

Neue Biomaterialien für das *Tissue Engineering*  
osteocondraler Gewebe und Knochenzüchtung mittels eines  
innovativen 3D-Bioreaktorsystems

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochem. Kirstin Suck  
geboren am 07.04.1975 in Hamburg

2006

**Referent:** Prof. Dr. T. Scheper  
Institut für Technische Chemie  
Universität Hannover

**Korreferent:** Prof. Dr. M. van Griensven  
Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie  
Wien, Österreich

**Tag der Promotion:** 16.02.2006

**Erklärung**

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen durchgeführt habe. Diese Arbeit wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, im Dezember 2005

## Danksagung

Für die Bereitstellung des spannenden Themas bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. Thomas Scheper. Für die Übernahme des Koreferates danke ich Herrn Professor Dr. Martijn van Griensven.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Walter Sebald vom Institut für physiologische Chemie der Universität Würzburg für die großzügige Spende von BMP-2 und der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care AG für die Bereitstellung der Kollagen-Matrices.

Der Firma Zellwerk GmbH möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Kultivierung mit dem BIOSTAT® Bplus RBS 500 danken.

Dr. Armin Feldhoff und Frank Steinbach vom Institut für physikalische Chemie der Universität Hannover danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Bei Martijn van Griensven möchte ich mich herzlich für die fachliche Unterstützung und das Korrekturlesen bedanken.

Arne danke ich für den missionarischen Einsatz mir  $\LaTeX$  beizubringen und für das Korrekturlesen.

Ein besonders großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter des Arbeitskreises Scheper für das hervorragende Arbeitsklima:

An Dr. Cornelia Kasper für die sehr gute, persönliche Betreuung während der Doktorarbeit und das Korrekturlesen.

An Dr. Frank Stahl und Martin Pähler für die Unterstützung im RNA- und Chip-Labor.

An Larissa für Ihre großartige Unterstützung bei den Laborarbeiten.

An Johanna und Solvig für die Durchsicht dieser Arbeit und an den Denkraum für die gute Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Gerrit für seine Unterstützung und Geduld und meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben.



# Inhalt

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2 Aufgabenstellung</b>	<b>7</b>
<b>3 Theoretische Grundlagen</b>	<b>9</b>
3.1 Mesenchymale Stammzellen . . . . .	9
3.2 Differenzierung zu Osteoblasten und Chondrozyten <i>in vitro</i> . . . . .	9
3.3 Aufbau von Knorpel . . . . .	10
3.4 Entstehung und Aufbau von Knochengewebe . . . . .	11
3.5 Die extrazelluläre Knochenmatrix . . . . .	13
3.6 <i>Tissue Engineering</i> von Knorpel- und Knochenzellen . . . . .	13
3.7 Zellen . . . . .	14
3.8 Matrix . . . . .	15
3.9 Matrices für Knochen und Knorpel . . . . .	16
3.10 Bioreaktoren für Knochen- und Knorpelzüchtung . . . . .	17
3.10.1 Spinnerflaschen . . . . .	18
3.10.2 <i>Rotating Wall Vessel Reactor</i> . . . . .	18
3.10.3 Perfusionskultur . . . . .	19
3.11 Wachstumsfaktoren . . . . .	20
3.11.1 Rezeptoren der TGF- $\beta$ Familie . . . . .	21
3.11.2 Immobilisierung von Wachstumsfaktoren . . . . .	21
3.12 N-Vinylpyrrolidon Polymere . . . . .	23
3.13 RGD-Peptide . . . . .	24
<b>4 Experimenteller Teil</b>	<b>25</b>
4.1 Generieren von Knorpelgewebe auf Kollagen-Matrices . . . . .	25
4.1.1 Isolierung und Kultivierung von Knorpelzellen . . . . .	25
4.1.2 Kollagen-Matrices . . . . .	26
4.1.3 Kultivierung auf Kollagen-Matrices . . . . .	27
4.1.4 Histologische und immunhistologische Färbungen . . . . .	27
4.1.5 Expression von Kollagen II . . . . .	29
4.1.6 Fazit . . . . .	29
4.2 Matrices und Kultivierungsbedingungen für die Herstellung von Knochengewebe	30

4.2.1	Biokeramiken . . . . .	30
4.2.2	Besiedlung von Sponceram <sup>®</sup> -Matrices für die statische Kultivierung . . . . .	30
4.2.3	Aufbau des BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500 . . . . .	31
4.2.4	Kultivierung im BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500 . . . . .	33
4.3	Immobilisierung von BMP-2 mittels N-Vinylpyrrolidon und RGD-Peptiden . . . . .	33
4.3.1	Aktivierung von N-Vinylpyrrolidon und Bindung an Aminogruppen . . . . .	34
4.3.2	Bindung von BMP-2 an N-Vinylpyrrolidon . . . . .	34
4.3.3	Adsorption von N-Vinylpyrrolidon an Sponceram <sup>®</sup> . . . . .	36
4.3.4	Einfluss von N-Vinylpyrrolidon auf die Viabilität/Proliferation . . . . .	36
4.3.5	Einfluss von kovalent gebundenem BMP-2 auf die Alkalische-Phosphatase-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen . . . . .	37
4.3.6	Bindung von BMP-2 an RGD . . . . .	40
4.3.7	Adsorption von RGD und RGD/Protein auf Sponceram <sup>®</sup> . . . . .	43
4.3.8	Fazit . . . . .	45
4.4	Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen zu Knochengewebe . . . . .	45
4.4.1	Proliferation der MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram <sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Kultivierungsbedingungen . . . . .	46
4.4.2	REM-Aufnahmen der MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram <sup>®</sup> nach statischer Kultivierung . . . . .	47
4.4.3	Alkalische-Phosphatase-Aktivität unter statischen Kultivierungsbedingungen . . . . .	48
4.4.4	Limitierung unter statischen Kultivierungsbedingungen . . . . .	49
4.4.5	Kultivierung der MC3T3-E1-Zellen im BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500 . . . . .	50
4.4.6	Wachstum der MC3T3-E1-Zellen im BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500 . . . . .	51
4.4.7	Mineralisierung der extrazellulären Matrix . . . . .	51
4.4.8	Struktur der extrazellulären Matrix . . . . .	52
4.4.9	Ergebnisse der RNA-Isolierung . . . . .	53
4.4.10	Expression knochenspezifischer Gene . . . . .	54
4.4.11	Fazit . . . . .	55
4.5	Kultivierung von humanen BMSCs und Osteoblasten zur Herstellung von Knochengewebe . . . . .	56
4.5.1	Proliferation der BMSCs auf Sponceram <sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Kultivierungsbedingungen . . . . .	57
4.5.2	Alkalische Phosphatase Aktivität der BMSCs unter statischen Kultivierungsbedingungen . . . . .	58
4.5.3	Mineralisierung der extrazellulären Matrix in Monolayerkultur . . . . .	59
4.5.4	Morphologische Veränderung der BMSCs . . . . .	60

---

4.5.5	Isolierung von humanen Osteoblasten . . . . .	62
4.5.6	Proliferation der Osteoblasten auf Sponceram <sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Kultivierungsbedingungen . . . . .	62
4.5.7	Morphologische Veränderung der Osteoblasten . . . . .	63
4.5.8	Kultivierung der humanen Osteoblasten im BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500 . . . . .	64
4.5.9	Mineralisierung der extrazellulären Matrix . . . . .	65
4.5.10	Struktur der extrazellulären Matrix . . . . .	66
4.5.11	Ergebnisse der RNA-Isolierung . . . . .	67
4.5.12	RT-PCR-Analyse knochenspezifischer Gene . . . . .	68
4.5.13	Expressionsanalyse knochenspezifischer Gene mittels humanem Knochen/Knorpelchip . . . . .	69
4.5.14	Fazit . . . . .	70
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>77</b>
6.1	Statistik . . . . .	77
6.2	Medien und Puffer . . . . .	77
6.3	Säugerzellen . . . . .	78
6.4	Methoden . . . . .	78
6.4.1	Zellkultur . . . . .	78
6.4.2	Histologische Färbung der Knorpelzellen mit Safranin O . . . . .	79
6.4.3	Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II . . . . .	79
6.4.4	Fixierung von Zellen . . . . .	80
6.4.5	Toluidinblau-Färbung . . . . .	81
6.4.6	Alizarinrot-Färbung . . . . .	81
6.4.7	Von-Kossa-Färbung . . . . .	81
6.4.8	Raster-Elektronen-Mikroskopie . . . . .	81
6.4.9	MTT-Test . . . . .	82
6.4.10	Alkalische-Phosphatase-Aktivitätstest . . . . .	82
6.4.11	Proteinbestimmung . . . . .	82
6.4.12	DNA-Bestimmung . . . . .	83
6.4.13	RNA-Isolierung . . . . .	83
6.4.14	Qualitätskontrolle der RNA . . . . .	84
6.4.15	cDNA-Synthese . . . . .	84
6.4.16	RT-PCR . . . . .	85
6.4.17	Agarosegelelektrophorese . . . . .	86
6.4.18	cDNA-Synthese für Chipexperimente . . . . .	87

---

6.4.19	Aufreinigung der cDNA . . . . .	88
6.4.20	Transfer der cDNA auf den Chip . . . . .	88
6.4.21	Aktivierung von N-Vinylpyrrolidon . . . . .	89
6.4.22	Bindung von Proteinen an N-VP-DAAc . . . . .	89
6.4.23	Konzentrationsbestimmung des Polymers . . . . .	89
6.4.24	Konzentrationsbestimmung von RGD mittels HPLC . . . . .	89
6.4.25	SDS-Gelelektrophorese . . . . .	90
6.5	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	93
6.6	Geräte und Reagenzien . . . . .	95

## Abbildungsverzeichnis

3.1	BMSCs-Entwicklung . . . . .	9
3.2	Osteozyten-Reifung . . . . .	11
3.3	Proteinexpression während der Osteoblastenreifung . . . . .	12
3.4	Prinzip des <i>Tissue Engineering</i> . . . . .	14
3.5	Bioreaktoren-Spinnerflasche . . . . .	18
3.6	Bioreaktoren- <i>Rotating Wall Vessel Bioreactor</i> . . . . .	19
3.7	Bioreaktoren-Perfusionsreaktor . . . . .	20
3.8	Struktur von N-VP-DAAc . . . . .	23
4.1	Knorpelzellen im Phasenkontrast . . . . .	26
4.2	Matriderm zur statischen Kultivierung . . . . .	27
4.3	Safranin-O-Färbung . . . . .	28
4.4	Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II . . . . .	28
4.5	PCR-Ergebnisse von Kollagen II . . . . .	29
4.6	Sponceram <sup>®</sup> -Matrices . . . . .	31
4.7	BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500 und <i>GMP-Breeder</i> . . . . .	32
4.8	Schema BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500 . . . . .	32
4.9	Schema Immobilisierung von BMP-2 . . . . .	34
4.10	Bindung von N-VP-DAAc an Proteine . . . . .	35
4.11	Bindungsnachweis von N-VP-DAAc an BMP-2 . . . . .	35
4.12	Einfluss von N-Vinylpyrrolidon auf die Proliferation von SAOS-2-Zellen . . . . .	37
4.13	AP-Aktivität von gebundenem BMP-2 an N-VP-DAAc . . . . .	38
4.14	AP-Aktivität von adsorbierten BMP-2, BMP-2/Polymer im Vergleich zu BMP-2- bzw. Differenzierungs-Medium . . . . .	40
4.15	Struktur - Glutaraldehyd . . . . .	41
4.16	Bindungsnachweis von RGD an RNase . . . . .	41
4.17	Bindungsnachweis von RGD an BMP-2 . . . . .	42
4.18	Adsorption von RGD an Sponceram <sup>®</sup> . . . . .	43
4.19	Viabilität/Proliferation von MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram <sup>®</sup> und Spon- ceram/HA unter statischen Bedingungen . . . . .	46
4.20	Toluidinblaufärbung von MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram <sup>®</sup> unter statischen Bedingungen . . . . .	47
4.21	REM von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram <sup>®</sup> unter statischen Bedin- gungen . . . . .	48
4.22	AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram <sup>®</sup> unter statischen Bedin- gungen . . . . .	49

---

4.23 Viabilität und Proteingehalt von MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram <sup>®</sup> unter statischen Bedingungen . . . . .	50
4.24 Glukoseverbrauch von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram <sup>®</sup> im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . . . .	51
4.25 Mineralisierung von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram <sup>®</sup> im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . . . .	52
4.26 REM von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram <sup>®</sup> im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS .	53
4.27 Agilent 2100 Bioanalyser Ergebnisse der MC3T3-E1-RNA nach Kultivierung im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . . . .	54
4.28 RT-PCR von MC3T3-E1-Zellen nach Kultivierung im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . .	55
4.29 Viabilität/Proliferation von BMSCs unter statischen Kultivierungsbedingungen	57
4.30 Toluidinblaufärbung von BMSCs auf Sponceram <sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Bedingungen . . . . .	58
4.31 AP-Aktivität von BMSCs auf Sponceram <sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Bedingungen . . . . .	59
4.32 Von-Kossa-Färbung der BMSCs in 6-Lochplatten . . . . .	60
4.33 Alizarinrot-Färbung der BMSCs in 6-Lochplatten . . . . .	60
4.34 Morphologische Veränderung der BMSCs . . . . .	61
4.35 Toluidinblaufärbung/REM von Osteoblasten auf Sponceram <sup>®</sup> unter statischen Bedingungen . . . . .	62
4.36 Viabilität/Proliferation von Osteoblasten auf Sponceram <sup>®</sup> unter statischen Kultivierungsbedingungen . . . . .	63
4.37 Morphologische Veränderung der Osteoblasten . . . . .	64
4.38 Glukoseverbrauch der Osteoblasten kultiviert im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . . . .	64
4.39 Mineralisierung der humanen Osteoblasten kultiviert auf Sponceram <sup>®</sup> und Sponceram/HA im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . . . .	65
4.40 REM von humanen Osteoblasten kultiviert auf Sponceram <sup>®</sup> und Sponceram/HA im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . . . .	66
4.41 Agilent 2100 Bioanalyser Ergebnisse der humanen Osteoblasten-RNA nach Kultivierung im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . . . .	67
4.42 RT-PCR humaner Osteoblasten nach Kultivierung im BIOSTAT <sup>®</sup> RBS . . .	68

## Zusammenfassung

Für die Behandlung von Knorpel- und Knochenerkrankungen kommt immer mehr das *Tissue Engineering* zum Einsatz. Das Prinzip dabei ist, Träger-Materialien mit Zellen zu besiedeln, diese *in vitro* zu kultivieren und anschließend die entstandenen Gewebekonstrukte in den Patienten zu implantieren. Für diesen Ansatz müssen oft teure Wachstumsfaktoren eingesetzt werden, um den entsprechenden Differenzierungsstatus des Zielgewebes zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Träger-Materialien auf Ihre Eignung zur Züchtung künstlichen Knorpel- und Knochengewebes getestet. Die Kultivierung wurde zunächst unter statischen Bedingungen, d. h. in Zellkulturschalen, durchgeführt.

Zur Kultivierung von Knorpelzellen wurde eine Kollagen-Matrix (Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck), die bisher in der Kosmetik und Wundheilung eingesetzt wird, verwendet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Matrix zur Kultivierung von primären Knorpelzellen (Schwein) geeignet war und die Differenzierung der Zellen, auch ohne die Zugabe des knorpel-spezifischen Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ), unterstützte.

Weiterhin wurde der knochenspezifische Wachstumsfaktor *Bone Morphogenetic Protein 2* (BMP-2) auf einer Matrix immobilisiert und der Einfluss auf die Differenzierung zu Knochenzellen untersucht. Dabei wurde BMP-2 kovalent an biokompatible N-Vinylpyrrolidon Polymere (N-VP-DAAc) und das Tripeptid RGD (Arginin Glycin Asparaginsäure) gebunden. Die Bindungsprodukte wurden auf der keramischen Sponceram<sup>®</sup>-Matrix (Zellwerk GmbH, Oberkrämer) adsorbiert und diese anschließend mit Zellen besiedelt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Bindungsprodukte keinen negativen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hatten. Die Differenzierung zu Knochengewebe war jedoch durch die Zugabe von ungebundenem BMP-2 zum Medium effizienter.

Für die Kultivierung von Knochenzellen wurden auf Sponceram<sup>®</sup> und Hydroxylapatit beschichtetem Sponceram<sup>®</sup> (Sponceram/HA) eine Osteoblasten-Vorläuferzelllinie, humane Knochenmarkstammzellen (*Bone Marrow Stroma Cells*, BMSCs) und primäre humane Osteoblasten zunächst unter statischen Bedingungen erfolgreich kultiviert.

Darüber hinaus wurde die Herstellung von Knochengewebe in einem neu entwickelten 3-D-Bioreaktorsystem etabliert. Die Kultivierung der Vorläuferzelllinie MC3T3-E1 auf Sponceram<sup>®</sup> im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 Reaktorsystem (Sartorius BBI Systems, Göttingen) zeigte, dass auch ohne die Zugabe des Wachstumsfaktors BMP-2 eine Differenzierung zu Knochengewebe induziert wurde.

Die Herstellung von Knochengewebe aus primären humanen Osteoblasten war auf beiden Keramiken im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 erfolgreich.

Schlagwörter: Tissue Engineering, Knochen, Knorpel, Differenzierung, Bioreaktor



## Abstract

Cartilage and bone generation by using the *Tissue Engineering* approach is one of the most promising techniques in the biomedical field. The principle of *Tissue Engineering* is to culture cells on an appropriate matrix *in vitro* and to integrate the developed construct into the defect of the patient. To induce or maintain the differentiation pattern of the desired tissue special proteins called growth factors are necessary.

In the present study new matrices for cartilage and bone *Tissue Engineering* were applied. The first tests were performed under static conditions in cell culture dishes.

A collagen matrix from Dr. Suwelack Skin & Health Care AG (Billerbeck) was used for the cultivation of primary chondrocytes (pig). Currently, this matrix is in use for cosmetics and wound healing purposes. The results of this work revealed that the matrix was suitable for the cultivation of chondrocytes. The cells showed good proliferation results and the matrix supported the differentiation status of the cartilage tissue, even in the absence of the growth factor transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ).

In additional experiments bone specific growth factor bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) was immobilized on a ceramic Sponceram<sup>®</sup> (Zellwerk GmbH, Oberkrämer) matrix and its influence on the differentiation to bone tissue was investigated. BMP-2 was covalently bound to biocompatible N-vinylpyrrolidone polymere (N-VP-DAAc) and RGD-peptides (arginine glycine asparatic acid). The coupling products were adsorbed to Sponceram<sup>®</sup> and afterwards the matrices were seeded with cells. The results showed that the coupling products had no inhibitory effect on the cell proliferation. The results of bone differentiation revealed, that the addition of uncoupled BMP-2 to the cell culture medium was more efficient than the adsorption of the coupling products.

The cultivation of bone tissue under static conditions on Sponceram<sup>®</sup> and hydroxyapatite coated Sponceram<sup>®</sup> (Sponceram/HA) was successfully performed with an osteoblastic like precursor cell line, human bone marrow stroma cells (BMSCs) and human osteoblasts.

In addition for the generation of bone tissue a newly developed 3D-bioreactor system was applied. Cultivating the precursor cell line MC3T3-E1 cells on Sponceram<sup>®</sup> in the BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 bioreactor (Sartorius BBI Systems, Göttingen) showed, that bone differentiation was also promoted in the absence of BMP-2.

The development of bone tissue from primary human osteoblasts in the BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 was successful on Sponceram<sup>®</sup> and Sponceram/HA.

Keywords: Tissue Engineering, Bone, Cartilage, Differentiation, Bioreactor



## 1 Einleitung

Knorpel- und Knochendefekte haben eine hohe Inzidenz und werden durch Unfälle, Tumore, entzündliche oder altersbedingte Erkrankungen hervorgerufen. Gelenkschmerzen, ein typisches Symptom der mittleren und älteren Generation, werden meist durch Arthritis oder durch den Verlust von Knorpelgewebe hervorgerufen. Das Problem dabei ist, dass Gelenkknorpel sich kaum selbst regeneriert. Oft werden als letzte Konsequenz künstliche Gelenke eingesetzt, die jedoch eine eingeschränkte Lebensdauer haben. Eine der neuen Heilungsmethoden ist die so genannte Autologe- (körpereigene) Chondrozyten-Transplantation (ACT). Diese Methode beinhaltet eine *ex vivo* Expansion von patienteneigenen Knorpelzellen (Chondrozyten), die anschließend in den Patienten reimplantiert werden. Diese Methode führt zur Regeneration von Knorpelgewebe.

Bei Knochendefekten wird häufig die Autologe-Knochen-Transplantation angewandt, bei der das Knochenmaterial meistens aus dem Becken entnommen und verpflanzt wird. Bei großen Defekten z. B. der Röhrenknochen ist diese Methode jedoch nicht ausreichend. Als Alternative werden tiefgefrorene Knochen von Spendern (aus Leichen) implantiert. Kritisch dabei ist das mögliche Infektionsrisiko mit Bakterien oder Viren durch das Spendermaterial und mögliche Abstoßungsreaktionen.

Ein vielversprechender Ansatz zur Heilung von Knorpel- und Knochendefekten ist das so genannte *Tissue Engineering*, bei dem künstliches Gewebe *in vitro* gezüchtet wird. Das Prinzip dabei ist, dass Zellen (oft Stammzellen) oder auch Gewebe *in vitro* auf einer formgebenden Matrix angesiedelt werden, und das Konstrukt in Kultur eine dreidimensionale Gewebestruktur bildet. Anschließend wird das Implantat in den Gewebedefekt des Patienten integriert.

Die Zellen zur Herstellung von Knorpel- oder Knochenkonstrukten können von Spendern (allogen), oder von einer anderen Spezies (xenogen) stammen. Im Idealfall sollten die Zellen vom Patienten selbst (autolog) stammen, damit Abstoßungsreaktionen vermieden werden. Dabei können verschiedene Zelltypen zum Einsatz kommen. Chondrozyten oder Osteoblasten (Knochenzellen), entsprechen bereits dem Gewebetyp, haben jedoch eine begrenzte Proliferationsaktivität. Da Stammzellen eine gesteigerte Proliferationsaktivität haben, werden für das *Tissue Engineering* z. B. Knochenmarkstammzellen eingesetzt, die u. a. zu Knorpel- und Knochenzellen differenziert werden können.

Für schnelles Zellwachstum sollte die verwendete Matrix einfach zu besiedeln und formgebend für das entstehende Gewebe sein. Sie muss in jedem Fall biokompatibel sein, mechanische Stabilität aufweisen und sollte die Eigenschaften des entstehenden Zielgewebes zur Unterstützung der Differenzierung imitieren. Für ideales Knorpel- und Knochenwachstum ist eine poröse, interkonnektierte Struktur vorteilhaft, damit der Transport von Nährstoffen und Abbauprodukten des entstehenden Gewebes gewährleistet ist.

Für die gezielte Herstellung des Differenzierungsmusters von Knorpel- oder Knochengewebe *in vitro* müssen teure Wachstums- und Differenzierungsfaktoren eingesetzt werden. Die optimale Verwendung dieser Proteine in der Zellkultur ist weitgehend ungeklärt. Bisher werden sie meistens während der Kultivierung dem Medium zugegeben.

Die Kultivierung der Zell/Matrix Konstrukte für das *Tissue Engineering* erfolgt überwiegend unter statischen Bedingungen, d. h. in Gewebekulturschalen. Problematisch dabei ist, dass unter statischen Bedingungen die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen auf bzw. innerhalb einer dreidimensionalen Matrix inhomogen ist. Dies kann zu einem verlangsamten Wachstum bis hin zum Absterben des Gewebes auf der Matrix führen. Für den Einsatz im Patienten sollte das Gewebekonstrukt möglichst schnell und funktionsfähig herzustellen sein. Dieser Anspruch führte in den letzten Jahren dazu, dass speziell angepasste Bioreaktoren für die kontrollierte Herstellung künstlicher Gewebe eingesetzt werden. Durch die Verwendung von Bioreaktoren ist eine bessere Versorgung der Zellen gewährleistet, so dass schneller ein biologisch aktives, reproduzierbares Gewebe entsteht.

## 2 Aufgabenstellung

Für die Kultivierung von Knorpelzellen werden oft Trägermaterialien natürlichen Ursprungs wie Chitosane, Alginate und Kollagene eingesetzt. Nach der Isolierung von Chondrozyten aus Knorpelgewebe haben diese die Eigenschaft in Zellkultur zu dedifferenzieren. Zur Redifferenzierung wird hauptsächlich der Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  oder eine entsprechend geeignete Matrix eingesetzt. Hier soll eine Matrix der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care zur Kultivierung von primären Knorpelzellen aus Schwein eingesetzt werden. Bisher finden die Matrices hauptsächlich Anwendung in der Kosmetikindustrie und der Wundheilung. Weiterhin soll der Einfluss von TGF- $\beta$  im Kulturmedium auf die Differenzierung der Zellen untersucht werden. Zur Analyse des Differenzierungsgrads der Knorpelzellen auf den Matrices soll die Expression des Hauptknorpelproteins Kollagen II analysiert werden. Dies soll mittels RT-PCR und immunhistologischer Färbung erfolgen. Zusätzlich werden durch Färbung mit Safranin O, das an saure Proteoglykane bindet, weitere Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) von Knorpel nachgewiesen.

Für die Kultivierung von Knochenzellen zum Einsatz im *Tissue Engineering* werden u. a. Keramiken, wie z. B. Hydroxylapatit verwendet. Sponceram<sup>®</sup> ist eine Keramik, die von der Firma Zellwerk GmbH zur Kultivierung von adhären Zellen im 3D-Bioreaktorsystem BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 (Sartorius BBI Systems, Göttingen) hergestellt wurde. In dieser Arbeit soll Sponceram<sup>®</sup> und das Reaktorsystem zur Herstellung von Knochengewebe eingesetzt werden. Zur Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten *in vitro* wird hauptsächlich der Wachstumsfaktor BMP-2 dem Medium zugegeben. Durch eine stabile Immobilisierung des Wachstumsfaktors auf der Oberfläche einer Matrix könnte dieser für längere Zeit den Zellen verfügbar gemacht werden. BMP-2 soll an N-Vinylpyrrolidon-Polymere und RGD-Peptide gebunden werden. Anschließend werden die Bindungsprodukte und ungebundenes BMP-2 auf Sponceram<sup>®</sup> adsorbiert. Die Matrices werden mit Modellzelllinien besiedelt, in 96-Lochplatten kultiviert und die Viabilität/Proliferation durch den MTT-Test bestimmt. Die beginnende Differenzierung der Zellen soll durch Aktivitätsmessung des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP) bestimmt werden.

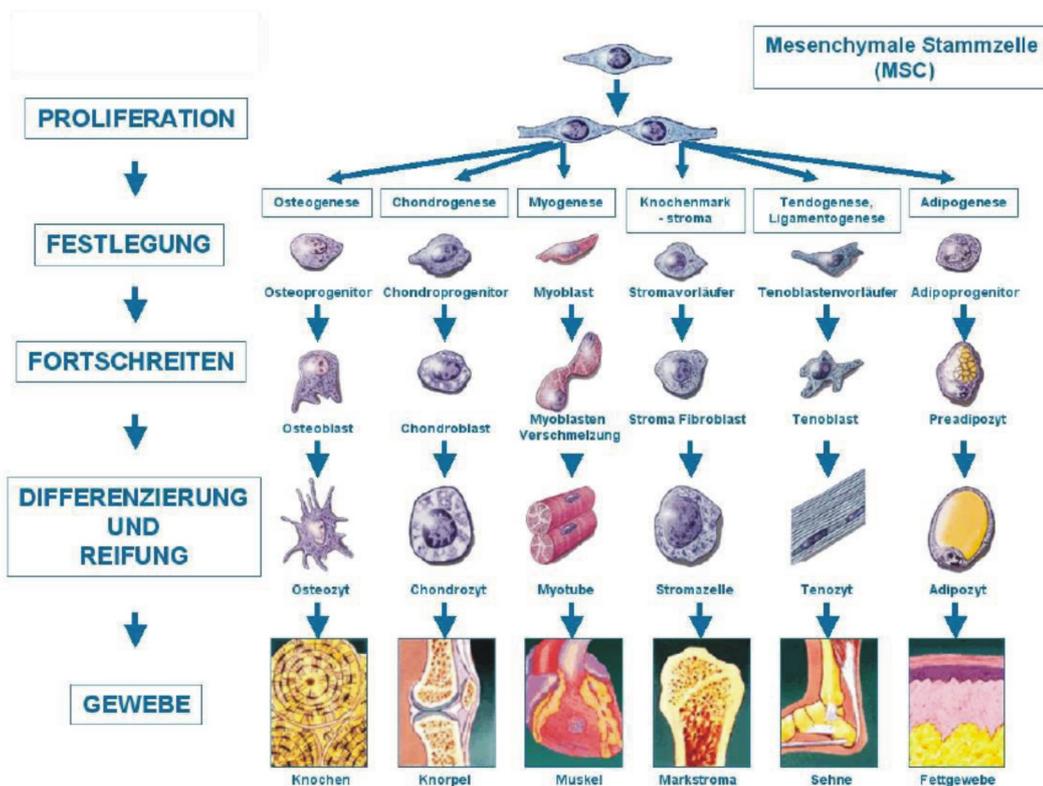
Des Weiteren sollen drei verschiedene Zellsysteme zur Herstellung von Knochengewebe auf Sponceram<sup>®</sup> und Hydroxylapatit beschichtetem Sponceram<sup>®</sup> (Sponceram/HA) getestet werden. Zunächst wird die Kultivierung mit der murinen Osteoblasten-Vorläuferzelllinie MC3T3-E1 etabliert. Dann sollen primäre humane BMSCs bzw. Osteoblasten auf den Matrices kultiviert werden. Die Kultivierung soll zunächst unter statischen Bedingungen in 96-Lochplatten erfolgen. Die MC3T3-E1-Zellen und Osteoblasten sollen außerdem auf Sponceram<sup>®</sup>-Scheiben im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 Reaktorsystem kultiviert werden. Bei der Kultivierung der MC3T3-E1-Zellen soll in zwei vergleichenden Reaktoren der Einfluss von

BMP-2 auf die Differenzierung der Zellen untersucht werden. Die humanen Osteoblasten sollen in einem Reaktor sowohl auf Sponceram<sup>®</sup> als auch auf Sponceram/HA kultiviert werden. Analysiert werden anschließend die Proliferation und die Differenzierung der Zellen auf den Matrices. Die Bestimmung der Viabilität/Proliferation nach Kultivierung in 96-Lochplatten soll durch den MTT-Test bzw. Bestimmung des DNA- und Proteingehalts erfolgen. Die Morphologie der Zell- bzw. Gewebesicht auf den Matrices soll durch Färbung mit Toluidinblau und Raster-Elektronen-Mikroskopie bestimmt werden. Der Nachweis der mineralisierten extrazellulären Matrix wird mittels Von-Kossa- und Alizarinrot-Färbung nachgewiesen werden. Der Differenzierungsstatus wird durch Bestimmung der AP und durch RT-PCR knochenspezifischer Gene wie Kollagen I, Osteocalcin, *Bone Sialoprotein 2* und Osteopontin analysiert. Zusätzlich soll nach Kultivierung der Osteoblasten im Bioreaktor eine Expressionsanalyse der Gene mittels eines spezifischen humanen DNA-Chips durchgeführt werden.

### 3 Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Mesenchymale Stammzellen

Im menschlichen Knochenmark kommen zwei Arten von Stammzellen vor: Multipotente hämatopoetische Stammzellen (*Hematopoietic Stem Cells*, HSCs) sind Vorläufer für alle Arten von Blutzellen, wie Erythrocyten, Leukocyten oder Thrombocyten. Mesenchymale Stammzellen (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs), die auch als Stromazellen (*Bone Marrow Stroma Cells*, BMSCs) bezeichnet werden, sind multipotente Vorläuferzellen verschiedener mesenchymaler Gewebe und lassen sich u. a. zu Osteoblasten, Chondrozyten [Pittenger u. a. 1999], Adipozyten [Bennett u. a. 1991] und Tenozyten [Altman u. a. 2002] differenzieren (siehe Abb. 3.1). Primäre BMSCs bilden somit ein wichtiges Modellsystem zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen dieser Stammzellen.



**Abb. 3.1:** Entwicklungswege von mesenchymalen Stammzellen zu verschiedenen mesenchymalen Geweben [Caplan und Bruder 2001].

#### 3.2 Differenzierung zu Osteoblasten und Chondrozyten *in vitro*

Die *in vitro* Differenzierung von BMSCs oder Vorläuferzellen zu Knochengewebe wird durch Mediumzusätze wie Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerolphosphat und Dexamethason ausgelöst. Ascor-

binsäure ist essentiell für die Synthese des von Knochen sezernierten Kollagen I [Barnes 1975].  $\beta$ -Glycerolphosphat liefert die Phosphat-Ionen zur Synthese der anorganischen Knochenmatrix [Tenenbaum 1981]. Dexamethason gehört zu den biologisch stark aktiven Glucocorticoiden, welche die Genexpression während der Differenzierung beeinflussen [Feldman u. a. 1975]. Es ist bekannt, dass Dexamethason die Differenzierung zu Knochengewebe auslöst, doch der genaue Mechanismus ist noch weitgehend ungeklärt [Jorgensen u. a. 2004]. Für die Osteoblastendifferenzierung kann außerdem der Wachstumsfaktor *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) eingesetzt werden. Der Differenzierungseinfluss der Wachstumsfaktoren wird in Kapitel 3.11 detaillierter beschrieben.

Die *in vitro* Differenzierung von BMSCs zu Chondrozyten wird durch Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  ausgelöst [Mackay u. a. 1998]. Im Gegensatz zur Osteoblastendifferenzierung ist hierbei die Zugabe des Wachstumsfaktors essentiell.

### 3.3 Aufbau von Knorpel

Knorpelgewebe gehört zu den Binde- und Stützgeweben des Körpers und wird in drei Arten unterteilt:

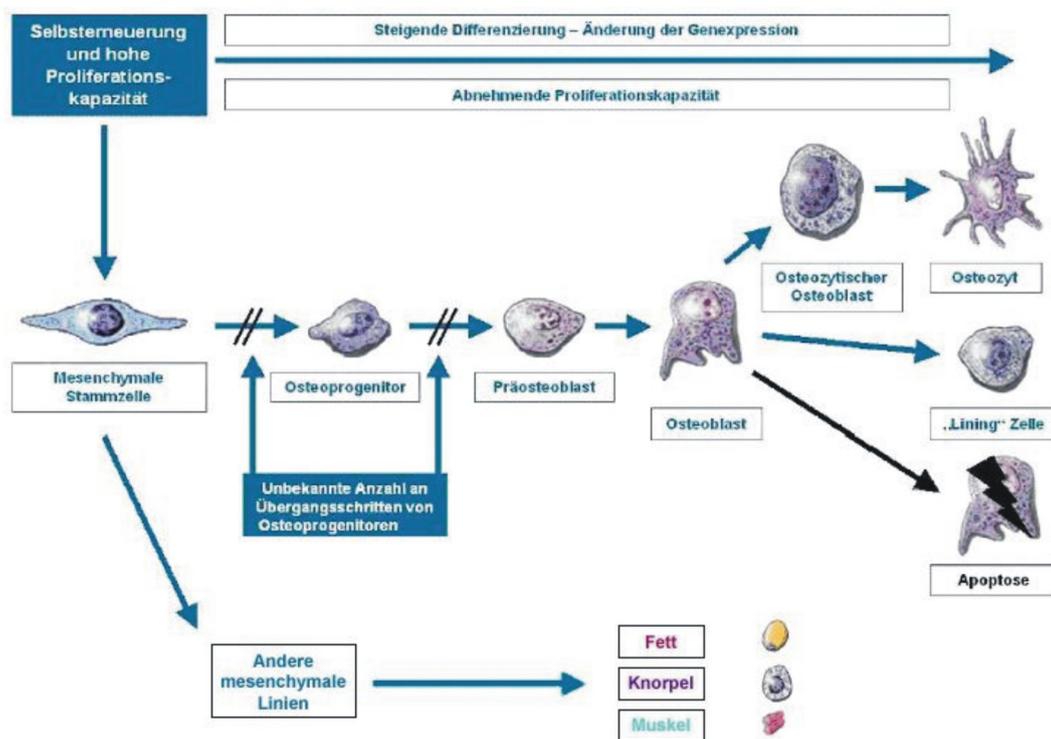
1. Hyaliner Knorpel (Gelenk, Gewebe, Luftröhre, Rippe, Bronchien) besteht hauptsächlich aus Kollagen II.
2. Elastischer Knorpel (Ohr, Nasenscheidewand) besteht aus Kollagen II.
3. Faseriger Knorpel (Bandscheibe, Knochenansatz der Bänder und Sehnen) besteht hauptsächlich aus Kollagen I.

