- und Phosphatkonzentration der Matrix kolorimetrisch bestimmt, um die Bildung von Hydroxyapatit nachzuweisen. Dabei ergab sich, dass die jeweiligen Spender entweder im Hinblick auf die Genexpression gerade in der Differenzierung befindlich waren oder sie bereits eine Matrixmineralisierung zeigten. Das heißt, die Differenzierung schritt je nach Spender unterschiedlich schnell voran. Außerdem konnten nur bei fünf der getesteten 17 Zellpräparationen Merkmale von fortgeschrittener osteogener Differenzierung gemessen werden. Die Tatsache, dass das osteogene Potential bei unterschiedlichen Spendern so stark variiert, wird auch in der Literatur immer wieder beleuchtet, jedoch gibt es hier noch keine eindeutige Erklärung für dieses Phänomen. In nächsten Schritten sollten hier weitere Untersuchungen wie zum Beispiel Genom- oder Metabolomanalysen der einzelnen Spender vorgenommen werden.

Da zum einen in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe bereits die Unterschiede im Hinblick auf die Induktion der osteogenen Differenzierung mittels verschiedener Phosphatquellen (3 mM Natriumdihydroxyphosphat oder 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat) betrachtet wurden und zum anderen der Fokus dieser Arbeit auf dem Einsatz von BMP-2 liegt, wurden Kombinationen von verschiedenen Differenzierungszutaten vergleichend untersucht. Dabei erwies sich die Kombination von  $\beta$ -Glycerophosphat, BMP-2 und Ascorbat-2-Phosphat als die erfolgreichste. Ein interessantes Ergebnis

dieser Untersuchung war die teilweise adipogene Differenzierung der Zellen aufgrund der Zugabe von Dexamethason und die Erkenntnis, dass hier eine Anpassung der eingesetzten Konzentration erfolgen muss. Dexamethason ist ein bekannter Induktor von osteogener und adipogener Differenzierung und lenkt die Zellen jeweils mit Hilfe zusätzlicher Faktoren in die jeweilige Differenzierungs-Richtung. Die in der Literatur am meisten zitierte Induktionsmethode weist aber gegebenenfalls Schwächen auf. Hier sollten weitere Untersuchungen mit geringeren Konzentrationen an Dexamethason erfolgen, um diese Theorie zu bestätigen. Weiterhin wurde in früheren Arbeiten die anorganische Phosphatquelle  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in Kombination mit Dexamethason für geeigneter als die organische Phosphatquelle  $\beta$ -Glycerophosphat identifiziert und stellte sich hier als weniger passend für die Induktion der osteogenen Differenzierung mit BMP-2 heraus. Möglicherweise besteht hier auch ein Spender-spezifischer Zusammenhang, der in weiteren Untersuchungen noch genauer beleuchtet werden sollte. Generell sollten hier noch weitere Experimente mit weiteren Donoren erfolgen, um eine höhere biologische Variabilität zu erzielen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der sensitive und schnelle Bioaktivitätsassay BRE-Luc optimiert. Das Reporter-gen Luziferase wurde an einen Enhancer des Promotors eines *Immediate Early Response Gen*s von BMP-2 fusioniert, das BMP-Responsive-Element, und ermöglicht so einen schnellen und zuverlässigen Nachweis von bioaktivem BMP-2. Andere Assays wie zum Beispiel der in der Literatur häufig verwendete Alkalische Phosphatase-Assay sind weniger sensitiv und benötigen auch wesentlich mehr Zeit zur Durchführung.

Der Assay wurde so angepasst, dass nun die Messung in einer 96-Loch-Platte erfolgen kann und weniger Pipettierschritte notwendig sind. Dadurch werden Messungenauigkeiten durch häufige Zwischenschritte minimiert und zusätzlich der Probendurchsatz maximiert. Gerade im Hinblick auf die erfolgten Freisetzungsuntersuchungen, für die über vier bis acht Wochen jeden Tag Proben genommen werden müssen, ist dies ein wesentlicher Vorteil. Zusätzlich wurde der geeignetste Messzeitpunkt für den Assay mittels Kinetik bestimmt und auf 17-24 h festgelegt. Es wurde mittels BrdU-Assay und Zellzählung gezeigt, dass BMP-2 keinen Einfluss auf das Zellwachstum über diesen kurzen Zeitraum hat, so dass hier keine zusätzliche Normalisierung der Ergebnisse notwendig ist.

Der BRE-Luc-Assay bietet somit wesentliche Vorteile zur Quantifizierung von bioaktivem BMP-2 im Vergleich zum Alkalische Phosphatase-Assay. Mit Hilfe des Assays konnte in der Arbeit das Löslichkeitsverhalten von BMP-2 unter verschiedenen Pufferbedingungen erwiesen werden. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Löslichkeit von BMP-2 nicht nur vom pH-Wert, sondern auch vom Puffertyp abhängig ist. Bei einem pH-Wert zwischen pH 2 und pH 5 ist BMP-2 in allen Puffern löslich, wohingegen sich bei pH 6 und pH 7 eine Abhängigkeit vom Puffer zeigt. Das Protein

löst sich in MOPS und MES, da es sich um zwitterionische Puffer handelt, während es im Phosphatpuffer bereits unlöslich ist, da dieser divalente Anionen enthält. Allerdings zeigt BMP-2 trotz der Aggregation in einigen Puffern und pH-Werten in allen getesteten Puffersystemen Bioaktivität. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Aggregate sich mit MES pH 5 wieder resolubilieren lassen. Diese Erkenntnis ist für den Einsatz von BMP-2 in Implantatsystemen essenziell, denn sie macht den Einsatz von BMP-2-Aggregaten möglich. Da es sich bei BMP-2 um ein Protein handelt, welches schnell aggregiert, kann diese Erkenntnis die Implantatforschung und den Einsatz von BMP-2 zur Knochenregeneration stark verändern.

Im Zuge der eigenen Implantatforschung wurde im letzten Teil der Arbeit die Freisetzung und Aktivität von BMP-2 aus organischen und anorganischen Nanopartikeln untersucht. Dabei wurden anorganische aminomodifizierte Partikel ( $\text{SiNH}_2$ ) und aminohexylaminopropyl-modifizierte (SiAHAP) nanoporöse Silica-Nanopartikel untersucht sowie auch organische acetylierten Chitosan/Tripolyphosphat-Partikel CS(58)/TPP und CS(83)/TPP und Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel.

Es konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten Konzentrationen der Nanopartikel nicht wesentlich zytotoxisch auf MSC wirken. In der weiteren Analyse wurden Differenzierungsanalysen mit den Nanopartikeln durchgeführt. Dabei zeigte sich ein deutlicher kurzfristiger Effekt von freigesetztem BMP-2 auf die ID1 und ID3 Genexpression beim Einsatz von  $\text{SiNH}_2$ - und SiAHAP-Partikeln. In der langfristigen Differenzierung mit den Nanopartikeln konnten teilweise Anstiege bei der Genexpression ermittelt werden. Hierbei wurde deutlich, dass die Differenzierung mit den SiOH- und SiAHAP-Partikel langsamer verläuft als beim Einsatz der  $\text{SiNH}_2$ -Partikel. Die  $\text{SiNH}_2$ -Partikel exprimierten an Tag 28 das späte osteogene Markergen BGLAP, die anderen beiden NPSNP-Modifikationen zeigten bei der Differenzierung mit BMP-2-Beladung eine Erhöhung der Genexpression der frühen Markergene RUNX2 und ALP.

Die BMP-2-beladenen Chitosan-Nanopartikel induzierten zwar über die 28 Tage die osteogene Differenzierung, was durch den Anstieg der jeweiligen Markergenexpression deutlich wurde, zeigten aber keine Verbesserung im Vergleich zur partikelfreien Kontrolle. Womöglich muss hier noch am Freisetzungsmechanismus gearbeitet werden. Die Induktion durch die Alg/PLL fiel weniger stark aus, was ebenfalls bei der chondrogenen Differenzierung mit TGF- $\beta$  beobachtet werden konnte.

Sowohl mit den anorganischen als auch mit den organischen Nanopartikeln war kein Nachweis der Matrixmineralisierung der Zellen möglich. Es ist unklar, ob die abgegebene Menge an BMP-2 eventuell insbesondere am Ende der Differenzierung nicht mehr ausreichte, um diese weiter voranzutreiben oder ob der Zeitraum der Analyse zu kurz war. In weiteren Analysen müssen diese



Fragen weiter beleuchtet werden. Die Differenzierungsexperimente sollten über einen längeren Zeitraum wiederholt werden und das Freisetzungverhalten der unterschiedlichen Partikelsorten sollte weiter untersucht werden. Während der Zusammenstellung dieser Arbeit wurden bereits Untersuchungen mit Nanopartikeln, die auf PCL-Fasermatten aufgebracht wurden, durchgeführt. Es ist vorstellbar, dass diese Untersuchungen erfolgversprechender sind, da hier die Nanopartikelschicht nicht direkt auf den Zellen liegt, sondern die Zellen auf der PCL-Matte angesiedelt werden können.

## 7 Literatur

- [1] A. K. K. Teo and L. Vallier, "Emerging use of stem cells in regenerative medicine," *Biochemical Journal*, vol. 428, no. 1. Portland Press, pp. 11–23, May 15, 2010, doi: 10.1042/BJ20100102.
- [2] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–676, Aug. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- [3] H. E. Young and A. C. Black, "Adult Stem Cells," *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, vol. 276, no. 1. Wiley-Liss Inc., pp. 75–102, 2004, doi: 10.1002/ar.a.10134.
- [4] J. Czyz, C. Wiese, A. Rolletschek, P. Blyszczuk, M. Cross, and A. M. Wobus, "Potential of embryonic and adult stem cells in vitro," *Biological Chemistry*, vol. 384, no. 10–11. Biol Chem, pp. 1391–1409, Oct. 2003, doi: 10.1515/BC.2003.155.
- [5] F. H. Gage, "Mammalian neural stem cells," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 287, no. 5457, pp. 1433–1438, Feb. 2000, doi: 10.1126/SCIENCE.287.5457.1433.
- [6] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina, "The Development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea-pig Bone Marrow and Spleen Cells," *Cell Proliferation*, vol. 3, no. 4, pp. 393–403, Oct. 1970, doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
- [7] A. Caplan, "Mesenchymal stem cells.," *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 9, no. 5, pp. 641–50, 1991, doi: 10.1002/jor.1100090504.
- [8] M. Owen and A. J. Friedenstein, "Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.," *Ciba Foundation symposium*, vol. 136. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 42–60, 1988, doi: 10.1002/9780470513637.ch4.
- [9] S. E. Haynesworth, J. Goshima, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan, "Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow," *Bone*, vol. 13, no. 1, pp. 81–88, Jan. 1992, doi: 10.1016/8756-3282(92)90364-3.
- [10] A. Erices, P. Conget, and J. J. Minguell, "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood," *British Journal of Haematology*, vol. 109, no. 1, pp. 235–242, Apr. 2000, doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x.

- 
- [11] P. A. Zuk *et al.*, "Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies," in *Tissue Engineering*, Jul. 2001, vol. 7, no. 2, pp. 211–228, doi: 10.1089/107632701300062859.
- [12] L. da Silva Meirelles, P. C. Chagastelles, and N. B. Nardi, "Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues," *Journal of Cell Science*, vol. 119, no. 11, pp. 2204–2213, Jun. 2006, doi: 10.1242/jcs.02932.
- [13] M. Dominici *et al.*, "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, pp. 315–317, 2006, doi: 10.1080/14653240600855905.
- [14] Y. Jiang *et al.*, "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow," *Nature*, vol. 418, no. 6893, pp. 41–49, 2002, doi: 10.1038/nature00870.
- [15] M. F. Pittenger *et al.*, "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, Apr. 1999, doi: 10.1126/science.284.5411.143.
- [16] Q. Chen *et al.*, "Fate decision of mesenchymal stem cells: Adipocytes or osteoblasts?," *Cell Death and Differentiation*, vol. 23, no. 7, pp. 1128–1139, 2016, doi: 10.1038/cdd.2015.168.
- [17] S. Muruganandan, A. A. Roman, and C. J. Sinal, "Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 2, Springer, pp. 236–253, Jan. 16, 2009, doi: 10.1007/s00018-008-8429-z.
- [18] F. Barry, R. E. Boynton, B. Liu, and J. M. Murphy, "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components," *Experimental Cell Research*, vol. 268, no. 2, pp. 189–200, Aug. 2001, doi: 10.1006/excr.2001.5278.
- [19] I. Sekiya, J. T. Vuoristo, B. L. Larson, and D. J. Prockop, "In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 7, pp. 4397–4402, Apr. 2002, doi: 10.1073/pnas.052716199.

- [20] C. Tacchetti, S. Tavella, B. Dozin, R. Quarto, G. Robino, and R. Cancedda, "Cell condensation in chondrogenic differentiation," *Experimental Cell Research*, vol. 200, no. 1, pp. 26–33, May 1992, doi: 10.1016/S0014-4827(05)80067-9.
- [21] F. Barry, R. E. Boynton, B. Liu, and J. M. Murphy, "Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components," *Experimental Cell Research*, vol. 268, no. 2, pp. 189–200, Aug. 2001, doi: 10.1006/excr.2001.5278.
- [22] L. M. Matrisian, "Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling," *Trends in Genetics*, vol. 6, no. C, pp. 121–125, Apr. 1990, doi: 10.1016/0168-9525(90)90126-Q.
- [23] J. Yang, Y. S. Zhang, K. Yue, and A. Khademhosseini, "Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 57. Acta Materialia Inc, pp. 1–25, Jul. 15, 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.036.
- [24] A. F. Girão, Â. Semitela, G. Ramalho, A. Completo, and P. A. A. P. Marques, "Mimicking nature: Fabrication of 3D anisotropic electrospun polycaprolactone scaffolds for cartilage tissue engineering applications," *Composites Part B: Engineering*, vol. 154, pp. 99–107, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.compositesb.2018.08.001.
- [25] J. Sundermann, S. Sydow, L. Burmeister, A. Hoffmann, H. Menzel, and H. Bunjes, "Spatially and temporally controllable BMP-2 and TGF- $\beta$ 3 double release from PCL fiber scaffolds via chitosan-based polyelectrolyte coatings," *Unpublished Manuscript*, 2021.
- [26] E. D. Rosen and O. A. MacDougald, "Adipocyte differentiation from the inside out," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 7, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 885–896, Dec. 08, 2006, doi: 10.1038/nrm2066.
- [27] R. Negrel, P. Grimaldi, and G. Ailhaud, "Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75, no. 12, pp. 6054–6058, 1978, doi: 10.1073/pnas.75.12.6054.
- [28] A. B. Chapman, D. M. Knight, B. S. Dieckmann, and G. M. RingoldII, "Analysis of Gene Expression during Differentiation of Adipogenic Cells in Culture and Hormonal Control of the Developmental Program," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, no. 24, pp. 15548–15555, 1984, doi: 10.1016/S0021-9258(17)42583-X.

- [29] H. Green and O. Kehinde, "An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion," *Cell*, vol. 5, no. 1, pp. 19–27, 1975, doi: 10.1016/0092-8674(75)90087-2.
- [30] R. F. Morrison and S. R. Farmer, "Role of PPAR $\gamma$  in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21(Waf1/Cip1), during adipogenesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 24, pp. 17088–17097, Jun. 1999, doi: 10.1074/jbc.274.24.17088.
- [31] D. Shao and M. A. Lazar, "Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ , CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$ , and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 34, pp. 21473–21478, Aug. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.34.21473.
- [32] B. M. Spiegelmans, L. Choy, G. S. Hotamisligil, R. A. Graves, and P. Tontonoz, "Regulation Expression Syndromes of Adipocyte Gene in Differentiation and of Obesity/Diabetes\*," 1993. doi: 10.1016/S0021-9258(18)53107-0.
- [33] A. Must, J. Spadano, E. H. Coakley, A. E. Field, G. Colditz, and W. H. Dietz, "The disease burden associated with overweight and obesity," *Journal of the American Medical Association*, vol. 282, no. 16, pp. 1523–1529, Oct. 1999, doi: 10.1001/jama.282.16.1523.
- [34] K. Tsuji, Y. Ito, and M. Noda, "Expression of the PEBP2 $\alpha$ A/AML3/CBFA1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells," *Bone*, vol. 22, no. 2, pp. 87–92, Feb. 1998, doi: 10.1016/S8756-3282(97)00267-6.
- [35] K.-S. Lee *et al.*, "Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 23, pp. 8783–8792, Dec. 2000, doi: 10.1128/mcb.20.23.8783-8792.2000.
- [36] J. E. Aubin, "Advances in the osteoblast lineage," *Biochemistry and Cell Biology*, vol. 76, no. 6, pp. 899–910, 1998, doi: 10.1139/o99-005.

- [37] P. Ducy *et al.*, "A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development," *Genes and Development*, vol. 13, no. 8, pp. 1025–1036, Apr. 1999, doi: 10.1101/gad.13.8.1025.
- [38] C. Banerjee *et al.*, "Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 N-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype," *Endocrinology*, vol. 142, no. 9, pp. 4026–4039, 2001, doi: 10.1210/endo.142.9.8367.
- [39] P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A. L. Ridall, and G. Karsenty, "Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation," *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 747–754, May 1997, doi: 10.1016/S0092-8674(00)80257-3.
- [40] Jitesh Pratap *et al.*, "Cell Growth Regulatory Role of Runx2 during Proliferative Expansion of Preosteoblasts," *Cancer Research*, vol. 63, pp. 5357–5362, 2003.
- [41] M. Galindo *et al.*, "The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 21, pp. 20274–20285, May 2005, doi: 10.1074/jbc.M413665200.
- [42] K. Turksen and J. E. Aubin, "Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells," *Journal of Cell Biology*, vol. 114, no. 2, pp. 373–384, 1991, doi: 10.1083/jcb.114.2.373.
- [43] M. Noda, K. Yoon, G. A. Rodan, and D. E. Koppel, "High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol-anchored membrane protein.," *The Journal of cell biology*, vol. 105, no. 4, pp. 1671–1677, 1987, doi: 10.1083/jcb.105.4.1671.
- [44] M. Hui, M. Hu, and H. C. Tenenbaum, "Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase," *Cell and Tissue Research*, vol. 274, no. 3, pp. 429–437, Dec. 1993, doi: 10.1007/BF00314539.
- [45] F. Liu, L. Malaval, A. K. Gupta, and J. E. Aubin, "Simultaneous detection of multiple bone-related mRNAs and protein expression during osteoblast differentiation: Polymerase chain reaction and immunocytochemical studies at the single cell level," *Developmental Biology*, vol. 166, no. 1, pp. 220–234, 1994, doi: 10.1006/dbio.1994.1309.

- 
- [46] J. Chen, H. S. Shapiro, and J. Sodek, "Developmental expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 7, no. 8, pp. 987–997, 1992, doi: 10.1002/jbmr.5650070816.
- [47] L. Malaval, D. Modrowski, A. K. Gupta, and J. E. Aubin, "Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 158, no. 3, pp. 555–572, 1994, doi: 10.1002/jcp.1041580322.
- [48] J. D. Termine and A. S. Posner, "Infrared analysis of rat bone: Age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions," *Science*, vol. 153, no. 3743, pp. 1523–1525, Sep. 1966, doi: 10.1126/science.153.3743.1523.
- [49] L. G. Raisz, "Physiology and pathophysiology of bone remodeling," in *Clinical Chemistry*, Aug. 1999, vol. 45, no. 8 II, pp. 1353–1358, doi: 10.1093/clinchem/45.8.1353.
- [50] G. K. Hunter and H. A. Goldberg, "Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 18, pp. 8562–8565, Sep. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.18.8562.
- [51] G. S. Baht, G. K. Hunter, and H. A. Goldberg, "Bone sialoprotein-collagen interaction promotes hydroxyapatite nucleation," *Matrix Biology*, vol. 27, no. 7, pp. 600–608, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.matbio.2008.06.004.
- [52] T. A. Owen *et al.*, "Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix," *Journal of Cellular Physiology*, 1990, doi: 10.1002/jcp.1041430304.
- [53] M. Bruderer, R. G. Richards, M. Alini, and M. J. Stoddart, "Role and regulation of runx2 in osteogenesis," *European Cells and Materials*, vol. 28, 2014.
- [54] Z. Hamidouche *et al.*, "FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-dependent Runx2 expression," doi: 10.1096/fj.08-106302.
- [55] J. E. Phillips, C. A. Gersbach, A. M. Wojtowicz, and A. J. García, "Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation," *Journal of Cell Science*, vol. 119, no. 3, pp. 581–591, Feb. 2006, doi: 10.1242/jcs.02758.

- [56] M. Q. Hassan *et al.*, "BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 52, pp. 40515–40526, Dec. 2006, doi: 10.1074/jbc.M604508200.
- [57] R. T. Franceschi, B. S. Iyer, and Y. Cui, "Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 9, no. 6, pp. 843–854, 1994, doi: 10.1002/jbmr.5650090610.
- [58] R. -I Hata and H. Senoo, "L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 138, no. 1, pp. 8–16, 1989, doi: 10.1002/jcp.1041380103.
- [59] P. F. M. Choong, T. J. Martin, and K. W. Ng, "Effects of ascorbic acid, calcitriol, and retinoic acid on the differentiation of preosteoblasts," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 11, no. 5, pp. 638–647, 1993, doi: 10.1002/jor.1100110505.
- [60] C. H. Chung, E. E. Golub, E. Forbes, T. Tokuoka, and I. M. Shapiro, "Mechanism of action of  $\beta$ -glycerophosphate on bone cell mineralization," *Calcified Tissue International*, vol. 51, no. 4, pp. 305–311, Oct. 1992, doi: 10.1007/BF00334492.
- [61] L. M. Schäck *et al.*, "The Phosphate Source Influences Gene Expression and Quality of Mineralization during In Vitro Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells," *PLoS ONE*, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065943.
- [62] M. R. Urist, "Bone: Formation by autoinduction," *Science*, vol. 150, no. 3698, pp. 893–899, 1965, doi: 10.1126/science.150.3698.893.
- [63] M. R. Urist, H. Nogami, and A. Mikulski, "A Bone Morphogenetic Polypeptide," in *Calcified Tissues 1975*, Springer Berlin Heidelberg, 1976, pp. 81–87.
- [64] T. Kobayashi, K. M. Lyons, A. P. McMahon, and H. M. Kronenberg, "BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 50, pp. 18023–18027, Dec. 2005, doi: 10.1073/pnas.0503617102.
- [65] A. Stewart, H. Guan, and K. Yang, "BMP-3 promotes mesenchymal stem cell proliferation through the TGF- $\beta$ /activin signaling pathway," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 223, no. 3, pp. 658–666, Jun. 2010, doi: 10.1002/jcp.22064.



- [66] H. Zou and L. Niswander, "Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation," *Science*, vol. 272, no. 5262, pp. 738–741, May 1996, doi: 10.1126/science.272.5262.738.
- [67] A. Hemmati-Brivanlou and G. H. Thomsen, "Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: Expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4," *Developmental Genetics*, vol. 17, no. 1. Dev Genet, pp. 78–89, 1995, doi: 10.1002/dvg.1020170109.
- [68] K. Bobacz, R. Gruber, A. Soleiman, L. Erlacher, J. S. Smolen, and W. B. Graninger, "Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 48, no. 9, pp. 2501–2508, Sep. 2003, doi: 10.1002/art.11248.
- [69] C. Scheufler, W. Sebald, and M. Hu, "Crystal Structure of Human Bone Morphogenetic Protein-2 at 2.7 Å Resolution." [Online]. Available: <http://www.idealibrary.com>.
- [70] C. H. Heldin, K. Miyazono, and P. ten Dijke, "TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins," *Nature*, vol. 390, no. 6659. Nature, pp. 465–471, Dec. 04, 1997, doi: 10.1038/37284.
- [71] M. de Caestecker, "The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 15, no. 1. Elsevier BV, pp. 1–11, 2004, doi: 10.1016/j.cytogfr.2003.10.004.
- [72] C. H. Heldin and A. Moustakas, "Role of Smads in TGF $\beta$  signaling," *Cell and Tissue Research*, vol. 347, no. 1. Cell Tissue Res, pp. 21–36, Jan. 2012, doi: 10.1007/s00441-011-1190-x.
- [73] D. Horbelt, A. Denkis, and P. Knaus, "A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 44, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 469–474, 2012, doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.013.
- [74] D. S. de Jong *et al.*, "Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 19, no. 6, pp. 947–958, Jun. 2004, doi: 10.1359/JBMR.040216.
- [75] K. Miyazono and K. Miyazawa, "Id: A Target of BMP Signaling," *Science Signaling*, vol. 2002, no. 151, pp. pe40–pe40, Sep. 2002, doi: 10.1126/stke.2002.151.pe40.