Knorpel ist wie Knochen mechanisch belastbar und zeichnet sich durch eine formgebende Wirkung sowie Flexibilität aus. Bei Chondrozyten wird zwischen einem aktiven und passiven Zustand unterschieden. Die Chondroprogenitorzellen sezernieren die extrazelluläre Matrix. In diesem Stadium werden die Zellen als Chondroblasten (Knorpelbildner) bezeichnet. Die Zellen vereinzeln sich, bis sie vollständig von der Extrazellulärsubstanz umgeben sind und werden zu so genannten Chondrozyten. Chondrozyt und Matrix bilden zusammen das Chondron. Chondrozyten sind nur begrenzt teilungsfähig, da die umgebende Matrix den Vorgang der Mitose behindert. Versorgt werden die Zellen mittels Diffusion aus dem umliegenden Gewebe, dem Perichondrium, das in Knorpelgewebe übergeht [Buckwalter 1983] [Petrides 1997].

Die extrazelluläre Knorpelmatrix besteht hauptsächlich aus den Kollagenen II (95 %), IX (1 %), XI (3 %) sowie Kollagen VI, X und Proteoglykanen. Das am häufigsten vorkommende Proteoglykan ist Aggrekan, welches zu 90 % aus Chondroitinsulfatketten besteht. Im Knorpel liegt das Aggrekan als Aggregat von bis zu 100 Monomeren vor, die mit Hyaluronat verbunden sind. Die Matrix weist ähnliche Eigenschaften wie ein Schwamm auf, da sie unter mechanischer Druckbelastung Wasser abgibt und unter Entlastung wieder aufnimmt [Eyre 2002].

### 3.4 Entstehung und Aufbau von Knochengewebe

Das Knochengewebe im menschlichen Organismus besitzt eine relativ starre Struktur und dient hauptsächlich als Stützgewebe und Speicher für Kalzium- und Phosphat-Ionen. Knochen wird während der Embryonalentwicklung und des Wachstums fortwährend neu gebildet und im adulten Organismus ständig umgebaut (*bone remodeling*). Das Knochengewebe besteht aus Osteoblasten, ausdifferenzierten Osteozyten und Osteoclasten [Aubin 1998]. Die Zellen sind umgeben von einer Matrix aus organischen sowie anorganischen Bestandteilen. Während der Embryogenese wird zwischen den unabhängigen Prozessen der direkten und indirekten Ossifikation unterschieden [Karsenty 1999]. Bei der direkten Ossifikation bildet sich aus mesenchyalem Gewebe Knochen aus, bei der indirekten wird zunächst Knorpelgewebe aufgebaut, welches verkalkt und durch einwandernde Osteoblasten durch Knochengewebe ersetzt wird. Ausgehend von der mesenchymalen Stammzelle durchläuft die osteogene Differenzierung mehrere Zellstadien über Präosteoblasten bis hin zum Osteozyt (Abb. 3.2) [Heng u. a. 2004].



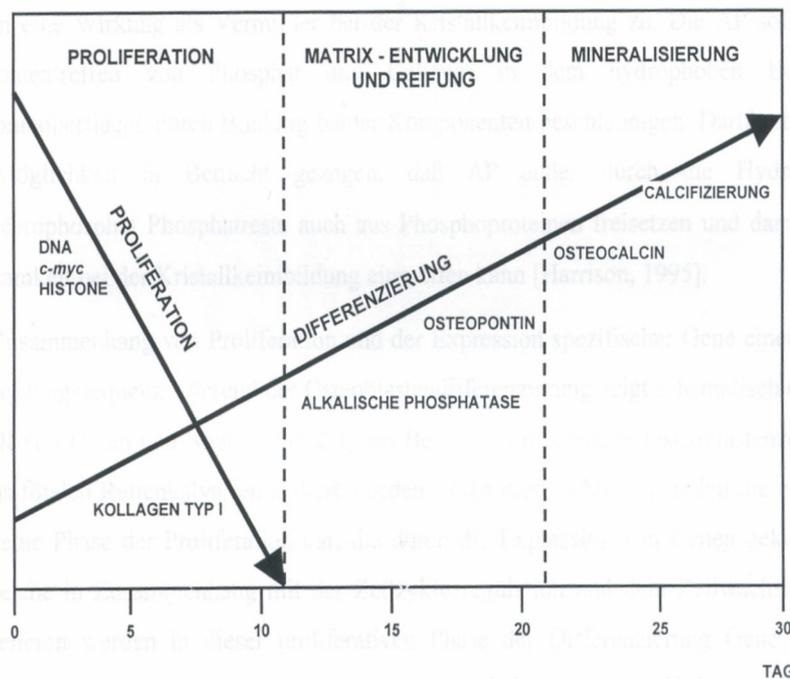
**Abb. 3.2:** Entwicklungsweg von mesenchymalen Stammzellen zu ausdifferenzierten Osteozyten und anderen mesenchymalen Geweben [Aubin 1996].

Osteoblasten kommen am häufigsten im Knochengewebe vor und induzieren die Knochenneubildung. Sie sezernieren die Knochenmatrix, indem zuerst das Hauptknochenprotein Kollagen I synthetisiert wird und weitere Proteine der extrazellulären Matrix wie Osteocalcin und

Osteopontin. Im späteren Stadium kalzifiziert die ECM und es entsteht die typische Hydroxylapatitstruktur. Nach der Mineralisierung werden die Osteoblasten zum Teil in Osteozyten und so genannten *lining cells*, die sich in der Peripherie des bereits mineralisierten Gewebes befinden, umgewandelt oder unterliegen der Apoptose [Aubin 1996].

Osteoclasten sind zusammen mit den Osteoblasten für den Ab- und Umbau des Knochengewebes verantwortlich. Im Gegensatz zu Osteoblasten leiten sich Osteoclasten von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab [Abu-Amer und Tondravi 1997].

Der Prozess der Osteoblastenreifung lässt sich durch Expression bestimmter Markerproteine in drei Phasen einteilen: 1. Proliferation, 2. Reifung und Entwicklung der extrazellulären Matrix, 3. Mineralisierungsphase. In Abbildung 3.3 ist der schematische Verlauf dargestellt [Owen u. a. 1990]. Demnach sind Proliferation und Differenzierung gegenläufige Prozesse. Der Differenzierungsprozess zu reifen Osteoblasten wird durch eine zeitliche Abfolge bestimmter Markergene bestimmt. Zu diesen Markern gehören Kollagen I und Alkalische Phosphatase am Beginn der Reifung, Osteopontin und Osteocalcin während der Mineralisierungsphase [Aubin 1996].



**Abb. 3.3:** Expression der Markerproteine während der Osteoblastenreifung [Owen u. a. 1990].

### 3.5 Die extrazelluläre Knochenmatrix

Aus der extrazellulären Knochenmatrix, in die die Zellen eingebettet sind, entsteht nach der Kalzifizierung der eigentliche Knochen. Die Knochenmatrix unterscheidet sich gegenüber anderen ECM hauptsächlich durch die Mineralisierung. Die extrazelluläre Knochenmatrix besteht zu über 90 % aus Kollagen I, welches sehr früh in der Osteoblastenreifung sezerniert wird. Die mechanische Belastbarkeit von Knochen beruht auf der zu Fibrillen assoziierten und quervernetzten Tripelhelixstruktur von Kollagen. Desweiteren kommen Hydroxylapatitkristalle und sogenannte Nichtkollagenproteine in der Knochenmatrix vor.

Zu den Nichtkollagenproteinen gehören u. a. die *bone sialo proteins* (BSPs) und Osteocalcin (OC) [Hauschka u. a. 1989].

BSP kommt nur im Knochengewebe vor und ist essentiell für die Mineralisierung der organischen Matrix. BSP wird früh transient während der Osteoblastenreifung exprimiert und die Synthese durch das Hormon Dexamethason stimuliert [Ganss u. a. 1999].

Osteocalcin wird nach dem Einsetzen der Mineralisierung exprimiert und ist somit ein später Marker der osteogenen Differenzierung. Osteocalcin hat zwei Bindestellen für Kalzium und ist wahrscheinlich an der Regulation des Hydroxylapatitsynthese beteiligt [Hauschka u. a. 1989].

Das schwerlösliche Kalziumphosphat Hydroxylapatit bestimmt die hohe Druckfestigkeit des Knochengewebes.

### 3.6 *Tissue Engineering* von Knorpel- und Knochenzellen

Das Prinzip des *Tissue Engineerings* beruht darauf Zellen auf einer geeigneten, formgebenden Matrix *in vitro* zu expandieren und anschließend das entstandene Konstrukt in den Gewebedefekt eines Patienten zu implantieren. Abbildung 3.4 auf der folgenden Seite verdeutlicht dieses Prinzip. Um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden sollte die verwendete Matrix biokompatibel sein und die verwendeten Zellen vom Patienten selbst stammen. Je nach Zielgewebe werden die Zellen, die Matrix und die Kultivierungsbedingungen variiert. In jedem Fall soll ein biologisch funktionales Gewebekonstrukt geschaffen werden, das sich nach der Reimplantation in das vorhandene Gewebe integriert. Dabei sollte die Bildung der extrazellulären Matrix unterstützt werden. Die ECM dient als Gerüst für die Zellen und das entstehende Gewebe. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Zell-Zell-Interaktion und der Zellkommunikation [Langer und Vacanti 1993].

Bei der Behandlung von Knorpel- und Knochendefekten gibt es einen großen Bedarf an Ersatzmaterialien.

Zur Behandlung von Knorpeldefekten werden derzeit Autologe-Chondrozyten-Transplantationen (ACT) durchgeführt, bei denen die *in vitro* gezüchteten Zellen direkt in den Defekt des Patienten gebracht werden [Brittberg u. a. 1994].

Bei Knochendefekten wird, wo dies möglich ist, eine Autologe-Knochen-Transplantation durchgeführt, z. B. mit Knochenmaterial aus dem Becken. Häufig jedoch reicht dieses Material zum Auffüllen großer Defekte nicht aus. Alternativ zu diesem Ansatz werden seit vielen Jahren tiefgefrorene Knochen von Spendern (aus Leichen) verpflanzt. Dieser Ansatz ist aber in Hinblick auf mögliche Infektionsrisiken kritisch.

Zur Lösung dieser Probleme sind verschiedene Verfahren aus dem Bereich des *Tissue Engineering* von Knochen und Knorpel entwickelt worden. Beim Entwickeln eines geeigneten Konstruktes *in vitro* spielen verschiedene Faktoren wie verwendete Zellen, Matrix, Wachstumsfaktoren und die Kultivierungsbedingungen eine entscheidende Rolle. In den folgenden Kapiteln werden die genannten Faktoren näher beschrieben.

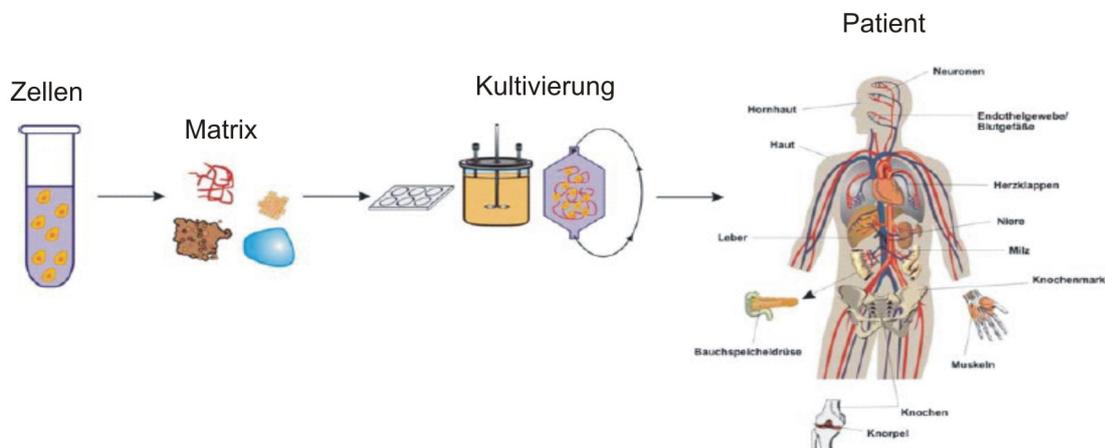


Abb. 3.4: Prinzip des *Tissue Engineering*.

### 3.7 Zellen

Bei der Wahl der Zellen für das Generieren von Knochengewebe können verschiedene Ansätze verfolgt werden. Zelllinien können als Modellsystem zur Untersuchung grundlegender Fragestellungen verwendet werden. Vor allem MC3T3-E1-Zellen, die pluripotente Zelllinie C3H10T1/2 oder SAOS-2-Zellen (humane Osteosarkomzellen) werden eingesetzt um auf geeigneten Matrices Knochengewebe zu züchten.

Für den Einsatz im Patienten werden autologe Zellen bevorzugt. Osteoblasten können aus Patientenmaterial isoliert und *in vitro* expandiert werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass keine Abstoßungsreaktionen nach Reimplantation ausgelöst werden und die Zellen bereits dem Zelltyp des Knochengewebes entsprechen. Der Nachteil ist, dass Osteoblasten nur in limitierter Anzahl zu gewinnen sind und ihre Proliferation begrenzt ist. Zwei Lösungen dieses Problems wären eine humane Spende oder Zellen/Gewebe einer anderen Säugetierspezies

(xenogen), was jedoch im Hinblick auf Abstoßungsreaktionen und mögliche Infektionsrisiken kritisch ist [Salgado u. a. 2004].

Bei der Knorpelgenerierung ist die Verwendung differenzierter Chondrozyten weit verbreitet, da diese einfach durch Isolierung aus einer Biopsie in höheren Zellzahlen als Osteoblasten gewonnen werden. Die isolierten Chondrozyten können erneut proliferieren, haben jedoch die Eigenschaft in Kultur ihren knorpelspezifischen Phänotyp zu verlieren, das heißt sie dedifferenzieren [Benya u. a. 1978]. Daher ist nach erfolgreicher Proliferation der Zelle eine Redifferenzierung notwendig. Dies kann durch Zugabe von geeigneten Wachstumsfaktoren (TFG- $\beta$ ) oder einer geeigneten Matrix, wie z. B. Agarose erfolgen [Nettles u. a. 2002]. Da die Differenzierungsmuster von Chondrozyten unterschiedlicher Herkunft heterogen sind, ist ein Nachweis knorpelspezifischer Marker, wie Kollagen II, immer notwendig.

Durch diese Erkenntnis werden momentan zunehmend Stammzellen zur Generierung verschiedenster Gewebe eingesetzt. Für das *Tissue Engineering* von Knochen und Knorpel finden BMSCs eine breite Anwendung, die aus Knochenmarkspunktionen gewonnen werden können und zu verschiedensten mesenchymalen Gewebetypen differenzieren. Da BMSCs Stammzellen sind, besitzen sie eine ausgeprägte Proliferationsfähigkeit [Bruder u. a. 1997]. Aus BMSCs differenzierte Osteoblasten und Chondrozyten wurden bereits erfolgreich zur *In-vivo*-Transplantation eingesetzt [Bruder u. a. 1998].

### 3.8 Matrix

Die Matrix für das Generieren von Knochen und Knorpel muss einige Anforderungen des entstehenden Gewebes erfüllen. Sie muss auf jeden Fall biokompatibel sein um keine Abstoßungsreaktionen und Entzündungen im Patienten zu induzieren. Bei einer bioabbaubaren Matrix dürfen die Abbauprodukte nicht toxisch sein und sie sollten den Stoffwechsel nicht beeinflussen. Eine geeignete Matrix sollte die ECM imitieren, die Zelladhäsion fördern sowie die Proliferation und Differenzierung zum gewünschten Gewebe unterstützen. Sie dient als Reservoir für Wasser, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren und unterstützt die Bildung der zelleigenen ECM [Hutmacher u. a. 2000].

#### Porosität und Porengröße

Für die Züchtung von Knochen- und Knorpelgewebe ist eine offene, interkonnektierte dreidimensionale Porenstruktur mit einer großen Oberfläche vorteilhaft [Lu u. a. 2001] [Yang u. a. 2001a]. So wird eine gleichmäßige Verteilung und das Einwachsen der Zellen in die Poren unterstützt. Des Weiteren wird eine homogene Verteilung der Nährstoffe und Gase innerhalb der Matrix und somit für das entstehende Gewebe gewährleistet. Die Porengröße sollte zwischen 200–900  $\mu\text{m}$  liegen, damit bei ausreichender Stabilität Blutgefäße in die Matrix einwandern können [Burg u. a. 2000]. Die mechanischen Eigenschaften der Matrix sollten

den *in vivo* Bedingungen von Knochen und Knorpel entsprechen und sollten auch während eines Abbaus ausreichend stabil bleiben. Die chemische Zusammensetzung und Oberflächenbeschaffenheit der Matrix ist verantwortlich für das Adhieren und Proliferieren der Zellen [Salgado u. a. 2004].

### 3.9 Matrices für Knochen und Knorpel

Materialien, die zur Zeit für das Knochen- und Knorpelwachstum eingesetzt werden, sind entweder natürlichen oder synthetischen Ursprungs [Hubbell 1995]. Für Knochen werden Materialien wie natürliche/synthetische Polymere, Keramiken, Metalle und Komposite eingesetzt [Yang u. a. 2001a].

Für Knorpel werden Substanzen natürlichen Ursprungs wie Kollagen und ebenfalls natürliche/synthetische Polymere verwendet. Bei der Knochen- und Knorpelzüchtung werden oft ähnliche Materialien verwendet, da die beiden Gewebetypen ähnliche physiologische Anforderungen an die Matrices haben.

Keramiken wie Hydroxylapatit, Kalziumphosphat, bioaktives Glas, oder Komposite aus den Materialien werden oft als Knochenersatzmaterial eingesetzt [Burg u. a. 2000] [Yang u. a. 2001a] [Logeart-Avramoglou u. a. 2005]. Biokeramiken können in folgende Gruppen eingeteilt werden:

- Oberflächenaktive Materialien wie gesintertes Hydroxylapatit und Bioglas.
- Bioresorbierbare Materialien, wie  $\beta$ -Trikalziumphosphat oder kalziniertes Hydroxylapatit.

Bisher wurde beschrieben, dass Hydroxylapatit (HA), Trikalziumphosphat (TCP) oder Komposite die Differenzierung zu Knochengewebe induzieren. Hydroxylapatit wird aufgrund der ähnlichen chemischen Zusammensetzung wie im natürlichen Knochen häufig eingesetzt. Das Material zeichnet sich durch eine sehr gute Bioverträglichkeit aus. Es zeigte sich, dass verschiedene Hydroxylapatitkonstrukte das Wachstum von MC3T3-E1-Zellen unterdrückten und die Zell-Differenzierung induzierten [Shu u. a. 2003]. Ein Kompositmaterial aus Hydroxylapatit und löslichem Kalziumphosphat induzierte eine erhöhte Kollagensynthese und stärker kalzifizierte ECM in MC3T3-E1-Zellen, verglichen mit einer Matrix aus reinem Hydroxylapatit [Ogata u. a. 2005]. Verschiedene Kalziumphosphat/Hydroxylapatit Komposite zeigten eine Induktion der osteogenen Differenzierung bei humanen BMSCs [Arinze u. a. 2005].

Zum Generieren von Knorpelgewebe werden oft Polymere natürlichen Ursprungs verwendet. Zu diesen zählen Kollagen, Alginate, Chitosane, Fibrin und Hyaluronsäure [Lu u. a. 2001] [Gutowska u. a. 2001] [Nettles u. a. 2002] [Shu u. a. 2003]. Dabei werden diese Substanzen z. B. in Gelform direkt ins Gewebe eingebracht [Temenoff und Mikos 2000]. Chondrozyten, die auf Kompositmaterialien aus Alginat und Kalzium kultiviert wurden, zeigten nach Transplantation morphologische Eigenschaften von Gelenkknorpel [Paige u. a. 1996]. Humane Chondro-

zyten zeigten nach Kultivierung in Alginatkugeln die Bildung von ECM wie im Gelenkknorpel [Hauselmann u. a. 1996].

Chitosan, ein Derivat von Chitin, wird hauptsächlich bei der Züchtung von Knorpelgewebe eingesetzt [Mattioli-Belmonte u. a. 1999] [Suh und Matthew 2000]. Kalziumphosphat-Chitosan Komposite werden bisher erfolgreich zur Herstellung von Knochenkonstrukten eingesetzt [Zhang u. a. 2003].

Am weitesten verbreitet ist der Einsatz von synthetischen Polymeren für das *Tissue Engineering* von Knochen und Knorpel. Dazu gehören u. a. die Polymere Polyglykolsäure (PGA), Poly(L-milchsäure) (PLA) und deren Komposit Poly(DL-Milchglykolsäure) (PLGA) [Freed u. a. 1993] [Vacanti und Upton 1994] [Chu u. a. 1995]. Die Esterbindung dieser Moleküle ist hydrolytisch labil. Die Abbaurate der Polymere kann durch Änderungen der Kristallstruktur, dem Molekulargewicht und dem Milchsäure/Glycol Verhältnis im Bereich von Wochen bis zu Monaten reguliert werden [Kim u. a. 2000]. Primäre Chondrozyten, isoliert aus Gelenkknorpel (Rind, Mensch) wurden auf PGA- und PLGA-Matrices ausplattiert und das Wachstum und die Bildung von Knorpel *in vitro* und *in vivo* untersucht. Im Organismus bildete sich Knorpel auf beiden Matrices, *in vitro* war ein besseres Wachstum und Differenzieren auf der PGA Matrix zu beobachten [Freed u. a. 1993].

Die Herstellung von Knochengewebe auf PLGA-Matrices mit Vorläuferzellen war erfolgreich *in vitro* und *in vivo* [Ishaug-Riley u. a. 1997] [Ishaug-Riley u. a. 1998] .

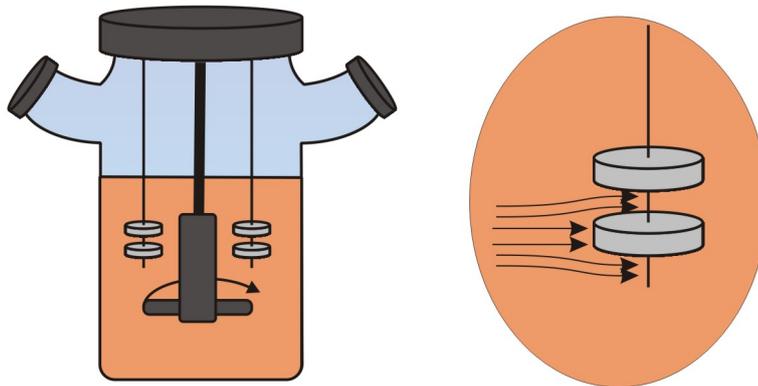
### 3.10 Bioreaktoren für Knochen- und Knorpelzüchtung

Beim *Tissue Engineering* werden Zellen auf Matrices *in vitro* kultiviert. Untersuchungen zur Eignung des verwendeten Materials im kleinen Maßstab werden im Labor in Gewebekulturschalen durchgeführt. Für eine kontrollierte Herstellung eines Knochen- oder Knorpelkonstruktes ist die Kultivierung in einem Bioreaktor notwendig. In einem Bioreaktor sind wichtige Größen wie die Sauerstoff- bzw. Nährstoffversorgung und der pH-Wert besser regel- und kontrollierbar. Unter statischen Bedingungen in Zellkulturschalen ist die Versorgung der Zellen innerhalb einer porösen Matrix inhomogen. Der Transport von Metaboliten und Abfallprodukten findet nur durch Diffusionsprozesse im Innern der Matrix statt. Dies kann dazu führen, dass die Zellen nach außen auf die Oberfläche der Matrix wandern, wo eine bessere Versorgung gewährleistet ist [Sikavitsas u. a. 2002]. Dabei kann so eine dichte Zellschicht entstehen, die die Nährstoffversorgung der darunter wachsenden Zellen verringert.

Bei der Entwicklung eines Bioreaktors zur Knochen- und Knorpelzüchtung sollten auch die *In-vivo*-Bedingungen und Funktionen dieser Gewebe berücksichtigt werden. Knochen und Knorpel unterliegen *in vivo* ständig Zug- und Druckkräften. Diese Bedingungen werden in einer statischen Kultur nicht imitiert [Sikavitsas u. a. 2001].

### 3.10.1 Spinnerflaschen

Der einfachste Bioreaktor für das Generieren von Knochen und Knorpel ist die Spinner Flasche. Das Medium wird durch einen Magnetrührkern kontinuierlich vermischt (Abb. 3.5).



**Abb. 3.5:** Spinnerflaschen zur Kultivierung von Zellen auf Biomaterialien [Martin u. a. 2004].

Zum *Tissue Engineering* von Zellen auf Trägermaterialien in Spinnerflaschen gibt es bisher zwei Ansätze:

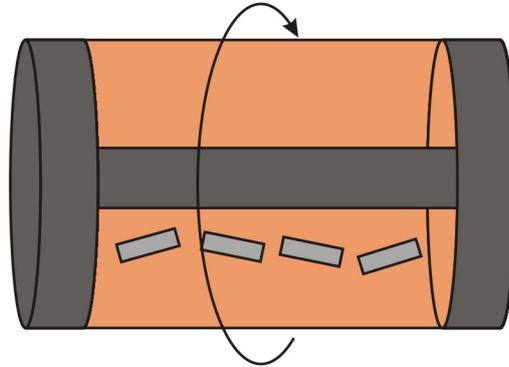
Microcarrier sind Partikel mit einer Größe von 80-350  $\mu\text{m}$ , auf deren Oberfläche sich Säugtierzellen anhaften und kultiviert werden. Bisher werden zum Kultivieren von Knochen- und Knorpelzellen verschiedene Microcarrier, z. B. aus Dextran oder Kollagen verwendet [Temenoff und Mikos 2000]. Die Kultivierung von Chondrozyten auf Kollagen I Microcarriern zeigte, dass die Zellen proliferierten und die Expression der knorpelspezifischen Marker verstärkt wurde [Fronzoza u. a. 1996].

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Matrices an Nadeln zu fixieren, die vom Kopf der Flasche herunterhängen und in das gerührte Medium eintauchen (Abb. 3.5 rechts). Chondrozyten/Polymerkonstrukte, die für fünf Wochen in Spinnerkulturen kultiviert wurden, waren größer und hatten eine höhere Zelldichte, als die in Petrischalen durchgeführte Vergleichskultur [Vunjak-Novakovic u. a. 1996]. In Spinnerflaschen auf PLGA-Matrices kultivierte mesenchymale Stammzellen zeigten ein deutlicheres Differenzierungsmuster zu Knorpelgewebe als Zellen, die auf PLGA-Matrices unter statischen Bedingungen kultiviert wurden [Sikavitsas u. a. 2002].

### 3.10.2 *Rotating Wall Vessel Reactor*

Ein weiteres Reaktorsystem, das mit Microcarriern oder Matrices betrieben werden kann, ist der so genannte *Rotating Wall Vessel Reactor* (RWVR), ein rotierendes Reaktorsystem.

Ursprünglich wurde dieser Reaktortyp von der NASA eingesetzt um die Schwerelosigkeit zu simulieren [Temenoff und Mikos 2000].



**Abb. 3.6:** *Rotating wall vessel bioreactor* (RWVR) zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrices [Martin u. a. 2004].

Das Reaktorgehäuse besteht aus zwei konzentrischen Zylindern, zwischen die kontinuierlich Medium gepumpt wird [Schwarz u. a. 1992]. Der stationäre innere Zylinder hat eine Membran für einen kontinuierlichen Gasaustausch. Der äußere Zylinder besteht aus undurchlässigem Material und sorgt für die Drehung des Reaktors. Matrices oder Microcarrier werden vor der Reaktorkultivierung besiedelt und in den Zwischenraum gebracht. Während der Kultivierung rotiert der äußere Zylinder und die Träger werden aufgrund der Schwerkraft im *freien Fall* kultiviert (Abb. 3.6). Die Regelung der Zentrifugalkraft erfolgt durch Einstellung der Rotationsgeschwindigkeit des äußeren Zylinders [Freed und Vunjak-Novakovic 1997].

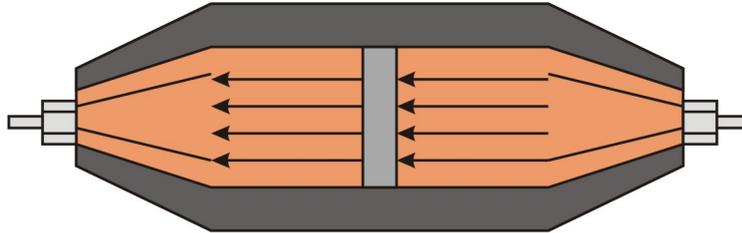
Dieser Reaktortyp wurde bereits zur Knochen- und Knorpelkultivierung eingesetzt [Freed und Vunjak-Novakovic 1997] [Qiu u. a. 1999]. Chondrozyten/Matrix Konstrukte, die für fünf Wochen im RWVR kultiviert wurden zeigten eine stärker ausgebildete ECM als in der entsprechenden Spinnerkultur [Freed und Vunjak-Novakovic 1997].

Eine vergleichende Kultivierung von BMSCs auf PLGA Matrices für 21 Tage in Spinnerkultur und RWVR zeigte, dass in Spinnerkultur eine höhere Zelldichte und eine stärkere osteogene Differenzierung erreicht wurde [Sikavitsas u. a. 2002]. Der Grund dafür könnte die Kollision der Matrices mit der Wand der Zylinder sein. Dies kann zur Zerstörung der Zellen auf der Matrixoberfläche führen. Des Weiteren ist bekannt, dass Schwerelosigkeit schädlich für Knochengewebe ist [Droppert 1990] [Sinha u. a. 2002].

### 3.10.3 Perfusionskultur

Ein weit verbreitetes System für das *Tissue engineering* von Knochen- und Knorpelzellen ist die Perfusionskultur [Sikavitsas u. a. 2003] [Wang u. a. 2003] [Fassina u. a. 2005]. Zellen werden unter statischen Bedingungen auf Matrices angesiedelt. Die Matrix wird in einem Gefäß

aus Glas oder Plexiglas fixiert. Durch eine Peristaltikpumpe wird das Medium gleichmäßig durch das Kulturgefäß und so auch durch das Matrix/Zell Konstrukt gepumpt (Abb. 3.7).



**Abb. 3.7:** Perfusionssystem zur Kultivierung von Zellen auf Biomatrizes [Martin u. a. 2004].

So wird eine Versorgung der Zellen im Innern der Matrix gewährleistet [Bancroft u. a. 2003]. Des Weiteren begünstigt der durch den Flüssigkeitsstrom entstehende Scherstress die Differenzierung zu Knochengewebe. Es ist bekannt, dass die Osteoblastenreifung durch mechanische Signale stimuliert wird [Sikavitsas u. a. 2001] [Bancroft u. a. 2003]. Eine stärker mineralisierte ECM von mesenchymalen Stammzellen wurde durch Erhöhung des Flüssigkeitsstroms im Perfusionssystem erreicht [Sikavitsas u. a. 2003].

Eine vergleichende Kultivierung in Spinnerkultur, RWVR und Perfusionssystem von mesenchymalen Stammzellen (Ratte) auf Polymerschaum zeigte, dass die Differenzierung zu Knochen im Perfusionssystem begünstigt war [Goldstein u. a. 2001]. Der Nachteil dieser Kultivierungsform ist, dass der Kontakt zwischen Medium und Zellen sehr kurz ist.

### 3.11 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Signalproteine, die von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden. Die Bindung des Wachstumsfaktors an den entsprechenden Rezeptor löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die u. a. die Proliferation oder Differenzierung induziert [Rose und Oreffo 2002]. 1965 entdeckte Urist, dass demineralisierte Knochenmatrix die Induktion von Knochengewebe auslöst, wenn sie im Muskel von Kaninchen implantiert wurde [Urist 1965]. Später bezeichnete er den auslösenden Faktor als *bone morphogenetic protein* BMP [Urist und Strates 1971]. BMPs spielen ebenfalls in der Induktion von Knorpelgewebe eine Rolle [Wozney u. a. 1988]. BMPs gehören, neben Activinen und den Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (*growth and differentiation factors* (GDFs)) zur *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) Familie. TGF- $\beta$ 1 wird als der Prototyp der Proteinfamilie bezeichnet. In Säugtieren existieren über 30 TGF- $\beta$  verwandte Proteine, von denen BMPs etwa ein Drittel ausmachen [Sebald u. a. 2004]. BMPs spielen sowohl pränatal während der Embryogenese, als auch nach der Geburt bei vielen Prozessen wie z. B. der Skelettentwicklung eine wichtige Rolle. Sie werden ebenfalls während der frühen Phase einer Frakturheilung exprimiert. Bisher wurden 15 verschiedene BMPs kloniert, jedoch induzieren BMP-2, 4, 6 und 7 hauptsächlich die Knochen-

bildung. Insbesondere BMP-2 und BMP-7 induzieren die *in vitro* Differenzierung von verschiedenen Vorläuferzellen wie MC3T3-E1 und BMSCs [Yamaguchi u. a. 2000] [Balint u. a. 2003] [Canalis u. a. 2003]. BMP-2 z. B. induziert die Produktion der Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase und Osteocalcin in MC3T3-E1-Zellen [Takuwa u. a. 1991]. Aus diesem Grund werden BMPs, insbesondere BMP-2, im *Tissue Engineering* von Knochenzellen zur Induktion der Zelldifferenzierung eingesetzt [Hollinger u. a. 1998].

Die Struktur von BMP-2 wurde 1999 aufgeklärt [Scheufler u. a. 1999]. In der biologisch aktiven Form ist BMP-2 ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 12,9 kDa pro Untereinheit.

Beim *Tissue Engineering* von Knorpel wird neben Interleukin-4 (IL-4) und dem *platelet derived growth factor* (PDGF) häufig TGF- $\beta$  gewählt um die Matrixbiosynthese zu induzieren [Blunk u. a. 2002] [Mauck u. a. 2003]. TGF- $\beta$  gilt als potenzieller Stimulator bei der Regenerierung von Knorpelgewebe. Das multifunktionale Protein steuert unter anderem das Zellwachstum, die Differenzierung und den ECM Metabolismus. TGF- $\beta$  ist ein homodimeres Protein zwischen 28-30 kDa groß und liegt in vielen isomeren Formen vor. In Säugetieren konnten bisher drei TGF- $\beta$  identifiziert werden: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 [Janssens u. a. 2005].

TGF- $\beta$  und BMP haben *in vitro* verschiedene Differenzierungseinflüsse in unterschiedlichen Zellen. BMPs induzieren z. B. die Differenzierung von mesenchymalen Zellen in Knorpel- und Knochengewebe. TGF- $\beta$  induziert in der frühen Phase die Differenzierung zu Knorpel. In der späten Phase der Knochenreifung inhibiert TGF- $\beta$  die BMP induzierten Differenzierungswege zu Osteoblasten [Roelen und Dijke 2003].

### 3.11.1 Rezeptoren der TGF- $\beta$ Familie

Die Rezeptoren der TGF- $\beta$  sind Heterodimere und gehören zur Klasse der Serin/Threonin Kinase Rezeptoren. Sie bestehen aus einer Typ I und Typ II Kette, die nach Aktivierung dimerisieren [Massague u. a. 1994] [Massague 1998]. BMP-2 z. B. bindet zunächst an die Typ I Kette. Die Dimerisierung wird ausgelöst und anschließend wird die Typ I Kette durch die Typ II Kette phosphoryliert [Wrana u. a. 1994]. Dabei wird eine Signalkaskade ausgelöst, die über mehrere Wege durch das Zytoplasma der Zelle im Kern endet. Am besten untersucht ist der Weg über so genannte Smad Proteine, die durch die Typ I Kette phosphoryliert werden. Durch eine Phosphorylierungskaskade aus mehreren Smad Proteinen gelangt ein Heterodimer aus Smad-1 und Smad-4 in den Zellkern und bindet dort mit Hilfe eines DNA-bindenden Proteins an die Zielsequenz der DNA. BMP-2 wirkt somit auf der Transkriptionsebene [Massague 1998].

### 3.11.2 Immobilisierung von Wachstumsfaktoren

Für die erfolgreiche Bildung von Knochen- und Knorpel-Ersatzmaterial mittels des *Tissue Engineering* Ansatzes müssen entsprechende Wachstums-, Differenzierungs- und Vaskulari-

sierungsfaktoren eingesetzt werden. Bisher werden diese Proteine überwiegend einfach dem Kulturmedium zugesetzt, die effiziente Verfügbarkeit ist hierdurch allerdings nicht gegeben, da diese Proteine unter diesen Bedingungen sehr schnell abgebaut werden. Der Zusatz von BMP-2 in das Zellkulturmedium ist hierbei die standardmäßig angewendete Methode. Der Zusatz von Zytokinen in Zellkulturmedien muss kontinuierlich erfolgen. Auf der einen Seite stellt dies einen großen Kostenfaktor dar, auf der anderen Seite ist die kontinuierliche Zugabe von Zytokinen wenig praktikabel und birgt eine hohe Infektionsgefahr. Im Hinblick darauf, generierte Konstrukte aus Zellen und Matrix in den Patienten zu implantieren, könnte der Wachstumsfaktor auf der Matrix immobilisiert werden, da nach erfolgter Implantation die Zugabe des Wachstumsfaktors erschwert wird. Daher wird nach Methoden gesucht um den Zellen den zur Differenzierung nötigen Wachstumsfaktor zur Verfügung zu stellen. Hierbei können verschiedene Wege verfolgt werden. So ist es für die Entwicklung von Knochengewebe möglich neben den zu differenzierenden Zellen eine zweite Zellart in die Kultur einzubringen, die BMP-2 überexprimiert [Olmsted u. a. 2001]. Dieser Ansatz ist für die Anwendung im Patienten nicht realisierbar. Zur Regeneration von Knochengewebe *in vivo* mit BMP werden zurzeit verschiedene Ansätze beschrieben:

1. Die Zelltherapie beinhaltet die Biopsie von mesenchymalen Stammzellen, die Expansion auf einer geeigneten Matrix und die Reimplantation in den Patienten. Während der Kultivierung *in vitro* werden zur Unterstützung der Differenzierung Wachstumsfaktoren eingesetzt. Diese Methode ist weit verbreitet und außerdem Basis für die Grundlagenforschung. Der Nachteil hierbei ist, dass die Herstellung des Konstruktes lange Zeit in Anspruch nimmt.

2. Die Gentherapie wirkt *in vitro* und *in vivo*. Bei der *in vivo* Methode ist das BMP-Gen in einen Vektor integriert und das Konstrukt wird direkt in die Zellen injiziert. Vektoren dabei sind u. a. Viren, Liposomen und Polymere. Die Schwierigkeit bei dieser Methode ist die Kontrolle über die Konzentration der produzierten Wachstumsfaktoren *in vivo*. Bei der *in vitro* Methode werden dem Patienten Zellen entnommen und der Gentransfer in Kultur durchgeführt. Die entstandenen BMP produzierenden Zellen werden dann in den Knochendefekt reimplantiert. Nachteile der Gentherapie sind das Infektionsrisiko bei der Verwendung von Virusvektoren und die kontrollierte Transfektion des richtigen Gens an der richtigen Stelle zur richtigen Zeit.

3. Die Zytokintherapie beinhaltet die rekombinante Herstellung von BMP *in vitro*. Das BMP wird zusammen mit einem geeigneten Trägermaterial in den Defekt des Patienten implantiert. Der Vorteil dabei ist, dass der Wachstumsfaktor direkt an der Reparaturstelle wirken kann. BMP-2 wird dann nach erfolgter Implantation über einen längeren Zeitraum an die Umgebung freigegeben um die Knochenbildung zu aktivieren [Saito und Takaoka 2003].

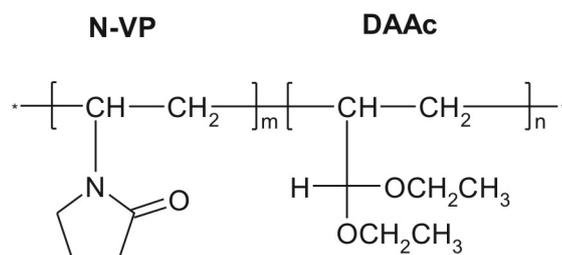
Bisher sind viele Methoden beschrieben BMP auf Matrices zu immobilisieren. So konnte BMP-2 auf Metalloberflächen durch Hitze und durch kovalente Bindung fixiert werden

[Wiemann u. a. 2002]. Auch die chemische Bindung an Epoxy-Gruppen auf Oberflächen erscheint möglich, jedoch sind für diese Anwendungen spezielle metallische oder aktivierte Oberflächen nötig, was die Verfügbarkeit von Matrices für das *Tissue Engineering* stark einschränkt.

Fibrilläres Kollagen ist ein geeigneter Träger für BMP. BMP-Lösungen wurden zusammen mit Kollagen-Matrices gefriergetrocknet, so dass die BMP-Moleküle an das Netzwerk der Kollagenmatrix adherieren konnten. Bei Transplantation des Konstruktes in den Muskel eines Tiermodells wurde Knochenbildung beobachtet [Takaoka u. a. 1991]. Neben Keramiken und Polymeren werden auch biodegradable Hydrogele aus Gelatine oder Alginaten als Träger für Wachstumsfaktoren eingesetzt [Tabata 2003]. Hydrogele werden z. B. aus biodegradablen Polymeren mit negativer Ladung hergestellt. Der Wachstumsfaktor mit seiner positiven Ladung bindet elektrostatisch an das Polymer. Wenn die Umgebung sich ändert, z. B. eine Erhöhung der Ionenstärke, wird der Wachstumsfaktor freigegeben. Auch wenn *in vivo* diese Veränderung nicht stattfindet, wird der Wachstumsfaktor durch die Degradation des Polymers freigegeben [Tabata 2003]. Weit verbreitet ist auch die Abgabe von Wachstumsfaktor über Microsphären [Saltzman und Baldwin 1998]. Mit TGF- $\beta$  und IGF-I beladene PLGA-Microsphären wurden zusammen mit Chondrozyten in ein Hydrogel gebracht. Die Wachstumsfaktoren wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen kontrolliert in das Hydrogel abgegeben und induzierten die Bildung von Knorpel [Elisseff u. a. 2001].

### 3.12 N-Vinylpyrrolidon Polymere

Das Polymer N-Vinylpyrrolidon (N-VP-DAAc) ist ein wasserlösliches Copolymer aus den Monomeren N-Vinylpyrrolidon (N-VP) und Acrolein-Diethylacetal (DAAc) (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8:** Struktur von N-VP-DAAc.

Poly-N-Vinylpyrrolidone (PVP) sind hydrophile Polymere, die eine breite Anwendung in der pharmazeutischen und medizinischen Industrie haben. Die Polymere sind nicht toxisch und nicht immunogen. Endfunktionalisierte Polymere können mit anderen Materialien unter kovalenter Bindung reagieren [Ranucci u. a. 2000]. Ebenso wurden nicht kovalente Komplexe aus PVP mit biologisch aktiven Peptiden, wie Natrium-(Poly  $\alpha$ ,L-Glutamat) herge-

stellt [Pemawansa und Khan 2002]. Diese Bindungseigenschaften könnten auch genutzt werden, um bioaktive Matrices für das *Tissue Engineering* herzustellen. Wachstumsfaktoren wie BMP-2 könnten kovalent an die Polymere gebunden und auf Biomatrices immobilisiert werden [Vlakh u. a. 2005]. Einige dieser Copolymere wurden bereits in der biologisch/medizinischen Anwendung getestet [Panarin u. a. 1996] [Solovskij u. a. 1996] [Solovskij und Panarin 1999]. Zum Beispiel zeigten PVPs mit Phenolgruppen in den Seitenketten anti Tumor Eigenschaften [Solovskij u. a. 1996]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass PVPs stabil an verschiedenen Oberflächen adhärten [Kiseleva u. a. 1981].

### 3.13 RGD-Peptide

Um Wachstumsfaktoren koppeln zu können werden verschiedene Oligo- und Polykationen, wie RGD-Peptide und poly-L-Lysine verwendet, die die Zelladhäsion fördern.

Fibronectin ist ein Protein der extrazellulären Matrix, das die Zelladhäsion an Oberflächen fördert. Die Aminosäuresequenz RGD (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) ist die minimale Sequenz, die in Fibronectin die Bindung an Oberflächen auslöst [Pierschbacher und Ruoslahti 1984]. Auch in Proteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Laminin gibt es RGD-Sequenzen [Hersel u. a. 2003]. RGD bindet an Integrine auf Zelloberflächen. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, sie bilden Rezeptoren für die verschiedensten Proteine und auch für deren RGD-Domäne. Für die Integrin-Affinität sind auch die räumliche Konformation und die flankierenden Aminosäuren des RGD-Motivs bedeutsam [Plow u. a. 2000]. Aufgrund der Wirkung von RGD-Peptiden werden diese auch zunehmend im *Tissue Engineering* eingesetzt. Kommerziell erhältlich sind RGD-enthaltene Proteine, sowie synthetische RGD-Oligopeptide verschiedener Länge und cyclische RGD-Peptide.

Aufgebracht auf Oberflächen fördert RGD die Adhäsion von Zellen [Hersel u. a. 2003]. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass die RGD-Domäne die Differenzierung von Osteoblastenvorläufern unterstützt [Yang u. a. 2001b]. Das RGD wird entweder kovalent über Anker-moleküle an die Matrixoberfläche gebunden, oder physikalisch auf Oberflächen adsorbiert [Marletta u. a. 2005]. Ein OPF-Hydrogel (Oligo-Polyethylenglycol-Fumarat) wurde mit RGD-Peptiden modifiziert und für die Generierung von Knochengewebe aus MSCs eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Proliferation und die Expression von knochenspezifischen Markern wie Alkalischer Phosphatase bei Erhöhung der Peptidkonzentration anstiegen [Shin u. a. 2005]. Adsorptionen an Oberflächen werden hauptsächlich über ionische Wechselwirkungen ausgeübt. Es wird davon ausgegangen, dass RGD in Lösung über zwei positive Ladungen am Arginin und zwei negative Ladungen am Aspartat die Bindung ausübt, auch wenn noch keine Versuche zu Bindungsisothermen beschrieben sind.

## 4 Experimenteller Teil

In dieser Arbeit wurden neue Aspekte bei der Kultivierung von Knochen- und Knorpelzellen untersucht. Auf der Suche nach einer geeigneten Matrix wurden diverse Materialien getestet, u. a. Paramylon, ein Polysaccharid, Kollagen, Trikalziumphosphat und Sponceram<sup>®</sup>-Keramiken. Die besten Ergebnisse für die Kultivierung von Knochenzellen wurden auf 2 verschiedenen Sponceram<sup>®</sup>-Keramiken erhalten. Zusätzlich wurden im Rahmen der Mitbetreuung einer Diplomarbeit vielversprechende Ergebnisse bei der Kultivierung von primären Knorpelzellen auf Kollagen-Matrices erhalten und im folgenden Kapitel dargestellt.

Die Kultivierung der Zellen wurde zunächst unter statischen Bedingungen, d. h. in Zellkulturschalen, durchgeführt. Des Weiteren wurde der Wachstumsfaktor BMP-2 an biokompatible Peptide und Polymere gebunden, auf den Oberflächen der Keramikmatrices immobilisiert und zur Kultivierung von Knochenzellen eingesetzt. Zusätzlich wurde Knochengewebe in einem neu entwickelten 3-D-Bioreaktorsystem generiert. Die Entwicklung des jeweiligen Gewebes wurde durch detaillierte Analyse des Differenzierungsmusters untersucht.

### 4.1 Generieren von Knorpelgewebe auf Kollagen-Matrices

Im Folgenden wurden Knorpelzellen aus Schweinepfoten isoliert und in Zellkultur expandiert. Anschließend wurden Kollagen-Matrices mit den Zellen besiedelt und unter statischen Bedingungen kultiviert.

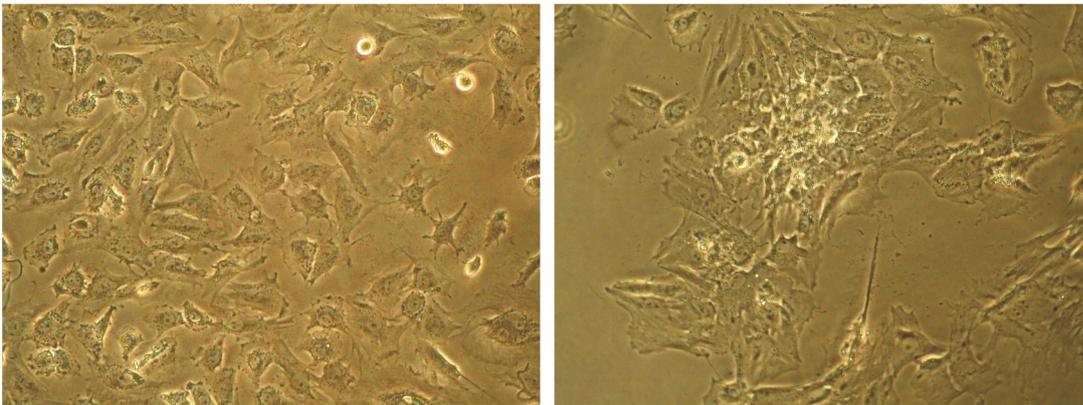
In Zellkulturschalen können Chondrozyten nach Isolierung aus Knorpelgewebe erneut proliferieren, haben jedoch die Eigenschaft zu dedifferenzieren [Benya u. a. 1978]. Beim *Tissue Engineering* kann der Differenzierungsstatus der Zellen u. a. durch Zugabe des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  oder durch Kultivierung auf einer geeigneten Matrix erhalten bleiben [Nettles u. a. 2002].

#### 4.1.1 Isolierung und Kultivierung von Knorpelzellen

Primäre Knorpelzellen sind ein gängiges Modellsystem zur Herstellung von Knorpelgewebe, da sie einfach zu isolieren und expandieren sind. Frisch isolierter Gelenkknorpel (Schweinepfote, Schlachthof-Gleidungen) wurde in sterilem, antibiotikahaltigem PBS aufbewahrt und innerhalb von fünf Stunden verarbeitet. Der Knorpel (ca. 500 mg liefern  $1 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  Zellen) wurde mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und über Nacht in Medium (DMEM + 10 % FCS; Pen/Strep/Neo) mit Kollagenase IV ( $350 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  oder  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) bei  $37^\circ\text{C}$  verdaut. Die Zellsuspension wurde anschließend über eine Nylonmembran mit einer Porengröße von  $25 \mu\text{m}$  filtriert und mit PBS gewaschen. Die filtrierten Zellen wurden bei  $400 \text{ g}$  für 10-15 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in DMEM resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann mit einer Dichte von  $1 \cdot 10^4$ – $3 \cdot 10^4$  Zellen je

cm<sup>2</sup> in Zellkulturflaschen ausplattiert.

Nach der Isolierung war die Struktur der Chondrozyten rund. Nach ca. 2–3 Tagen begannen die Zellen sich auszubreiten und auf der Oberfläche der Kulturflaschen zu adhären. Knorpelzellen, die in Standard-Medium kultiviert wurden, hatten eine dreieckige bis hexagonale Morphologie (Abb. 4.1, links). Durch Kultivierung in TGF- $\beta$ -Medium (Zusammensetzung: Anhang 6.2) wurde die Zellfläche größer, die Zellen wuchsen vermehrt in Zellgruppen und bildeten Zell-Zell-Kontakte aus (Abb. 4.1, rechts) [Stark 2004].



**Abb. 4.1:** 200fache Vergrößerung: Knorpelzellen im Phasenkontrast in Standard- (links) bzw. TGF- $\beta$ -Medium (rechts) [Stark 2004].

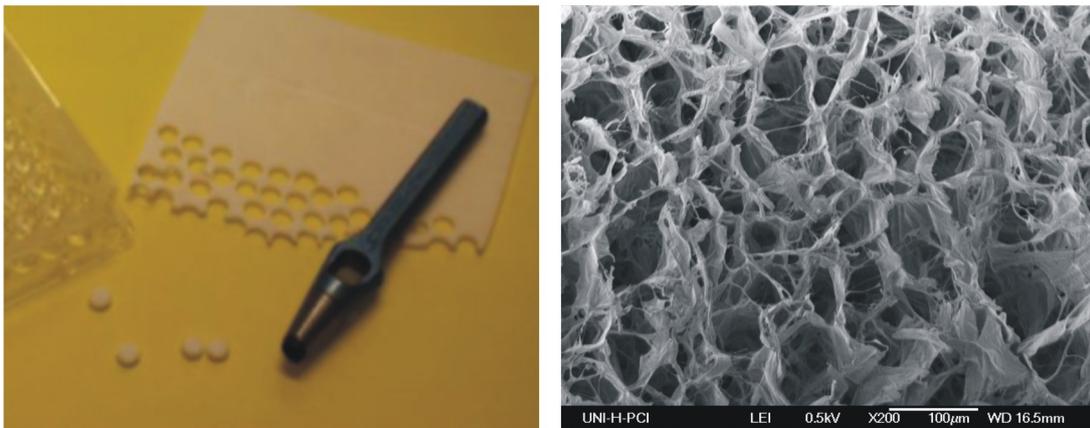
#### 4.1.2 Kollagen-Matrices

Zur Generierung von Knorpelgewebe werden oft Polymere natürlichen Ursprungs verwendet [Gutowska u. a. 2001] [Nettles u. a. 2002] [Shu u. a. 2003]. Dazu gehört auch Kollagen, das häufigste Protein im Säugetier. Als Gerüst für das Wachstum der Knorpelzellen wurde eine Kollagen-Matrix der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care AG (Billerbeck) verwendet (Abb. 4.2). Hauptbestandteil der Matrix ist Kollagen I. Zur Steigerung der Stabilität wird diese mit Elastin quervernetzt. Die Kollagen-Matrices werden bisher für die Kosmetik und zur Wundabdeckung von Brandverletzungen eingesetzt.

Gewonnen wird das Kollagen für die Matrices bevorzugt aus den unter der Lederhaut liegenden Kollagenfasern aus dem Kalb oder Rind. Fett und Sehnen werden entfernt, bis eine netzartige Struktur zurückbleibt, die zu 98 % aus Wasser besteht. Die Feuchtigkeit wird durch Gefriertrocknung entzogen und das Material dadurch haltbar gemacht ohne die Produkteigenschaften zu verändern.

### 4.1.3 Kultivierung auf Kollagen-Matrices

Kollagen-Matrices wurden mit einem Loch Eisen (Innendurchmesser: 6 mm) ausgestanzt, in 96-Lochplatten überführt und durch Einlegen in 70%igem Isopropanol für 2–3 h sterilisiert (Abb. 4.2, links). Die Matrices wurden über Nacht in Kulturmedium bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die Knorpelzellen mit einer Dichte von  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Matrix ausplattiert. Zur besseren Anhaftung wurden die Zellen in 20 µl Medium auf die Matrices gegeben, für 2 h bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mit 200 µl Medium aufgefüllt. Die Knorpelzellen wurden über einen Zeitraum von bis zu 19 Tagen auf den Kollagen-Matrices kultiviert und der Differenzierungsstatus analysiert [Stark 2004].



**Abb. 4.2:** Ausgestanzte Matriderm-Matrices mit einem Durchmesser von 6 mm für die Kultivierung in 96-Lochplatten (links). Raster-Elektronen-Mikroskop (REM)-Aufnahme von unbesiedelter Matriderm 2 mm (rechts) [Stark 2004].

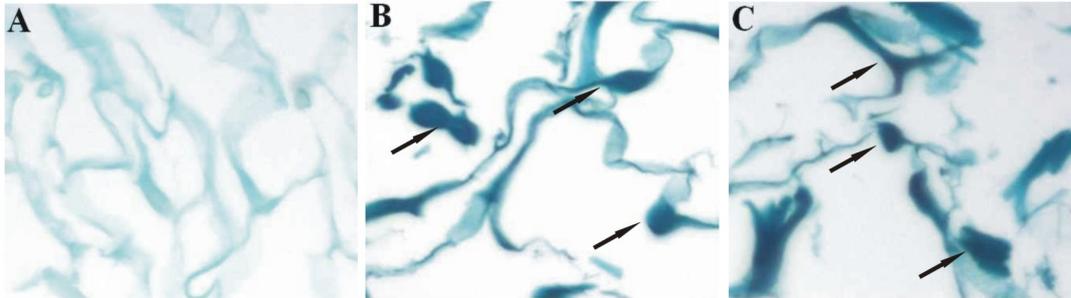
### 4.1.4 Histologische und immunhistologische Färbungen

Kollagen II ist das Hauptprotein von Knorpelgewebe und damit ein wichtiger Nachweis des Differenzierungsstatus.

Safranin O ist ein Farbstoff, der in die Knorpelsubstanz eindringt und an saure Proteoglykane bindet. Das Zytoplasma und die Kernmembran werden grün angefärbt. Knorpelzellen wurden auf Matriderm 2 mm für 19 Tage kultiviert. Zum Vergleich des Differenzierungsstatus wurden die Zellen in Standard- und in TGF- $\beta$ -Medium kultiviert. Die besiedelten Matrices und eine unbesiedelte Matrix wurden in Paraffin eingebettet, Dünnschnitte angefertigt und mit Safranin O gefärbt (Durchführung: Anhang 6.4.2).

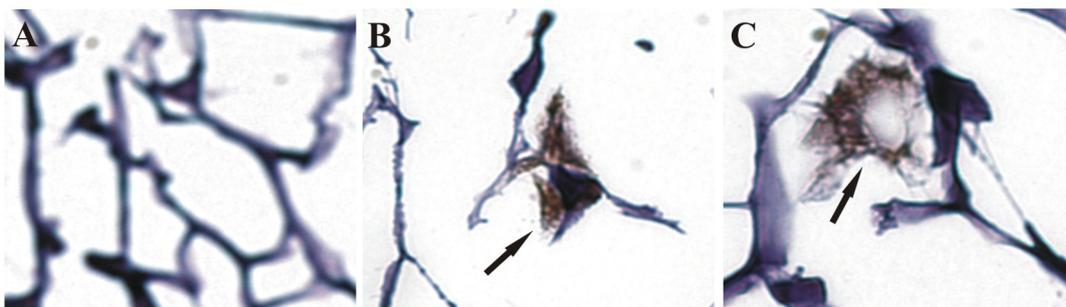
Durch die Inkubation mit Safranin O wurden die Kollagen- und Elastinfasern der unbesiedelten Matrix ebenfalls angefärbt (Abb. 4.3, A). Trotz der Anfärbung von Matriderm war ein deutlicher Unterschied der besiedelten Matrices zur unbesiedelten Matrix zu erkennen. Die besiedelten Matrices hatten eine dunklere grün/blaue Färbung (Abb. 4.3, B und C). Es schien,

dass die Knorpelzellen über ihre Filopodien in den Kollagen- bzw. Elastinfasern der Matrix eingebettet waren (Abb. 4.3, Pfeile). Ein deutlicher Unterschied der Morphologie zwischen Standard- und TGF- $\beta$ -Medium war nicht zu erkennen (vergleiche Abb. 4.3, B und C).



**Abb. 4.3:** Safranin-O-Färbung von Matriderm 2 mm bei 400facher Vergrößerung. **A:** unbesiedelte Matrix; **B:** Kultivierung von Knorpelzellen auf Matriderm 2 mm für 19 Tage in Standard-Medium; **C:** Kultivierung von Knorpelzellen auf Matriderm 2 mm für 10 Tage in Standard-Medium, gefolgt von 9 Tagen Kultivierung in TGF- $\beta$ -Medium. Die Pfeile zeigen die mit Safranin O angefärbten Zellen [Stark u. a. 2005].

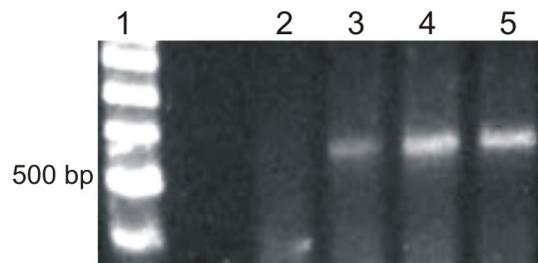
Da die Beurteilung der Zellmorphologie durch das gleichzeitige Anfärben der Matrixstrukturen erschwert war, wurde die Expression von Kollagen II immunhistologisch durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen (Durchführung: Anhang 6.4.3). Im Vergleich zur unbesiedelten Matrix wurde die Expression von Kollagen II durch die Bildung des braunen Diaminobenzidin (DAB)-Niederschlags nachgewiesen (Abb 4.4, Pfeile). Auch hier wurde kein Unterschied zwischen Standard- bzw. TGF- $\beta$ -Medium festgestellt. Somit wurde der Differenzierungsstatus auf Matriderm 2 mm auch ohne die Zugabe von TGF- $\beta$  erhalten [Stark u. a. 2005].



**Abb. 4.4:** Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II auf Matriderm 2 mm bei 400facher Vergrößerung. **A:** unbesiedelte Matrix; **B:** Kultivierung von Knorpelzellen auf Matriderm 2mm für 19 Tage in Standard-Medium; **C:** Kultivierung von Knorpelzellen auf Matriderm 2 mm für 10 Tage in Standard-Medium, gefolgt von 9 Tagen Kultivierung in TGF- $\beta$ -Medium. Die Pfeile zeigen freies bzw. in den Zellen vorliegendes Kollagen II [Stark u. a. 2005].

#### 4.1.5 Expression von Kollagen II

Die oben beobachtete Expression von Kollagen II der kultivierten Zellen auf Matriderm 2 mm unter Standard- und TGF- $\beta$ -Medium wurde zusätzlich durch RT-PCR untersucht. Knorpelzellen wurden in Standard- bzw. TGF- $\beta$ -Medium in Kulturflaschen und auf Matriderm 2 mm kultiviert. Die Zellen wurden von der Matrix durch Verdau für 45 min bei 37 °C mit Kollagenase IV (1 mg/ml Standard-Medium) entfernt und anschließend wurde die RNA isoliert (Durchführung: Anhang 6.4.13). Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und diese wurde darauf in der PCR eingesetzt (Durchführung: Anhang 6.4.15 und 6.4.16). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Die Expression von Kollagen II wurde bei der Kultivierung der Knorpelzellen mit TGF- $\beta$  in Zellkulturflaschen und auf Matriderm 2 mm nachgewiesen (Abb. 4.5, Spur 3 und 5) [Stark 2004]. Somit induzierte bzw. verstärkte der Wachstumsfaktor die Differenzierung des Haupt-ECM-Proteins von Knorpelgewebe. Beim Kultivieren der Zellen in Standard-Medium exprimierten nur Zellen, die auf Matriderm 2 mm kultiviert wurden, Kollagen II (Abb. 4.5, Spur 4). Dies zeigt, dass die Matrix die Bildung von Knorpel, auch ohne Zugabe des Wachstumsfaktors, unterstützte.



**Abb. 4.5:** 2%iges Agarosegel der RT-PCR des knorpelspezifischen Markers Kollagen II in Zellkulturflaschen (Spur 2, 3) und auf Matriderm 2 mm (Spur 4, 5). Die Zellen wurden für 1 Woche in Standard-Medium (Spur 2, 4) bzw. in TGF- $\beta$ -Medium (Spur 3, 5) kultiviert [Stark 2004].

#### 4.1.6 Fazit

Das Ziel war die Matrices der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care auf ihre Eignung zur Kultivierung von Knorpelgewebe zu testen. Der Hauptbestandteil der Materialien ist Kollagen II, welches zur Stabilisierung mit Elastin quervernetzt ist. Der Vorteil dieser Matrices ist, dass sie bereits als Wundauflagen z. B. bei Verbrennungen, eingesetzt wurden. Dabei zeigten sie eine anti-irritative und blutstillende Wirkung [Guett 2003]. Durch diese Verwendung wurde die Biokompatibilität bereits bestätigt, die wichtig für das *Tissue Engineering* ist.

Es ist bekannt dass durch ein ideales dreidimensionales Gerüst die Ausbildung von Knorpelgewebe unterstützt [Kaps u. a. 2004]. Dies wurde durch histologische/immunhistologische

und PCR-Analysen bestätigt. Kollagen II, der Hauptmarker von Knorpelgewebe, wurde auf Matriderm 2 mm auch bei Kultivierung in Standard-Medium exprimiert. Dies wurde durch den spezifischen Nachweis mit einem Kollagen-II-Antikörper und durch RT-PCR bestätigt. Dies zeigt, dass die Matrix die Erhaltung der chondrozytären Eigenschaften unterstützte. Die dreidimensionale Struktur oder die Zusammensetzung der Matrix begünstigt den Differenzierungsstatus des Gewebes, auch ohne den Zusatz von TGF- $\beta$ . Zusätzlich begünstigt eine offenporige Struktur das Einwachsen der Zellen in die Matrix. Die REM-Aufnahme in Abb. 4.2 auf Seite 27 (rechts) zeigt, dass Matriderm 2 mm dieser Struktur entspricht. Zusätzlich deuten die Ergebnisse der Färbung mit Safranin O an, dass die Zellen in den Fasern der Matrix integriert wuchsen.

## 4.2 Matrices und Kultivierungsbedingungen für die Herstellung von Knochengewebe

### 4.2.1 Biokeramiken

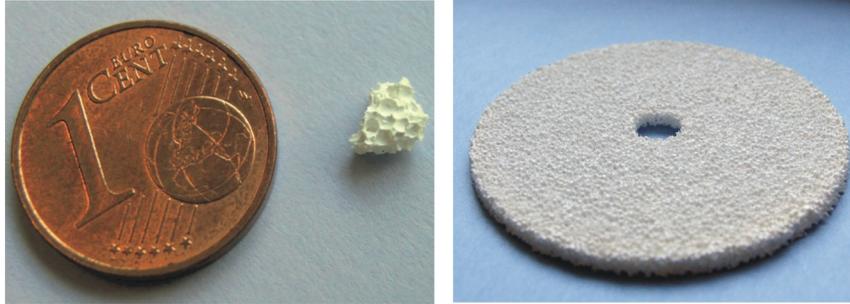
Für die Experimente mit den Knochenzellen wurden biokompatible Keramiken der Firma Zellwerk GmbH (Oberkrämer) verwendet. Die Basis der Keramik (Markenname Sponceram<sup>®</sup>), besteht hauptsächlich aus dotiertem Zirconia (ZrO<sub>2</sub>). Des Weiteren wurden Sponceram<sup>®</sup>-Matrices verwendet, die mit Hydroxylapatit beschichtet sind, die im Folgenden als Sponceram/HA bezeichnet werden. Beide Keramiken sind porös und mit verschiedenen Porengrößen zwischen 600-900  $\mu\text{m}$  erhältlich. Für Experimente unter statischen Bedingungen wurden Keramiken mit einer durchschnittlichen Porengröße von 600  $\mu\text{m}$  eingesetzt. Die Oberfläche dieser Keramiken beträgt  $2 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ .

Die Kultivierungen im Reaktorsystem erfolgten auf Sponceram<sup>®</sup>- bzw. Sponceram/HA-Scheiben mit einem Durchmesser von 6,5 cm, einer Dicke von 3 mm und einer Oberfläche von  $14 \text{ m}^2$  (Abb. 4.6, rechts). Das Porenvolumen macht ca. 85 % einer Scheibe aus. Zusätzlich wurden in einer Reaktorkultivierung Sponceram<sup>®</sup>-Scheiben mit einer Porengröße von ca. 900  $\mu\text{m}$  eingesetzt.

### 4.2.2 Besiedlung von Sponceram<sup>®</sup>-Matrices für die statische Kultivierung

Für die Experimente in 96-Lochplatten wurden pro Kultivierungsbedingung Matrices ähnlichen Gewichtes, mit einer Größe von ca. 3 mm x 3 mm x 4 mm verwendet (Abb. 4.6, links). Alle Matrices wurden vor der Besiedlung autoklaviert und über Nacht in Zellkulturmedium bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Vor der Besiedlung wurde das Medium abgenommen und ca.  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen in 80  $\mu\text{l}$  Medium auf die Matrices gegeben und für 30–60 min bei 37°C/5% CO<sub>2</sub> geschüttelt. Anschließend wurden die nicht adhärennten Zellen entfernt und jede Matrix mit 200  $\mu\text{l}$  Medium versetzt. Je nach Verbrauch der Zellen wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

Für die Analyse der Zellviabilität (MTT-Test), des Wachstums (DNA- bzw. Protein-Test) und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurden die Matrices in neue 96-Lochplatten überführt, damit die Aktivität der Zellen auf dem Boden der Platten nicht zusätzlich vermessen wurde (Anhang 6.4.9-6.4.12).



**Abb. 4.6:** Sponceram<sup>®</sup>-Matrices für die Kultivierung in 96-Lochplatten (links) bzw. im Bioreaktor (rechts).

#### 4.2.3 Aufbau des BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500

Der BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS (*Rotating Bed System*) 500 (Sartorius BBI Systems, Göttingen), im folgenden als BIOSTAT<sup>®</sup> RBS bezeichnet, ist ein Drehbett-Bioreaktor für das Kultivieren von Eukaryontenzellen. Im Gegensatz zum RWVR (Kap. 3.10.2), beim dem die Matrices im *freien Fall* kultiviert werden, sind im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS die Matrices während der Kultivierung auf einer Welle fixiert. Das Kulturgefäß besteht aus einem Glaszylinder mit zwei Verschlusskappen und einem magnetgekuppelt angetriebenen Drehbett (Abb. 4.7 auf der folgenden Seite, rechts). Der Glaszylinder, mit einem Füllvolumen von 500 ml, wird in eine Halterung mit einem Elektromotor fixiert. Der Elektromotor wird über Magneten an den Glaszylinder gebunden, so dass das Drehbett angetrieben werden kann. Der Glaszylinder besteht aus einem Einfach- oder einem Doppelmantel. Bei der Kultivierung im Gefäß mit Einfachmantel wird die Temperatur über den *GMP-Breeder*, eine Sterilwerkbank mit Temperaturregulierung, kontrolliert (Abb. 4.7 auf der folgenden Seite, links). Bei der Kultivierung im Doppelmantelgefäß erfolgt die Temperaturregulierung durch Wasser, das durch den Innenraum der beiden Glasgefäße fließt.

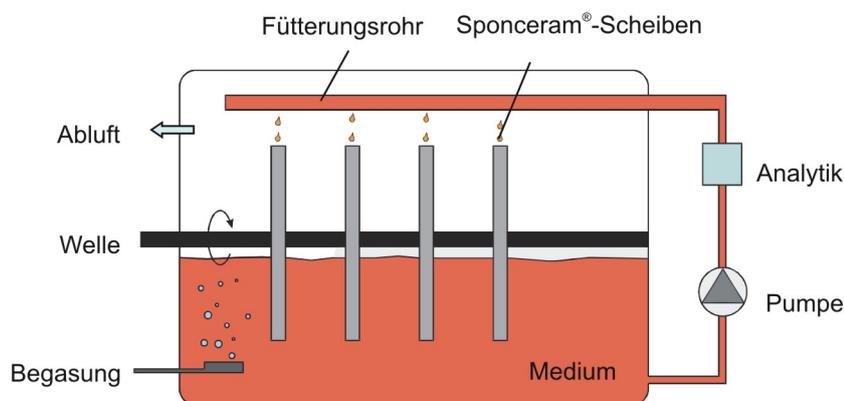
In der vorderen Verschlusskappe befinden sich Anschlüsse für pH-, pO<sub>2</sub>-, und Temperatursonde sowie Anschlüsse für Medienzuzug- bzw. ablauf. Die Kultivierungsparameter werden über eine digitale Steuereinheit geregelt. Die pH-Wert-Regelung erfolgt über CO<sub>2</sub> das über eine Fritte in das Medium gegeben wird, wobei es über ein Magnetventil der Druckluftbegasung zugeführt wird. Die Dosierung von CO<sub>2</sub> wird über die Einstellung der PID-Werte (Regelungsparameter der Steuereinheit des RBS) festgelegt. Die Begasung mit Druckluft erfolgt über den Kopfraum



**Abb. 4.7:** BIostat® Bplus RBS 500 im GMP-Breeder (links) und mit Doppelmantelgefäß (rechts).

des Gefäßes. Bei der Kultivierung wachsen Zellen adhärent auf Sponceram®-Scheiben. Maximal 20 Scheiben können auf einer Welle fixiert werden. Für eine Kultivierung mit weniger Scheiben werden Platzhalter auf der Welle befestigt, damit eine ausreichende Vermischung und Verdrängung des Mediums gewährleistet ist. Das Medium wird über ein externes Umlaufsystem umgewälzt, wobei die Scheiben über ein Fütterungsrohr mit Medium beträufelt werden. Das Fütterungsrohr dient auch zum Besiedeln der Matrices mit Zellen (Abb. 4.8). Während der Kultivierung wird eine Drehzahl von  $2 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$  eingestellt.

Der Reaktor wurde vorwiegend für die Vermehrung von Säugerzellen zur Produktion rekombinanter Proteine entwickelt. In dieser Arbeit wurde erstmals die Kultivierung auf Sponceram®-Matrices im Reaktorsystem zur Generierung von Knochengewebe durchgeführt.



**Abb. 4.8:** Schematische Zeichnung des Bioreaktors BIostat® Bplus RBS 500.

#### 4.2.4 Kultivierung im BIOSTAT® Bplus RBS 500

Zur Vorbereitung für die Kultivierung im Bioreaktor wurden die Platzhalter und 4 Sponceram®-Scheiben auf der Welle befestigt. Zum Autoklavieren wurden pro Scheibe 500 µl Wasser in das Gehäuse gegeben. Das Fütterungsrohr war mit 20 Löchern versehen, die beim Zusammenbau des Reaktors möglichst genau über die Scheiben fixiert wurden. Für die Kultivierung mit weniger Scheiben wurde ein kürzeres Fütterungsrohr verwendet, oder die nicht benötigten Bohrungen mit Silikonenschläuchen verschlossen. Der Reaktor wurde durch Autoklavieren sterilisiert. Zur Besiedlung der Matrices wurden die Zellen über ein Diaphragma, durch das Fütterungsrohr auf die Scheiben injiziert. (Eine weitere Möglichkeit der Besiedlung wäre die direkte Zellinjektion auf die Matrices in Petrischalen unter der Sterilwerkbank; anschließend werden die Matrix/Zellkonstrukte auf der Welle im Reaktorgefäß befestigt.) Während des Animpfens wurde eine Drehzahl von 4 U·min<sup>-1</sup> eingestellt, damit die Zellen gleichmäßig auf der Scheibe verteilt wurden. Die Zellen wurden mit einer Mindestzellzahl von 1·10<sup>7</sup>/ml pro Scheibe injiziert. Durch das geringe Animpfvolumen von ca. 2,5 ml pro Scheibe können die porösen Scheiben die Flüssigkeit vollständig aufnehmen. Um das vollständige Adhären der Zellen an das poröse Trägermaterial zu gewährleisten wurde erst 30 min nach dem Animpfen der Reaktor mit einem Gesamtvolumen von ca. 300 ml Medium aufgefüllt. Die Kultivierungsparameter wurden anschließend auf 37 °C, 2 U·min<sup>-1</sup> und einen pH-Wert von 7,3 eingestellt.