- [76] M. Hayashi *et al.*, "Pitx2 prevents osteoblastic transdifferentiation of myoblasts by bone morphogenetic proteins," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 1, pp. 565–571, Jan. 2008, doi: 10.1074/jbc.M708154200.
- [77] J. M. Granjeiro, R. C. Oliveira, J. C. Bustos-Valenzuela, M. C. Sogayar, and R. Taga, "Bone morphogenetic proteins: From structure to clinical use," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 38, no. 10. Associacao Brasileira de Divulgacao Cientifica, pp. 1463–1473, 2005, doi: 10.1590/S0100-879X2005001000003.
- [78] R. N. Wang *et al.*, "Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases," *Genes & Diseases*, vol. 1, pp. 87–105, 2014, doi: 10.1016/j.gendis.2014.07.005.
- [79] R. M. Lequin, "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Clinical Chemistry*, vol. 51, no. 12, pp. 2415–2418, Dec. 2005, doi: 10.1373/clinchem.2005.051532.
- [80] B. Dattatreymurthy *et al.*, "Cerebrospinal fluid contains biologically active bone morphogenetic protein-7," *Experimental Neurology*, vol. 172, no. 2, pp. 273–281, 2001, doi: 10.1006/exnr.2001.7728.
- [81] J. Dai, J. Keller, J. Zhang, Y. Lu, Z. Yao, and E. T. Keller, "Bone morphogenetic protein-6 promotes osteoblastic prostate cancer bone metastases through a dual mechanism," *Cancer Research*, vol. 65, no. 18, pp. 8274–8285, Sep. 2005, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1891.
- [82] T. Katagiri *et al.*, "Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage [published erratum appears in *J Cell Biol* 1995 Feb;128(4):following 713]," *J Cell Biol*, vol. 127, no. 6 Pt 1, pp. 1755–1766, 1994, doi: 10.1083/jcb.127.6.1755.
- [83] A. Sabokbar, P. J. Millett, B. Myer, and N. Rushton, "A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro," *Bone and Mineral*, vol. 27, pp. 57–67, 1994.
- [84] O. Korchynskiy and P. ten Dijke, "Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter," *Journal of Biological Chemistry*, 2002, doi: 10.1074/jbc.M111023200.
- [85] M. Deluca and W. D. McElroy, "Purification and properties of firefly luciferase," *Methods in Enzymology*, vol. 57, no. C, pp. 3–15, Jan. 1978, doi: 10.1016/0076-6879(78)57003-1.

- [86] "Validation and Comparison of Single-Step Flash and Dual-Spectral Luciferase Reporter Gene Assays using the Synergy™ Line of Microplate Readers | October 16, 2013." <https://www.biotek.de/de/resources/application-notes/validation-and-comparison-of-single-step-flash-and-dual-spectral-luciferase-reporter-gene-assays-using-the-synergy-line-of-microplate-readers/> (accessed May 26, 2021).
- [87] C. Milgrom, M. Schaffler, S. Gilbert, and M. van Holsbeeck, "Rotator-cuff changes in asymptomatic adults. The effect of age, hand dominance and gender," *Journal of Bone and Joint Surgery - Series B*, vol. 77, no. 2, pp. 296–298, Mar. 1995, doi: 10.1302/0301-620x.77b2.7706351.
- [88] H. Minagawa *et al.*, "Prevalence of symptomatic and asymptomatic rotator cuff tears in the general population: From mass-screening in one village," *Journal of Orthopaedics*, vol. 10, no. 1, pp. 8–12, 2013, doi: 10.1016/j.jor.2013.01.008.
- [89] A. Yamamoto *et al.*, "Prevalence and risk factors of a rotator cuff tear in the general population," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 19, no. 1, pp. 116–120, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.jse.2009.04.006.
- [90] S. Tempelhof, S. Rupp, and R. Seil, "Age-related prevalence of rotator cuff tears in asymptomatic shoulders," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 8, no. 4, pp. 296–299, 1999, doi: 10.1016/S1058-2746(99)90148-9.
- [91] L. M. Galatz, S. Griggs, B. D. Cameron, and J. P. Iannotti, "Prospective longitudinal analysis of postoperative shoulder function: A ten-year follow-up study of full-thickness rotator cuff tears," *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, vol. 83, no. 7, pp. 1052–1056, 2001, doi: 10.2106/00004623-200107000-00011.
- [92] R. Mirzayan, A. E. Weber, F. A. Petrigliano, and J. Chahla, "Rationale for biologic augmentation of rotator cuff repairs," *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 27, no. 13, Lippincott Williams and Wilkins, pp. 468–478, Jul. 01, 2019, doi: 10.5435/JAAOS-D-18-00281.
- [93] A. Hoffmann *et al.*, "Vollantrag zur Einrichtung einer Forschergruppe bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft Gradierte Implantate für Sehnen-Knochen-Verbindungen Kurztitel: 'Gradierte Implantate' FOR 2180."

- [94] J. Apostolakos *et al.*, "The enthesis: A review of the tendon-to-bone insertion," *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, vol. 4, no. 3. CIC Edizioni Internazionali s.r.l., pp. 333–342, Jul. 01, 2014, doi: 10.11138/mltj/2014.4.3.333.
- [95] R. Newsham-West, H. Nicholson, M. Walton, and P. Milburn, "Long-term morphology of a healing bone-tendon interface: A histological observation in the sheep model," *Journal of Anatomy*, vol. 210, no. 3, pp. 318–327, Mar. 2007, doi: 10.1111/j.1469-7580.2007.00699.x.
- [96] P. J. Yang and J. S. Temenoff, "Engineering orthopedic tissue interfaces," *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, vol. 15, no. 2. Tissue Eng Part B Rev, pp. 127–141, Jun. 01, 2009, doi: 10.1089/ten.teb.2008.0371.
- [97] H. H. Lu, S. D. Subramony, M. K. Boushell, and X. Zhang, "Tissue engineering strategies for the regeneration of orthopedic interfaces," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 38, no. 6, pp. 2142–2154, Jun. 2010, doi: 10.1007/s10439-010-0046-y.
- [98] M. Singh, C. Berklund, and M. S. Detamore, "Strategies and applications for incorporating physical and chemical signal gradients in tissue engineering," *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, vol. 14, no. 4. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA , pp. 341–366, Dec. 01, 2008, doi: 10.1089/ten.teb.2008.0304.
- [99] S. Noack *et al.*, "Periostin secreted by mesenchymal stem cells supports tendon formation in an ectopic mouse model," *Stem Cells and Development*, vol. 23, no. 16, pp. 1844–1857, Aug. 2014, doi: 10.1089/scd.2014.0124.
- [100] A. Hoffmann *et al.*, "Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 4, pp. 940–952, Apr. 2006, doi: 10.1172/JCI22689.
- [101] X. Liu, S. K. Joshi, B. Ravishankar, D. Laron, H. T. Kim, and B. T. Feeley, "Upregulation of transforming growth factor- $\beta$  signaling in a rat model of rotator cuff tears," *Journal of Shoulder and Elbow Surgery*, vol. 23, no. 11, pp. 1709–1716, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.jse.2014.02.029.
- [102] K. W. Lee, J. S. Lee, Y. S. Kim, Y. B. Shim, J. W. Jang, and K. il Lee, "Effective healing of chronic rotator cuff injury using recombinant bone morphogenetic protein-2 coated dermal patch in vivo," *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, vol. 105, no. 7, pp. 1840–1846, Oct. 2017, doi: 10.1002/jbm.b.33716.

- [103] A. Prabhath, V. N. Vernekar, E. Sanchez, and C. T. Laurencin, "Growth factor delivery strategies for rotator cuff repair and regeneration," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 544, no. 2, pp. 358–371, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.01.006.
- [104] V. Mamaeva, C. Sahlgren, and M. Lindén, "Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 5, pp. 689–702, May 2013, doi: 10.1016/j.addr.2012.07.018.
- [105] S. Simovic, N. Ghouchi-Eskandar, A. M. Sinn, D. Losic, and C. A. Prestidge, "Silica Materials in Drug Delivery Applications," 2011.
- [106] K. Möller and T. Bein, "Talented mesoporous silica nanoparticles," *Chemistry of Materials*, vol. 29, no. 1, pp. 371–388, 2017, doi: 10.1021/acs.chemmater.6b03629.
- [107] N. Poth, V. Seiffart, G. Gross, H. Menzel, and W. Dempwolf, "Biodegradable chitosan nanoparticle coatings on titanium for the delivery of BMP-2," *Biomolecules*, vol. 5, no. 1, pp. 3–19, 2015, doi: 10.3390/biom5010003.
- [108] A. v. Kabanov and S. v. Vinogradov, "Nanogels as pharmaceutical carriers: Finite networks of infinite capabilities," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 48, no. 30, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 5418–5429, Jul. 13, 2009, doi: 10.1002/anie.200900441.
- [109] Y. Shigemasa and S. Minami, "Applications of chitin and chitosan for biomaterials," *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, vol. 13, no. 1, pp. 383–420, Dec. 1996, doi: 10.1080/02648725.1996.10647935.
- [110] N. Saveh-Shemshaki, L. S. Nair, and C. T. Laurencin, "Nanofiber-based matrices for rotator cuff regenerative engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 94, Acta Materialia Inc, pp. 64–81, Aug. 01, 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.041.
- [111] S. E. Haynesworth, J. Goshima, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan, "Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow," *Bone*, vol. 13, no. 1, pp. 81–88, 1992, doi: 10.1016/8756-3282(92)90364-3.
- [112] S. M. McGee Russel, "Histochemical Methods for Calcium," *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, vol. 6, no. 1, pp. 22–42, 1958.
- [113] G. L. Humason, *Staining lipids and carbohydrates. In: Animal tissue techniques*. 1972.

- [114] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, and D. Grossin, *Bioactive Ceramics: Physical Chemistry*. Elsevier Ltd., 2011.
- [115] C. Lorenz *et al.*, "Coating of Titanium Implant Materials with Thin Polymeric Films for Binding the Signaling Protein BMP2," *Macromolecular Bioscience*, vol. 11, no. 2, pp. 234–244, 2011, doi: 10.1002/mabi.201000342.
- [116] D. Logeart-Avramoglou, M. Bourguignon, K. Oudina, P. Ten Dijke, and H. Petite, "An assay for the determination of biologically active bone morphogenetic proteins using cells transfected with an inhibitor of differentiation promoter-luciferase construct," *Analytical Biochemistry*, 2006, doi: 10.1016/j.ab.2005.10.030.
- [117] Y. Takuwa, C. Ohse, E. A. Wang, J. M. Wozney, and K. Yamashita, "Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 174, no. 1, pp. 96–101, Jan. 1991, doi: 10.1016/0006-291X(91)90490-X.
- [118] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254, 1976, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [119] P. Corporation, "CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Quick Protocol, FB045," 2012.
- [120] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [121] T. Riss, R. Moravec, A. Niles, *et al.*, and editors. A. G. M. [Internet]. B. (MD): E. L. & C. and the N. C. for A. T. S. 2004- In: Sittampalam GS, Coussens NP, Brimacombe K, *et al.*, "Figure 1: [Structures of MTT and colored formazan product.]. Cell Viability Assays," Jul. 2016.
- [122] Life Technologies, "TaqMan Gene Expression Assay Solutions - Proven performance for fast, reliable results," [https://Tools.Lifetechnologies.Com/Content/Sfs/Brochures/Cms\\_085696.Pdf](https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/cms_085696.pdf).
- [123] Z. A. Qiao, L. Zhang, M. Guo, Y. Liu, and Q. Huo, "Synthesis of mesoporous silica nanoparticles via controlled hydrolysis and condensation of silicon alkoxide," *Chemistry of Materials*, vol. 21, no. 16, pp. 3823–3829, 2009, doi: 10.1021/cm901335k.

- [124] X. S. Zhao and G. Q. Lu, "Modification of MCM-41 by Surface Silylation with Trimethylchlorosilane and Adsorption Study," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 102, no. 9, pp. 1556–1561, 1998, doi: 10.1021/jp972788m.
- [125] A. Satalov, "Nanoporous Silica Nanoparticles and Bone Morphogenetic Protein 2 for Bone Regeneration," 2017.
- [126] D. de Cassan *et al.*, "Attachment of nanoparticulate drug-release systems on poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers via a graftpolymer as interlayer," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 163, pp. 309–320, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.12.050.
- [127] D. G. Phinney, G. Kopen, W. Righter, S. Webster, N. Tremain, and D. J. Prockop, "Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 75, no. 3, pp. 424–436, 1999, doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19991201)75:3<424::AID-JCB8>3.0.CO;2-8.
- [128] F. Matsuoka *et al.*, "Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e55082, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0055082 [pii].
- [129] S. V and S. K, "Bone morphogenetic protein-2 stimulates adipogenic differentiation of mesenchymal precursor cells in synergy with BRL 49653 (rosiglitazone)," *FEBS letters*, vol. 475, no. 3, pp. 201–204, Jun. 2000, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01655-0.
- [130] A. E. Dmitriev, R. A. Lehman, and A. J. Symes, "Bone morphogenetic protein-2 and spinal arthrodesis: The basic science perspective on protein interaction with the nervous system," *Spine Journal*, vol. 11, no. 6, pp. 500–505, Jun. 2011, doi: 10.1016/j.spinee.2011.05.002.
- [131] Y. K. Wang *et al.*, "Bone morphogenetic protein-2-induced signaling and osteogenesis is regulated by cell shape, RhoA/ROCK, and cytoskeletal tension," *Stem Cells and Development*, vol. 21, no. 7, pp. 1176–1186, May 2012, doi: 10.1089/scd.2011.0293.
- [132] H. Lin, Y. Tang, T. P. Lozito, N. Oyster, B. Wang, and R. S. Tuan, "Efficient in vivo bone formation by BMP-2 engineered human mesenchymal stem cells encapsulated in a projection stereolithographically fabricated hydrogel scaffold," *Stem Cell Research and Therapy*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, Aug. 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1350-6.

- [133] A. J. Salgado, M. E. Gomes, A. Chou, O. P. Coutinho, R. L. Reis, and D. W. Hutmacher, "Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds," *Materials Science and Engineering C*, vol. 20, no. 1–2, pp. 27–33, 2002, doi: 10.1016/S0928-4931(02)00009-7.
- [134] A. M. Osyczka, D. L. Diefenderfer, G. Bhargave, and P. S. Leboy, "Different Effects of BMP-2 on Marrow Stromal Cells from Human and Rat Bone," *Cells Tissues Organs*, vol. 176, no. 1–3, pp. 109–119, 2004.
- [135] N. Fekete *et al.*, "GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0043255.
- [136] R. Hannah, M. Beck, R. Moravec, and T. Riss, "CELLTITER-GLO™ Luminescent Cell Viability Assay: A Sensitive and Rapid Method for Determining Cell Viability," *Promega Corporation*.
- [137] "High Sensitivity Luminescence Reporter Gene Assay System." Accessed: Jul. 19, 2020. [Online]. Available: [www.perkinelmer.com](http://www.perkinelmer.com).
- [138] "Dual-Luciferase® Reporter Assay System." [https://www.promega.de/en/products/luciferase-assays/reporter-assays/dual\\_luciferase-reporter-assay-system/?catNum=E1910](https://www.promega.de/en/products/luciferase-assays/reporter-assays/dual_luciferase-reporter-assay-system/?catNum=E1910) (accessed Jun. 12, 2021).
- [139] B. Quaas *et al.*, "Stability and Biological Activity of E. coli Derived Soluble and Precipitated Bone Morphogenetic Protein-2," *Pharmaceutical Research*, vol. 36, no. 12, Dec. 2019, doi: 10.1007/s11095-019-2705-5.
- [140] "DIN EN ISO 10993-5 - 2009-10 - Beuth.de." <https://www.beuth.de/de/norm/din-en-iso-10993-5/113571989> (accessed Aug. 31, 2020).
- [141] A. Hollnagel, V. Oehlmann, J. Heymer, U. Rü Ther ‡, and A. Nordheim, "Id Genes Are Direct Targets of Bone Morphogenetic Protein Induction in Embryonic Stem Cells\*," 1999. Accessed: Dec. 11, 2020. [Online]. Available: <http://www.jbc.org/>.
- [142] M. A. Scott, V. T. Nguyen, B. Levi, and A. W. James, "Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Stem Cells and Development*, vol. 20, no. 10, pp. 1793–1804, Oct. 2011, doi: 10.1089/scd.2011.0040.
- [143] A. W. James, "Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation," vol. 684736, 2013, doi: 10.1155/2013/684736.



- [144] C. Rey, C. Combes, C. Drouet, and D. Grossin, "Bioactive ceramics: Physical chemistry," in *Comprehensive Biomaterials*, vol. 1, Elsevier, 2011, pp. 187–221.
- [145] E. della Bella *et al.*, "Dexamethasone Induces Changes in Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells via SOX9 and PPARG, but Not RUNX2," *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 4785, vol. 22, no. 9, p. 4785, Apr. 2021, doi: 10.3390/IJMS22094785.
- [146] A. Yu, J. Dill, and M. Mitas, "The purine-rich trinucleotide repeat sequences d(CAG)<sub>15</sub> and d(GAC)<sub>15</sub> form hairpins," 1995. Accessed: Jul. 19, 2020. [Online].
- [147] M. Shimizu, R. Gellibolian, B. A. Oostra, and R. D. Wells, "Cloning, characterization and properties of plasmids containing CGG triplet repeats from the FMR-1 gene," *Journal of Molecular Biology*, vol. 258, no. 4, pp. 614–626, May 1996, doi: 10.1006/jmbi.1996.0273.
- [148] T. Katagiri, M. Imada, T. Yanai, T. Suda, N. Takahashi, and R. Kamijo, "Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis," *Genes to Cells*, vol. 7, no. 9, pp. 949–960, 2002, doi: 10.1046/j.1365-2443.2002.00573.x.
- [149] M. Stadtfeld, T. Graf, and F. Varas, "Fluorescent protein-cell labeling and its application in time-lapse analysis of hematopoietic differentiation," 2005. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/8225425>.
- [150] P. C. Bessa *et al.*, "Osteoinduction in human fat-derived stem cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2 produced in *Escherichia coli*," *Biotechnology Letters*, 2008, doi: 10.1007/s10529-007-9501-8.
- [151] C. J. Roberts, "Therapeutic protein aggregation: Mechanisms, design, and control," *Trends in Biotechnology*, vol. 32, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 372–380, 2014, doi: 10.1016/j.tibtech.2014.05.005.
- [152] C. X. Song *et al.*, "Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 43, pp. 197–212, 1997.
- [153] V. Masson, F. Maurin, H. Fessi, and J. P. Devissaguet+, "Influence of sterilization processes on poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanospheres," *Biomaterials*, vol. 18, pp. 327–335, 1997.
- [154] U. Antebi, M. B. Mathor, A. F. da Silva, R. P. Guimarães, and E. K. Honda, "Effects of ionizing radiation on proteins in lyophilized or frozen demineralized human bone," *Revista Brasileira*

- de Ortopedia (English Edition)*, vol. 51, no. 2, pp. 224–230, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.rboe.2016.02.006.
- [155] R. Guillot *et al.*, “The stability of BMP loaded polyelectrolyte multilayer coatings on titanium,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 23, pp. 5737–5746, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.03.067.
- [156] K. Wittmaack, “Excessive delivery of nanostructured matter to submersed cells caused by rapid gravitational settling,” *ACS Nano*, vol. 5, no. 5, pp. 3766–3778, May 24, 2011, doi: 10.1021/nn200112u.
- [157] T. L. Riss *et al.*, *Cell Viability Assays*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- [158] A. Hollnagel, V. Oehlmann, J. Heymer, U. Rütther, and A. Nordheim, “Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 28, pp. 19838–19845, 1999, doi: 10.1074/jbc.274.28.19838.
- [159] T. Ogata, J. M. Wozney, R. Benezra, and M. Noda, “Bone morphogenetic protein 2 transiently enhances expression of a gene, Id (inhibitor of differentiation), encoding a helix-loop-helix molecule in osteoblast-like cells.,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 90, no. 19, pp. 9219–22, 1993, doi: 10.1073/pnas.90.19.9219.
- [160] X. Yang *et al.*, “The stimulatory effect of silica nanoparticles on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells,” *Biomedical Materials (Bristol)*, vol. 12, no. 1, p. 015001, Feb. 2017, doi: 10.1088/1748-605X/12/1/015001.
- [161] A. Neumann, A. Christel, C. Kasper, and P. Behrens, “BMP2-loaded nanoporous silica nanoparticles promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells,” doi: 10.1039/c3ra44734k.
- [162] P. Han, C. Wu, and Y. Xiao, “The effect of silicate ions on proliferation, osteogenic differentiation and cell signalling pathways (WNT and SHH) of bone marrow stromal cells,” *Biomaterials Science*, vol. 1, no. 4, pp. 379–392, Apr. 2013, doi: 10.1039/c2bm00108j.
- [163] M. Shi *et al.*, “Stimulation of osteogenesis and angiogenesis of hBMSCs by delivering Si ions and functional drug from mesoporous silica nanospheres,” *Acta Biomaterialia*, vol. 21, pp. 178–189, Jul. 2015, doi: 10.1016/j.actbio.2015.04.019.

- [164] S. W. Ha, M. Neale Weitzmann, and G. R. Beck, "Bioactive silica nanoparticles promote osteoblast differentiation through stimulation of autophagy and direct association with LC3 and p62," *ACS Nano*, vol. 8, no. 6, pp. 5898–5910, Jun. 2014, doi: 10.1021/nn5009879.
- [165] M. Knippenberg, M. N. Helder, B. Zandieh Doulabi, P. I. J. M. Wuisman, and J. Klein-Nulend, "Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 342, no. 3, pp. 902–908, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.052.
- [166] I. S. Kim *et al.*, "In vitro response of primary human bone marrow stromal cells to recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the early and late stages of osteoblast differentiation," *Development Growth and Differentiation*, vol. 50, no. 7, pp. 553–564, Sep. 2008, doi: 10.1111/j.1440-169X.2008.01052.x.
- [167] A. Abarategi *et al.*, "Gene expression profile on chitosan/rhBMP-2 films: A novel osteoinductive coating for implantable materials," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 7, pp. 2633–2646, Sep. 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2009.02.031.
- [168] J. L. López-Lacomba, J. M. García-Cantalejo, J. v. Sanz Casado, A. Abarategi, V. Correas Magaña, and V. Ramos, "Use of rhBPM-2 activated chitosan films to improve osseointegration," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 3, pp. 792–798, Mar. 2006, doi: 10.1021/bm050859e.
- [169] M. Rajaonarivony, C. Vauthier, G. Couarraze, F. Puisieux, and P. Couvreur, "Development of a new drug carrier made from alginate," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 82, no. 9, pp. 912–917, 1993, doi: 10.1002/jps.2600820909.
- [170] B. L. Strand, Y. A. Mørch, T. Espevik, and G. Skjåk-Bræk, "Visualization of alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules by confocal laser scanning microscopy," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 82, no. 4, pp. 386–394, May 2003, doi: 10.1002/bit.10577.
- [171] S. v. Bhujbal, B. de Haan, S. P. Niclou, and P. de Vos, "A novel multilayer immunisolating encapsulation system overcoming protrusion of cells," *Scientific Reports*, vol. 4, no. 1, pp. 1–8, Oct. 2014, doi: 10.1038/srep06856.
- [172] G. Orive, S. K. Tam, J. L. Pedraz, and J. P. Hallé, "Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy," *Biomaterials*, vol. 27, no. 20, pp. 3691–3700, Jul. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.048.

- [173] Y. Roger, S. Sydow, L. Burmeister, H. Menzel, and A. Hoffmann, "Sustained release of TGF- $\beta$ 3 from polysaccharide nanoparticles induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 189, May 2020, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.110843.

## A Anhang

### A.1 Verwendete Geräte, Materialien und Chemikalien

#### 7.1.2 Geräte

Tabelle A7: Übersicht der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller, Ort
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder, Tuttlingen, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Life Science, Waltham, USA
Geldokumentation	Intas, Göttingen, Deutschland
Heiz-Thermomixer MHR 23	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
Horizontales Gelelektrophorese-System	BRL, Gaithersburg, USA
Laboklav 160V-FA	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
Laboklav 25M	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss, Deutschland
Magnetrührer RCT Basic	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer Synergy I	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, Deutschland
Photometer Genesys 10 Bio	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Real Time PCR System Step One Plus	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Thermocycler TProfessional Basic	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transferpette	Brand, Wertheim, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultratiefkühlschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
UV-Küvette aus Quarzglas	Hellma, Mühlheim, Deutschland
Vortex Mixer VTX-3000 L	Kefo, Ljubljana, Slowakei

Gerät	Hersteller, Ort
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft, Dresden, Deutschland
Zählkammer Fuchs-Rosenthal	Brand, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico 17	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Biofuge Pico 21	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

### A.1.2 Materialien

**Tabelle A8: Verwendete Materialien.**

Material	Hersteller, Ort
Färbeküvette	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Folien Optical Adhesive Covers (qRT)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Loch-Platte 6/12/24/48/96-Loch	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
MicroAmp™Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
MicroAmp™Optical Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad, USA
Mikroreaktionsgefäß 1,5/2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Parafilm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR Multiply-μStrip Pro 8er Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Gefäße 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten Plastik 5/10/25 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10/200/1000/1250 μl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Spritze 20 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflasche 25/75/175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche 300 cm <sup>2</sup>	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellsieb 100 μm	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zentrifugenröhrchen 15/50 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland

### A.1.3 Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits

Tabelle A9: Verwendete Chemikalien, Lösungen und Kits.