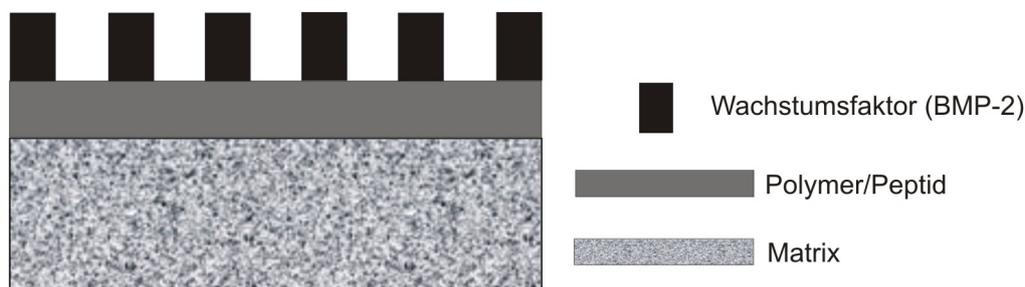
#### 4.3 Immobilisierung von BMP-2 mittels N-Vinylpyrrolidon und RGD-Peptiden

Für die Züchtung eines funktionalen Gewebes ist die Verwendung von körpereigenen Stammzellen vorteilhaft. Stammzellen können einfach aus dem Patienten isoliert werden, sie proliferieren stärker als ausdifferenzierte Zellen und sie lösen nach erfolgter Reimplantation im Patienten keine Abstoßungsreaktionen aus. Ein Problem dabei ist, dass zur Entwicklung des Zielgewebes teure Wachstumsfaktoren benötigt werden. Oft reicht ein Typ Wachstumsfaktor für das Generieren von z. B. Knochen oder Knorpel nicht aus. An einigen Stellen im Organismus kann ein Wachstumsfaktor auch für die Integration in das umliegende Gewebe essentiell sein, z. B. wenn Gefäße in das neu entstehende Gewebe einwachsen müssen.

Es sind bisher verschiedene Methoden beschrieben, Wachstumsfaktoren den entsprechenden Zellen bzw. Gewebe verfügbar zu machen. Sie können z. B. direkt dem Medium während der Kultivierung *in vitro* zugegeben werden. Dies garantiert eine Kontrolle über die Konzentration, kann aber unter Umständen sehr teuer werden. Eine weitere Methode ist die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf den Oberflächen der verwendeten Matrices [Saito und Takaoka 2003]. Dabei gibt es die Möglichkeit die Proteine auf der Oberflä-

che zu adsorbieren, sie in so genannte *controlled release* Systeme zu integrieren, aus denen sie kontinuierlich abgegeben werden, oder sie kovalent direkt an die Matrix zu binden [Saltzman und Baldwin 1998] [Wiemann u. a. 2002].

Ein wichtigste Wachstumsfaktor für die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Knochengewebe ist BMP-2. In dieser Arbeit wurde der Wachstumsfaktor BMP-2 indirekt auf Sponceram<sup>®</sup>-Matrices immobilisiert. Dazu wurden verschiedene Ansätze gewählt. BMP-2 wurde zunächst an zwei verschiedene N-Vinylpyrrolidon-Polymere bzw. verschiedene RGD-Peptide kovalent gebunden. Anschließend wurde der Komplex auf Sponceram<sup>®</sup>-Matrices adsorbiert. Das Prinzip ist in Abbildung 4.9 dargestellt.



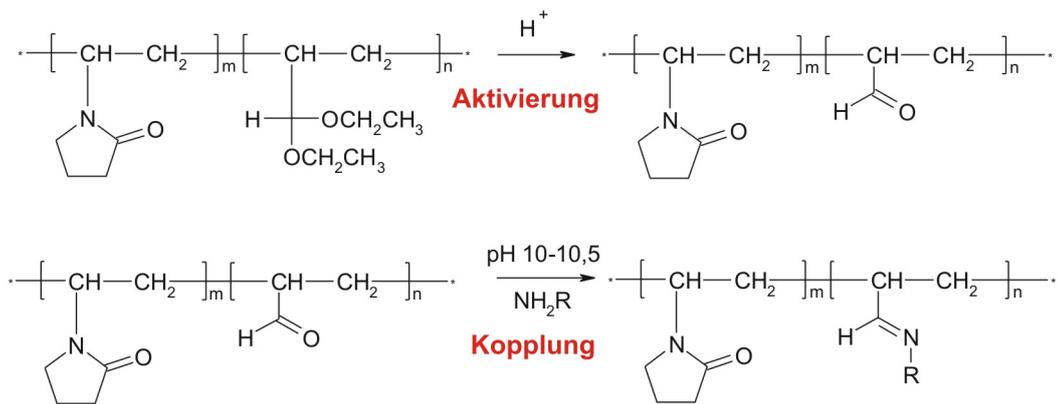
**Abb. 4.9:** Schema der Immobilisierung von BMP-2 über N-Vinylpyrrolidon-Polymere bzw. RGD-Peptide.

#### 4.3.1 Aktivierung von N-Vinylpyrrolidon und Bindung an Aminogruppen

Die Bindung von Proteinen/Aminen an das Polymer N-Vinylpyrrolidon ist in Abbildung 4.10 dargestellt. Die Acetalschutzgruppe wurde durch saure Hydrolyse bei 70–80 °C von dem wasserlöslichen Polymer entfernt (Durchführung: Anhang 6.4.21). Die dadurch entstandene Aldehydgruppe bindet im folgenden Schritt an die Aminogruppen des BMP-2 (Abb. 4.10). Dabei entstanden keine toxischen Produkte. In der Literatur ist beschrieben, dass Enzyme über N-Vinylpyrrolidon-Polymere immobilisiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität des Enzyms durch die Bindung nicht verändert wurde [Tennikova u. a. 1980].

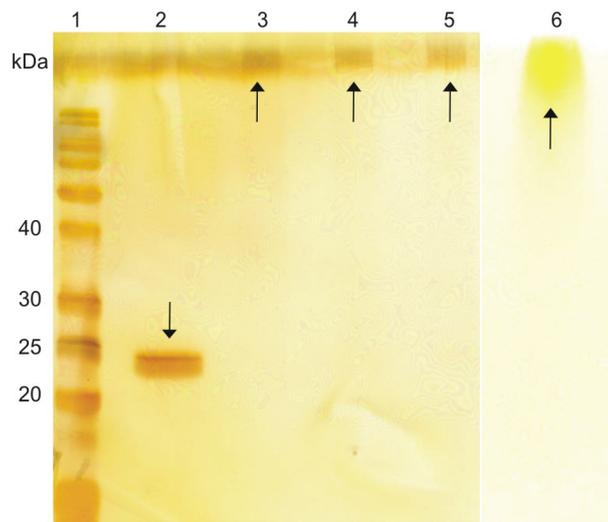
#### 4.3.2 Bindung von BMP-2 an N-Vinylpyrrolidon

Zur Bindung von BMP-2 an N-Vinylpyrrolidon wurden zwei Polymere mit unterschiedlicher molekularer Masse, von 17 kDa bzw. 50 kDa eingesetzt. Die Bindung wurde im basischen Bereich bei pH 10 (Carbonat- oder Borat-Puffer) durchgeführt, wobei das Polymer im 3-, 5- bzw. 10-fachen molaren Überschuss zum Protein eingesetzt wurde (Durchführung: Anhang 6.4.22). Die optimalen Puffersysteme und Salzkonzentrationen zur Bindung wurden zunächst anhand des Modellproteins RNase A bestimmt (ähnlicher isoelektrischer Punkt wie BMP-2) (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.10:** Aktivierung des Polymers N-Vinylpyrrolidon (oben). Bindung von Aminen/Protein an N-Vinylpyrrolidon (unten).

Die erfolgte Bindung des BMP-2 an das Polymer wurde mittels SDS-Gelelektrophorese überprüft. Da das ungeladene Polymer und somit auch das entstandene Bindungsprodukt im Gel nicht wandert, wurde nach der Proteinfärbung des Gels das gebundene BMP-2 kurz unterhalb der Taschen detektiert (Abb.4.11). Die Lösungen wurden vor dem Auftragen auf das Gel nicht denaturiert, damit keine Spaltprodukte entstehen. BMP-2 hat als Dimer eine Größe von ca. 25 kDa (Spur 2). Die Spuren 3-5 zeigen die Bindungsprodukte mit unterschiedlichem molaren Überschuss an Polymer. Keine Banden sind auf Höhe des ungebundenen BMP-2 (Spur 2) sichtbar.



**Abb. 4.11:** Kovalente Bindung von BMP-2 an N-Vinylpyrrolidon. 12,5%iges SDS-Gel, Silberfärbung (Spur 1-5); Iodfärbung (Spur 6). **Spur 1:** Protein Marker; **Spur 2:** BMP-2; **Spur 3:** Polymer + BMP-2 (10:1); **Spur 4:** Polymer + BMP-2 (5:1); **Spur 5:** Polymer + BMP-2 (3:1); **Spur 6:** Polymer + BMP-2 (3:1).

Dies zeigt, dass BMP-2 vollständig an das Polymer gebunden wurde. In Spur 6 wurde das Bindungsprodukt aus Polymer und BMP-2 im Verhältnis 3:1 aufgetragen und zusätzlich das Polymer durch Iodfärbung sichtbar gemacht. Die Versuche mit dem 50-kDa-Polymer wurden äquivalent durchgeführt. Auch hier wurde BMP-2 an das Polymer gebunden [Vlakh u. a. 2005].

### 4.3.3 Adsorption von N-Vinylpyrrolidon an Sponceram<sup>®</sup>

Sponceram<sup>®</sup>-Matrices wurden für mindestens eine Stunde in Polymer-Lösung (0,5 mg/ml PBS) bzw. den Bindungsprodukten aus Polymer und Proteinen bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung von der Matrix entfernt und die Konzentration an adsorbiertem Polymer indirekt über Differenzmessung im Überstand mittels eines spezifischen Iodtests (Anhang 6.4.23) bestimmt [Moulinex 1984]. Um ungebundenes Polymer zu entfernen wurden die Matrices für 30 s bei 80 W im Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurde die Matrix über einen Zeitraum von 14 Tagen in PBS-Puffer bei 37 °C inkubiert. Nach 2, 6 bzw. 14 Tagen wurde die Desorption des Polymers im Überstand bestimmt. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Adsorptionen des 50-kDa-Polymer und der Bindungsprodukte aus dem Modellprotein RNase und Polymer dargestellt. Ungefähr 200 µg Polymer pro g Matrix wurden auf Sponceram<sup>®</sup> adsorbiert.

	Adsorption [µg/g]	Desorption [µg/g]			Nettoadsorption [µg/g]
		nach 2 d	nach 6 d	nach 14 d	
Polymer	205	10	5	0	190
Polymer-RNase (10:1)	205	0	0	0	205
Polymer-RNase (5:1)	240	0	0	0	240

**Tab. 4.1:** Ergebnisse der Adsorption und Desorption von N-Vinylpyrrolidon und den Bindungsprodukten aus N-Vinylpyrrolidon/RNase an Sponceram<sup>®</sup> [Vlakh u. a. 2005].

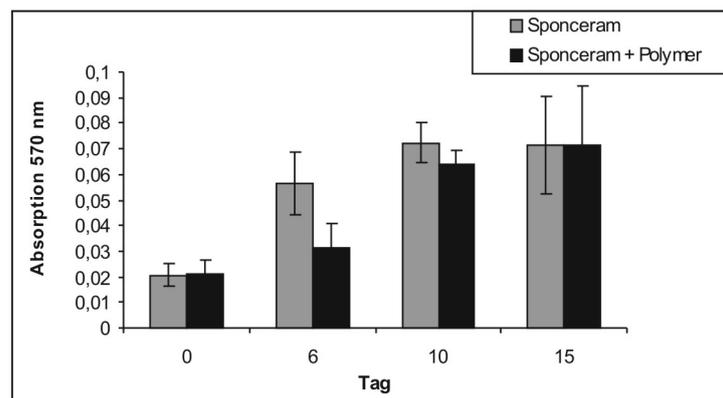
Innerhalb von 14 Tagen wurde kaum eine Desorption des Polymers beobachtet. Es ist beschrieben, dass N-Vinylpyrrolidon-Polymere an mineralischen Oberflächen adsorbieren [Moulinex 1984].

### 4.3.4 Einfluss von N-Vinylpyrrolidon auf die Viabilität/Proliferation

Der MTT-Test dient als Messgröße für die relative Viabilität von Eukaryonten. MTT wird nur von Mitochondrien lebender Zellen umgesetzt. Da bei proliferierenden Zellen eine erhöhte Mitochondrienaktivität vorliegt wurde in allen folgenden Kapiteln beim MTT-Test die Viabilität/Proliferation bestimmt.

Um den Einfluss von N-Vinylpyrrolidon auf die Zellproliferation zu testen wurden autoklavierte Sponceram<sup>®</sup>-Matrices in sterilen Polymer-Lösungen von 0,5 mg/ml für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Matrices

mit PBS gewaschen und über Nacht in Zellkulturmedium bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Matrices mit  $1,5 \cdot 10^4$  SAOS-2-Zellen besiedelt, in Standard-Medium kultiviert und die Viabilität/Proliferation mit dem MTT-Test (Anhang 6.4.9) über einen Kultivierungszeitraum von 15 Tagen bestimmt. Exemplarisch wird hier der Einfluss des 50-kDa-Polymers auf die Proliferation von SAOS-2 dargestellt (Abb. 4.12). Insgesamt waren die Absorptionswerte am Tag 6 und Tag 10 auf unbeschichteten Sponceram<sup>®</sup>-Matrices größer als auf den mit Polymer beschichteten Matrices, was auf eine höhere Viabilität schließen ließ. Diese Ergebnisse sind jedoch nach Überprüfung der Varianz durch einen F-Test und einen anschließenden *t*-Test statistisch nicht signifikant (Statistik: Anhang 6.1). Am Tag 15 war das Absorptionsmaximum, unabhängig von der Beschichtung, auf beiden Matrices gleich. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Beschichtung mit N-Vinylpyrrolidon insgesamt keinen Einfluss auf die Zell-Viabilität hatte und dadurch geeignet ist um Wachstumsfaktoren zu koppeln. Das 17-kDa-Polymer zeigte ebenfalls keine Effekte auf die Proliferation von SAOS-2 Zellen (Daten nicht gezeigt).



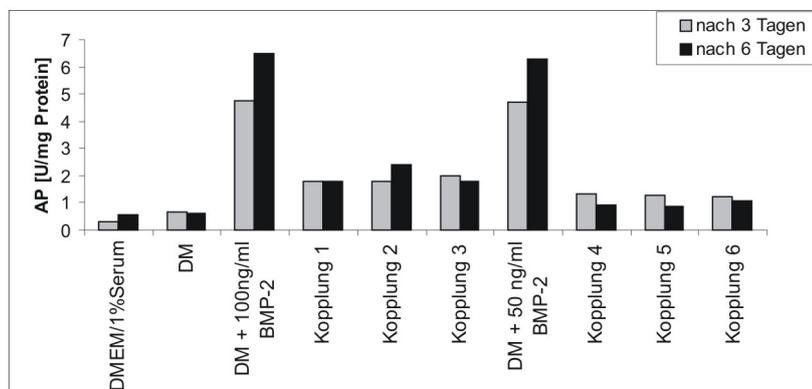
**Abb. 4.12:** Darstellung der Ergebnisse des MTT-Tests zur Bestimmung der Viabilität/Proliferation von SAOS-2-Zellen kultiviert auf beschichtetem bzw. unbeschichtetem Sponceram<sup>®</sup> über einen Zeitraum von 15 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 Matrices +/- Standardabweichung [Vlakh u. a. 2005].

#### 4.3.5 Einfluss von kovalent gebundenem BMP-2 auf die Alkalische-Phosphatase-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen

Nach der erfolgreichen Bindung von BMP-2 an N-Vinylpyrrolidon (vgl. Abb. 4.11 auf Seite 35) wurde die Aktivität des gebundenen Wachstumsfaktors im Vergleich zu ungebundenem BMP-2 untersucht. Die Polymere wurden wie in Kap. 4.3.2 an die Polymere gebunden und der Erfolg der Bindung durch SDS-Gelelektrophorese bestimmt. Zusätzlich wurden die Bindungsprodukte durch eine 30 kDa Ausschluss-Membran filtriert, damit kein ungebundenes BMP-2 die Ergebnisse der Aktivität der Bindungsprodukte fälscht. Die Aktivität des BMP-2 bzw. BMP-2/Polymer-Komplexes wurde indirekt durch Messung der Alkalischen-Phosphata-

se-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen bestimmt. Das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) ist ein früher Marker der Knochenentwicklung und ein häufig verwendetes Marker-Protein um Differenzierungsprozesse zu untersuchen [Aubin 1996]. MC3T3-E1 sind Vorläuferzellen, die oft zur Untersuchung von Differenzierungsprozessen zu Knochengewebe eingesetzt werden [Sudo u. a. 1983]. Sie lassen sich u. a. durch Zugabe von BMP-2 zu Osteoblasten differenzieren.

Je  $1 \cdot 10^4$  MC3T3-E1-Zellen/Loch wurden in 96-Lochplatten ausplattiert und über Nacht in Standard-Medium bei  $37^\circ\text{C}/5\%$   $\text{CO}_2$  kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bindungsprodukte und unbehandeltes BMP-2 mit der gleichen Endkonzentration an Wachstumsfaktor in Differenzierungs-Medium (Zusammensetzung: Anhang 6.2) verdünnt und auf MC3T3-E1-Zellen gegeben. Der Serumanteil im Zellkulturmedium wurde auf 1 % abgesenkt, damit die Zellen weniger proliferierten und damit verstärkt differenzieren konnten. Bereits Konzentrationen von 5 ng/ml BMP-2 in Zellkulturmedium zeigten einen deutlichen Anstieg der AP-Aktivität in MC3T3-E1-Zellen. Hier wurde eine hohe Konzentration des Wachstumsfaktors mit einer Endkonzentration von 50 ng/ml bzw. 100 ng/ml eingesetzt um eine deutliche Enzymaktivität zu erreichen. Die Aktivität des Enzyms wurde nach 3 und 6 Tagen bestimmt. In Abbildung 4.13 ist der Einfluss von kovalent gebundenem BMP-2/17 kDa Polymer auf die AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen dargestellt.



**Abb. 4.13:** Einfluss von BMP-2 bzw. kovalent gebundenem BMP-2 auf die AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen nach drei bzw. sechs Tagen. BMP-2 wurde an das 17 kDa Polymer gebunden. In den Ansätzen 1-3 hat BMP-2 eine Endkonzentration von 100 ng/ml, in 4-6 50 ng/ml. Ansätze 1, 4: 10facher Überschuss Polymer; Ansätze 2, 5: 5facher Überschuss Polymer; Ansätze 3, 6: 3facher Überschuss Polymer. Die Werte sind gemittelt aus Dreifachbestimmungen. (DM= Differenzierungs-Medium)

Durch die Bindung an das 17-kDa-Polymer wurde bei allen Bindungsansätzen eine geringere Aktivität des frühen Knochenmarkers im Vergleich zu ungebundenem/löslichem BMP-2 gemessen. Der Aktivitätsverlust lag zwischen 67-87 %, wobei kein Zusammenhang mit der eingesetzten Konzentration an Polymer erkennbar war. Nur im Vergleich zur Kultivierung in

Differenzierungs-Medium und Standard-Medium war die AP-Aktivität durch die Bindungsprodukte in Zellkulturmedium erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität von BMP-2 durch Bindung an das 17-kDa-Polymere im Vergleich zu löslichem BMP-2 verringert wurde. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass eine Konformationsänderung die Rezeptorbindestelle von BMP-2 durch Bindung an das N-Vinylpyrrolidon induziert wurde. Oder die Rezeptorbindestelle von BMP-2 hat direkt an das Polymer gebunden, so dass die Bindung an den BMP-2 Rezeptor verhindert wurde. Ein weiterer Grund wäre, dass das gebundene BMP-2 während der Kultivierung aus dem Komplex wieder freigesetzt wurde.

Das Bindungsprodukt von BMP-2/50-kDa-Polymer induzierte keine Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Daten nicht gezeigt).

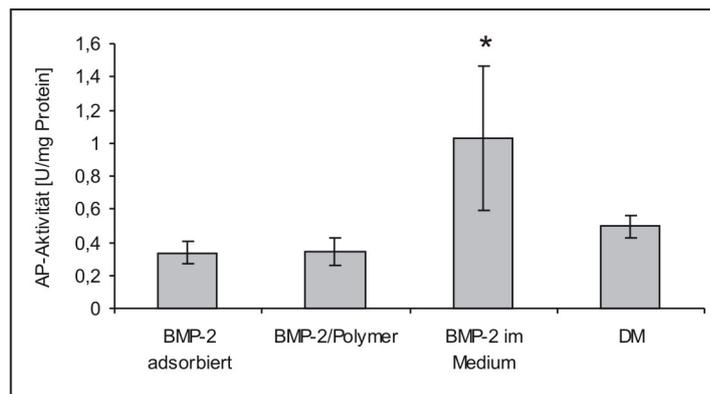
Der Aktivitätsverlust durch die Bindung an N-Vinylpyrrolidon wäre dadurch zu kompensieren wenn bei anschließender Adsorption an einer Träger-Matrix insgesamt weniger gebundenes BMP-2 effektiver immobilisiert werden könnte, als lösliches dem Medium zugesetzt werden muss. Deshalb wurde dieser Ansatz in dem folgenden Experiment betrachtet.

Eine Konzentration von 5 ng/ml BMP-2 induzierte bereits eine Differenzierung von Vorläuferzellen zu Knochengewebe und ist realistisch für die Anwendung *in vivo*. Das 17 kDa-Polymer wurde bei der Bindung an BMP-2 im 10fachen Überschuss eingesetzt (Durchführung: Anhang 6.4.22). 20 µl/Matrix wurden direkt auf die Sponceram<sup>®</sup>-Matrices gegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wurden nach Berechnung der adsorbierten Menge an Polymer auf der Matrix ca. 5–8 ng gebundenes BMP-2 auf der Oberfläche adsorbiert. Als Vergleich wurden ebenfalls 5 ng ungebundenes BMP-2 für 2 h auf Sponceram<sup>®</sup> adsorbiert. Die Matrices wurden anschließend mit PBS gewaschen und für 1 Woche bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturmedium inkubiert. Daraufhin wurden die Matrices mit MC3T3-E1-Zellen besiedelt, in Standard-Medium kultiviert und nach einer Woche die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Zusätzlich wurden über den gleichen Zeitraum Zellen auf unbeschichteten Matrices in Differenzierungs- bzw. BMP-2-Medium (5 ng/ml BMP-2 in Differenzierungs-Medium) kultiviert. Die Matrices wurden in 96-Lochplatten kultiviert und das Medium während der Kultivierung zweimal gewechselt. Pro Matrix wurden 200 µl Medium eingesetzt, so dass bei der Kultivierung mit BMP-2-Medium effektiv 3 ng BMP-2/Matrix eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 auf der folgenden Seite dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die AP-Aktivität um 70 % höher war bei der Kultivierung mit BMP-2-Medium als auf den Matrices, bei denen der Wachstumsfaktor bzw. das Bindungsprodukt adsorbiert wurden. Auch bei der Kultivierung in Differenzierungs-Medium war die Aktivität des Enzyms um 15 % höher. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kultivierung auf Sponceram<sup>®</sup> in BMP-2-Medium effektiver war, als auf den Matrices mit adsorbiertem Wachstumsfaktor bzw. Bindungsprodukt. Diese Ergebnisse sind nach Überprüfung der Varianz durch einen F-Test und einen anschließenden *t*-Test signifikant (siehe Anhang 6.1).

Für die geringen AP-Aktivitäts Werte der Zellen auf den adsorbierten Matrices kann es verschiedene Erklärungen geben. Der Komplex und auch der Wachstumsfaktor wurden im ng-Bereich auf den Matrices adsorbiert. Adsorptionsprozesse an Oberflächen sind auch konzentrationsabhängig, so dass für die Bindung an der Sponceram<sup>®</sup>-Oberfläche eine höhere Konzentration nötig ist. Höhere Konzentrationen des Wachstumsfaktors zur Adsorption einzusetzen ist aufgrund der hohen Kosten nicht sinnvoll, wenngleich die Zugabe zum Medium effektiver ist. Die Adsorption des Polymer/BMP-2 Komplexes könnte ebenso konzentrationsabhängig sein. Zur Messung der Adsorption wurden die Sponceram<sup>®</sup>-Matrices in 10fach höher konzentrierter Polymer-Lösung inkubiert als für die Zellkulturexperimente, so dass hier nur wenig oder nichts auf Sponceram<sup>®</sup> gebunden hat.

Die Matrices wurden nach der Adsorption für eine Woche in Standard-Medium kultiviert und dann mit Zellen besiedelt. Dem Medium wird zur Versorgung der Zellen Serum zugegeben. Die Proteine des Serums könnten BMP-2 oder den Komplex von der Oberfläche der Sponceram<sup>®</sup>-Matrix verdrängt haben, so dass keine Aktivität mehr gemessen wurde.

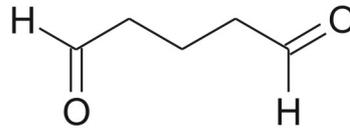


**Abb. 4.14:** Einfluss von adsorbiertem BMP-2 (5 ng), BMP-2 (5-8 ng)/17-kDa-Polymer und BMP-2-Medium (3 ng) bzw. Differenzierungs-Medium (DM) auf die AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen nach sieben Tagen Kultivierung. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 besiedelten Matrices +/- Standardabweichung. \* $p < 0,05$  (Anhang 6.1)

#### 4.3.6 Bindung von BMP-2 an RGD

In einem weiteren Immobilisierung-Ansatz wurde BMP-2 an RGD-Peptide gebunden. RGD ist die Sequenz, die die Zellanhaftung an Oberflächen auslöst. Es ist nicht toxisch, kostengünstig herzustellen und lässt sich an Oberflächen adsorbieren. So könnte BMP-2 an RGD gebunden und anschließend auf Sponceram<sup>®</sup> immobilisiert werden. Die Bindung der beiden Moleküle wurde durch Glutaraldehyd durchgeführt [Avrameas 1969]. Glutaraldehyd ist ein bifunktionelles Reagens, das zwei Aldehydfunktionen zur Ausbildung von Schiff'schen Basen

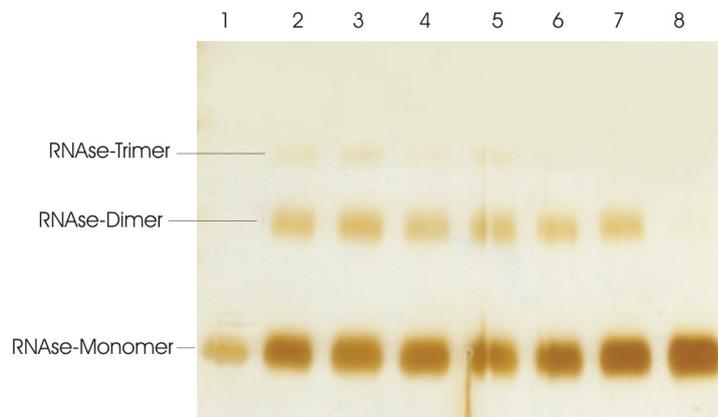
enthält (Abb. 4.15). Proteine und RGD-Peptide tragen Aminogruppen, die für die Bindung an Glutaraldehyd geeignet sind.



**Abb. 4.15:** Struktur von Glutaraldehyd.

Zuerst wurden die optimalen Konzentrationen der einzelnen Reaktanden zur Bindung ermittelt. Auch hier wurde zunächst mit dem Modellprotein RNase A gearbeitet. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen Protein, RGD und Glutaraldehyd in einem Reaktionsgefäß zusammen gegeben und zwei Stunden in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Da die Reaktion nicht selektiv ist für die Bindung von RGD an Proteine, wurden auch Nebenprodukte wie RGD- bzw. Protein-Dimere, sowie Oligomere erwartet [Fischer 2005]. Die erfolgte Bindung wurde über SDS-Gelelektrophorese analysiert.

In Abbildung 4.16 ist als Beispiel eine erfolgreiche Bindung von RNase A an RGD dargestellt. Dafür wurden für eine Bindung 50 µg/ml RNase A mit verschiedenen molaren Überschüssen RGD in 0,5%iger Glutaraldehyd-Lösung durchgeführt.

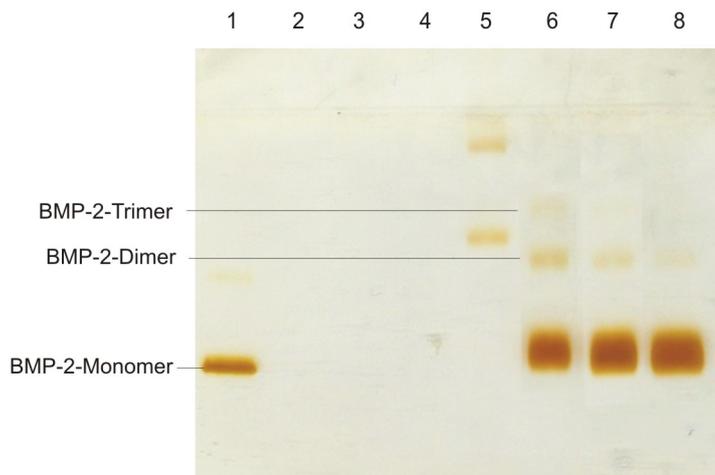


**Abb. 4.16:** Bindung von RGD an RNase A. 12%iges SDS-Gel, Silberfärbung: **Spur 1:** RNase-Standard ohne Glutaraldehyd; **Spur 2:** RNase-Standard mit Glutaraldehyd; **Spur 3:** RNase und RGD äquimolar; in den Spuren 3-8 steigt der Überschuss an RGD in folgender Reihenfolge: 3-, 10-, 50-, 200-, 500fach. In den Spuren 2-8 wurde 0,5% Glutaraldehyd eingesetzt [Fischer 2005].

Da RGD nur aus drei Aminosäuren besteht, ist ein deutlicher Größenunterschied zwischen Bindungsprodukt und BMP-2 auf dem Gel nicht zu erkennen. Allerdings war die Bande der Bindungsprodukte wesentlich breiter im Vergleich zum ungebundenen Protein. Bei einem 3fachen Überschuss RGD sind noch deutlich Protein-Dimere und Trimere zu erkennen (Abb.

4.16, Spur 3). Mit zunehmendem RGD-Überschuss nehmen zunächst die Trimer-Banden (ab 10fachem Überschuss) ab, dann die Dimer-Banden und ab 500fachem Überschuss an RGD ist nur noch das Monomer zu erkennen. Werden Protein und Glutaraldehyd in Lösung vorgelegt, ist davon auszugehen, dass eine Aldehydgruppe des Glutaraldehyds an die Oberfläche des Proteins bindet [Avrameas 1969]. Die andere Aldehydgruppe wird dann mit einem anderen passenden Reaktanden eine weitere Bindung eingehen. Bei geringer RGD-Konzentration konkurriert das frei vorhandene Protein mit dem RGD um den Bindungsplatz. So bilden sich noch bevorzugt Dimere und Trimere aus. Erhöht sich die RGD-Konzentration, reagieren die an ein Protein gebundenen Glutaraldehydmoleküle bevorzugt mit RGD und es werden weniger Proteindimere gebildet.

Anschliessend wurden die Experimente mit BMP-2 als Bindungspartner durchgeführt. Die Bindung von BMP-2 an RGD erfolgte bei einer Glutaraldehyd-Konzentration von 0,5 %, einer Protein-Konzentration von 50 µg/ml mit verschiedenen RGD-Überschüssen. Dabei wurden einige Unterschiede zu den Experimenten mit RNase A beobachtet (Abb. 4.17).



**Abb. 4.17:** Bindung von RGD an BMP-2. 12%iges SDS-Gel, Silberfärbung: **Spur 1:** BMP-2-Standard ohne Glutaraldehyd; **Spur 2:** BMP-2-Standard mit 0,5 % Glutaraldehyd; in den Spuren 3-8 steigt der Überschuss an RGD in folgender Reihenfolge: 100-, 150-, 225-, 300-, 500-, 1000fach [Fischer 2005].

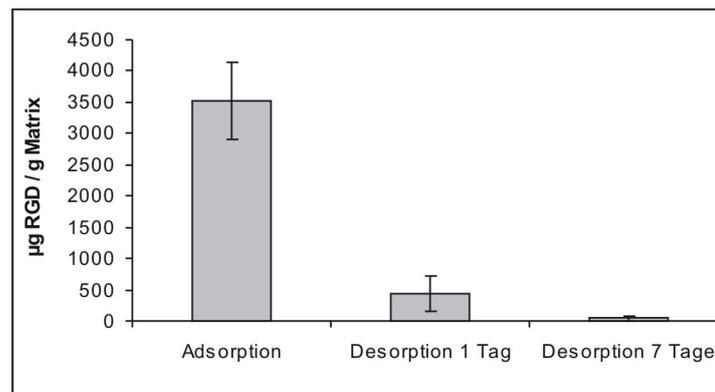
Erst ab einem 225fachen RGD-Überschuss entstehen Oligomere von BMP-2 (Spur 5) und ab einem 300fachen Überschuss entstanden auch BMP-2 Monomere (Spur 6, 7). Beim 1000fachen Überschuss waren nur noch Monomere sichtbar, so dass wahrscheinlich die Bindung von RGD an BMP-2 bei diesen hohen Peptidkonzentrationen bevorzugt war (Spur 8). In den Spuren 2-4, unterhalb des 200fachen RGD-Überschusses sind keine Protein-Banden erkennbar. Wahrscheinlich wurden bei den niedrigen RGD-Konzentrationen große Proteinagglomerate aus BMP-2 gebildet, die aufgrund ihrer Größe nicht ins Gel einwandern konnten [Fischer 2005]. Der Unterschied bei der Bildung der Bindungsprodukte könnte in

unterschiedlich reaktiven Gruppen der Proteine auf der Oberfläche begründet sein. Auf der Oberfläche des BMP-2-Moleküls könnten mehr reaktive Aminogruppen lokalisiert sein als bei RNase. Durch Glutaraldehyd wurden diese schnell abgesättigt und die einzelnen BMP-2-Moleküle koppelten untereinander. Aus der Röntgenstruktur des Proteins ist ersichtlich, dass exponierte Aminogruppen auf der Oberfläche lokalisiert sind [Scheufler u. a. 1999]. Allerdings gibt es keine Beschreibung über deren Reaktivität.

#### 4.3.7 Adsorption von RGD und RGD/Protein auf Sponceram<sup>®</sup>

Nach der Optimierung der Bindungsbedingungen von RGD-Peptiden und Proteinen wurde die Adsorption von RGD-Peptiden, RNase A als Proteinmodell sowie RGD-gebundener RNase A an Sponceram<sup>®</sup>-Matrices untersucht [Fischer 2005].

Zunächst wurden Matrices in RGD-Lösungen (500 µg/ml PBS) für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die überstehende Lösung wurde abgenommen und die Konzentration an adsorbiertem RGD-Peptid wurde indirekt aus der Differenz zwischen Überstand und Stammlösung mittels HPLC bestimmt (Anhang: 6.4.24). Anschließend wurde der Überstand von der Matrix entfernt, die Matrices in PBS eingelegt und die Desorption von RGD nach 1 und 7 Tagen Inkubation bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.18 dargestellt. Es wurden 3525 µg RGD/g Matrix adsorbiert, die Desorption nach einem Tag betrug 432 µg/g Matrix, nach 7 Tagen 40 µg/g Matrix. Die Nettoadsorption betrug somit ca. 3000 µg RGD/g Matrix.



**Abb. 4.18:** Adsorption und Desorption von RGD auf Sponceram<sup>®</sup>. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 5 Messungen +/- Standardabweichung [Fischer 2005].

Bei den Adsorptions-Versuchen mit RNase A wurden die Sponceram<sup>®</sup>-Matrices in einer Lösung von 100 µg/ml RNase inkubiert. Die Konzentrationen wurden auch hier indirekt aus der Differenz zwischen Überstand und Stammlösung durch den Micro-BCA Protein-test bestimmt (Anhang: 6.4.11). Eine Adsorption des Proteins an Sponceram<sup>®</sup> wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Somit ließen sich große Mengen RGD auf Sponceram<sup>®</sup>

adsorbieren, das Protein RNase nicht. Daher wurden Adsorptionsexperimente mit dem RGD/RNase-Bindungsprodukt durchgeführt. 500 µg/ml RGD wurden an 100 µg/ml RNase in 1%iger Glutaraldehyd-Lösung gebunden und das Produkt anschließend auf Sponceram<sup>®</sup> adsorbiert. Die Konzentration im Überstand und in der Stammlösung wurden mit dem Micro-BCA Proteintest bestimmt. Auch hier ergab sich keine Netto-Adsorption nach 7 Tagen (Daten nicht gezeigt).