Chemikalien, Lösungen, Kits	Hersteller, Ort
1-Brom-3-chlorpropan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2-Mercaptoethanol (für mRNA-Aufreinigung)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Alizarinrot S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ascorbat-2-Phosphat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
bFGF, human	Peprotech, Hamburg, Deutschland
Biocoll	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
BrdU Cell Proliferatin ELISA	abcam
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DAPI	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
dATP/dCTP/dGTP/dNTP/dTTP	GE Healthcare, München, Deutschland
Dexamethason	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriummonohydrogenphosphatdihydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiotreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM high glucose	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM low glucose	Biochrom, Berlin, Deutschland
DNA Stain Clear G	SERVA, Heidelberg, Deutschland
EDTA-Na <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EGF, human	Peprotech, Hamburg, Deutschland
Essigsäure konzentriert	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol p.a. abs.	Roth, Karlsruhe, Deutschland



---

Chemikalien, Lösungen, Kits	Hersteller, Ort
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS Hyclone	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Ficoll-400	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Gelatine Typ B	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
GeneJET Gel Extraction Kit	life technologies, Carlsbad, USA
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (1 M)	Biochrom, Berlin, Deutschland
JETSTAR Plasmid Purification Kit 2.0 Maxi	Genomed, Löhne, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Monophosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Oil Red O	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Para-Formaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
QuantiChrom Phosphate Assay Kit	Bioassay Systems
RevertAid First Strand cDNA-Synthesis Kit	life technologies, Carlsbad, USA
Ribolock Rnase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Salzsäure (37 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq Man Fast Advanced Master Mix	life technologies, Carlsbad, USA
Taq Man Probes	life technologies, Carlsbad, USA
Total Calcium LiquiColor	Stanbio
TriReagent RNA Solution (Trizol)	Ambion, Austin, USA
Trypsin/EDTA (10x)	Biochrom, Berlin, Deutschland
$\beta$ -Glycerophosphat-Pentahydrat	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

## A.2 Spenderübersicht der mesenchymalen Stammzellen

Tabelle A10: Übersicht der verwendeten MSC-Spender.

Spender- nummer	Geschlecht	Alter	Passage	Entnahmeort
42	weiblich	49	5	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
55	männlich	36	5	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
59	männlich	52	6	Unfallchirurgie Medizinische Hochschule Hannover
72	weiblich	69	6	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
76	weiblich	74	4	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
77	weiblich	81	4	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
101	weiblich	45	4	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
108	männlich	60	3	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
109	männlich	63	3	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
111	männlich	79	3	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
112	weiblich	76	4	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
115	männlich	79	4	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
122	weiblich	72	3	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
125	weiblich	71	3	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
126	männlich	?	3	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
127	weiblich	48	3	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH
128	weiblich	41	4	DIAKOVERE Annastift - Orthopädische Klinik der MHH

### A.3 Verwendete Primer

#### 7.1.5 qRT-PCR Primer

Tabelle A11: Verwendete qRT-PCR Primer.

Assay ID	Name	Alternativname	Farbstoff
Hs01060665_g1	ACTB	beta-Actin	FAM
Hs00758162_m1	ALPL	Alkalische Phosphatase	FAM
Hs01587814_g1	BGLAP	Osteocalcin	FAM
Hs00609791_m1	FABP4	Fatty acid binding protein 4	FAM
Hs02758991_g1	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	FAM
Hs00173720_m1	IBSP	Integrin Binding Sialoprotein	FAM
Hs03676575_s1	ID1	Inhibitpr of differentiation 1	FAM
Hs00171409_m1	ID3	Inhibitpr of differentiation 3	FAM
Hs01115513_m1	PPARg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	FAM
Hs03004310_g1	RPS29	Ribosomal Protein S29	FAM
Hs00231692_m1	RUNX2	Runt-related transcription factor 2	FAM
Hs00959010_m1	SPP1	Osteopontin	FAM

### 7.1.6 Semiquantitative PCR-Primer

Tabelle A12: Verwendete Primer semiquantitative PCR.

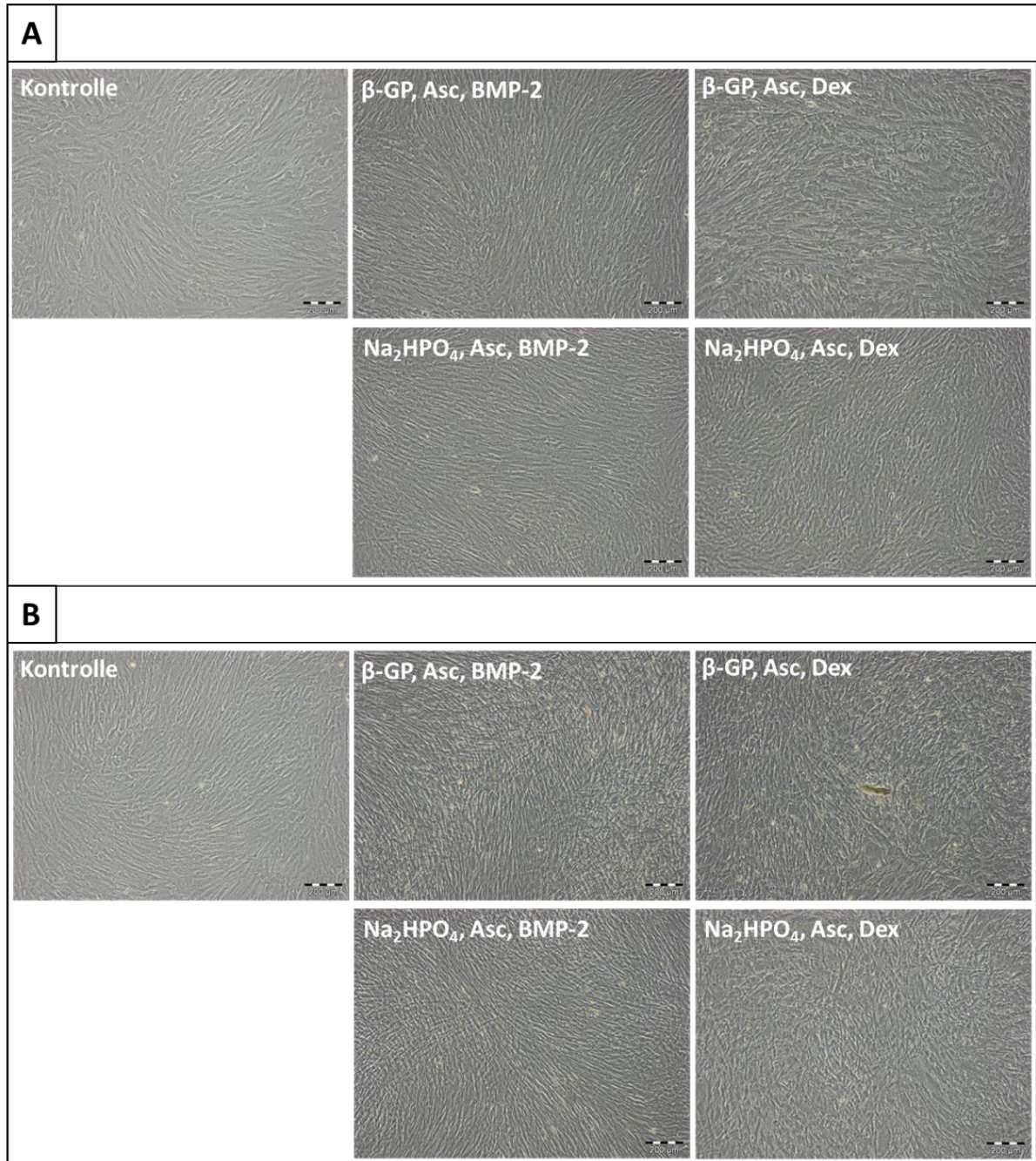
Gen	Organismus	Fragmentgröße [bp]	Annealingtemp. [°C]	Annealingzeit [s]	Sequenz
pGL3-Vektor_for		267	54,2	30	ctagcaaaataggctgtccc
pGL3-Vektor_rev			54,2	30	ctttatgttttggcgtctcca
GAPDH human_for	human	566	60	30	gcaggggggagccaaaagg
GAPDH human_rev	human	566	60	30	tgccagcccagcgtcaaag
TNAP_for	human	526	57,3	30	ctggacctcgttgacacctg
TNAP_rev	human	526	57,3	30	gacattctctcgttcaccgc
SSP-1 / OPN_for	human	348	54	30	ccaagtaagtccaacgaaag
SSP-1 / OPN_rev	human	348	54	30	ggtgatgtcctcgtctgta
BGLAP / Osteocalcin_for	human	218	58,2	20	ctcctcgcctattggcc
BGLAP / Osteocalcin_rev	human	218	58,2	20	ccaactcgtcacagtccgg
IBSP_for	human	450	54	30	aatgaaaacgaagaaagcgaa
IBSP_rev	human	450	54	30	atcatagccatcgtagccttg
FABP4_for	human	418	60	30	gtacctggaacttgtctcc
FABP4_rev	human	418	60	30	gtccaatgcgaacttcagtcc
PPAR-g_for	human	630	54,2	45	gaatgctgtctgtggaga
Gen	Organismus	Fragmentgröße [bp]	Annealingtemp. [°C]	Annealingzeit [s]	Sequenz

156

PPAR-g_rev	human	630	54,2	45	tgaggagagttacttggtcg
Basigin_for	human	357	52,5	30	taaagaaaacccaccccgtagatt
Basigin_rev	human	357	52,5	30	acagaccggtggccctcataaa
PTH/PTHrPrec_for	human	321	65	30	gcacgcgcaactacatccaca
PTH/PTHrPrec_rev	human	321	65	30	agccccacaggtacttcttctct
Autotaxin /ENPP2_for	human	468 / 393 / 381	54,3 (54)	30	caggagaccacggatttgataac
Autotaxin /ENPP2_rev	human	468 / 393 / 381	54,3 (54)	30	aggtcgcccatagaggaggtgt
Dhrs3_for	human	509	53,7 (54)	30	tgagaaatgcctgaaggagacgac
Dhrs3_rev	human	509	53,7 (54)	30	tcagtgggggaaagaggttg

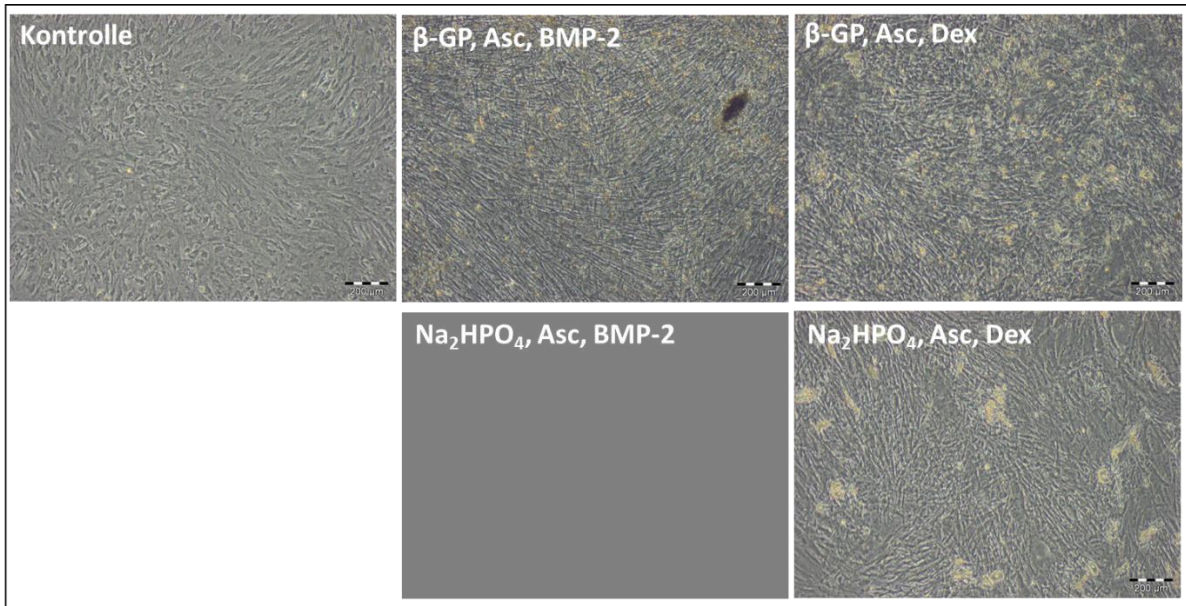
## A.1 Zusätzliche Ergebnisse

### 7.1.6.2 Einfluss unterschiedlicher Phosphatquellen auf die osteogene Differenzierung

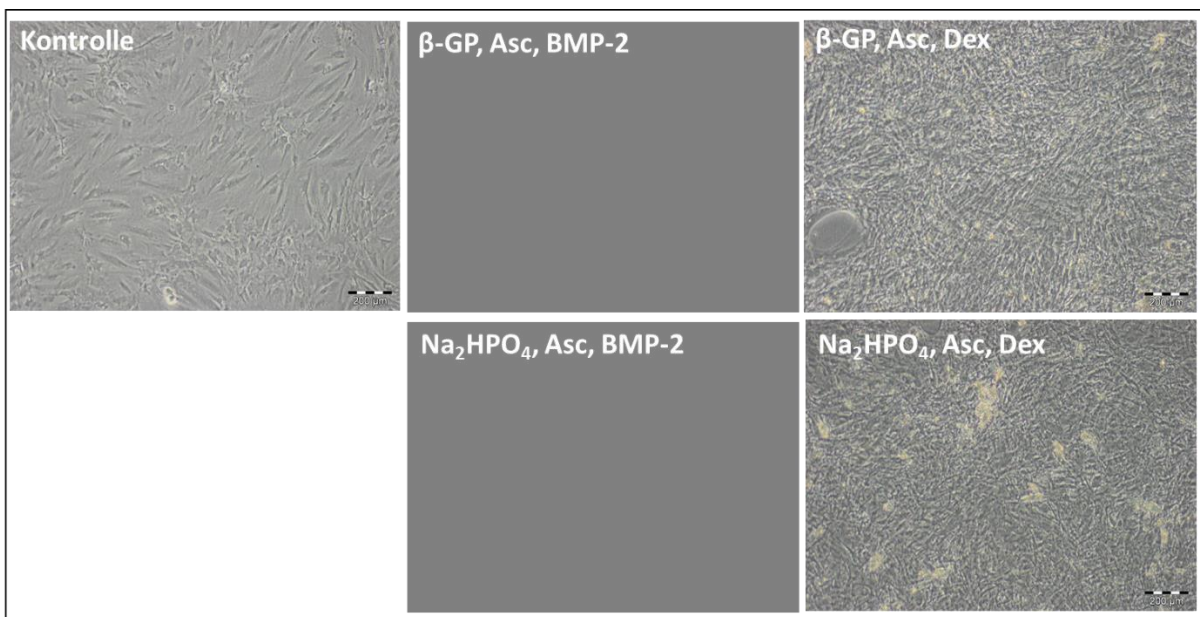


**Abb. A55: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 7 und Tag 14 (MSC 61).** Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Bilder nach einer Differenzierung mit den verschiedenen, in den Bildern beschrifteten Differenzierungszutaten nach 7 Tagen (A) und 14 Tagen (B).

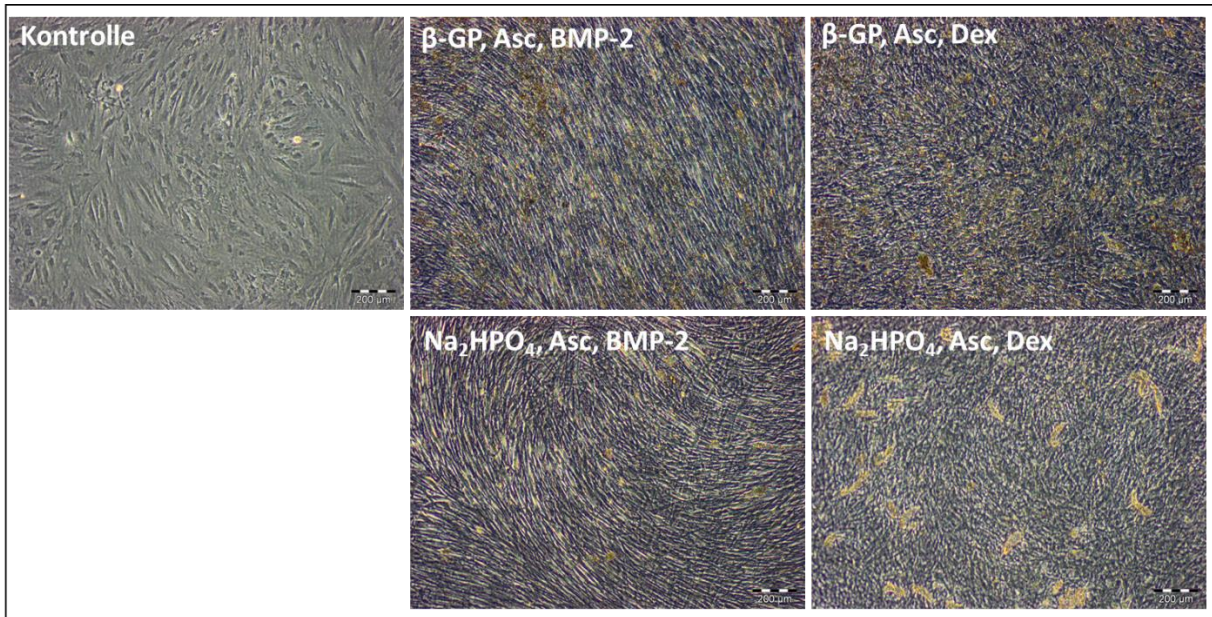




**Abb. A56: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 28 (MSC 59).** Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Bilder nach einer Differenzierung mit den verschiedenen, in den Bildern beschrifteten Differenzierungszutaten nach 28 Tagen.

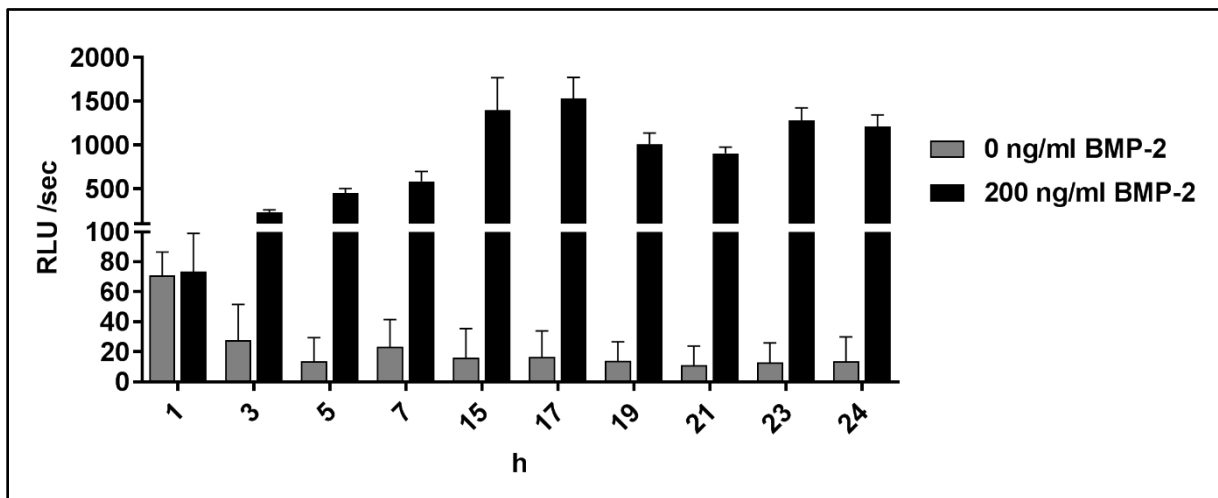


**Abb. A57: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 21 (MSC 62).** Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Bilder nach einer Differenzierung mit den verschiedenen, in den Bildern beschrifteten Differenzierungszutaten nach 21 Tagen. Die Differenzierung wurde anschließend abgebrochen.



**Abb. A58: Morphologische Unterschiede der verschiedenen Induktions-Konditionen zur osteogenen Differenzierung an Tag 28 (MSC 115).** Gezeigt sind die lichtmikroskopischen Bilder nach einer Differenzierung mit den verschiedenen, in den Bildern beschrifteten Differenzierungszutaten nach 28 Tagen.

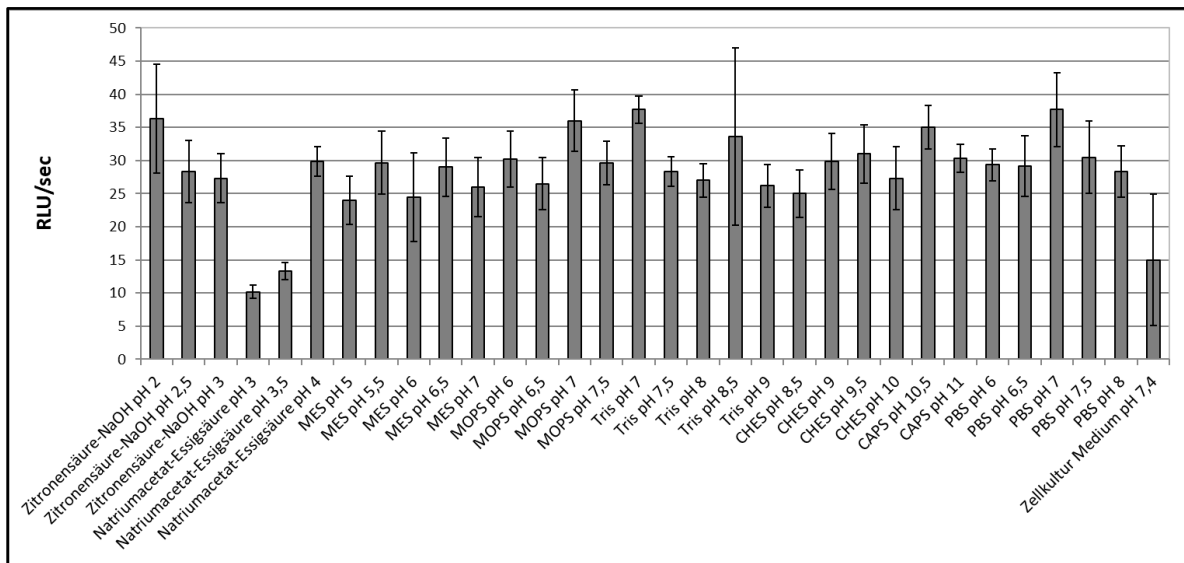
### 7.1.7 BRE-Luc-Kinetik 24-Loch-Platte



**Abb. A59: BRE-Luc-Kinetik im 24-Lochplattenformat.** Dargestellt ist die Kinetik de BRE-Luc-Assays mit jeweils 200 ng/ml und 0 ng/ml als Kontrolle. Gemessen wurden die Zeitpunkte von 1-24 h. n=3.