Dafür gibt es mehrere Erklärungen. Zum einen ist die Messmethode für das Bindungsprodukt nicht optimal, da RGD und Glutaraldehyd eine starke Hintergrund-Absorption beim Proteintest verursachen. Als Blindwert diente daher ein Reaktionsansatz von 500 µg/ml RGD in 1 % Glutaraldehydlösung. Die Messungen waren aufgrund der hohen Standardabweichungen sehr fehlerbehaftet. Eine weitere Möglichkeit ist, dass das RGD-Peptid durch die Bindung an das Protein seine adsorptiven Eigenschaften verloren hat. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass die Bindung der RGD-Domäne an RNase einen Einfluss auf die Bindung des Proteins haben könnte.

Da die Konzentrationsbestimmung der Bindungsprodukte durch den Proteintest so fehlerbehaftet waren und aufgrund einer größeren BMP-2-Spende von Professor Sebald (Universität Würzburg) konnte in weiteren Experimenten das Bindungsprodukt aus RGD und BMP-2 auf Sponceram<sup>®</sup>-Matrices adsorbiert werden. Anschließend wurden die Matrices mit MC3T3-E1-Zellen besiedelt und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als früher Marker der Osteoblastenentwicklung bestimmt. Es wurden verschiedene Reaktionsansätze mit unterschiedlichen Glutaraldehydkonzentrationen und RGD-Überschüssen getestet.

In allen Ansätzen wurde ein Wachstum der Zellen beobachtet, was einen zytotoxischen Effekt des Bindungsproduktes ausschließt [Fischer 2005].

Es wurde jedoch in keinem der Reaktionsansätze eine Steigerung der Alkalischen Phosphatase Aktivität erreicht verglichen mit der Kontrolle (BMP-2 in Zellkulturmedium). Die Zugabe von BMP-2 zum Zellkulturmedium war auch hier wie bei den Experimenten mit N-Vinylpyrrolidon effektiver (Daten nicht gezeigt).

Ein möglicher Grund wäre, dass die Adsorption des Bindungsproduktes auf Sponceram<sup>®</sup> nicht erfolgte, wie schon bei den Ergebnissen mit RNase A gemessen wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das BMP-2 durch die Bindung inaktiviert wurde. Glutaraldehydmoleküle könnten das aktive Zentrum von BMP-2 oder die zur Bindung an den Rezeptor nötigen Aminosäuren durch Absättigung inaktivieren. Weiterhin könnte eine Konformationsänderung von BMP-2 durch die Bindung induziert worden sein.

Des Weiteren ist auch hier zu beachten, dass Adsorptionen an Oberflächen konzentrationsabhängige Prozesse sind [Pulat u. a. 2003]. Der Wachstumsfaktor BMP-2 wurde in geringer Konzentration im ng-Bereich eingesetzt. Bei Erhöhung der Konzentration könnte auch mehr BMP-2 an Sponceram<sup>®</sup> adsorbieren.

#### 4.3.8 Fazit

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die kovalente Bindung des Wachstumsfaktors BMP-2 an N-Vinylpyrrolidon-Polymere und RGD-Peptide erfolgreich war. Jedoch zeigten die Ergebnisse, dass durch die Bindung an N-Vinylpyrrolidon die Aktivität von BMP-2 um bis zu 87 % herabgesetzt wurde und keine Adsorption bei geringen Konzentrationen an Polymer und BMP-2 erfolgte. Die Bindungsexperimente von RGD an BMP-2 zeigten, dass Glutaraldehyd die Aktivität des Zytokins oder die Adsorptionseigenschaften des Komplexes veränderte. Weiterhin muss Glutaraldehyd als Bindungsreagenz kritisch betrachtet werden. Bei Anwendung im menschlichen Körper könnte der Komplex so abgebaut werden, dass Glutaraldehyd wieder freigesetzt wird und dieses ist toxisch.

Für weitere Immobilisierungsversuche könnte BMP-2 direkt kovalent an einer Matrix gebunden werden. Dies wäre möglich durch freie OH-Gruppen auf der Oberfläche einer Matrix, wie zum Beispiel bei Alginaten oder auch bei Hydroxylapatit. Für diesen Ansatz könnte Hydroxylapatit-beschichtetes Sponceram<sup>®</sup> verwendet werden. So könnten sehr wenig BMP-2-Moleküle kovalent gebunden werden. Kritisch bei diesem Ansatz ist, dass die kovalente direkte Bindung sehr stabil ist, und das BMP-2 auf der Matrix für einen langen Zeitraum aktiv sein könnte. Durch die andauernde Stimulierung der Zellen durch das Zytokin könnte Krebs ausgelöst werden.

#### 4.4 Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen zu Knochengewebe

Zunächst wurde die Herstellung von Knochengewebe auf Sponceram<sup>®</sup>-Matrices anhand der Osteoblasten-Vorläuferzelllinie MC3T3-E1 etabliert (siehe Anhang 6.3). Die Vorläuferzellen wurden bereits auf anderen Materialien kultiviert, um die Differenzierung zu Knochen zu induzieren [Fischer u. a. 2003] [Shu u. a. 2003] [Ogata u. a. 2005]. Zunächst wurden Sponceram<sup>®</sup> und Hydroxylapatit beschichtetes Sponceram<sup>®</sup> (Sponceram/HA) als Matrix zur Kultivierung der Vorläuferzellen unter statischen Bedingungen getestet. Die Zellen wurden in verschiedenen Medienzusammensetzungen kultiviert (genaue Konzentrationen: Anhang 6.2):

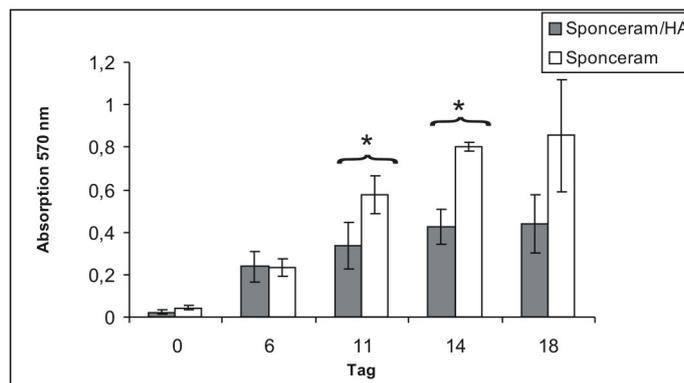
1. Standard-Medium: DMEM + 10 % FCS und Antibiotika.
2. Differenzierungs-Medium: wie 1. + Ascorbinsäure,  $\beta$ -Glycerolphosphat und Dexamethason.
3. BMP-2-Medium: wie 2. + 10 ng/ml BMP-2.

Nach der Kultivierung in Zellkulturschalen wurde die Differenzierung zu Knochengewebe in zwei vergleichenden Reaktorläufen im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS untersucht.

#### 4.4.1 Proliferation der MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Kultivierungsbedingungen

Sponceram<sup>®</sup>- bzw. Sponceram/HA-Matrices (600 µm Porengröße) mit einer Größe von ca. 3 mm x 3 mm x 4 mm (ca. 15-20 mg) wurden mit MC3T3-E1-Zellen besiedelt und unter statischen Bedingungen über einen Zeitraum von 18 Tagen kultiviert. Die Proliferation/Viabilität der Zellen wurde mittels des MTT-Tests bestimmt (Anhang 6.4.9).

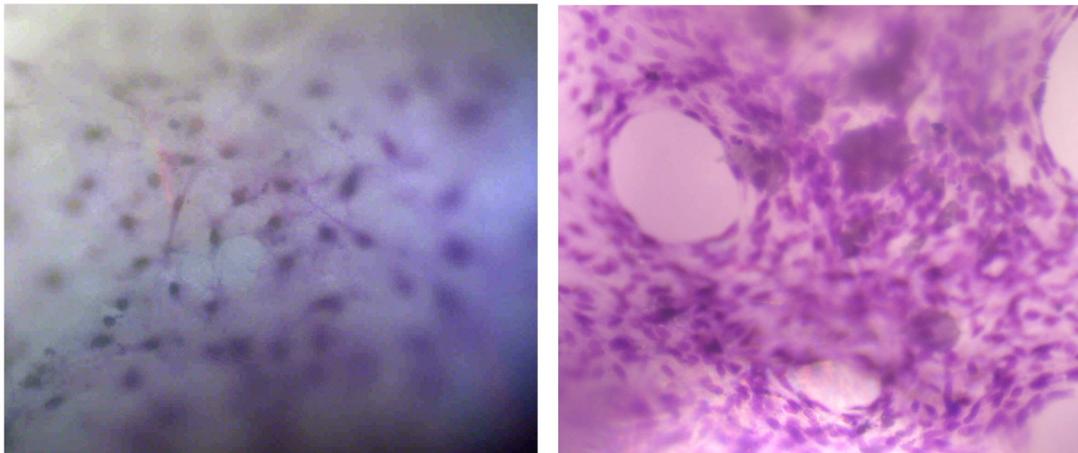
Der Verlauf der Viabilität ist bis zum Tag 6 auf beiden Matrices ähnlich (Abb. 4.19). Die Messungen von Tag 11 bis Tag 18 zeigten, dass die MC3T3-E1-Zellen eine höhere Viabilität auf unbeschichtetem Sponceram<sup>®</sup> erreichten. Am Tag 11 war die Viabilität um 43 % und am Tag 14 um fast 48 % höher auf Sponceram<sup>®</sup> als auf Sponceram/HA. Diese Unterschiede sind nach Überprüfung der Varianz durch den F-Test und einem anschließenden *t*-Test signifikant (Anhang: 6.1). Obwohl die Hydroxylapatitbeschichtung der Knochenstruktur ähnlich ist, wuchsen die Vorläuferzellen bevorzugt auf Sponceram<sup>®</sup>. Aufgrund dessen wurde ausschließlich Sponceram<sup>®</sup> als Matrix für die weiteren Versuche mit den MC3T3-E1-Zellen eingesetzt.



**Abb. 4.19:** Darstellung der Ergebnisse des MTT-Tests zur Bestimmung der Viabilität/Proliferation von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA in Standard-Medium über einen Zeitraum von 18 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 Matrices +/- Standardabweichung. \* $p < 0,05$  (Anhang 6.1)

Zur Darstellung der Zellen auf dem porösen Sponceram<sup>®</sup>-Träger, wurden diese mit Toluidinblau gefärbt (Anhang: 6.4.5) und im Phasenkontrast mikroskopiert. Mineralisierte ECM ist nach der Färbung mit Toluidinblau farblos bis blass blau, während Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume und Kollagenfasern blau erscheinen. MC3T3-E1-Zellen wurden auf Sponceram<sup>®</sup> ausplattiert, in DMEM Medium kultiviert und nach 6 Tagen bzw. 12 Tagen mit Toluidinblau gefärbt (Abb. 4.20).

In beiden Abbildungen sind hauptsächlich die Kerne der Zellen als dunkle punkt-ähnliche Strukturen zu erkennen. Nach 6 Tagen Kultivierung waren neben den blau gefärbten Kernstrukturen auch die blau gefärbten Zellmembranen zu erkennen (Abb. 4.20, links). Die Zell-

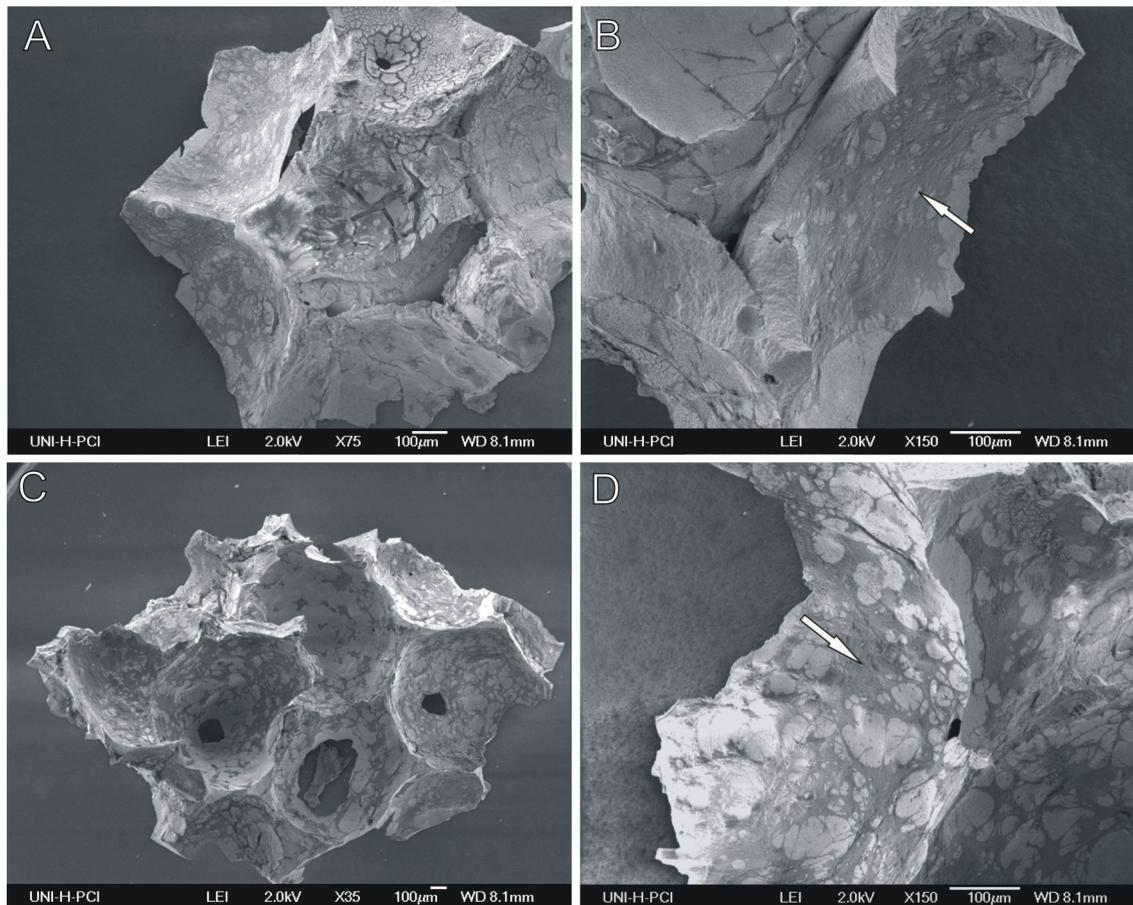


**Abb. 4.20:** Toluidinblaufärbung von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> für 6 Tage (links) bzw. 12 Tage (rechts) in Standard-Medium (200fache Vergrößerung).

morphologie war dreieckig bis hexagonal, mit interzellulären Ausläufern zu den umliegenden Zellen. Nach 12 Tagen Kultivierung waren aufgrund der hohen Zelldichte keine Membranstrukturen, sondern nur noch Zellkerne zu erkennen. Aufgrund der Anordnung der Zellkerne um die Poren erschien das Zellwachstum kreisförmig um die Poren (Abb. 4.20, rechts). Die Zellen wurden zusätzlich unter differenzierenden Bedingungen (Dexamethason, BMP-2) kultiviert und mit Toluidinblau gefärbt, jedoch wurden keine morphologischen Unterschiede zu den Zellen in Standard-Medium beobachtet (Daten nicht gezeigt).

#### 4.4.2 REM-Aufnahmen der MC3T3-E1-Zellen auf Sponceram<sup>®</sup> nach statischer Kultivierung

Im Phasenkontrast wurden keine morphologischen Unterschiede der kultivierten Zellen in Standard- bzw. BMP-2-Medium beobachtet. Zur detaillierteren Betrachtung wurden die Zellen auf Sponceram<sup>®</sup> ausplattiert, in Standard- bzw. BMP-2-Medium für 10 Tage kultiviert und anschließend für die Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM) fixiert und getrocknet (Durchführung: Anhang 6.4.8). Die Matrices wurden auf einem Träger befestigt und im REM aufgenommen. Die Abbildungen 4.21 A und C geben einen Überblick über die Struktur von besiedeltem Sponceram<sup>®</sup>. Zu erkennen sind die Makroporen mit der hellgrauen Färbung der mikroporösen Struktur von Sponceram<sup>®</sup>. Die dunklen Bereiche innerhalb der Makroporen sind die adhärenierten Zellen. In den Abbildungen 4.21 B und D ist deutlicher die Struktur der Zellen bzw. Zellverbände zu erkennen (Pfeile). Auch nach den REM-Aufnahmen wurde kein morphologischer Unterschied unter beiden Kultivierungsbedingungen festgestellt. Die Zellen wuchsen sehr flach auf der Matrix und bildeten Zell-Zell-Kontakte aus (Abb. 4.21, B und C). Dadurch entstand ein Zellgeflecht, so dass vereinzelte Zellen kaum mehr erkennbar waren.

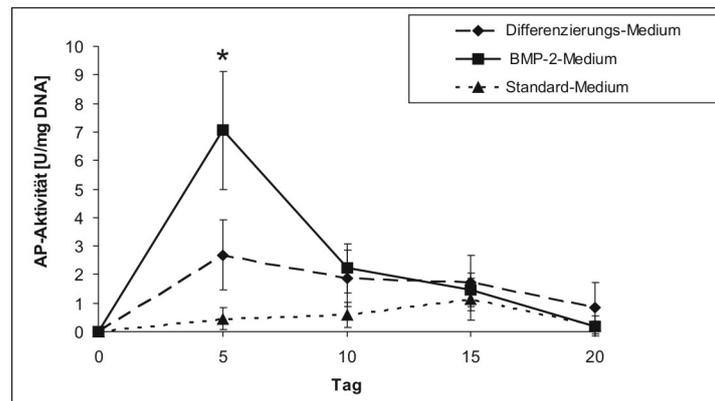


**Abb. 4.21:** REM-Aufnahmen von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> unter statischen Bedingungen für 10 Tage in Standard-Medium (A, B) bzw. BMP-2-Medium (C, D). Die Pfeile zeigen Zellen auf der Sponceram<sup>®</sup>-Matrix [Suck u. a. 2005].

#### 4.4.3 Alkalische-Phosphatase-Aktivität unter statischen Kultivierungsbedingungen

MC3T3-E1-Zellen wurden auf Sponceram<sup>®</sup> in Standard-, Differenzierungs- und BMP-2-Medium kultiviert und die beginnende Differenzierung durch Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase bestimmt (Durchführung: Anhang 6.4.10).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivität des Enzyms abhängig von der Mediumzusammensetzung war (Abb. 4.22). Die Zellen, die in Standard-Medium kultiviert wurden zeigten keinen relevanten Anstieg der Enzymaktivität. Die Zellen, die in Differenzierungsmedium mit Dexamethason kultiviert wurden, hatten ein Maximum der spezifischen Enzymaktivität von 2,7 U/mg am Tag fünf. Wurde zusätzlich der Wachstumsfaktor BMP-2 zum Medium gegeben, wurde ein Aktivitätsmaximum von 7 U/mg DNA erreicht. Die Unterschiede der Enzymaktivität am Tag 5 zwischen Standard-Medium und Differenzierungs-Medium bzw. BMP-2-Medium waren statistisch signifikant (Anhang 6.1). Ebenso die Werte zwischen Differenzierungs-Me-



**Abb. 4.22:** Verlauf der AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> in Standard-, Differenzierungs- und BMP-2-Medium über einen Zeitraum von 20 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 besiedelten Matrices [Suck u. a. 2005]. \* $p < 0,05$  (Statistik: Anhang 6.1)

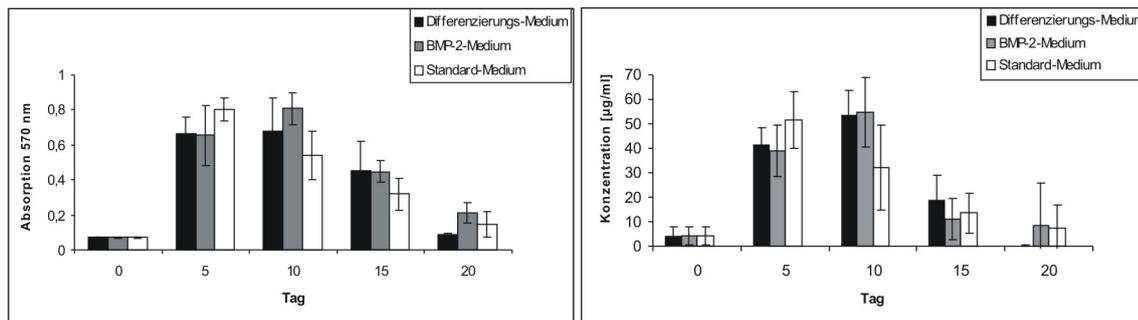
dium und BMP-2-Medium. Diese Ergebnisse waren zu erwarten, da Dexamethason und BMP-2 beide die AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen erhöhen [Yamaguchi u. a. 2000]. In Standard-Medium wurde die Aktivität des Enzyms nicht erhöht, was vermuten lässt, dass die Sponceram<sup>®</sup>-Matrix selber keinen Einfluss auf die Differenzierung unter statischen Bedingungen hatte.

#### 4.4.4 Limitierung unter statischen Kultivierungsbedingungen

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Sponceram<sup>®</sup> eine geeignete Matrix ist um Osteoblastenvorläufer zu kultivieren und unter definierten Mediumbedingungen zu differenzieren. Allerdings war z. B. anhand der REM-Aufnahmen erkennbar, dass die Zellen auf den Matrices keine dichte Zellschicht bildeten. Messungen der Viabilität/Proliferation durch den MTT-Test bzw. über den DNA- und Protein-Gehalt zeigten, dass die maximale Zelldichte, je nach adhärierter Zellzahl nach 8-18 Tagen erreicht war, und die Proliferation stoppte (Abb. 4.23 auf der folgenden Seite). Anschließend war über den sinkenden Kurvenverlauf sogar ein Absterben der Zellen zu beobachten. Diese Tendenz wurde auch bei anderen Zellsystemen, z. B. SAOS-2-Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Eine Erklärung für diese Limitierung wäre, dass die Versorgung der Zellen auf den Matrices unter statischen Bedingungen nicht optimal waren. Versorgungsgrößen wie pH-Wert und Sauerstoff sind statisch schwer zu kontrollieren. Die Verteilung der Nährstoffe innerhalb des Mediums erfolgt nur durch Diffusion. So haben Zellen, die außen auf der Matrix lokalisiert sind, eine bessere Nährstoffversorgung als Zellen, die im Innern der Matrix wachsen. Dies könnte dazu führen, dass die Zellen im Innern der Matrix zusätzlich an die Oberfläche wandern.

Dadurch könnte an der Oberfläche eine so dichte Zellschicht entstehen, dass die verbliebenen inneren Zellen nicht mehr versorgt werden und absterben [Sikavitsas u. a. 2002]. Dadurch wäre die Kultivierung unter statischen Bedingungen zeitlich limitiert. Die Generierung eines funktionalen Gewebes sollte daher in einem geeigneten Reaktorsystem erfolgen, in dem z. B. der pH-Wert, die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung besser regel- und kontrollierbar sind. Daher wurden bei Kultivierungen von 3-4 Wochen MC3T3-E1-Zellen im BIOSTAT® RBS auf Sponceram®-Matrices kultiviert.



**Abb. 4.23:** Viabilität (links) bzw. Protein-Gehalt (rechts) der MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram® in Standard-, Differenzierungs- und BMP-2-Medium über einen Zeitraum von 20 Tagen. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte von 5 kultivierten Matrices +/- Standardabweichung.

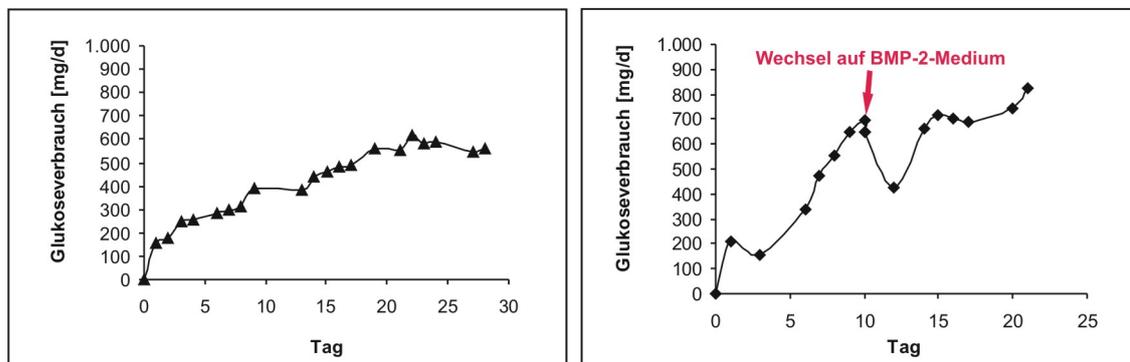
#### 4.4.5 Kultivierung der MC3T3-E1-Zellen im BIOSTAT® Bplus RBS 500

Die mikroskopischen Ergebnisse nach der Kultivierungen unter statischen Bedingungen zeigten, dass kein morphologischer Unterschied der Zellen unter Standard- bzw. Differenzierungs-Bedingungen festgestellt wurde. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase von MC3T3-E1-Zellen war jedoch unter Standard-Medium-Bedingungen auf Sponceram® nicht erhöht. Um ein funktionales Knochengewebe zu entwickeln und den Einfluss der Sponceram®-Matrix auf den Differenzierungsstatus der MC3T3-E1-Zellen zu analysieren wurden zwei Kultivierungen im BIOSTAT® Bplus RBS 500 durchgeführt.

Im BIOSTAT® RBS mit Doppelmantelgefäß wurden auf 4 Sponceram®-Scheiben (Porengröße: 600 µm) mit je  $2,5 \cdot 10^7$  MC3T3-E1-Zellen pro Scheibe besiedelt. Die Zellen wurden 28 Tage in Standard-Medium kultiviert. Da aus technischen Gründen ein weiterer Reaktor erst 7 Tage später angeimpft werden konnte, wurde eine höhere Animpfzellzahl von  $5,5 \cdot 10^7$  Zellen pro Scheibe gewählt. Diese Kultivierung wurde im Gefäß mit Einfachmantel im GMP-Breeder (siehe Abb. 4.7 auf Seite 32) durchgeführt. MC3T3-E1-Zellen wurden für 10 Tage in Standard-Medium kultiviert und anschließend wurde die Kultivierung für 11 Tage in BMP-2-Medium (10 ng BMP-2/ml Medium) fortgesetzt.

#### 4.4.6 Wachstum der MC3T3-E1-Zellen im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500

Der Gesamt-Glukoseverbrauch der Standard-Kultur im Doppelmantelgefäß war 8,389 g in 28 Tagen (Abb. 4.24, links). Der Verbrauch der Kultivierung unter BMP-2-Bedingungen im Einfachmantelgefäß (im GMP-Breeder) war mit 9,142 g in 21 Tagen 8 % höher als in Standard-Medium (Abb. 4.24, rechts). Dies zeigte, dass mehr Zellen auf Sponceram<sup>®</sup> im Einfachmantel wuchsen. Der Wechsel von Standard-Medium auf BMP-2-Medium am Tag 11 war anhand der Senkung des Glukoseverbrauchs um 34 % erkennbar (Abb. 4.24, rechts). Durch den Mediumwechsel war die Proliferation langsamer, da sich die Zellen an die neuen Mediumbedingungen adaptierten.



**Abb. 4.24:** Glukoseverbrauch von MC3T3E-Zellen kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 mit Doppelmantel für 28 Tage in Standard-Medium (links) bzw. im Einfachmantel für 11 Tage in Standard-Medium und anschließend 10 Tage in BMP-2-Medium (10 ng/ml) (rechts).

Der Glukoseverbrauch und damit das Wachstum der Zellen im Doppelmantelgefäß stieg insgesamt langsamer an und erreichte nach 19 Tagen eine Plateau-Phase mit einem Verbrauch von ca. 560 mg Glukose/Tag. Ein Grund für die Differenz des Zellwachstums könnte die unterschiedliche Temperaturregulierung der beiden Reaktorgehäuse sein. Das Gefäß mit Einfachmantel wird durch Kultivierung im GMP-Breeder konstant auf 37 °C temperiert. Die Temperaturregulierung im Doppelmantelgefäß erfolgt durch einen Wasserkreislauf zwischen den beiden Glaswänden. Dabei wurden Schwankungen der Temperatur festgestellt, was vielleicht einen Einfluss auf die Proliferation der Zellen hatte.

#### 4.4.7 Mineralisierung der extrazellulären Matrix

Die Knochenmatrix unterscheidet sich gegenüber anderen ECM dadurch, dass sie mineralisiert. Die für Knochen typische Extrazellulärsbstanz besteht im Wesentlichen aus Hydroxylapatit, Kalziumcarbonat und weiteren anorganischen Kalzium- und Magnesiumsalzen. Diese Mineralisierung wurde durch die Von-Kossa- und Alizarinrot-Färbung nachgewiesen (Durchführung: Anhang 6.4.6 und 6.4.7). Bei der Von-Kossa-Färbung wird das Kalzium

durch einwertiges Silber ersetzt, das als helles Silberphosphat und Silbercarbonat im Gewebe ausfällt und durch Reduktion zu schwarz-braunem elementarem Silber nachgewiesen wird [Chaplin und Grace 1975].

Alizarin ist ein substituiertes Anthrachinon, das mit dem Kalzium der extrazellulären Matrix farbige Chelatkomplexe bildet. Die Zellen auf den Matrices wurden nach der Kultivierung mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend fixiert (Anhang 6.4.4). Nach der Kultivierung im RBS war unter beiden Bedingungen eine Mineralisierung der ECM auf Sponceram<sup>®</sup> im Vergleich zur Blindprobe zu erkennen. Dies wurde durch die dunkle Färbung nach von Kossa und die rote Färbung durch Alizarinrot verdeutlicht (Abb. 4.25).



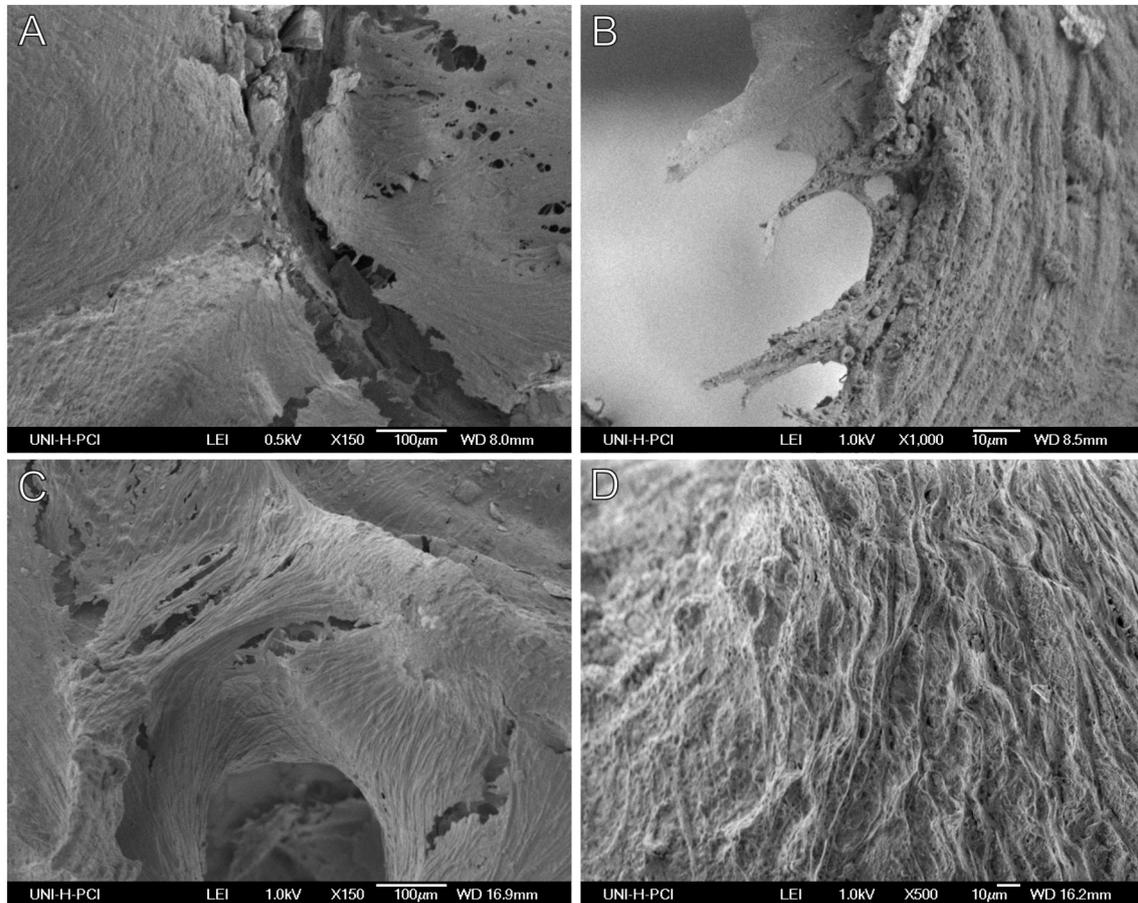
**Abb. 4.25:** Mineralisierung der ECM nach der Kultivierung im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500. Von-Kossa-Färbung (links) bzw. Alizarinrot-Färbung (rechts) [Suck u. a. 2005].

Dabei weisen die Zellen, die in BMP-2-Medium kultiviert worden waren, eine intensivere Färbung im Vergleich zum Standard-Medium auf. Ein naheliegender Grund wäre, dass durch die Verwendung des Wachstumsfaktors BMP-2 die Differenzierung zu Knochen verstärkt induziert wurde. Außerdem war der Glukoseverbrauch und damit die Zellzahl unter Standard-Medium um 8 % kleiner, was zusätzlich ein Grund für die schwächere Färbung der ECM sein könnte. Da auch die Zellen in Standard-Medium auf Sponceram<sup>®</sup> mineralisierten, wurde die Differenzierung zu Knochengewebe auch ohne Zugabe des Wachstumsfaktors induziert.

#### 4.4.8 Struktur der extrazellulären Matrix

Für die Aufnahmen im Raster-Elektronen-Mikroskop wurden die Zellen/Gewebe fixiert und getrocknet (Anhang 6.4.8). Die Ergebnisse der REM-Aufnahmen zeigten, dass die Matrices vollständig mit extrazellulärer Matrix bewachsen waren und die Sponceram<sup>®</sup>-Oberfläche unter der dichten Zellschicht nicht mehr sichtbar war (Abb. 4.26). Einzelne MC3T3-E1-Zellen waren unter der dichten ECM nicht mehr zu erkennen (vergleiche mit Abb. 4.21 auf Seite 48). Die faserigen Strukturen der extrazellulären Matrix bestehen wahrscheinlich hauptsächlich aus

Kollagen I, dem Hauptknochenprotein. Die parallele Anordnung ist typisch für Knochengewebe. Ein Unterschied zwischen Standard- und BMP-2-Bedingungen war nicht zu beobachten.

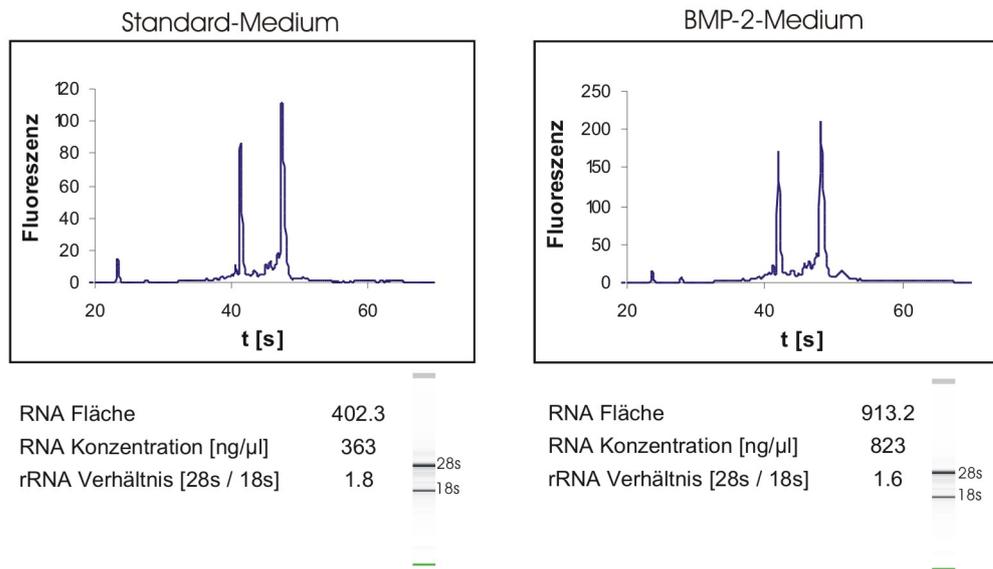


**Abb. 4.26:** REM-Aufnahme von MC3T3-E1-Zellen kultiviert auf Sponceram® im BIOSTAT® Bplus RBS 500 mit Dopplemantel für 28 Tage in Standard-Medium (A, B) bzw. im Einfachmantel für 11 Tage in Standard-Medium und anschließend 10 Tage in BMP-2-Medium (10 ng/ml) (C, D).

#### 4.4.9 Ergebnisse der RNA-Isolierung

Für die Expressionsanalyse knochenspezifischer Marker nach den Kultivierungen im RBS, wurden die MC3T3-E1-Zellen durch Inkubation für 15-20 min in Trypsin-Lösung (37°C/5 % CO<sub>2</sub>) von der Matrix abgelöst. Die Matrices wurden mehrmals für ca. 15 min in Trypsinlösung bei 37°C inkubiert, mit Medium gespült und für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Anschließend erfolgte die RNA-Aufreinigung mit einem Kit der Firma Promega (Durchführung: Anhang 6.4.13). Die Reinheit der RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyser gemessen (Durchführung: Anhang 6.4.14). Die Auswertung der elektrophoretischen Messung erfolgte integrativ. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.27 dargestellt. Das Verhältnis der 28S- und 18S-RNA-Un-

tereinheiten zueinander ist ein Maß für die Reinheit der isolierten RNA. Die optimale Reinheit wird mit einem 28S/18S-Verhältnis von 2 erreicht. Für eine anschließende PCR-Analyse sollte das Verhältnis zwischen 1,5–2,0 liegen. Die Probe, die in Standard-Medium kultiviert wurde hatte eine Reinheit von 1,8, die RNA unter BMP-2-Bedingungen hatte eine Reinheit von 1,6. Bei der Isolierung von RNA aus Zellen, die unter Standard-Bedingungen kultiviert wurden, ergab die Isolierung der RNA immer eine höhere Reinheit als bei Zellen unter differenzierenden Bedingungen. Wahrscheinlich war die Bildung der extrazellulären Matrix bei Zellen unter differenzierenden Bedingungen stärker, so dass bei der RNA-Isolierung mehr Proteine der ECM die Proben verunreinigten.

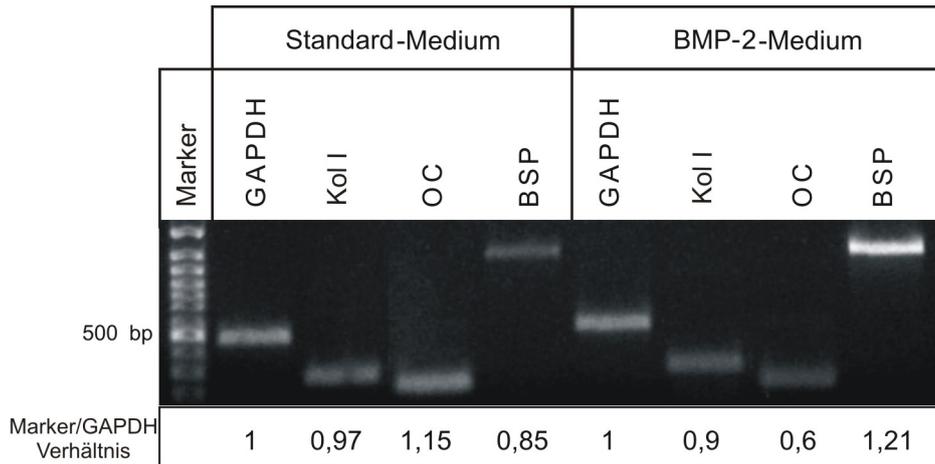


**Abb. 4.27:** Bestimmung der RNA-Reinheit von MC3T3-E1-Zellen nach Kultivierung im BIOSTAT® RBS mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker. Die Peaks stellen jeweils die 18S- und 28S-rRNA dar.

#### 4.4.10 Expression knochenspezifischer Gene

Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben um eine Analyse einiger knochenspezifischer Marker auf Expressionsebene durchzuführen. In allen PCRs wurde die gleiche Konzentration an cDNA eingesetzt. Kollagen I (Kol I), Osteocalcin (OC) und *bone sialoprotein 2* (BSP) sind knochenspezifische Proteine. GAPDH ist ein so genanntes Kontrollgen, das unabhängig vom Zellzustand gleichmäßig exprimiert wird. Die Anzahl an GAPDH cDNAs diente somit als Bezugsgröße. Durch Bestimmung der Bandenintensitäten auf dem Agarosegel konnte semiquantitativ das Verhältnis der spezifischen Marker zum Kontrollgen GAPDH dargestellt werden. Die erhaltenen Bandenintensitäten sind Mittelwerte aus drei durchgeführten PCRs. Alle drei gewählten Marker wurden in beiden Kultivierungen exprimiert (Abb. 4.28). Das Verhältnis von Marker- zur GAPDH-Intensität zeigte, dass die Konzentration von Kollagen I

unter beiden Bedingungen gleich war. Die Expression von Osteocalcin war unter Standard-Medium-Bedingungen fast doppelt so hoch wie unter BMP-2-Bedingungen. Die Konzentration von BSP war in BMP-2-Medium stärker. Durch diese Ergebnisse konnte keine Aussage getroffen werden, unter welchen Bedingungen ein stärker ausgeprägter Knochenphänotyp entstand. Die unterschiedlichen Intensitäten der Expressionen von Osteocalcin und BSP könnten durch die unterschiedlichen Kultivierungszeiträume von 21 und 28 Tagen entstanden sein, da knochenspezifische Marker zeitabhängig exprimiert werden.



**Abb. 4.28:** 1%iges Agarosegel der RT-PCR-Analyse der knochenspezifischen Marker Kollagen I (Kol I), Osteocalcin (OC) und *bone sialoprotein 2* (BSP) nach der Kultivierung im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500.

#### 4.4.11 Fazit

Das Ziel war die neu entwickelte Matrix Sponceram<sup>®</sup> und das RBS-Reaktorsystem zur Generierung von Knochengewebe zu verwenden. Dies wurde zunächst anhand der Modellzelllinie MC3T3-E1 etabliert. Dabei war die Proliferation der Osteoblastenvorläuferzellen auf unbeschichtetem Sponceram<sup>®</sup>, das hauptsächlich aus dotiertem ZrO<sub>2</sub> besteht höher als auf Hydroxylapatit-beschichtetem Sponceram<sup>®</sup>. Die Kultivierung unter statischen Bedingungen war insofern limitiert, dass das Zellwachstum nach ca. 8-18 Tagen stoppte.

Durch die Kultivierung der Zellen im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS wurde eine hohe Zelldichte mit der Bildung der extrazellulären Matrix erreicht. Die Herstellung der extrazellulären Matrix ist ein wichtiger Schritt für ein Gewebe, da durch die ECM Stabilität und Versorgung der Zellen mit Nährstoffen gewährleistet ist.

Die Entstehung des Knochengewebes wurde unter beiden Kultivierungsbedingungen erreicht. Elektronenmikroskopisch wurde kein morphologischer Unterschied der Gewebe auf der Matrix festgestellt. Auch bei der Kultivierung in Standard-Medium wurde die extrazelluläre Matrix mineralisiert, wodurch die Bildung von Knochen nachgewiesen wurde. Die Expression der kno-

chenspezifischen Gene Kollagen I, Osteocalcin und *Bone Sialoprotein 2* wurde nach beiden Kultivierungen nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen auch ohne die Zugabe von BMP-2 zum Medium möglich war. Dabei könnte Sponceram<sup>®</sup> die Differenzierung induziert haben. Die Matrix, die für das *Tissue Engineering* eingesetzt wird, sollte die natürliche Umgebung des Zielgewebes ersetzen. Es ist bekannt, dass Matrices aus Hydroxylapatit, Trikalziumphosphate oder Komposite die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Knochengewebe induzieren [Arinzeu u. a. 2005] [Ogata u. a. 2005]. Zusätzlich könnte die dreidimensionale Struktur von Sponceram<sup>®</sup> wichtig für die Knocheninduktion sein. Nicht nur die Zusammensetzung sondern auch die räumliche Anordnung der Matrix ist entscheidend für die Entstehung von Knochengewebe [Yang u. a. 2001a]. Für die Generierung von Knochen sollte die Matrix makroporös sein, damit der Transport von Metaboliten und Abfall bis in das Innere der Matrix gewährleistet ist. Diese Anforderungen wurden durch Sponceram<sup>®</sup> erfüllt. Auch die Bedingungen im Bioreaktorsystem könnten die Differenzierung verstärken. Dafür spricht auch, dass unter statischen Bedingungen im Standard-Medium keine Differenzierung festgestellt wurde. Ein rotierendes System wie im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS wurde zur Generierung von Knochengewebe bisher nicht beschrieben. Der alternierende Kontakt zwischen dem Medium und der Gasatmosphäre im Kopfraum des Reaktors unterstützt die Versorgung der Zellen bzw. des Gewebes mit Nährstoffen. Durch die rotierende Bewegung der Zell/Matrixkonstrukte wird im Gasraum ein Flüssigkeitsstrom des herunterlaufenden Mediums über die Zellschicht auf der Matrix verursacht. Diese Kräfte könnten zusätzlich einen Einfluss auf den Differenzierungsstatus der Zellen haben. Es ist bekannt, dass z.B. die Erhöhung des Flüssigkeitsstroms im Perfusionsreaktorsystem die Differenzierung zu Knochengewebe verstärkt [Sikavitsas u. a. 2003].

#### 4.5 Kultivierung von humanen BMSCs und Osteoblasten zur Herstellung von Knochengewebe

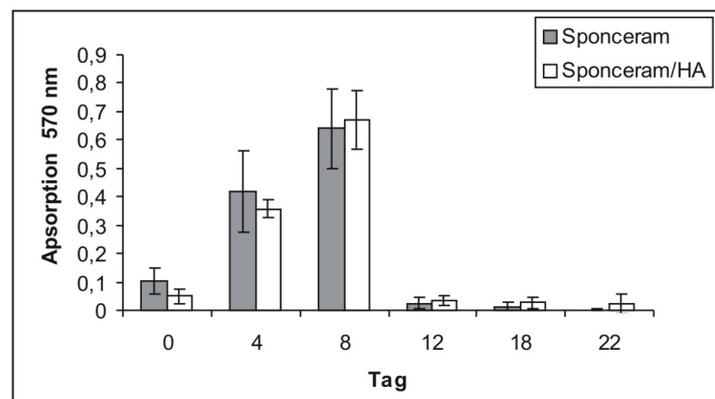
Die Kultivierung von Knochengewebe auf Sponceram<sup>®</sup> wurde zunächst erfolgreich mit der Zelllinie MC3T3-E1 unter statischen Bedingungen und anschließend im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 durchgeführt. Für den Einsatz im menschlichen Organismus sind körpereigene Zellen bevorzugt, da sie keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen. Für die Herstellung von Knochen können verschiedene Zelltypen verwendet werden. Osteoblasten entsprechen bereits dem Zelltyp des Knochengewebes. Sie können aus Patientenmaterial isoliert und *in vitro* expandiert werden. Der Nachteil ist, dass zur Gewinnung der Osteoblasten eine Biopsie vom Patienten benötigt wird und die Proliferation der Zellen begrenzt ist [Salgado u. a. 2004]. Daher werden oft BMSCs verwendet. BMSCs sind Stammzellen und können z. B. durch Punktion des Knochenmarks gewonnen werden, ohne eine Biopsie entnehmen zu müssen. BMSCs können vermehrt proliferieren und u. a. zu Knochenzellen differenziert werden [Bruder u. a. 1997].

Hier wurden beide Modellsysteme zur Kultivierung auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA zunächst unter statischen Bedingungen eingesetzt. Des Weiteren wurden die primären Osteoblasten auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 kultiviert und die Entwicklung des Gewebes auf den unterschiedlichen Materialien untersucht.

#### 4.5.1 Proliferation der BMSCs auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Kultivierungsbedingungen

Untersucht wurde die Proliferation/Viabilität (MTT-Test: Anhang 6.4.9) der humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Rückenmark (BMSCs) auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA in Standard-Medium über einen Zeitraum von 22 Tagen. Die Zellen wurden von Prof. van Griensven (MH-Hannover) zur Verfügung gestellt. Sie wurden aus einer Knochenmarkspunktion eines 27-jährigen männlichen Spenders mittels Percollgradienten isoliert. Je Matrix (ca. 3 mm x 3 mm x 4 mm) wurden  $1,5 \cdot 10^4$  BMSCs der 5. Passage ausplattiert.

Der Verlauf der Proliferation/Viabilität ist auf beiden Materialien über den gesamten Zeitraum sehr ähnlich (Abb. 4.29) [Hildebrandt 2005]. Die maximale Proliferation/Viabilität wurde am 8. Tag der Kultivierung auf beiden Materialien erreicht. Nach dem 8. Tag fiel die relative Viabilität der Zellen um ca. 90 % unter das Niveau vom Besiedlungstag ab. Somit proliferierten die BMSCs auf beiden Materialien bis zu einem Maximum an Konfluenz und starben dann ab.

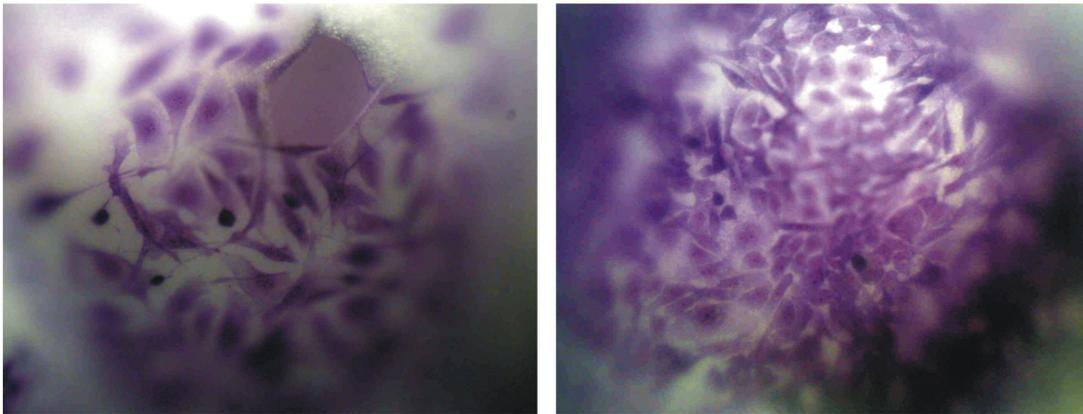


**Abb. 4.29:** Darstellung der Ergebnisse des MTT-Tests zur Bestimmung der Viabilität/Proliferation der BMSCs kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA in Standard-Medium über einen Zeitraum von 22 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 4 Matrices +/- Standardabweichung [Hildebrandt 2005].

Wie schon in Abschnitt 4.4.4 beschrieben, wurde diese Tendenz auch bei anderen Zellen wie MC3T3-E1 oder SAOS-2 beobachtet. Der Abfall der Viabilität um 90 % von Tag 8 auf Tag 12 wahr jedoch ungewöhnlich groß. Wie bereits in Abschnitt 4.4.4 beschrieben, könnte der Verlauf mit der schwer zu kontrollierenden Versorgung der Zellen unter statischen Bedingun-

gen zusammenhängen. Außerdem sind BMSCs primäre Zellen und damit anspruchsvoller in Bezug auf Versorgung mit Nährstoffen und Kultivierungsbedingungen als Zelllinien.

Bei der Bestimmung der AP-Aktivität (siehe 4.5.2) wurden aus der gleichen Probe zusätzlich die Gesamtproteinkonzentrationen bestimmt. Durch die Ermittlung des Proteingehalts kann ähnlich wie beim MTT-Test semiquantitativ auf die Proliferation geschlossen werden. Der starke Abfall der Proliferation wurde nicht erneut beobachtet. Der Verlauf der Proliferation war ähnlich wie es in Kap. 2.4.4 beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Die Färbung der BMSCs mit Toluidinblau (Anhang 6.4.5) in Abbildung 4.30 zeigt, dass die Zellen dicht aneinander im Innern der Porenstruktur der Matrices wuchsen. Die Morphologie der BMSCs war breit und flach mit Ausläufern zu den umgebenden Zellen.



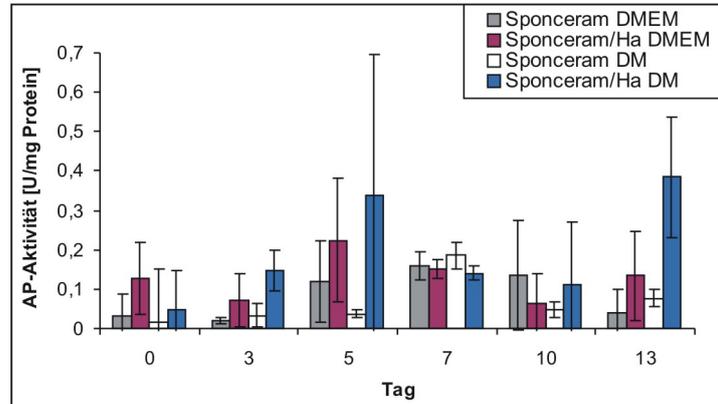
**Abb. 4.30:** Toluidinblaufärbung von BMSCs der 5. Passage kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> (200fache Vergrößerung, links) bzw. Sponceram/HA (100fache Vergrößerung, rechts) für 6 Tage [Hildebrandt 2005].

#### 4.5.2 Alkalische Phosphatase Aktivität der BMSCs unter statischen Kultivierungsbedingungen

BMSCs der 7. Kultivierungs-Passage wurden mit einer Zelldichte von  $1,5 \cdot 10^4$  Zellen/Matrix ausplattiert und in Standard- bzw. Differenzierungs-Medium mit dem Zusatz an Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat kultiviert (Zusammensetzung: Anhang 6.2). Anschließend wurde die Differenzierung zu Knochen durch Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase bestimmt (Anhang 6.4.10).

Die Aktivität des Enzyms war in den ersten 10 Tagen gleichbleibend niedrig, bis auf den Wert der Sponceram/HA-Matrix in Differenzierungs-Medium am Tag 5 (Abb. 4.31). Allerdings weist dieser Wert eine hohe Standardabweichung auf. Am Tag 13 wurde ein Maximum der spezifischen Aktivität von 0,4 U/mg Gesamtprotein auf Sponceram/HA in Differenzierungs-Medium erreicht [Hildebrandt 2005]. Folglich wurde nur eine Aktivitätssteigerung auf der Hydroxylapatit-beschichteten Matrix in Differenzierungsmedium erreicht. Hydroxylapatit

und das Differenzierungs-Medium haben bekanntlich einen steigenden Effekt auf die AP-Aktivität [Shu u. a. 2003] [Jorgensen u. a. 2004].

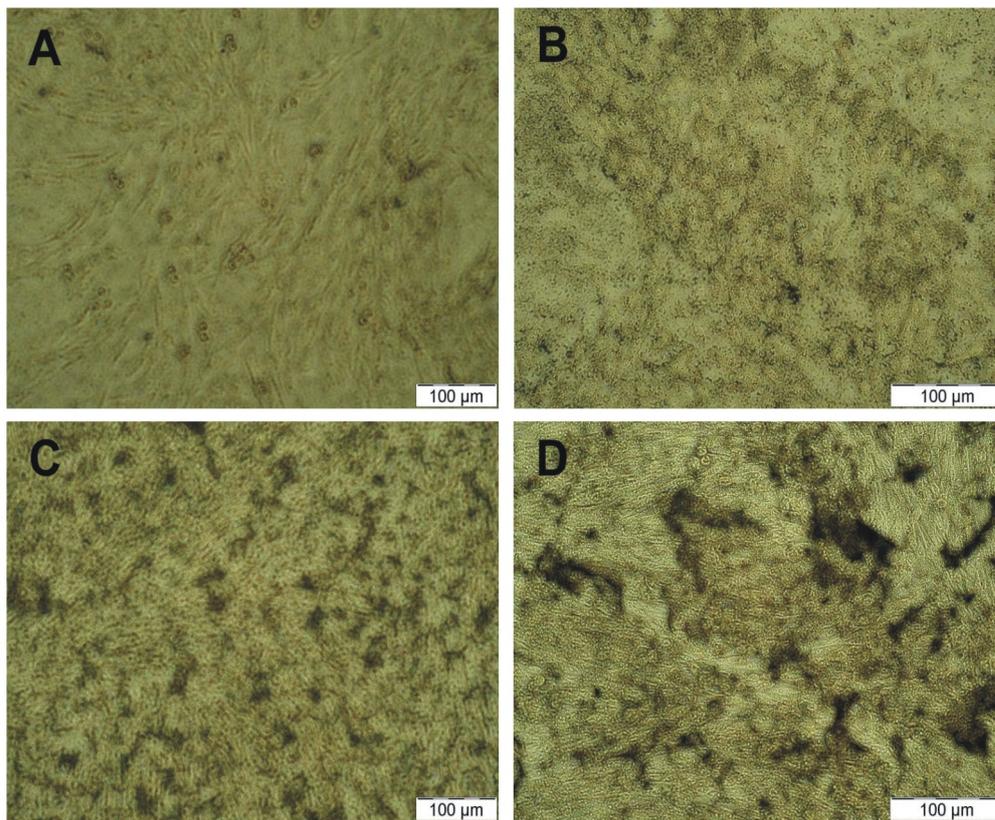


**Abb. 4.31:** Verlauf der spezifischen AP-Aktivität von BMSCs kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> und HA über einen Zeitraum von 13 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 4 besiedelten Matrices +/- Standardabweichung. DMEM: Standard-Medium; DM: Differenzierungs-Medium [Hildebrandt 2005].

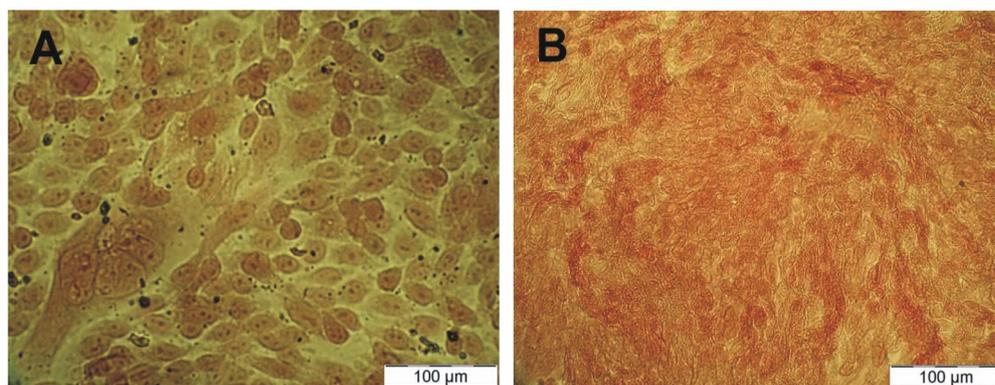
#### 4.5.3 Mineralisierung der extrazellulären Matrix in Monolayerkultur

BMSCs der 10. Passage wurden in 6-Lochplatten ausplattiert und in Standard- bzw. Differenzierungs-Medium über 12 Tage kultiviert. Um die Mineralisierung der extrazellulären Matrix und damit auch die Differenzierung zu Knochengewebe nachzuweisen wurden die Zellen nach von Kossa und mit Alizarinrot gefärbt (Anhang 6.4.6 und 6.4.7). Nach 4 Tagen wurde bei der Kultivierung in Differenzierungs-Medium eine geringfügig intensivere dunkle Färbung der ECM im Gegensatz zur Standard-Medium-Kultur beobachtet (Abb. 4.32, A und B). Nach 12 Tagen war deutlich die Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch die schwarze Färbung unter beiden Kultivierungsbedingungen zu erkennen (Abb. 4.32, C und D). Bei der Kultivierung in Differenzierungs-Medium wurden insgesamt größere Mineralisierungszonen beobachtet, was auf die Wirkung des Mediums zurückzuführen war.

Zusätzlich wurde die Mineralisierung der ECM durch Färbung mit Alizarinrot nachgewiesen. Die Zellen wurden ebenfalls in Standard- bzw. Differenzierungs-Medium kultiviert und nach 6 Tagen gefärbt. Der Unterschied der beiden Bedingungen war deutlich erkennbar. In Differenzierungs-Medium markieren die dunkelroten Bereiche die beginnende Mineralisierung (Abb. 4.33) [Hildebrandt 2005]. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Kultivierung in Differenzierungs-Medium die Bildung von Knochenzellen verstärkt wurde.



**Abb. 4.32:** Von-Kossa-Färbung der BMSCs kultiviert in 6-Lochplatten nach 4 Tagen (A, B) bzw. nach 12 Tagen (C, D). BMSCs wurden in Standard- (A, C) und Differenzierungs-Medium (B, D) kultiviert [Hildebrandt 2005].



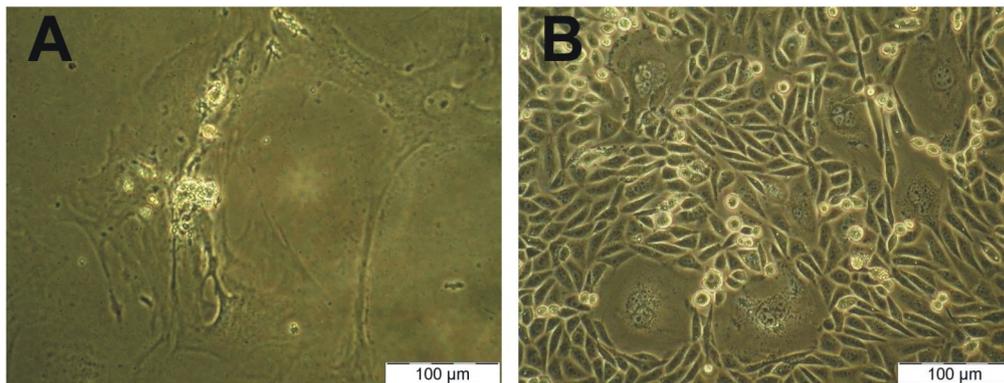
**Abb. 4.33:** Alizarinrot-Färbung der BMSCs kultiviert in 6-Lochplatten nach 6 Tagen in Standard- (A) und Differenzierungs-Medium (B) [Hildebrandt 2005].

#### 4.5.4 Morphologische Veränderung der BMSCs

Der Differenzierungsstatus der BMSCs zu Osteoblasten wurde außerdem durch RT-PCR Analyse spezifischer Differenzierungsmarker wie Kollagen I und Osteocalcin untersucht. Zusätzlich

wurde die Genexpression durch einen humanen Knochen/Knorpelchip analysiert. Für diese Experimente wurden BMSCs ab der 14. Passage eingesetzt, die RNA isoliert und in der RT-PCR eingesetzt (Anhang 6.4.13–6.4.16). Es wurden jedoch keine knochenspezifischen Gene nachgewiesen. Da die isolierte RNA intakt war, ließen die Ergebnisse darauf schließen, dass die osteogene Differenzierung der BMSCs bei den späteren Passagen nicht mehr induziert werden konnte [Hildebrandt 2005]. Ein möglicher Grund wäre, dass ein Alterungsprozess der primären Zellen *in vitro* stattgefunden hatte. In der Literatur ist beschrieben, dass BMSCs Mischpopulationen aus schnell proliferierenden, spindelförmigen Zellen und langsam proliferierenden flächigen Zellen sein können [Mets und Verdonk 1981] [Colter u. a. 2000]. Der flächige Zelltyp überwiegt in den frühen Kultur-Passagen. Weiter ist beschrieben, dass die beiden verschiedenen Zelltypen auch ineinander übergehen können. Außerdem werden die großen flächigen Zellen durch vermehrtes Passagieren spindelförmig und das Differenzierungspotenzial dieser Zellen nimmt ab. Die Zellen verlieren zunächst das Potenzial in Fettgewebe, dann in Knorpelgewebe und zuletzt in Knochen zu differenzieren [Digirolamo u. a. 1999].

Die in der Literatur beschriebenen morphologischen Veränderungen wurden auch hier beobachtet [Hildebrandt 2005]. Am Anfang der Kultivierung wuchsen die BMSCs großflächig und proliferierten langsam (Abb. 4.34, A). Ab ca. der 5.-7. Passage wurde zunehmend ein kleinerer, spindelförmiger Zelltyp mit einer gesteigerten Proliferationsaktivität beobachtet (Abb. 4.34, B). Die Zellen wurden wesentlich kleiner und wuchsen dichter zusammen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Angaben in der Literatur überein und erklären, warum keine knochenspezifischen Marker durch die RT-PCR bzw. den Knochen/Knorpelchip nachgewiesen wurden. Wahrscheinlich sind die großflächigen Zellen durch das häufige Passagieren dedifferenziert, so dass die andere spindelförmige Zellmorphologie entstanden ist.

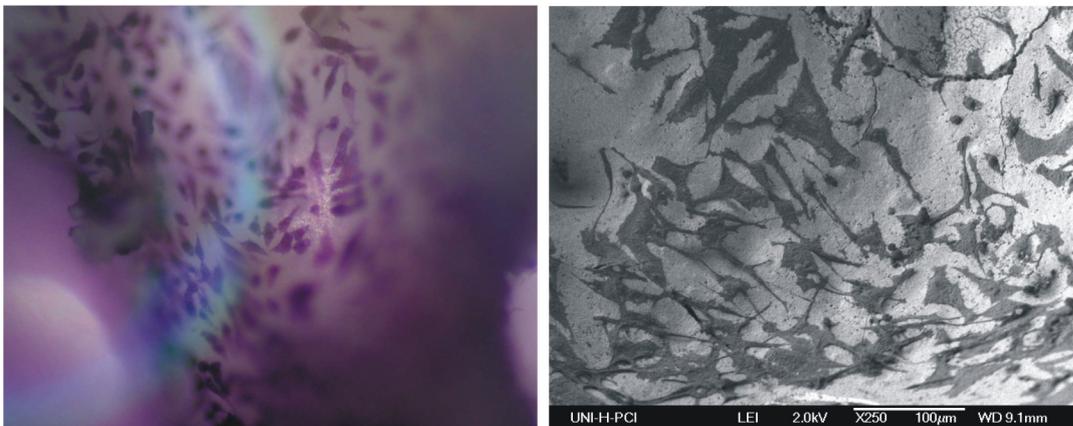


**Abb. 4.34:** Morphologische Veränderung der BMSCs während der Kultivierung. A: BMSCs, Passage 2 in Standard-Medium; B: BMSCs, Passage 23 in Standard-Medium [Hildebrandt 2005].

#### 4.5.5 Isolierung von humanen Osteoblasten

Die Isolierung primärer Osteoblasten erfolgte aus dem Überbein eines Oberschenkelknochen eines 38jährigen Patienten (zur Verfügung gestellt von Prof. van Griensven, MH-Hannover). Bis zur Präparation wurde die Probe steril in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Dann wurde das Knochenfragment in möglichst dünne Scheiben zerteilt und die Oberfläche mit einem Skalpell angeritzt. Die angeritzten Knochenscheiben wurden mit der verletzten Oberfläche auf eine ebenfalls angeritzte Petrischale gelegt. Die Schale wurde mit Standard-Medium aufgefüllt und für ca. 2–3 Wochen bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Aufgrund der verletzten Stellen kam es zum Herauswachsen der Osteoblasten [van Griensven u. a. 2002]. Die angeraute Oberfläche der Plastikschaalen bot den Zellen einen stabilen Oberflächenkontakt, so dass sie besser adhärirten. Zusätzlich wurden die Schalen über einen Zeitraum von 2–3 Wochen nicht bewegt. Nach ca. 2–3 Wochen wurden die Knochenscheiben entfernt, die Petrischalen mit PBS gewaschen und die Osteoblasten unter Standardbedingungen kultiviert.

Sponceram<sup>®</sup>-Matrices wurden mit den Osteoblasten der 1. Passage besiedelt. Zur Beurteilung der Morphologie und Verteilung auf der Matrix wurden die Zellen mit Toluidinblau gefärbt und REM-Aufnahmen angefertigt. Nach 12 Tagen Kultivierung waren die Matrices fast vollständig bewachsen. Die Osteoblasten wuchsen flach in meist hexagonaler Morphologie auf der Matrix und bildeten interzelluläre Ausläufer zu den umliegenden Zellen (Abb. 4.35).

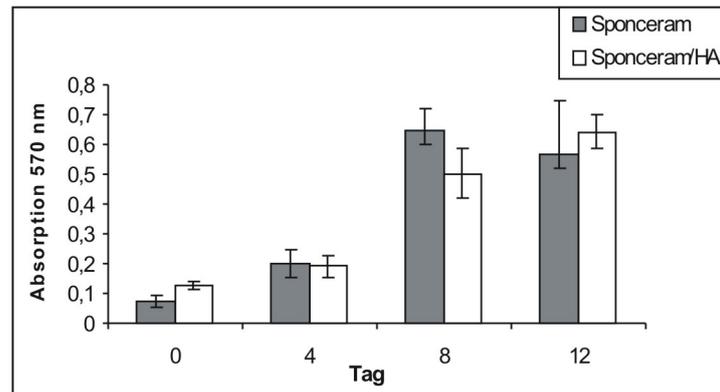


**Abb. 4.35:** Toluidinblaufärbung (links, 200fache Vergrößerung) und REM-Aufnahme (rechts) von primären Osteoblasten kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> für 12 Tage in Standard-Medium.

#### 4.5.6 Proliferation der Osteoblasten auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA unter statischen Kultivierungsbedingungen

Osteoblasten (1,5·10<sup>4</sup> Zellen/Matrix (3 mm x 3 mm x 4 mm)) der 1. Passage wurden auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA (600 µm Porengröße) über einen Zeitraum von 12 Tagen in Standard-Medium kultiviert. Der Verlauf der Proliferation/Viabilität verlief auf beiden Ma-

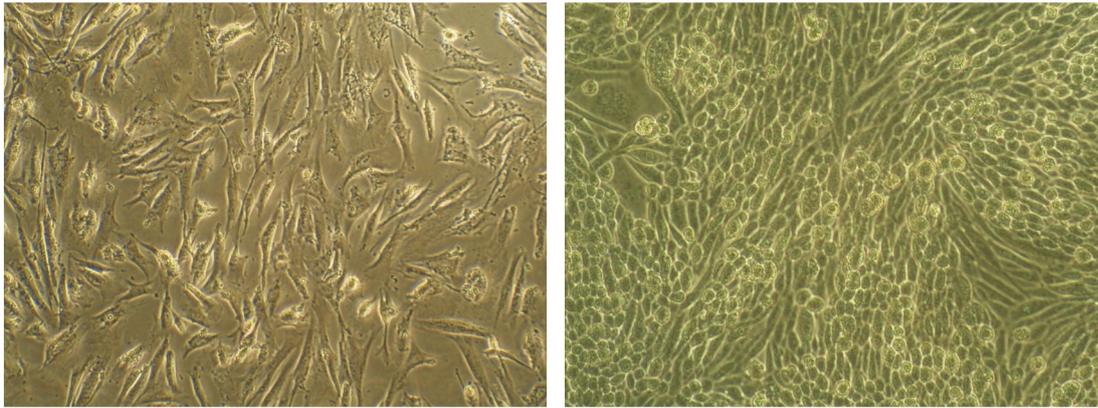
trices ähnlich (Abb. 4.36). Das Maximum der Zelldichte auf Sponceram® wurde am Tag 8 erreicht. Der Wert für Sponceram/HA war um 23 % kleiner. Auf Sponceram/HA war das relative Maximum der Zelldichte am Tag 12 erreicht. Folglich wuchsen die humanen Osteoblasten auf beiden Materialien ähnlich gut und somit wurden beide in einem anschließenden Reaktorlauf im BIOSTAT® Bplus RBS 500 zur Kultivierung eingesetzt.



**Abb. 4.36:** Darstellung der Ergebnisse des MTT-Tests zur Bestimmung der Viabilität/Proliferation von primären Osteoblasten kultiviert auf Sponceram® und Sponceram/HA in Standard-Medium über einen Zeitraum von 12 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 4 Matrices +/- Standardabweichung.

#### 4.5.7 Morphologische Veränderung der Osteoblasten

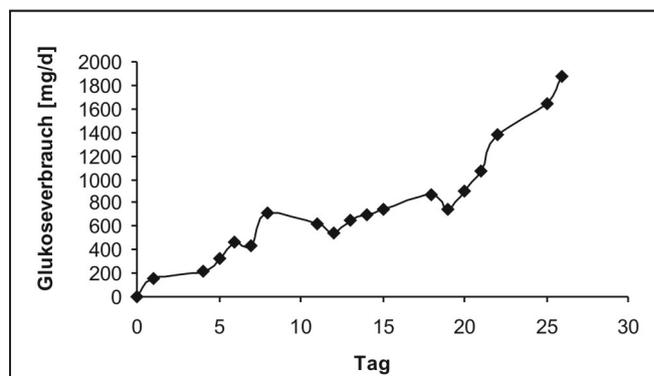
Nach der Isolierung der Osteoblasten aus dem Oberschenkelknochen wuchsen die Zellen flach und großflächig auf dem Kulturboden (Abb. 4.37, links). Die Zellen proliferierten langsam (Verdopplungszeit ca. 3 Wochen). Nach der dritten Passage veränderte sich die Morphologie in ähnlicher Weise wie es schon bei den BMSCs (siehe Kap. 4.5.1.4) beobachtet worden war. Die Zellen wurden kleiner und spindelförmiger und zeigten eine deutlich gesteigerte Proliferationsaktivität (Abb. 4.37, rechts). Diese Veränderung war unabhängig vom eingesetzten Medium. Diese morphologische Veränderung bei humanen Osteoblasten wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Bei dem Überbein des Patienten handelte es sich nicht um bösartig entartetes Gewebe. Da es sich aber um eine Wucherung handelte, könnte dies die gesteigerte Proliferation erklären. Auffällig war, dass sich die Zellen nach der 3. Passage veränderten. Wenn sie nach der 2. Passage nicht weiter geteilt wurden, wurde keine Veränderung beobachtet. Daher könnte auch hier, wie bei den BMSCs das Passagieren mit Trypsin die Veränderung der Zellen hervorgerufen haben. Um eine mögliche Dedifferenzierung zu überprüfen wurde mittels RT-PCR die Expression des knochenspezifischen Markers Kollagen I ermittelt. Kollagen I konnte bis zur 6. Passage nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.37:** Morphologische Veränderung der Osteoblasten während der Kultivierung. A: Osteoblasten, Passage 2 in Standard-Medium; B: Osteoblasten, Passage 5 in Standard-Medium (100fache Vergrößerung).