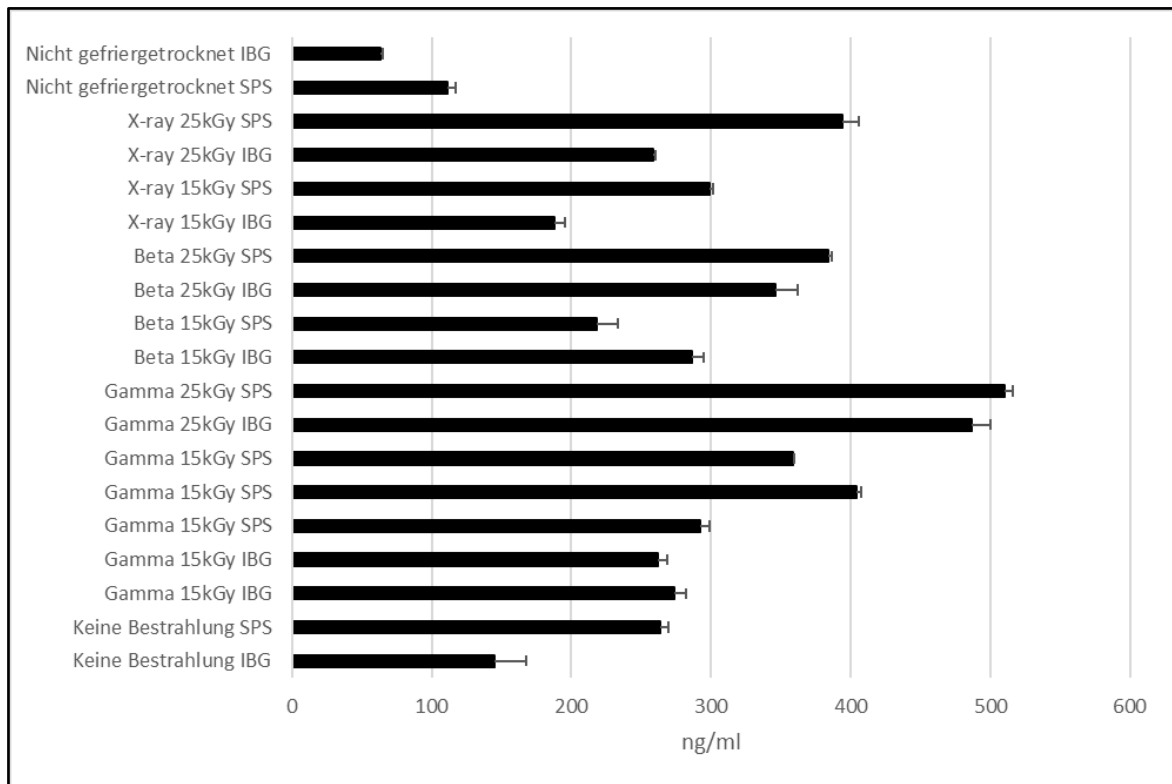


## 7.1.8 Löslichkeitsuntersuchungen von BMP-2 in verschiedenen Pufferlösungen



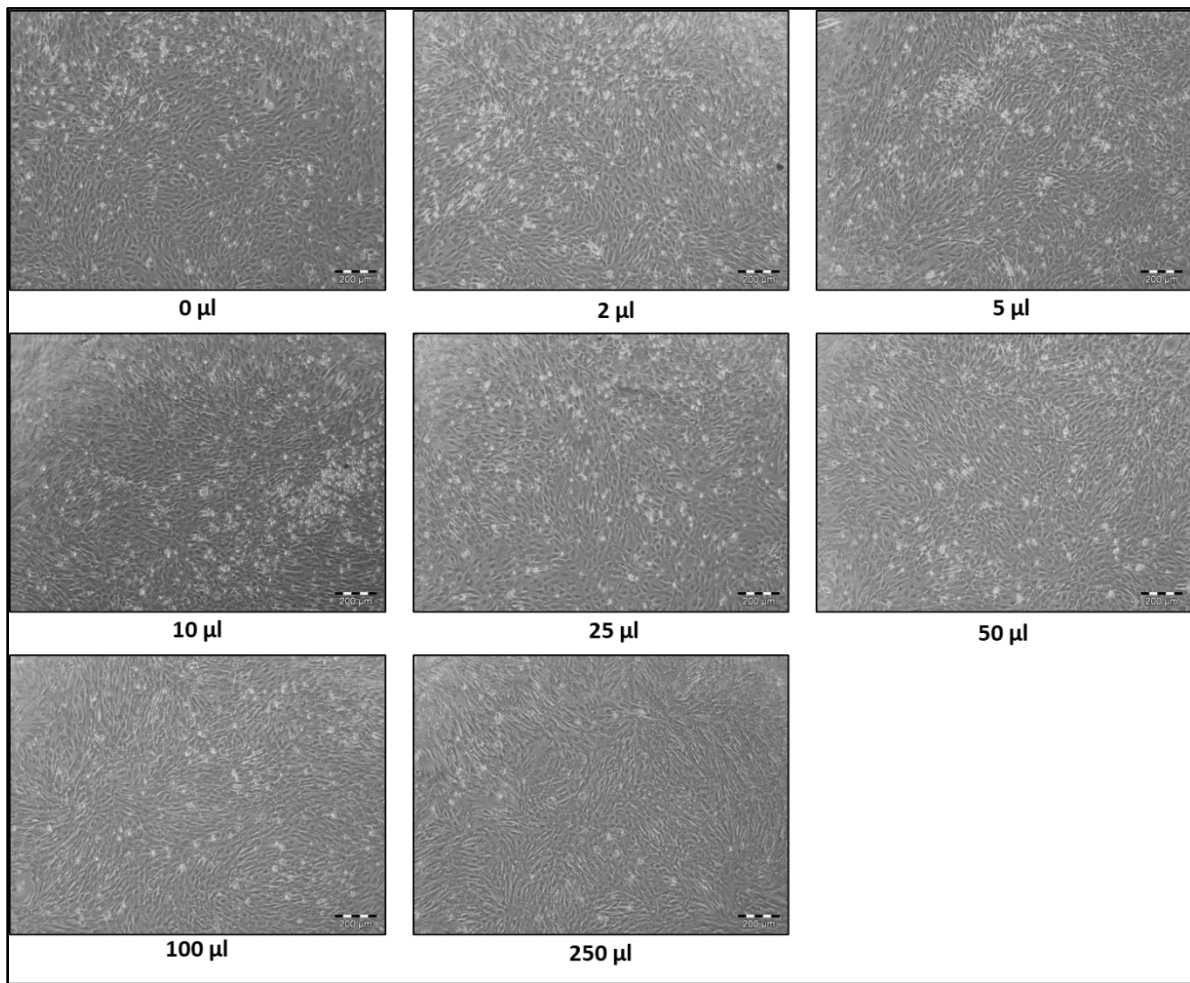
**Abb. A60: BRE-Luc-Messung der für die Löslichkeitsuntersuchung von BMP-2 verwendeten Puffer.** Dargestellt sind Bioaktivitätsmessungen der verwendeten Puffer auf den C2C12 BRE-Luc-Zellen ohne Zugabe von BMP-2, um Kreuzreaktionen auszuschließen. Dargestellt als n=3 mit Standardabweichung.

7.1.9 Sterilisation von BMP-2

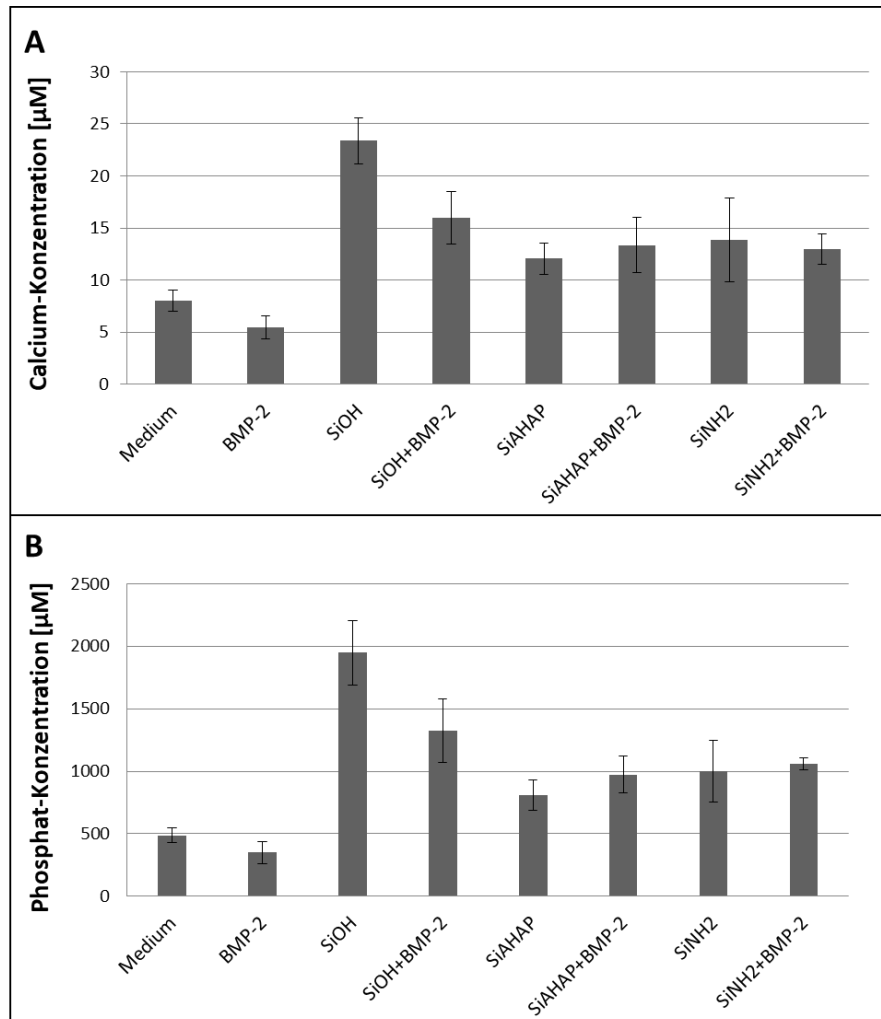


**Abb. A61: Konzentrationsbestimmung der sterilisierten BMP-2 Proben mittels NanoDrop™.** Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messwerten der unterschiedlich sterilisierten BMP-2-Proben in den beiden Lyophilisierungsschutz-Rezepturen.

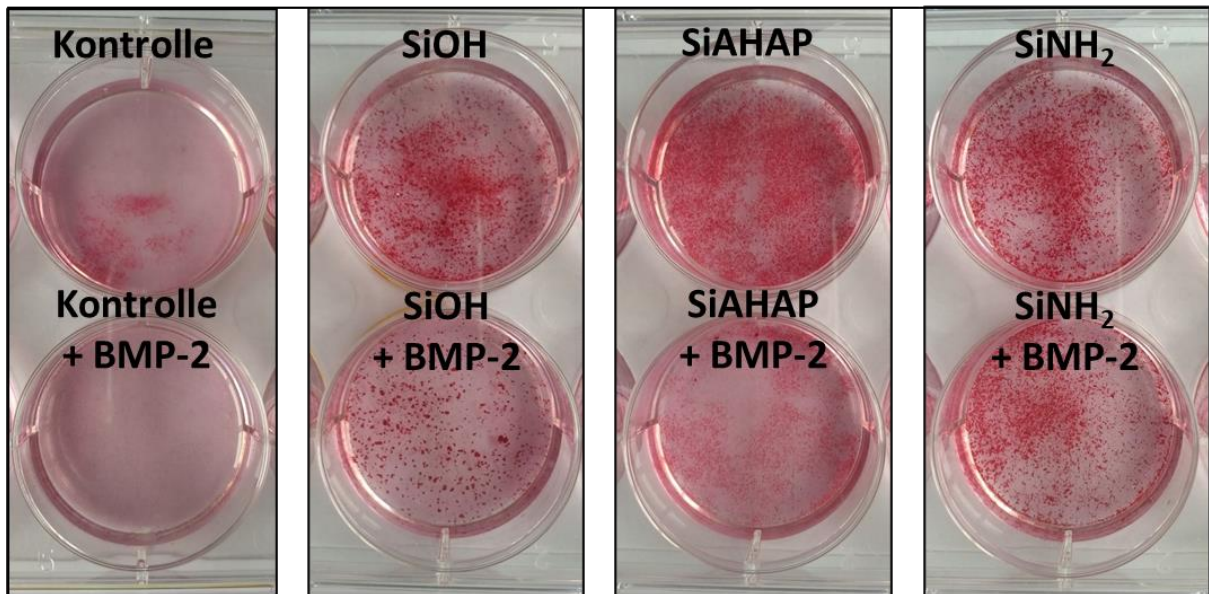
7.1.10 Anorganische nanoporöse Silica-Nanopartikel



**Abb. A62: Untersuchungen zum Effekt von MES-Puffer auf C2C12-Zellen.** Dargestellt ist jeweils die Menge an MES, die mit Zellkulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt wurde. Nach 24 h wurden die Zellen mikroskopisch dokumentiert.

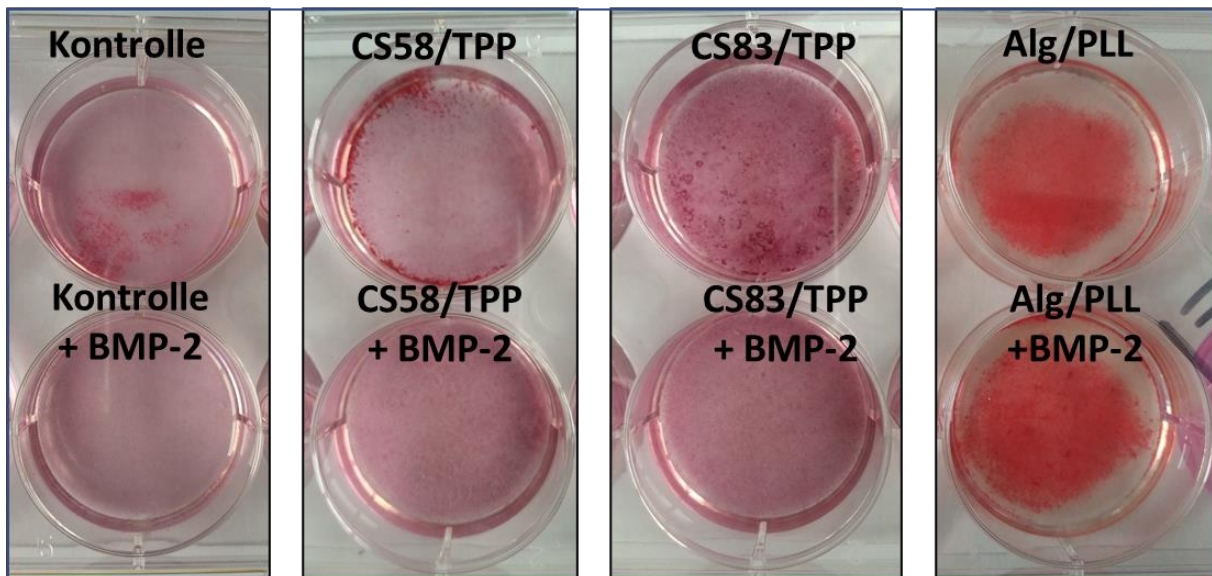


**Abb. A63: Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit NPSNP.** Dargestellt sind die Ergebnisse der kolorimetrischen Calcium- (A) und Phosphatbestimmung (B) der aus den putativ differenzierten Zellen gewonnenen Extrakte, die 28 Tage unter verschiedenen Bedingungen mit NPSNP kultiviert wurden.