#### 4.5.8 Kultivierung der humanen Osteoblasten im BIOSTAT® Bplus RBS 500

Dadurch dass die primären Osteoblasten ab der 3. Passage eine erhöhte Proliferationsaktivität zeigten, wurden genügend Zellen erhalten, um 4 Sponceram®-Scheiben für einen Reaktorlauf im BIOSTAT® Bplus RBS 500 zu besiedeln. Die Kultivierung wurde im Reaktorgefäß mit Einfachmantel im GMP-Breeder (Abb. 4.7 auf Seite 32) durchgeführt. Es wurden je 2 Scheiben Sponceram® mit einer durchschnittlichen Porengröße von 900 µm und 2 Scheiben Sponceram/HA mit einer Porengröße von 600 µm verwendet. Jede Scheibe wurde mit  $1 \cdot 10^7$  Zellen besiedelt. Dabei wurde ein Gemisch aus  $2,5 \cdot 10^5$  großflächigen Zellen der 2. Passage und  $9,5 \cdot 10^6$  kleinen, spindelförmigen Zellen der 3. Passage zum Besiedeln verwendet. Die Kultivierung wurde für 26 Tage in Differenzierungsmedium (Zusammensetzung: Anhang 6.2) durchgeführt.



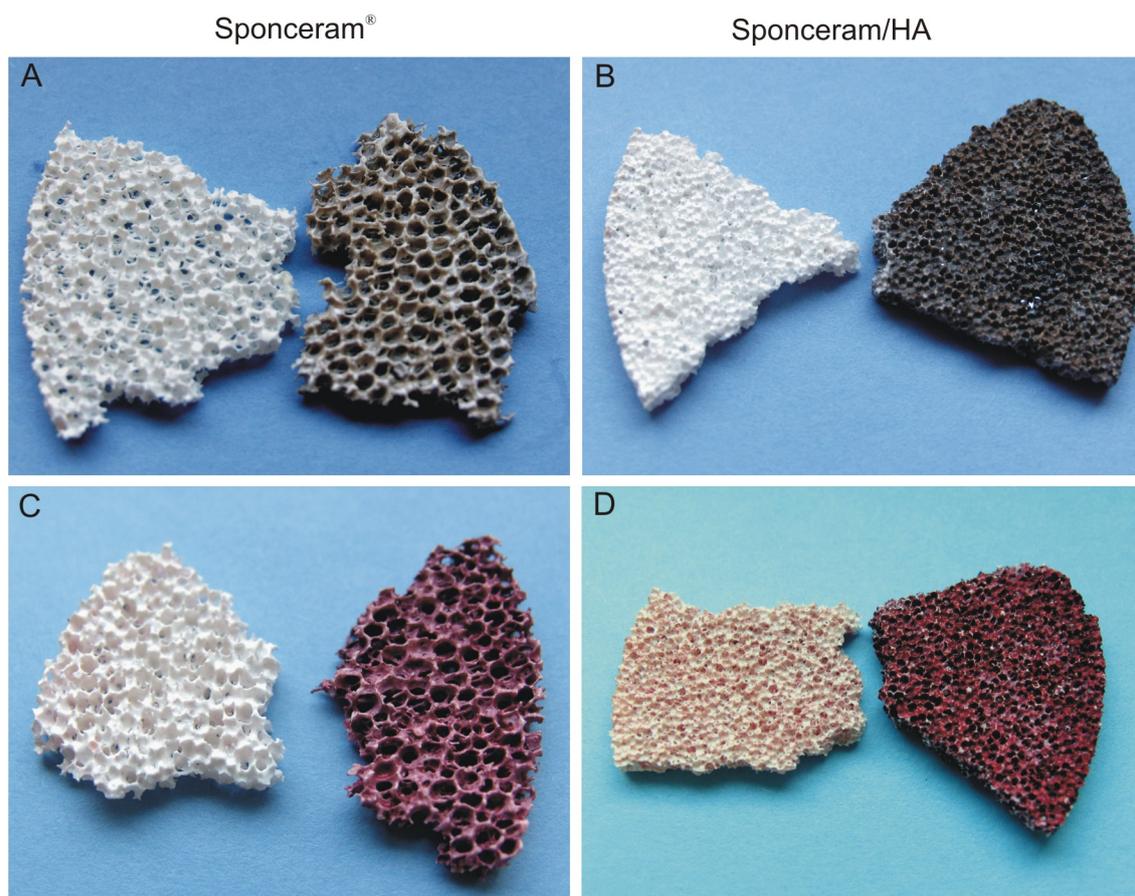
**Abb. 4.38:** Glukoseverbrauch der Osteoblasten kultiviert auf Sponceram® und Sponceram/HA im BIOSTAT® Bplus RBS 500 in Differenzierungs-Medium.

Insgesamt stieg die Glukoseverbrauchsrate während der Kultivierung von 153,5 mg/d am Tag 2 um das 12fache auf 1880 mg/d am Tag 25 an. Insgesamt wurden 14,05 g Glukose während der Kultivierung verbraucht (Abb. 4.38).

#### 4.5.9 Mineralisierung der extrazellulären Matrix

Die Mineralisierung der Knochenmatrix ist typisch und der Nachweis spezifisch für dieses Gewebe. Die Zellen wurden auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA fixiert und anschließend nach von Kossa und mit Alizarinrot gefärbt (Durchführung: Anhang 6.4.6 und 6.4.7).

Nach der Kultivierung wurde auf beiden unterschiedlichen Matrices eine Mineralisierung der Osteoblasten beobachtet. Dies wurde durch die dunkle Färbung nach von Kossa (Abb. 4.39, A und B) und die rote Färbung durch Alizarinrot (Abb. 4.39, C und D) im Gegensatz zur unbesiedelten Matrix (Kontrolle) verdeutlicht.

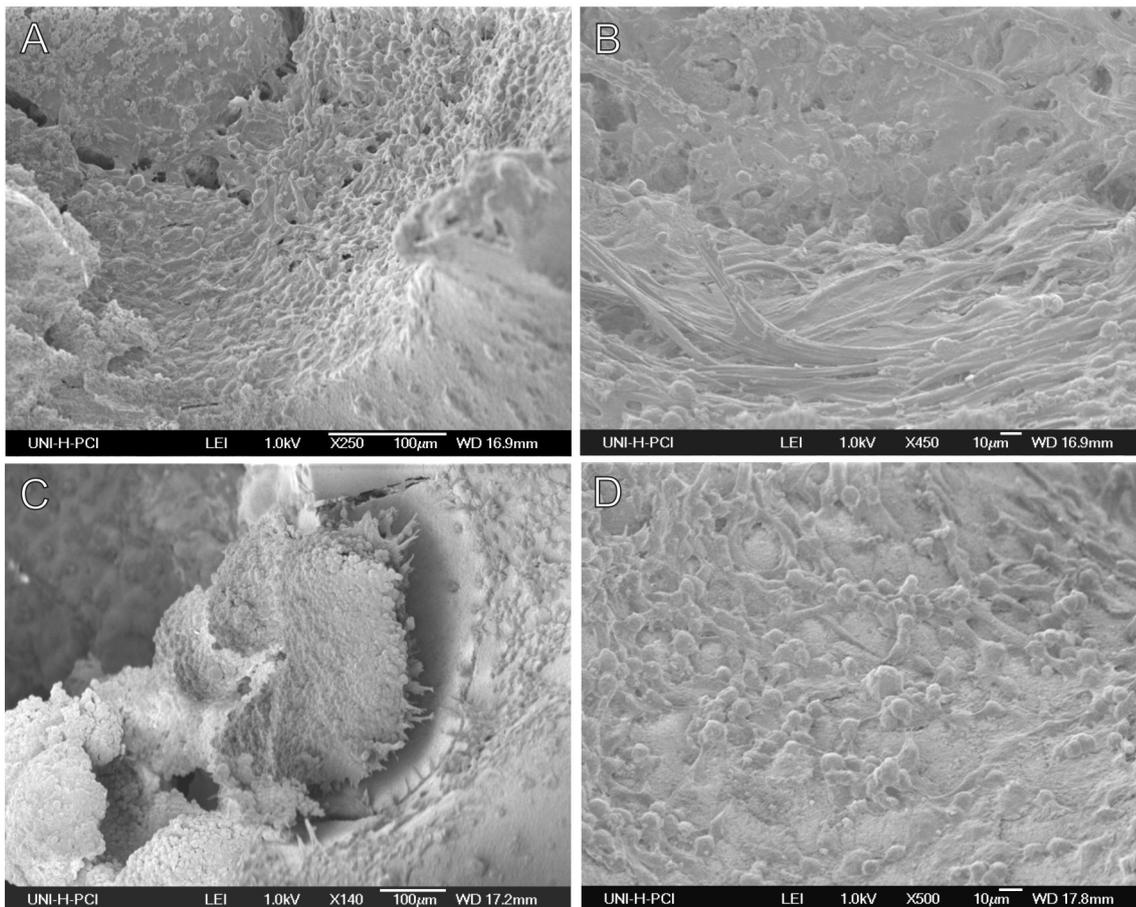


**Abb. 4.39:** Mineralisierung der ECM nach der Kultivierung im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500. Von-Kossa-Färbung (A, B) bzw. Alizarinrot-Färbung (C, D) der Osteoblasten auf Sponceram<sup>®</sup> (A, C) bzw. Sponceram/HA (B, D). Auf der linken Seite der Abbildungen sind jeweils die unbesiedelten, auf der rechten Seite die besiedelten Matrices abgebildet.

Da Sponceram/HA Kalzium enthält, wurde auch eine positive Färbung der Matrix erwartet. Bei der Von-Kossa-Färbung wurde die unbesiedelte Matrix nach Reduktion durch UV-Licht schwach braun gefärbt, was durch Inkubation in Natriumthiosulfat wieder rückgängig wurde. Durch Alizarinrot wurde die unbesiedelte Matrix dauerhaft schwach rot gefärbt. Dennoch wurde ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrolle und der besiedelten Matrix beobachtet (Abb. 4.39, D).

#### 4.5.10 Struktur der extrazellulären Matrix

Für die REM-Aufnahmen wurden die Osteoblasten auf den Matrices fixiert und getrocknet (Anhang 6.4.8). Die Matrices waren nach der Reaktorkultivierung vollständig mit ECM bedeckt, ohne dass das Trägermaterial noch zu erkennen war (Abb. 4.40). Die Gewebeschicht war teilweise zwischen 50–100  $\mu\text{m}$  dick.

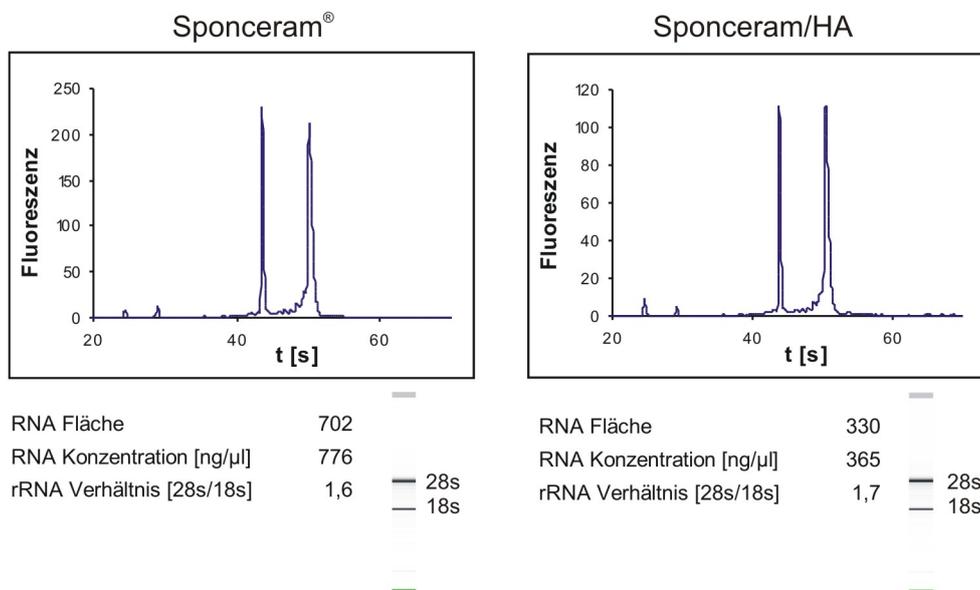


**Abb. 4.40:** REM-Aufnahme von humanen Osteoblasten kultiviert auf Sponceram<sup>®</sup> (A, B) und Sponceram/HA (C, D) im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500.

Die parallele faserige Struktur die bei den MC3T3-E1-Zellen (Abb. 4.25 auf Seite 52) beobachtet wurde, war hier weniger ausgeprägt. Auf der Oberfläche waren überwiegend runde, kugelförmige Strukturen zu erkennen. Die Größe dieser Strukturen variierte von ca. 10–100  $\mu\text{m}$ . Dabei handelte es sich um mineralische Ablagerungen, wie z. B. das Hydroxylapatit, der extrazellulären Matrix. Ein Unterschied der Zellmorphologie auf den unterschiedlichen Matrices wurde nicht beobachtet.

#### 4.5.11 Ergebnisse der RNA-Isolierung

Wie auch nach der Reaktorkultivierung der MC3T3-E1-Zellen wurden die Zellen durch Inkubation für ca. 15 min in Trypsinlösung (37°C/5 % CO<sub>2</sub>) von den Matrices abgelöst (vgl. Kap. 4.4.9). Die Matrices wurden mehrmals für ca. 15 min in Trypsinlösung inkubiert, mit Medium gespült und für 5 min bei 400 g abzentrifugiert. Die RNA-Aufreinigung erfolgte mit einem Kit der Firma Promega (Anhang 6.4.13). Die Bestimmung des Reinheitsgrad, der über das 28S zu 18S RNA-Verhältnis bestimmt wird, erfolgte ebenfalls mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Anhang 6.4.14). Für eine anschließende PCR-Analyse und für einen knochen-spezifischen DNA-Chip sollte die Reinheit zwischen 1,5–2,0 liegen. Die RNA der Zellen, die auf Sponceram<sup>®</sup> kultiviert worden waren hatten ein Verhältnis von 1,6, die RNA der Zellen auf Sponceram/HA ein Verhältnis von 1,7 (Abb. 4.41). Anschließend wurde die RNA zur Untersuchung der Expressionsanalyse verschiedener Knochenmarker eingesetzt.



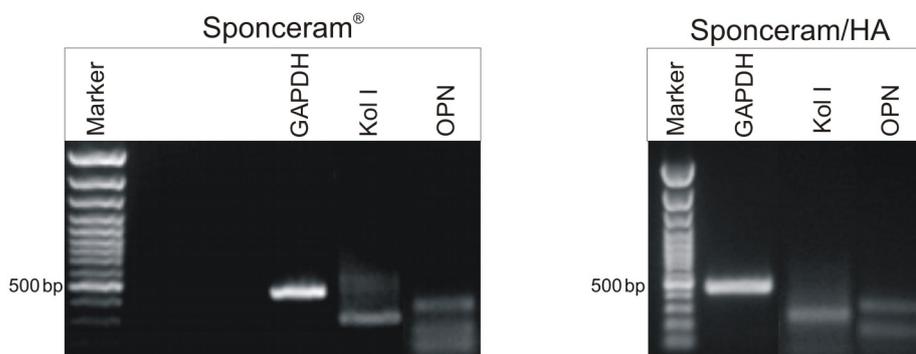
**Abb. 4.41:** Bestimmung der RNA-Reinheit humaner Osteoblasten nach Kultivierung im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer. Die Peaks stellen jeweils die 18S- und 28S-rRNA dar.

#### 4.5.12 RT-PCR-Analyse knochenspezifischer Gene

Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend in der PCR eingesetzt. Bei der PCR wurden die knochenspezifischen Gene Kollagen I (Kol I), *bone sialoprotein 2* (BSP) und Osteopontin (OPN) analysiert. Alle hier verwendeten Primer wurden zuvor anhand der humanen Osteosarkomzelllinie SAOS-2 getestet und die erwarteten Fragmente wurden erhalten (Daten nicht gezeigt).

Die PCR-Ergebnisse waren für die Zellen auf beiden verwendeten Matrices sehr ähnlich (Abb. 4.42). Die Expression des Kontrollgens GAPDH zeigt, dass die RNA intakt war. Die Expression von BSP wurde nicht nachgewiesen. Kollagen I konnte als Hauptknochenprotein nachgewiesen werden. Für OPN wurde ein Produkt der Größe von 330 bp erwartet. Diese Bande wurde bei beiden Proben mit einer schwachen Intensität erhalten. Zusätzlich war immer eine Bande bei ca. 200 bp zu beobachten. Aufgrund der schwachen Bandenintensitäten im Verhältnis zum Kontrollgen GAPDH wurde auf eine Analyse der Intensitäten an dieser Stelle verzichtet.

Da die Primer und die erhaltene RNA intakt waren, kann auf eine schwache Expression der gewählten Gene geschlossen werden. Die Expression der Gene ist zeitabhängig und da bereits differenzierte Osteoblasten verwendet wurden, könnte zum gewählten Zeitpunkt die Expression schon abgeschaltet oder herunterreguliert gewesen sein. Es ist bekannt, dass die Expression von Kollagen I am Ende der Mineralisierungsphase geringer wird. Auch BSP-2, das essentiell für die Mineralisierung der organischen Matrix ist, wird früh transient während der Osteoblastenreifung exprimiert [Ganss u. a. 1999]. Zum Zeitpunkt der Analyse könnte die Expression von BSP bereits wieder abgeschaltet gewesen sein.



**Abb. 4.42:** 1%iges Agarosegel der RT-PCR-Analyse der knochenspezifischen Marker Kollagen I (Kol I) und Osteopontin (OPN) nach der Kultivierung im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS auf Sponceram<sup>®</sup> (links) und Sponceram/HA (rechts).

#### 4.5.13 Expressionsanalyse knochenspezifischer Gene mittels humanem Knochen/Knorpelchip

Für eine detailliertere Expressionsanalyse wurde ein spezifischer humaner Knorpel/Knochenchip eingesetzt. Dieser Chip wurde an der GBF Braunschweig, Abteilung Organ- und Gewebekultur von Prof. Bader entwickelt und von Dr. Stahl, Arbeitsgruppe Chip-technologie des TCI Hannover zur Analyse eingesetzt. Bei der DNA-Microarray-Technologie werden DNA-Sonden eingesetzt. Bis zu dreißigtausend verschiedene genspezifische Oligonukleotid-Sonden können auf der funktionalen Oberfläche eines Chips immobilisiert werden. Die zu analysierende Probe wird fluoreszenzmarkiert und auf dem Chip hybridisiert. Die entsprechenden Gene können zugeordnet werden, wenn die komplementären Basenpaare hybridisieren [Skena u. a. 1998].

Für die Analyse der kultivierten Osteoblasten wurden je 100 µg RNA eingesetzt. Beide Proben konnten auf einem DNA-Chip hybridisiert werden, da sie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3, Cy5) markiert wurden. Der Chip wurde mit dem Array Scanner 428<sup>TM</sup> der Fa. Affimetrix im entsprechenden Kanal ausgelesen (Durchführung: Anhang 6.4.18–6.4.20). Es wurden insgesamt 5 Gene auf dem Chip nachgewiesen. Für beide Proben wurden die gleichen Gene identifiziert. Eine erste Bewertung der Ergebnisse war möglich, sollte aber aufgrund des schwachen Signals für weitere Experimente optimiert werden. Es wurden folgende Gene identifiziert:

- Matrix Metalloproteinase 3 (MMP3)
- *Tumor necrosis factor receptor I* (TNFR I)
- CD44
- *Inhibitor of DNA binding* (ID4)
- Noggin.

Knochengewebe unterliegt einem ständigem Umbau, dem so genannten *bone remodelling*. Osteoblasten exprimieren MMPs, Proteinasen, die die extrazelluläre Matrix bei physiologischem pH-Wert abbauen können. MMP-3 oder auch Stromelysin ist direkt am Abbau von Membranproteinen wie Fibronectin, Laminin oder Proteoglykanen beteiligt [Breckon u. a. 1999].

TNFR I oder auch p55 ist ein typisches Oberflächenantigen, das bei BMSCs und Osteoblasten gefunden wird [Bu u. a. 2003]. Dieses Protein ist einer der Hauptrezeptoren für den *tumor necrosis factor α* (TNF-α), der in Zellen Apoptose und Entzündungsreaktionen hervorrufen kann. Einige Proteine der TNFα-Familie sind in den Mechanismus der Osteoclasten-Differenzierung involviert [Suda u. a. 1999].

Das Oberflächenantigen CD44 ist typisch für BMSCs und für Osteoblasten. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, welches als Rezeptor für die Zell-Adhäsion verantwortlich ist. Zu den Liganden von CD44 zählen Hyaluronsäure, OPN, MMPs und Kollagene [Lesley 2002]

[Weber u. a. 1996].

ID-Proteine (*Inhibitor of DNA Binding*), wie ID4 können Heterodimere mit Transkriptionsfaktoren bilden und inhibieren so deren Bindung an spezifische DNA-Sequenzen. In der Literatur ist beschrieben, dass ID4 wahrscheinlich in der Signalkaskade von BMP4 involviert ist [Samanta und Kessler 2004].

Noggin ist ein Polypeptid, das an BMPs bindet und diese inaktiviert. Noggin wird verstärkt bei einer erhöhten Konzentration an BMPs in Osteoblasten exprimiert, wahrscheinlich um die Zelle vor einem krebserzeugenden Stimulus durch die Wachstumsfaktoren zu schützen [Canalis u. a. 2003].

Die erhaltenen Gene bei der PCR stimmen nicht mit den Ergebnissen des DNA-Chips überein. Bei der RT-PCR wurden Kollagen I und Osteopontin nachgewiesen. Diese Gene wurden auch auf den Chip gespottet, aber nicht nachgewiesen. Bei der RT-PCR werden die entsprechenden DNA-Sequenzen um ein Vielfaches amplifiziert und das Signal verstärkt. Für das Chip-Experiment war die Expression dieses Gene wahrscheinlich zu gering, um ein ausreichendes Signal zu erhalten. Als Vergleich müssten die auf dem Chip detektierten Gene zusätzlich in einer RT-PCR analysiert werden.

Im Zusammenhang könnte die erhöhte Expression an MMP3 und CD44 stehen, welcher ein Rezeptor für MMPs ist. Das kultivierte Gewebe könnte schon im Endstadium der Reifung sein, was die Expression an MMP-3, TNFR I und Noggin zeigte. MMP-3 könnte die organische Knochenmatrix bereits wieder abbauen, was mit dem *bone remodelling* in Zusammenhang stehen könnte. Noggin wird exprimiert, wenn die Konzentration an BMPs in der Zelle erhöht ist, z. B. am Ende der Mineralisierung. Nach der Mineralisierung unterliegen Osteoblasten u. a. der Apoptose [Aubin 1996], was die erhöhte Expression an TNFR I bestätigen könnte.

#### 4.5.14 Fazit

Für das *Tissue Engineering* von Knochenzellen im menschlichen Organismus kommen im Prinzip zwei Zellsysteme in Frage, BMSCs und Osteoblasten. Beide Zelltypen wurden erfolgreich zur Kultivierung auf den Matrices Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA eingesetzt. Die Messung der Viabilität/Proliferation zeigte, dass beide Zelltypen auf beiden Matrices ähnlich gut proliferierten.

Bei der Differenzierung der BMSCs zu Osteoblasten zeigte sich, dass die Sponceram/HA-Matrix besser geeignet war, da sie die AP-Aktivität erhöhte (siehe Abb. 4.31 auf Seite 59). Matrices, die Hydroxylapatit enthalten, induzieren die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Knochengewebe [Ogata u. a. 2005]. Weiter wurde die Differenzierung der BMSCs zu Knochengewebe in Zellkulturschalen durch Mineralisierung der extrazellulären Matrix bestätigt (Abb. 4.32 auf Seite 60, Abb. 4.33 auf Seite 60). Anschließend wurde durch das häufige Passagieren ein Alterungsprozess in den BMSCs induziert, was dazu führte, dass die

Zellen ihre Fähigkeit zur Knochen-Differenzierung verloren. Daher wurden die Zellen nicht im BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 kultiviert.

Für die primären Osteoblasten wurde die gesteigerte Proliferationsaktivität bereits ab der 3. Passage beobachtet. Da bereits Zellen einer so frühen Passage vermehrt proliferierten, wurden sie zur Kultivierung im Bioreaktor eingesetzt. Die Mineralisierung der Matrix und damit die Bildung von Knochengewebe wurde durch die Von-Kossa- und Alizarinrot-Färbung bestätigt (Abb. 4.39 auf Seite 65). Die REM-Aufnahmen zeigten zusätzlich, dass die extrazelluläre Matrix mineralisierte, indem sie Ablagerungen bildete (Abb. 4.40 auf Seite 66). Als problematisch erwies sich der Nachweis knochenspezifischer Gene auf Expressionsebene. Die geringe Expression weniger Gene kann damit zusammenhängen, dass nur wenige der Zellen auf den Matrices differenzierten und folglich hauptsächlich osteoblastenspezifische Gene exprimierten.

Ein bevorzugtes Wachstum der Zellen auf einer der Matrices wurde nicht beobachtet. Auf beiden Matrices wurde eine bis zu 100 µm dicke Zellschicht gebildet. Auch die Färbungen und Expressionsmuster waren auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA gleich.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Behandlung von Knorpel- und Knochendefekten hat in den letzten Jahren das *Tissue Engineering* an Bedeutung gewonnen, bei dem Zellen *in vitro* auf formgebenden, biokompatiblen Trägermaterialien kultiviert und anschließend in den Patienten implantiert werden.

Nach Isolierung aus dem Gewebe und Expansion *in vitro* kann es zur Dedifferenzierung von Knorpelzellen kommen. In dieser Arbeit wurde eine mit Elastin quervernetzte Kollagen-Matrix, die bisher in der Kosmetik und Wundheilung eingesetzt wurden, zur Kultivierung von Knorpelgewebe verwendet. Primäre Knorpelzellen aus Schweinepfoten wurden erfolgreich auf der Matrix kultiviert. Die Expression des knorpelspezifischen Proteins Kollagen II wurde durch RT-PCR und histologische/immunhistologische Analysen bestätigt. Auch ohne den knorpelinduzierenden Wachstumsfaktor TGF- $\beta$  wurde Kollagen II nach Kultivierung der Zellen auf der Matrix nachgewiesen. Dies zeigte, dass die verwendete Kollagen-Matrix die chondrozytären Phenotyp der Zellen unterstützte.

Eine detailliertere Analyse der Zellstruktur innerhalb der Kollagen-Matrix könnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt werden. Zur weiteren Charakterisierung der Zellen sollte z. B. die Expression von weiteren knorpelspezifischen Genen wie Aggrecan und Proteoglykan mittels RT-PCR untersucht werden. Zum Einsatz der Matrix *in vivo* sollte zusätzlich die mechanische Belastbarkeit, durch Zug- und Druckkräfte untersucht werden.

Der Wachstumsfaktor BMP-2 wird verwendet um Vorläufer- oder Stammzellen zu Knochengewebe zu differenzieren. Wachstumsfaktoren sind sehr teuer und durch stabile Immobilisierung auf einer Matrix und anschließender Besiedlung mit Zellen könnten diese für einen längeren Zeitraum den Zellen verfügbar gemacht werden.

Hier wurde BMP-2 kovalent an das Polymer N-Vinylpyrrolidon (N-VP-DAAc) sowie an RGD-Peptide gebunden, und das Bindungsprodukt an einer Keramik-Matrix, Sponceram<sup>®</sup>, immobilisiert. Dabei wurde gezeigt, dass N-VP-DAAc und RGD-Peptide auf Sponceram<sup>®</sup> adsorbierten. Die Bindung von BMP-2 an N-VP-DAAc entstand durch kovalente Bindung der Aminogruppen des BMP-2 an die freien Aldehydgruppen des Polymers. Eine kovalente Bindung von BMP-2 an RGD wurde mittels Glutaraldehyd durchgeführt. Die erfolgreichen Bindungen und die dadurch veränderten molekularen Massen wurden durch SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen. Auf den Matrices wurden die Bindungsprodukte und ungebundenes BMP-2 adsorbiert und mit den Zelllinien SAOS-2 und MC3T3-E1 besiedelt. Die Proliferation/Viabilität der Zellen wurde durch den MTT-Test, die frühe Differenzierung durch den Nachweis des osteoblastentypischen Markers Alkalische Phosphatase ermittelt. Dabei zeigte sich, dass an Sponceram<sup>®</sup> adsorbiertes N-VP-DAAc keinen zytotoxischen Einfluss auf die Proliferation der Osteosarkomzelllinie SAOS-2 hatte. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch die Bindung die Aktivität des Wachstumsfaktors oder die adsorptiven Eigenschaften von N-VP-DAAc verringert

wurden. Nur durch Zugabe von löslichem BMP-2 im Medium wurde eine erhöhte AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen gemessen, nicht jedoch bei der Verwendung der Bindungsprodukte. Die Ergebnisse der Bindung von BMP-2 an RGD waren ähnlich. Auch hier wurde durch die Bindung die Aktivität des Proteins oder die Adsorptionseigenschaft herabgesetzt. Auch die Adsorption des ungebundenen BMP-2 an Sponceram<sup>®</sup> war weniger effektiv im Vergleich zu BMP-2 in Zellkulturmedium.

Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung von BMP-2 wäre z. B. ein sogenanntes *controlled release system* in Sponceram<sup>®</sup>-Matrices. Das Protein könnte z. B. in Mikrosphären eingekapselt werden, die langsam BMP-2 an die Zellen abgeben. Ein anderer Ansatz wären Adsorptionsexperimente mit einem rekombinanten BMP-2, in das die RGD-Domäne eingefügt ist. So würde die Verwendung von Bindungsreagenzien wie Glutaraldehyd und damit der inhibierende Einfluss auf BMP-2 entfallen.

Zur Herstellung von Knochengewebe auf Matrices kommen verschiedene Zellsysteme in Frage. Zur Grundlagenforschung können etablierte Zelllinien verwendet werden. Für den klinischen Einsatz sind autologe Zellen ideal für das *Tissue Engineering* von Knochengewebe. Dabei können bereits differenzierte Osteoblasten oder auch Stammzellen aus dem Knochenmark, sogenannte BMSCs, eingesetzt werden.

Ziel war es, die drei Zellsysteme auf zwei unterschiedlichen Keramiken, Sponceram<sup>®</sup> und Hydroxylapatit beschichtetes Sponceram<sup>®</sup> (Sponceram/HA) zur Herstellung von Knochengewebe zu testen. Dies wurde zunächst unter statischen Bedingungen im 96-Lochplatten-Format und später auf Sponceram<sup>®</sup>-Scheiben im Bioreaktor BIOSTAT<sup>®</sup> Bplus RBS 500 analysiert. Bei der Kultivierung von MC3T3-E1-Zellen in 96-Lochplatten war die Proliferation auf unbeschichtetem Sponceram<sup>®</sup> höher als auf Sponceram/HA. Jedoch zeigte sich, dass die Proliferation unter statischen Bedingungen limitiert war, da das Zellwachstum nach ca. 14 Tagen stoppte. Die Messung der frühen Differenzierung auf Sponceram<sup>®</sup> kultivierter Zellen ergab, dass nur Zellen in Differenzierungs-Medium (mit Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerolphosphat) oder BMP-2-Medium eine erhöhte AP-Aktivität hatten. Für eine längere Kultivierungsdauer wurden die MC3T3-E1-Zellen im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS auf Sponceram<sup>®</sup>-Matrices kultiviert. Dabei wurden die Zellen in einem Reaktor in Standard-Medium für 28 Tage kultiviert. In einem weiteren Reaktor wurden die Zellen für 10 Tage in Standard-Medium, gefolgt von 11 Tagen in BMP-2-Medium kultiviert. Die REM-Aufnahmen zeigten, dass durch Kultivierung im Bioreaktor eine dichte Schicht der ECM gebildet worden war. Obwohl unter statischen Bedingungen keine Erhöhung der AP-Aktivität in Standard-Medium gemessen wurde, wurde im Bioreaktor unter beiden Bedingungen Knochengewebe gebildet. Dies wurde durch RT-PCR Analyse der knochenspezifischen Gene Kol I, OC und BSP bestätigt. Zusätzlich zeigten die Färbungen nach von Kossa und Alizarinrot, dass die

extrazelluläre Knochenmatrix mineralisiert war. Dabei war die Färbung der Konstrukte, die in BMP-2-Medium kultiviert wurden intensiver, was auf die induzierende Wirkung des Wachstumsfaktors zurückzuführen war. Die Ergebnisse zeigten, dass Sponceram<sup>®</sup>, kultiviert im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS auch ohne BMP-2 die Differenzierung von MC3T3-E1-Zellen zu Knochengewebe induzierte.

Das Zellwachstum von humanen BMSCs und Osteoblasten war im Gegensatz zu den MC3T3-E1-Zellen, auf beiden Matrices (Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA) ähnlich. Bei der Analyse der Differenzierung von BMSCs zu Osteoblasten wurde gezeigt, dass Sponceram/HA besser geeignet war, da nur bei Kultivierung auf Sponceram/HA mit Differenzierungsmedium die AP-Aktivität erhöht war, auf unbeschichtetem Sponceram<sup>®</sup> dagegen nicht. Dies ließ vermuten, dass die Hydroxylapatit-Beschichtung die frühe Differenzierung induzierte. Des Weiteren wurde die Differenzierung der BMSCs in Zellkulturplatten untersucht. Dabei zeigte die Ausbildung der mineralisierten Knochenmatrix, dass die osteogene Differenzierung der BMSCs durch Differenzierungsmedium in Monolayerkultur induziert wurde. Mit steigender Passagenzahl zeigten die BMSCs *in vitro* eine Alterungserscheinung, was in einer gesteigerten Proliferationsaktivität resultierte. Die RT-PCR-Analyse knochenspezifischer Marker, zeigte, dass die BMSCs nicht mehr zu Knochengewebe differenziert werden konnten.

Die primären Osteoblasten zeigten ebenfalls eine gesteigerte Proliferationsaktivität ab der dritten Passage jedoch konnte das knochenspezifische Kollagen I bis zur 6. Passage nachgewiesen werden. Die Osteoblasten wurden im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS auf Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA kultiviert. Nach einer Kultivierungsdauer von 26 Tagen zeigten die REM-Aufnahmen, dass beide Matrices mit einer bis zu 100 µm dicken Zellschicht bewachsen waren und die Zellen mineralisierte Ablagerungen bildeten. Auf beiden Matrices zeigten die Von-Kossa- und Alizarinrot-Färbungen eine deutliche Mineralisierung der ECM. Durch RT-PCR-Analyse wurden Kol I und OPN nachgewiesen. Durch Analyse des Expressionsmusters mittels humanem Knochen/Knorpelchip wurde eine geringfügig erhöhte Expression der Gene MMP-3, TNFR I, CD44, ID4 und Noggin nachgewiesen.

Damit wurde gezeigt, dass Sponceram<sup>®</sup> und Sponceram/HA geeignet sind primäre humane BMSCs und Osteoblasten zu kultivieren und könnten in Zukunft im klinischen Bereich als Trägermaterialien für das *Tissue Engineering* von Knochen eingesetzt werden.

Um die Dedifferenzierung der BMSCs zu vermeiden, könnten diese in weiteren Versuchen in BMP-2-Medium kultiviert werden. Bei ausreichender Zellzahl könnte die Differenzierung der Zellen durch Kultivierung im BIOSTAT<sup>®</sup> RBS zusätzlich unterstützt werden. Auch hier könnte der Differenzierungsstatus der Zellen durch einen spezifischen humanen Knochen/Knorpelchip genauer charakterisiert werden. Da die Verfügbarkeit von humanen Zellen begrenzt ist, könnten zur Reproduzierbarkeit der oben beschriebenen Ergebnisse tierische Zellen, z. B. aus Schwein verwendet werden.



## 6 Anhang

### 6.1 Statistik

Für alle Ergebnisse der Kultivierung auf den Matrices in 96-Lochplatten wurden ab vier Messwerten der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Ab fünf Messwerten wurde die Varianz der Gruppen mittels F-Test bestimmt. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde ein zweiseitiger t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt, um die Signifikanz der Abweichung zu überprüfen. Der t-Test wurde abhängig vom Ergebnis des F-Tests für gleiche oder unterschiedliche Varianzen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich gewertet bei  $p < 0,05$ . Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

### 6.2 Medien und Puffer

Alle im folgenden beschriebenen Medien und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser (ARIUM, Sartorius AG, Göttingen) hergestellt, welches im folgenden als ddH<sub>2</sub>O bezeichnet wird.