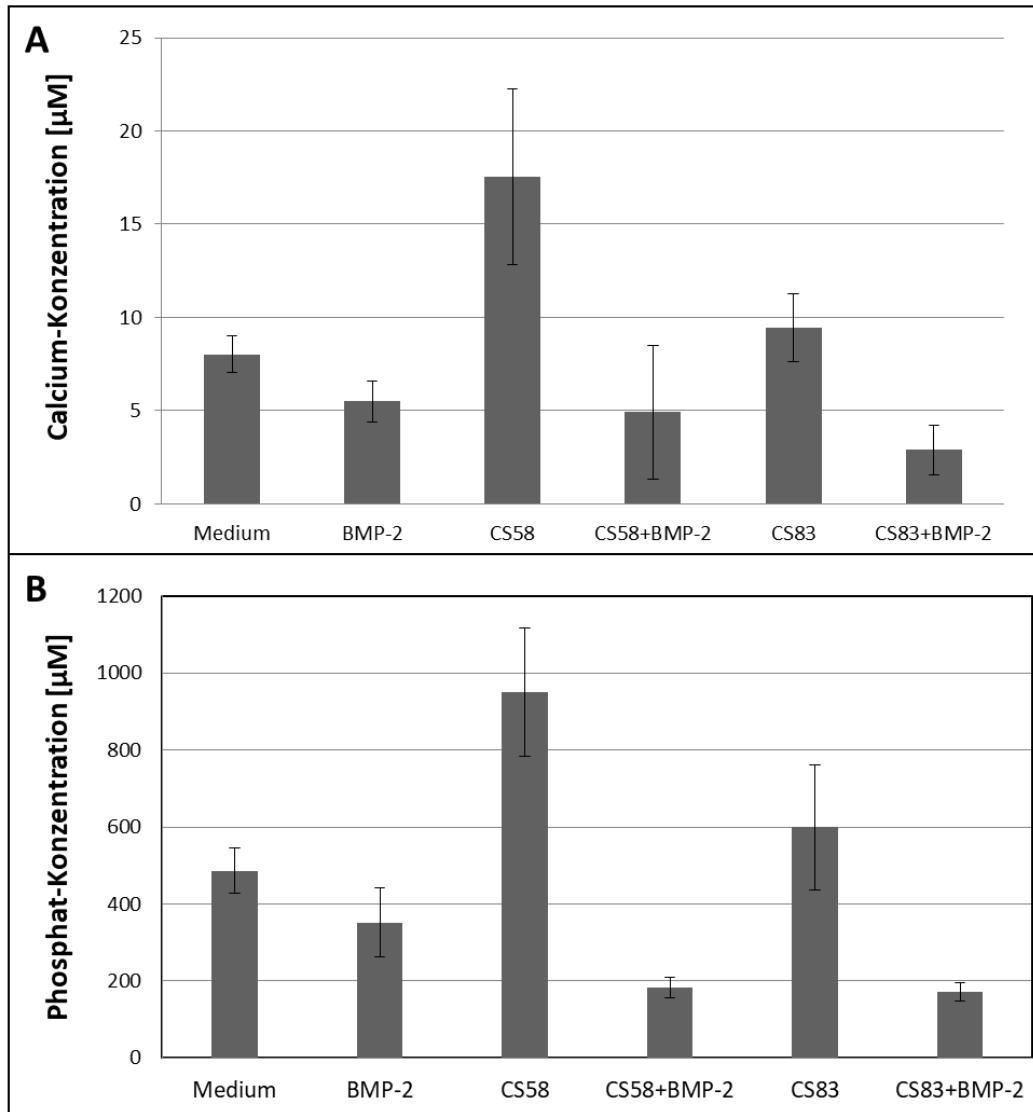


**Abb. A64:** Alizarinrot S-Färbung der putativ mit NPSNP differenzierten Zellen nach 28 Tagen. Dargestellt sind die verschiedenen Konditionen (siehe Beschriftung), die bei dem Differenzierungsversuch mit den NPSNP untersucht wurden. Nach Ende der Differenzierung wurden die Zellen fixiert und nach Protokoll mit Alizarinrot S gefärbt.

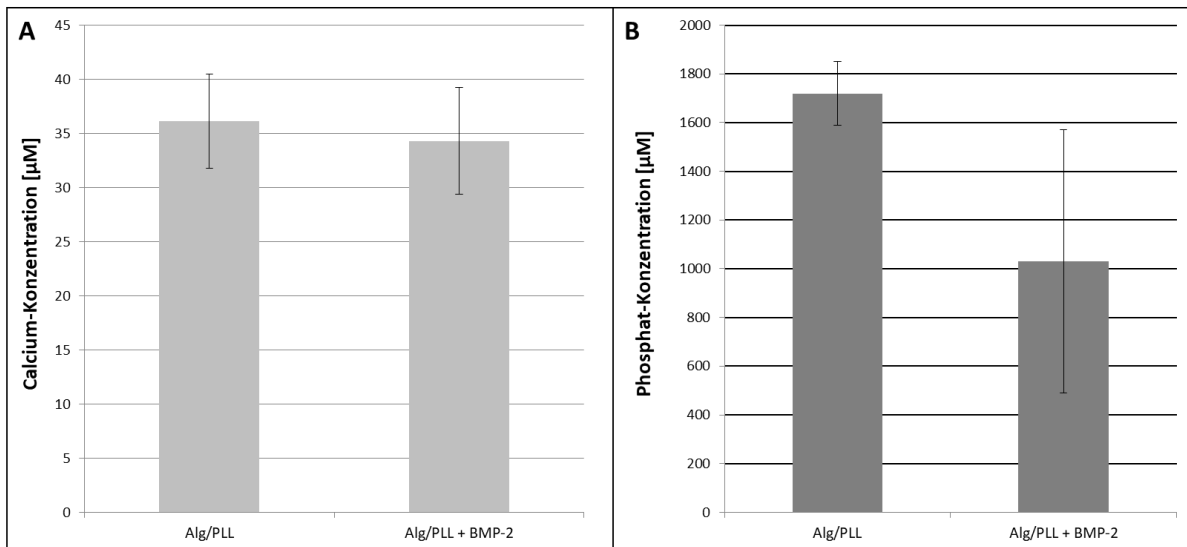
#### 7.1.11 Organische Chitosan/Tripolyphosphat- und Alginat/Poly-L-Lysin-Partikel



**Abb. A65:** Alizarinrot S-Färbung der putativ mit organischen Chitosan/TPP und Alg/PLL differenzierten Zellen nach 28 Tagen. Dargestellt sind die verschiedenen Konditionen (siehe Beschriftung), die bei dem Differenzierungsversuch mit den organischen Partikeln untersucht wurden. Nach Ende der Differenzierung wurden die Zellen fixiert und nach Protokoll mit Alizarinrot S gefärbt.



**Abb. A66: Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit CS/TPP-Partikeln.** Dargestellt sind die Ergebnisse der kolorimetrischen Calcium- (A) und Phosphatbestimmung (B) der aus den putativ differenzierten Zellen gewonnenen Extrakte, die 28 Tage unter verschiedenen Bedingungen mit CS/TPP kultiviert wurden.



**Abb. A67: Kolorimetrische Calcium- und Phosphatbestimmung der Extrakte nach 28 Tagen osteogener Differenzierung mit Alg/PLL-Partikeln.** Dargestellt sind die Ergebnisse der kolorimetrischen Calcium- (A) und Phosphatbestimmung (B) der aus den putativ differenzierten Zellen gewonnenen Extrakte, die 28 Tage unter verschiedenen Bedingungen mit Alg/PLL kultiviert wurden.

## Publikationen

- [1] Y. Roger, S. Sydow, L. Burmeister, H. Menzel und A. Hoffmann, „Sustained release of TGF- $\beta$ 3 from polysaccharide nanoparticles induces chondrogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells,“ *Colloids Surf B Biointerfaces*, p. 189:110843, May 2020.
- [2] Y. Roger, L. Burmeister, A. Hamm, K. Elger, O. Dittrich-Breiholz, T. Flörkemeier und A. Hoffmann, „Heparin Anticoagulant for Human Bone Marrow Does Not Influence In Vitro Performance of Human Mesenchymal Stromal Cells,“ *Cells*, p. 9(7):1580, 29 June 2020.
- [3] J. Sundermann, S. Oehmichen, S. Sydow, L. Burmeister, B. Quaas, R. Hänsch, U. Rinas, A. Hoffmann, H. Menzel und H. Bunjes, „Varying the sustained release of BMP-2 from chitosan nanogel-functionalized polycaprolactone fiber mats by different polycaprolactone surface modifications,“ *J Biomed Mater Res A*, pp. 109(5):600-614, May 2021.
- [4] B. Quaas, B. L. Z. Li, A. Satalov, P. Behrens, A. Hoffmann und U. Rinas, „Stability and Biological Activity of E. coli Derived Soluble and Precipitated Bone Morphogenetic Protein-2,“ *Pharm Res*, p. 36(12):184, 20 November 2019.
- [5] A. Winkel, Y. Jaimes, C. Melzer, P. Dillschneider, H. Hartwig, M. Stiesch, J. von der Ohe, S. Strauss, P. Voigt, A. Hamm, L. Burmeister, Y. Roger, K. Elger, T. Floerkemeier, E. Weissinger, O. Pogozhykh, T. Müller, A. Selich, M. Rothe, S. Petri, U. Köhl, R. Hass und A. Hoffmann, „Cell culture media notably influence properties of human mesenchymal stroma/stem-like cells from different tissues,“ *Cytotherapy*, pp. (11):653-668, 22 November 2020.
- [6] J. Sundermann, S. Sydow, L. Burmeister, A. Hoffmann, H. Menzel und H. Bunjes, „ELISA- and Activity Assay-Based Quantification of BMP-2 Released In Vitro Can Be Biased by Solubility in "Physiological" Buffers and an Interfering Effect of Chitosan,“ *Pharmaceutics*, p. 13(4):582, 19 April 2021.
- [7] B. Oelze, K. Elger, P. Schadzek, L. Burmeister, A. Hamm, S. Laggies, V. Seiffart, G. Gross und A. Hoffmann, „The inflammatory signalling mediator TAK1 mediates lymphocyte recruitment to lipopolysaccharide-activated murine mesenchymal stem cells through interleukin-6,“ *Mol Cell Biochem*, 29 May 2021.



## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Laura Maria Burmeister  
Geburtstag/-ort: 01. November 1989 in Staßfurt

### Bildung

Seit August 2018 PromoCell GmbH – Area Manager  
Seit August 2015 Promotion zum Dr. rer. nat. an der Leibniz Universität Hannover; Anfertigung der Arbeit an der Medizinischen Hochschule Hannover in der Arbeitsgruppe von Frau Professorin Dr. Andrea Hoffmann (Klinik für Orthopädie)  
10.2012 – 08.2014 Technische Universität Braunschweig, Biologie Master of Science, Masterthesis: „The influence of endogenous interferon on tumor cell extravasation“ am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung  
10.2009 – 06.2012 Technische Universität Braunschweig, Biologie Bachelor of Science, Bachelorthesis: „Biochemische Charakterisierung von Mo-Insertase Mutanten aus *Arabidopsis thaliana* und Etablierung einer Molybdat-Nachweisverfahrens“ an der TU Braunschweig  
08.2002 – 06.2009 Gymnasium Ricarda-Huch-Schule, Braunschweig, Allgemeine Hochschulreife  
07.2006 – 06.2007 Oswego High School, Oswego, NY, USA; Besuch im Rahmen eines Highschool- Austauschprogramms