**DMEM** (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)

DMEM-Pulver wurde mit NaHCO<sub>3</sub> versetzt der pH mit 1 M HCl auf 7,2 eingestellt und steril filtriert. Der pH Wert erhöhte sich durch das Filtrieren um 0,1-0,2 Einheiten.

#### 1. Standard-Medium:

DMEM + 10% FCS, Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml).

**MC3T3-E1-Zellen, BMSCs:**

#### 2. Differenzierungs-Medium:

Wie 1. + 80 µM Ascorbinsäure, 10 mM β-Glycerolphosphat und 1 µM Dexamethason.

#### 3. BMP-2-Medium:

Wie 2. + 10 ng/ml BMP-2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Professor Sebald, Universität Würzburg).

**Osteoblasten:**

#### 4. Differenzierungs-Medium:

Wie 1. + 80 µM Ascorbinsäure, 10 mM β-Glycerolphosphat und 100 nM Dexamethason.

**Chondrozyten:**

#### 5. TGF-β-Medium:

Wie 1. + 80 µM Ascorbinsäure, 100 nM Dexamethason, 10 ng/ml TGF-β.

<b>PBS:</b>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
	pH-Wert	7,4

### 6.3 Säugerzellen

#### MC3T3-E1-Zellen

MC3T3-E1-Zellen sind murine Vorläuferzellen aus der Schädeldecke von Embryonen. Sie können zu Osteoblasten differenziert werden. (DSMZ-Nr.: ACC 210)

#### SAOS-2 Zellen

SAOS-2 sind humane Zellen aus dem Osteoblastensarkom einer 11-jährigen Kaukasierin. (DSMZ-Nr.: ACC 243)

#### Knochenmarkstammzellen (BMSCs)

Humane Knochenmarkstammzellen wurden aus dem Beckenkamm isoliert. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. van Griensven, MH-Hannover)

#### Osteoblasten

Humane Knochenzellen/Osteoblasten wurden aus dem Überbein isoliert. (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. van Griensven, MH-Hannover)

#### Chondrozyten

Knorpelzellen/Chondrozyten wurden aus Schweinepfoten von ca. einjährigen Tieren isoliert (Schlachthof Gleidingen).

### 6.4 Methoden

#### 6.4.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wachsen adhärent in Zellkulturflaschen. Die Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Flaschen bei 37 °C/5 %CO<sub>2</sub> kultiviert. SAOS-2- und MC3T3-E1-Zellen wurden ein bis zweimal pro Woche passagiert, BMSCs, Knorpel- und Knochenzellen je nach Wachstum alle 10–21 Tage.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium vollständig abgenommen, die Zellen einmal mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,2 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA in PBS) gespült und anschließend mit 2,5 ml Trypsin/EDTA bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, bis die Zellen vollständig vom Kulturboden abgelöst waren (5-15 min). Daraufhin wurden die Zellen in 7,5 ml Medium resuspendiert, entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und in neue Kulturflaschen ausplattiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gefüllt und vier Großquadrate ausgezählt. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten, wurde die Anzahl der Zellen pro Quadrat mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert.

#### 6.4.2 Histologische Färbung der Knorpelzellen mit Safranin O

Für die histologische Färbung der Knorpelzellen wurden die Zell/Matrix-Konstrukte mit 5%iger phosphatgepufferter Formalin-Lösung überschichtet und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 2 µm dicke Schnitte am Ultramikrotom angefertigt und diese mikroskopiert. Safranin O ist ein Azinfarbstoff, der in die Knorpelsubstanz eindringt und dort stöchiometrisch an saure Proteoglykane bindet. Das Zytoplasma, die Kernmembran und Cellulose werden grün angefärbt.

Das Paraffin wurde durch 2 x 10 min Spülen in Xylol entfernt. Anschließend wurden die Schnitte mit 92%igem Isopropanol gewaschen und mit Safranin O Lösung für 24 h gefärbt. Dann wurden die Schnitte mit Leitungswasser und 92%igem Isopropanol gespült. Danach erfolgte eine Gegenfärbung für 30 sec mit Lichtgrün-Lösung. Die Färbung wurde durch Spülen mit 95%igem Isopropanol unterbrochen. Am Ende wurden die Schnitte mit 100%igem Isopropanol entwässert, für 10 min mit Xylol gespült und mit Vitro-Clud<sup>®</sup> eingedeckelt.

<b>5%ige Formalin-Lösung:</b>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	3,45 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,6975 g
	Formaldehyd (37%ig)	35 ml
	ddH <sub>2</sub> O (pH 7,5)	250 ml

<b>Safranin O-Lösung:</b>	1 g Safranin O
	100 ml EtOH (50 %)

<b>Lichtgrün-Lösung:</b>	0,5 g Lichtgrün
	100 ml EtOH (50 %)

#### 6.4.3 Immunhistologischer Nachweis von Kollagen II

Die oben beschriebenen Paraffinschnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und in steigender EtOH Reihe entwässert. Um die endogene Peroxidase zu blockieren wurden die Schnitte 3 x 5 min mit Wasserstoffperoxid-Lösung blockiert. Anschließend wurde 3 x 5 min mit TBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte 2 x 10 min in Citratpuffer und für 30 min mit 4 % Magermilchpulver. Danach wurden die Schnitte für 1 h mit dem primären Antikörper und für

30 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dann wurde für 30 min mit dem Avidin-Biotin Komplex (ABK) und für 10 min mit dem Diaminobenzidin (DAB) Komplex inkubiert. Nach jedem Schritt wurden die Schnitte 3 x 5 min mit TBS gespült. Danach wurden die Kerne mit Hämalaun gefärbt. Am Ende wurden die Schnitte 10 min unter fließendem Wasser gespült und in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit Vitro-Clud<sup>®</sup> eingedeckelt.

**TBS-Puffer:**

1. 25,5 g NaCl auf 3 l
2. 6,1 g Tris + 37 ml 1 N HCl auf 1 l ddH<sub>2</sub>O auffüllen, pH 7,6  
900 ml 1. + 100 ml 2. vermischen

**primärer Antikörper:** Maus anti Kollagen Typ II (1:100 in 1%iger BSA-Lösung)

**sekundärer Antikörper:** Ziege anti Maus Immunglobulin, Biotin gebunden  
1:100 in 20 % Human-Serum (in PBS)

**Wasserstoffperoxid-Lösung:** 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 %)  
180 ml MeOH

**ABK:**

- 5 µl A (Streptavidin)
- 5 µl B (Biotinilated Peroxidase)

**DAB:**

- 500 µl DAB
- 500 µl TBS
- 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 % in TBS)

#### 6.4.4 Fixierung von Zellen

Zur Fixierung der Zellen in Zellkulturschalen und auf Sponceram<sup>®</sup>-Matrices wurden diese zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann 20 min bei Raumtemperatur in 100 % Ethanol fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen für die von Kossa Färbung dreimal mit deionisiertem Wasser, für die Alizarinrot-Färbung und Toluidinblau-Färbung dreimal mit PBS gewaschen.

#### 6.4.5 Toluidinblau-Färbung

Toluidinblau wurde zur Übersichtsfärbung von Zellen eingesetzt. Die Zellen in den Platten und auf den Matrices wurden nach der Fixierung für 10 min in der Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde so lange mit PBS gewaschen, bis der Hintergrund entfärbt war.

#### 6.4.6 Alizarinrot-Färbung

Alizarinrot wird zum Anfärben der Mineralisierungszone im Knochengewebe verwendet, da es mit dem Kalzium der extrazellulären Matrix farbige Chelatkomplexe bildet. Nach dem Fixieren der Zellen wurden diese in Alizarinrot-Lösung (1 % Alizarinrot in 2 % EtOH) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mehrmals mit PBS gewaschen um Farbreste zu entfernen.

#### 6.4.7 Von-Kossa-Färbung

Die Von-Kossa-Färbung wird ebenfalls als Mineralisierungsnachweis der extrazellulären Matrix verwendet. Dabei wird das Kalzium der ECM durch einwertige Silberionen ersetzt und anschließend zu braun bis schwarzem elementarem Silber reduziert.

Nach Fixierung der Zellen werden diese für 30 min im Dunkeln in Silbernitratlösung (5 % in ddH<sub>2</sub>O) inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und die Zellen für 2 min unter UV-Licht exponiert. Der Hintergrund wurde durch Inkubation für 2 min in Natriumthiosulfat (5 % in ddH<sub>2</sub>O) entfärbt.

#### 6.4.8 Raster-Elektronen-Mikroskopie

Zell/Matrix Konstrukte zur Elektronenmikroskopie wurden dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C in Karnovsky Puffer fixiert. Anschließend wurden die Konstrukte mit Cacodylat Puffer (0,2 M in ddH<sub>2</sub>O; pH 7,3) gewaschen und konnten darin mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Zur Entwässerung der Zellen wurden die Konstrukte zunächst mit PBS gewaschen und anschließend schrittweise mit Lösungen ansteigender Acteonkonzentration (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) überschichtet. Bei jedem Schritt wurde 15 min bei 4°C inkubiert. Der letzte Schritt in 100 % Aceton wurde dreimal wiederholt bei Raumtemperatur. Die Acetonreste wurden vollständig entfernt und die Matrix/Zell Konstrukte für 24 h im Exsikator getrocknet. Die Zellen auf den Matrices wurden mit einem JEOL JSM-6700F Raster-Elektronen-Mikroskop (Physikalische Chemie, Universität Hannover) untersucht.

<b>Karnovsky Puffer:</b>	CaCl <sub>2</sub>	5 mg
	Cacodylatpuffer	10 ml
	Glutaraldehyd (50 %)	20 µl
	ddH <sub>2</sub> O ad	2,48 ml

#### 6.4.9 MTT-Test

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) ist ein gelbes Salz, welches von Dehydrogenasen in Mitochondrien lebender Eukaryonten zu einem blauen Formazan-komplex reduziert werden kann. Die Formazankristalle werden aufgelöst und die anschließende Bestimmung der optischen Dichte dient als Maß für die Viabilität/Proliferation der eingesetzten Zellen.

Vor Beginn wurden die kultivierten Matrices in eine neue 96-Lochplatte überführt, damit kein Transmissionssignal am Boden haftender Zellen mitgemessen wurde. Die Matrices wurden mit 100 µl frischem DMEM sowie 10 µl einer MTT-Lösung (5 mg·ml<sup>-1</sup> in PBS, steril filtriert) für 4 h bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Um die Formazankristalle aufzulösen wurde 100 µl Solubilisierungslösung (10 % SDS in 0,01 M HCl, steril filtriert) zugesetzt und über Nacht bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub>. Vor der Messung wurden die Matrices aus der Lösung entfernt und die Absorption des Formazans beim lokalen Absorptionsminimum von 570 nm gegen 630 nm als Referenzsignal gemessen. Als Negativkontrolle diente eine Matrix ohne Zellen.

#### 6.4.10 Alkalische-Phosphatase-Aktivitätstest

Vor Beginn wurden die kultivierten Matrices in eine neue 96-Lochplatte überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 250 µl einer Lösung von 0,01 % Triton X-100 in PBS dreimal für 20 s im Ultraschallbad aufgeschlossen. 150 µl wurden im Proteintest (siehe Abschnitt 6.4.11) verwendet. 50 µl des Überstandes wurden in eine neue 96-Lochplatte überführt und 125 µl einer Lösung von 0,012 M p-Nitrophenylphosphat in 0,05 M Ethanolamin pH 9,8 zugesetzt. Die Lösung wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl 2,5 M NaOH gestoppt. Die Messung der relativen Aktivität der Alkalischen Phosphatase erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 405 nm im Plattenlesegerät gegen einen Blindwert. Als Blindwert diente eine Probe von 0,01 % Triton X-100 in PBS.

#### 6.4.11 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Micro BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce durchgeführt. Die Methode beruht auf der Proteinbestimmung mittels Bicinchoninsäure (BCA).

Dabei wurden die drei mitgelieferten Lösungen A, B und C im Verhältnis 50:48:2 gemischt

und als Arbeitsreagenz für die Proteinbestimmung eingesetzt. 150 µl der aufgeschlossenen Probe wurden mit 150 µl des Arbeitsreagenzes in einer 96-Lochplatte gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Probe gegen einen Blindwert aus 150 µl 0,01 % Triton X-100 in PBS 150 µl Arbeitsreagenz bei 570 nm im Plattenlesegerät gemessen. Als Standardreihe diente eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA).

#### 6.4.12 DNA-Bestimmung

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen durchgeführt. Der aus dem Zellaufschluss erhaltene Überstand wird, je nach Anzahl der aufgeschlossenen Zellen 1:2–1:100 in TE-Puffer (pH 7,4) verdünnt. 10 µl der Verdünnung wurden mit 90 µl TE-Puffer versetzt. Hierzu wurden 100 µl einer Lösung aus 0,5 µl PicoGreen in 99,5 µl TE-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur in einer abgedunkelten 96-Lochplatte inkubiert und die Intensität im Fluoreszenzlesegerät gemessen. Als Kalibrationsreihe wurde Kalbsthymus-DNA bekannter Konzentrationen in TE-Puffer eingesetzt.

**TE-Puffer:**      Tris-HCl            10 mM  
                      EDTA                1 mM  
                      pH-Wert auf 7,4 einstellen

#### 6.4.13 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem *SV Total RNA-Isolation System* von Promega durchgeführt. Dabei wurden die trypsinierten und abzentrifugierten Zellen (vergl. Kapitel 6.3.1) mit Lysispuffer aufgenommen und in Matrixröhrchen (Hybaid, RiboLyse-Tubes-Green 1,4 mm Keramik-Kugeln) im Fast Prep (2 x 20 s bei Stärke 6) aufgeschlossen. Die Proben wurden zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 16200 g, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in in einem ERG mit 300 µl Dilution Puffer und 400 µl 100%igem EtOH vermischt. In allen folgenden Schritten wurden die Proben bei 16200 g und 4 °C abzentrifugiert. Die Lösung wurde in zwei Portionen über eine Säule gegeben und jeweils 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde mit 600 µl SV RNA Wash Solution gewaschen und die DNA für 15 min bei Raumtemperatur durch DNase I (55 µl DNase I Verdau Mix) verdaut. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 200 µl SV DNase Stop Solution. Dann wurde zweimal mit 600 µl und 200 µl Waschlösung gewaschen und für 1 min bzw. 2 min zentrifugiert. Abschließend wurde die RNA mit 50 µl DEPC-Wasser (0,1 %, pH 7) eluiert.

#### 6.4.14 Qualitätskontrolle der RNA

Der *Agilent 2100 Bioanalyzer* ermöglicht mit dem RNA Nano LabChip® die parallele Analyse von 12 RNA-Proben. Dabei wird die RNA-Konzentration und die Qualität, also das Verhältnis der RNA-Untereinheiten, bestimmt.

Das fluidische System des LabChip® wurde mit 9 µl *Gel-Dye-Mix* gefüllt. Die Reagenzien für das Gel wurden 30 min vor Gebrauch bei Raumtemperatur äquilibriert. 65 µl *RNA 6000 Nano gel matrix* wurden 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Das *dye concentrate* wurde 10 s gevortext und anschließend herunterzentrifugiert. 1 µl der Farbstofflösung wurden zum Gel gegeben, vermischt und direkt vor Gebrauch 10 min bei 13000 g zentrifugiert. 9 µl *Gel-Dye-Mix* wurden in eine der Vertiefungen gegeben und mit der speziellen *Priming Station* in das fluidische System appliziert. 9 µl des *Gel-Dye-Mixes* wurden in zwei weitere Vertiefungen pipettiert. Die übrigen 9 Vertiefungen wurden mit 5 µl *RNA 6000 Nano Marker* und 1 µl RNA, bzw. dem *RNA 6000 Ladder* befüllt. Die 12 Proben und der Marker wurden zuvor 2 min bei 70 °C denaturiert. Der fertig befüllte LabChip® wurde für 1 min auf einem Vortexer mit einem speziellen LabChip®-Aufsatz bei 2400 min<sup>-1</sup> geschüttelt. Anschließend wurde der LabChip® in dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* fixiert und gemessen.

#### 6.4.15 cDNA-Synthese

Nach der Isolierung der RNA wurde diese mittels des Enzyms MLV Reverse Transkriptase in die entsprechende cDNA umgeschrieben.

1 µg RNA wurden mit 3 µl Oligo dT Primer (100 µM) versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 21 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde anschließend für 5 min bei 65 °C inkubiert und kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurden folgende Reagenzien hinzupipettiert:

- 8 µl 5fach RT-Puffer
- 4 µl dNTP-Mix (5 mM)
- 1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)
- 6 µl ddH<sub>2</sub>O
- **40 µl Gesamtvolumen**

Die Reaktion wurde für 50 min bei 37 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 65 °C beendet.

### 6.4.16 RT-PCR

Für die PCR wurde folgender Ansatz zusammen gegeben:

	Stammlösung	Endkonzentration	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
5 x PCR-Puffer	5 x	1 x	10
Vorwärts Primer	10 pmol· $\mu\text{l}^{-1}$	0,2 pmol· $\mu\text{l}^{-1}$	1
Rückwärts Primer	10 pmol· $\mu\text{l}^{-1}$	0,2 pmol· $\mu\text{l}^{-1}$	1
dNTPs	5 mM	0,1 mM	2
Taq-Polymerase	1 U· $\mu\text{l}^{-1}$	1 U· $\mu\text{l}^{-1}$	1
cDNA		100 ng (RNA)	2
ddH <sub>2</sub> O			33
Gesamtvolumen			50

**Tab. 6.1:** PCR-Ansatz

Anschließend wurde die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

**1 Zyklus:** 5 min Denaturierung bei 94 °C

**35 Zyklen:** 45 s bei 94 °C; 45 s Annealing bei Primer-abhängigen Temperatur (siehe unten);  
45 s bei 72 °C

**1 Zyklus:** 7 min 72 °C

#### Primer für MC3T3-E1-Zellen:

##### GAPDH:

Vorwärts: 5'-GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT-3'

Rückwärts: 5'-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3'

Produktgröße: 455 bp

Annealingtemperatur: 60 °C

##### $\alpha$ -1(I) Kollagen:

Vorwärts: 5'-TTC TCC TGG TAA AGA TGG TGC-3'

Rückwärts: 5'-GGA CCA GCA TCA CCT TTA ACA-3'

Produktgröße: 255 bp

Annealingtemperatur: 57 °C

##### Osteocalcin:

Vorwärts: 5'-ACA AGT CCC ACA CAG CAG CTT-3'

Rückwärts: 5'-GCC GGA GTC TGT TCA CTA CCT-3'

Produktgröße: 187 bp

Annealingtemperatur: 62 °C

**BSP-2:**

Vorwärts: 5'-CTG TAG CAC CAT TCC ACA CT -3'

Rückwärts: 5'-ATG GCC TGT GCT TTC TCG AT-3'

Produktgröße: 1055 bp

Annealingtemperatur: 56 °C

**Primer für Chondrozyten aus Schwein:****Kollagen II:**

Vorwärts: 5'-TTC AGC TAT GGA GAT GAC AAT C-3'

Rückwärts: 5'-AGA GTC CTA GAG TGA CTG AG-3'

Annealingtemperatur: 56 °C

**Primer für humane Zellen:****GAPDH:**

Vorwärts: 5'-GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT-3'

Rückwärts: 5'-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3'

Produktgröße: 419 bp

Annealingtemperatur: 61 °C

**Kollagen I:**

Vorwärts: 5'-GAA AAC ATC CCA GCC AAG AA-3'

Rückwärts: 5'-CAG GTT GCC AGT CTC CTC AT-3'

Produktgröße: 234 bp

Annealingtemperatur: 57 °C

**BSP-2:**

Vorwärts: 5'-CAT TTT GGG AAT GGC CTG TG-3'

Rückwärts: 5'-ATT GTC TCC GCT GCT GC-3'

Produktgröße: 560 bp

Annealingtemperatur: 60 °C

**OPN:**

Vorwärts: 5'-CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC-3'

Rückwärts: 5'-CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C-3'

Produktgröße: 330 bp

Annealingtemperatur: 60 °C

**6.4.17 Agarosegelelektrophorese**

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurden die Proben auf 1-2%ige TAE-Agarosegele aufgetragen. Die benötigte Menge an Agarose wurde in TAE-Puffer durch Erwärmen in

der Mikrowelle gelöst. Nachdem die Lösung auf ca. 70 °C abgekühlt war, wurden 2 µl Ethidiumbromid (EtBr) (1 % in ddH<sub>2</sub>O) zugesetzt, in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen. Das Gel wurde mit TAE-Puffer überschichtet und ein Gemisch aus 18 µl PCR Produkt + 3 µl 6fach Auftragspuffer in die Probestaschen aufgetragen. Die anschließende Elektrophorese lief für ca. 45 min bei 100 V. Abschließend wurden die Gele auf einem UV-Leuchttisch analysiert und fotografiert.

<b>50fach TAE (Tris-Acetat)-Puffer:</b>	Tris	242 g
	Essigsäure (konz.)	57,1 ml
	0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml
	ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml
<b>6fach Auftragspuffer:</b>	Bromphenolblau	25 mg
	Saccharose	4 g
	ddH <sub>2</sub> O ad	10 ml

#### 6.4.18 cDNA-Synthese für Chipexperimente

Für ein Chipexperiment wurden insgesamt 100 µg RNA eingesetzt. 2 Proben mit einem RNA-Gehalt von je 50 µg RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf 18 µl aufgefüllt. Das Umschreiben in cDNA erfolgte mit dem *cDNA labeling Kit* der Firma Qiagen. Zu jeder Probe wurden 2 µl Denaturierungslösung hinzugegeben, vermischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe auf Eis abgekühlt und zu der Probe folgende Reagenzien hinzu pipettiert:

- 5 µl 10fach RT-Puffer
- 5 µl dNTP Mix U
- 1 µl Cy3/Cy5-dCTP
- 5 µl Oligo-dT-Primer
- 0,5 µl RNase Inhibitor
- 11 µl RNase freies Wasser
- 2,5 µl Label Star Reverse Transkriptase
- **50 µl Gesamtvolumen**

Das Gemisch wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 2 µl *Stopsolution LS* beendet.

Danach wurde eine heiße alkalische Hydrolyse des RNA-Templates durchgeführt. Dabei wurden zur Lösung 10 µl 1 M NaOH hinzu pipettiert und 10 min bei 65 °C inkubiert. Nachdem die Lösung auf Eis abgekühlt war, wurde sie mit 10 µl 1 M HCl neutralisiert.

#### 6.4.19 Aufreinigung der cDNA

Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mit dem *PCR Purification Kit* der Firma Qiagen. Zu dem RT-PCR Produkt wurden 300 µl PB-Puffer hinzugefügt, auf eine Säule gegeben und 1 min bei 16200 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und 700 µl 35%iges Guanidinhydrochlorid auf die Säule gegeben und erneut 1 min bei 16200 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 700 µl PE-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Dann wurde die Säule für 1 min bei 16200 g trocken zentrifugiert. Die cDNA wurde 2 x mit 25 µl EB-Puffer für 1 min bei 16200 g eluiert.

#### 6.4.20 Transfer der cDNA auf den Chip

Die gereinigte cDNA wurde in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockenheit eingeeengt und die Pellets in 36 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Die Probe wurde für 3 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis gekühlt und mit 4 µl *Top Block* vermischt. Der Reaktionsansatz wurde auf den Chip gegeben und eingedeckelt. Die Kanten wurden luftdicht mit *Fixogum* versiegelt und der Chip über Nacht bei 42 °C inkubiert.

Nach der Hybridisierung wurde der Chip nacheinander mit Waschpuffer 1, Waschpuffer 2 und Waschpuffer 3 je 5 min unter Schütteln bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend für 2 min bei 1200 g trocken zentrifugiert. Durch die Waschschrirte wird unspezifisch gebundene cDNA entfernt.

Der Chip wurde mit dem Array Scanner 428<sup>TM</sup> der Firma Affimetrix im entsprechenden Kanal (Cy3, Cy5) ausgelesen.

<b>20fach SSC, pH 7:</b>	NaCl	175,3 g
	tri-Natriumcitrat-Dihydrat	88,3 g
	ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml

<b>Waschpuffer 1:</b>	20fach SSC	100 ml
	SDS (10%)	10 ml
	ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml

<b>Waschpuffer 2:</b>	20fach SSC	5 ml
	SDS (10%)	20 ml

	ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml
<b>Waschpuffer 3:</b>	20fach SSC	5 ml
	ddH <sub>2</sub> O ad	1000 ml

Alle drei Waschpuffer wurden abschließend durch einen 0,22 µm Filter filtriert.

#### 6.4.21 Aktivierung von N-Vinylpyrrolidon

Die Polymere der N-Vinylpyrrolidon Gruppe (N-VP-DAAc) haben eine Acetal Schutzgruppe. Um die Schutzgruppe zu entfernen, wurde eine wässrige Lösung des Polymers in ddH<sub>2</sub>O mit 200 µl 0,1 M HCl bei 70–80 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Lösung mit 0,1 M NaOH auf 7 eingestellt. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C aufbewahrt und am nächsten Tag der pH-Wert nötigenfalls nachgestellt.

#### 6.4.22 Bindung von Proteinen an N-VP-DAAc

Zur Bindung der Proteine an N-Vinylpyrrolidon wurde eine Lösung von aktiviertem Polymer und Protein im gewünschten stöchiometrischen Verhältnis in Borat- oder Carbonatpuffer mit einer Endkonzentration von 0,05 M gelöst. Die Lösung wurde 1–2 h bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend neutralisiert.

#### 6.4.23 Konzentrationsbestimmung des Polymers

Die Konzentrationsbestimmung von N-Vinylpyrrolidon erfolgte mittels eines spezifischen Iodtests. Es wurde eine Verdünnungsreihe des Polymers in ddH<sub>2</sub>O hergestellt. 500 µl der Polymerlösung wurden mit 3 ml einer frisch angesetzten 3 mM Iodlösung in 0,2 M Acetatpuffer pH 4,6 versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 460 nm gegen einen Blindwert aus 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O in 3 ml Iodlösung gemessen.

#### 6.4.24 Konzentrationsbestimmung von RGD mittels HPLC

Die Bestimmung der RGD-Konzentration wurde mittels HPLC durchgeführt. Das Peptid wurde auf einer C-18-Austauschersäule abgetrennt. Durch einen Detektor wurde die UV-Absorption bei 215 nm aufgenommen und die Konzentration anhand der Peakflächen bestimmt. Eine Standardreihe wurde mit RGD-Lösungen verschiedener Konzentrationen hergestellt. Zum Eluieren wurde 0,1 % Trifluoressigsäure und 5 % Acetonitril in ddH<sub>2</sub>O über die Säule gegeben. Die Elution erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 1 ml/min und einer Temperatur von 30 °C.

#### 6.4.25 SDS-Gelelektrophorese

Für die Bindungsnachweise der N-Vinylpyrrolidone mit den Proteinen wurden 12,5%ige SDS-Fertiggele von der Firma Biorad verwendet.

Für die Bindungsnachweise der RGD-Peptide an Proteine wurden die Gele wie folgt gegossen:

##### Zusammensetzung Trenngel:

Acrylamid (40 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	2,92 ml
Bisacrylamid (2 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	1,56 ml
Tris-Puffer, pH 8,8 (1,5 M)	2,80 ml
SDS (1 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	1,00 ml
ddH <sub>2</sub> O	1,72 ml
TEMED	20 µl
Ammoniumpersulfat (25 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	20 µl

##### Zusammensetzung Sammelgel:

Acrylamid (40 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	0,731 ml
Bisacrylamid (2 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	0,39 ml
Tris-Puffer, pH 8,8 (1,5 M)	0,76 ml
SDS (1 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	0,3 ml
ddH <sub>2</sub> O	3,82 ml
TEMED	10 µl
Ammoniumpersulfat (25 % w/v in ddH <sub>2</sub> O)	10 µl

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden die Bestandteile des Trenngels zusammengegeben. Ca. 4,5 ml des Reaktionsgemisches wurden in die Gelkammer gegossen und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wird das Isopropanol entfernt und das Sammelgel darüber gegossen.

Zur Vorbereitung der aufzutrennenden Proben wurden diese im Verhältnis 1:1 mit SDS-Auftragspuffer gemischt, fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht, anzentrifugiert und 15 µl des Gemisches auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde Tris-Glycin (TGS) verwendet. Es wurde eine Spannung von 70 V angelegt, solange sich die Proben im Sammelgel befinden, danach wurde die Spannung auf 150 V im Trenngel erhöht.

Zum Nachweis der Bindung von N-VP-DAAc wurde das Gemisch direkt 1:1 mit SDS-Auftragspuffer versetzt und in der Gelelektrophorese eingesetzt.

<b>10fach TGS-Puffer:</b>	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
	pH-Wert 8,3	

<b>SDS-Auftragspuffer:</b>	Tris	25 mM
	Tris HCl	20 mM
	EDTA	2 mM
	SDS	5 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
	Glycerin	10 %

Die Gele wurden anschließend nach der Silbermethode gefärbt. Die einzelnen Schritte sind nachfolgend aufgeführt, die Färbung erfolgte auf einem Schütteltisch:

- Gel 30 min in Fixierlösung inkubieren
- Zweimal mit ddH<sub>2</sub>O spülen
- 2,5 min in Farmers Reducer inkubieren
- Gel solange mit ddH<sub>2</sub>O entfärben, bis keine gelbe Hintergrundfärbung mehr sichtbar ist
- 30 min in 0,1 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>-Lösung färben
- Zweimal 30 s mit ddH<sub>2</sub>O waschen
- Kurz mit 2,5 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung spülen
- Das Gel solange in Formaldehydlösung entwickeln, bis braune Proteinbanden gut sichtbar sind
- Abstoppen der Färbung durch 15 min Inkubation in 5 % Essigsäure (v/v)

Das Gel kann für mehrere Tage in Wasser gelagert werden. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

<b>Fixierlösung:</b>	Essigsäure	100 ml
	EtOH	400 ml
	ddH <sub>2</sub> O ad	400 ml

**Farmers Reducer Lösung:** eine Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat III  
eine Spatelspitze Natriumthiosulfat  
auf 100 ml ddH<sub>2</sub>O auffüllen

**Formaldehydlösung:** 0,2 % (v/v) konz. Formaldehydlösung (37 %)  
2,5 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung

## 6.5 Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotika/Antibiotikum
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AM	Acetoxymethylester
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ACT	Autologe-Chondrozyten-Transplantation
BCA	Bicinchoninsäure
BMP	bone morphogenetic protein
BMSCs	bone marrow stroma cells
BSP	bone sialo protein
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
d. h.	dass heißt
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Eppendorf-Reaktions-Gefäß
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDFs	growth and differentiation factors
GMP	good manufacturing practice
HA	Hydroxylapatit
HSCs	hematopoietic stem cells
HPLC	high performance liquid chromatography

---

IL-4	Interleukin-4
kDa	kilo Dalton
Kol I	Kollagen I
Kol II	Kollagen II
l	Liter
M	molar
MeOH	Methanol
mRNA	messenger RNA
MSCs	mesenchymal stem cells
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
NaOH	Natriumhydroxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OC	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PGA	Polyglykolsäure
PLA	Poly(L-Milchsäure)
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RGD	Arginin Glycin Asparaginsäure
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
RWVR	rotating wall vessel reactor
SDS	natriumdodecylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	transforming growth factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Maß für Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
U ·min <sup>-1</sup>	Umdrehungen pro Minute
z. B.	zum Beispiel

Für Längen-, Massen-, Stoffmengen- und Zeitangaben werden SI-Einheiten verwendet sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI-Einheiten nach DIN 1301.

## 6.6 Geräte und Reagenzien

Gerät	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese, Classic ISSU1214	Thermo Electron, Dreieich
Array Scanner 428 <sup>TM</sup>	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
Autoklav FV5/3	Integra Biosciences, Fernwald
BIOSTAT <sup>®</sup> Bplus RBS 500	Sartorius BBI Systems, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Digitalkamera	Olympus, Puchheim
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage, Analytica AC210S	Sartorius AG, Göttingen
FastPrep <sup>®</sup> Instrument FP120	Qbiogene, Heidelberg
Gelkammer Thermo Classic CSSU1214	Thermo Electron GmbH, Dreieich
GeneQuant pro RNA/DNA Calculator	Biochrom Ltd., Cambridge
Hybridisierungsöfen	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Kollagen-Matrix	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck
Kühl/Gefrierkombination	Bosch, Stuttgart
Lichtmikroskop	Axiophot, Zeiss Deutschland
UV/Vis Spektrometer Uvikon 922	Kontron Instruments, Eching
Magnetrühr-Heizplatte Typ RCT b	IKA Werke GmbH, Staufen
Mikrowelle Typ M1727N	Samsung Electronics GmbH, Schwalbach
Px2 PCR-Thermocycler	Thermo Electron, Dreieich
Phasenkontrastmikroskope	Olympus BX, Japan
	Olympus IX 50, Japan
pH-Elektrode, Checker	Hanna Instruments, USA
Plattenfluorimeter, Fluoroskan	Thermo Electron, Dreieich
Plattenlesegerät, Microplate Reader	Biorad, München
SDS-Gelelektrophorese	Amersham Biosciences, USA und Biorad, München
Sponceram <sup>®</sup>	Zellwerk GmbH, Oberkrämer
Sterilbank 2F150-II GS	Integra Biosciences, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Transilluminator UVT-20 S/W	Herolab GmbH, Heidelberg
Ultramikrotom E	Reichert-Jung, Nußloch

Ultramikrotom 2040	Reichert-Jung, Nußloch
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Bandelin electronic, Berlin
UV-Tisch	Roth, Karlsruhe
UV/Vis Spektrometer Uvikon 922	Kontron Instruments, Eching
Vortex-Mixer Typ 1719	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Sartorius AG, Göttingen
Wechselblock für 4 Slides	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5415R (gekühlt)	Eppendorf AG, Hamburg

### Verbrauchsmaterial

6-Lochplatten	Sarstedt, Nümbrecht
96-Lochplatten	Sarstedt, Nümbrecht
cDNA labeling Kit (DNA-Chip)	Qiagen, Hilden
Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Protein-Bestimmungs-Kit	Pierce, USA
PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
RNA-Isolations-Kit	Promega, Mannheim
Spritzen	Terumo, Belgien
Sterilfilter (0,22 µm)	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht

### Hersteller

### Reagenzien

Alle hier aufgeführten Chemikalien und Reagenzien hatten, falls nicht anders angegeben, den kommerziell höchsterhältlichen Reinheitsgrad.

### Reagenzien

Agarose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Alizarinrot	Fluka, Seelze
Antibiotika	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Ascorbinsäure	Fluka, Seelze
BMP-2	Spende von Prof. Sebald, Universität Würzburg

### Hersteller

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cacodylatpuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Coomassie <sup>TM</sup> Blue R-350	Amersham Bioscience Europe GmbH, Freiburg
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dexamethason	Fluka, Seelze
Diethanolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA-Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DMEM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DMSO	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eosin-Phloxin	Merck, Darmstadt
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt
Ethanol, abs, reinst	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerin	Fluka, Seelze
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\beta$ -Glycerolphosphat	Fluka, Seelze
Kaliumhexacyanoferrat III	Fluka, Seelze
Lichtgrün	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Fluka, Seelze
$\beta$ -Mercaptoethanol	Fluka, Seelze
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumcarbonat	Fluka, Seelze
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumthiosulfat	Fluka, Seelze
Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Oligo-dT-Primer (20 $\mu$ M)	Qiagen, Hilden
O'RangeRuler <sup>TM</sup> 500 bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PicoGreen	Molecular Probes, USA
PCR-Primer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe und MWG, Ebersberg

---

p-Nitrophenylphosphat	Fluka, Seelze
Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
RGD-Peptid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNA Molecular Weight Marker I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase A	Fluka, Seelze
Saccharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Safranin O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Silbernitrat	Fluka, Seelze
RNaseZAP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
TGF- $\beta$	Tebu-bio, Offenbach
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (SSC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-Puffer	Fluka, Seelze
Triton-X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin (10fach)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vitro-Clud <sup>®</sup>	R. Langenbrinck, Emmerdingen

## Literaturverzeichnis

- [Abu-Amer und Tondravi 1997] ABU-AMER, Y. ; TONDRAVI, M. M.: NF-kappaB and bone: the breaking point. In: *Nat Med* 3 (1997), Nr. 11, S. 1189–90
- [Altman u. a. 2002] ALTMAN, G. H. ; HORAN, R. L. ; MARTIN, I. ; FARHADI, J. ; STARK, P. R. ; VOLLOCH, V. ; RICHMOND, J. C. ; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. ; KAPLAN, D. L.: Cell differentiation by mechanical stress. In: *Faseb J* 16 (2002), Nr. 2, S. 270–2
- [Arinze u. a. 2005] ARINZE, T. L. ; TRAN, T. ; MCALARY, J. ; DACULSI, G.: A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. In: *Biomaterials* 26 (2005), Nr. 17, S. 3631–8
- [Aubin 1998] AUBIN, J. E.: Advances in the osteoblast lineage. In: *Biochem Cell Biol* 76 (1998), Nr. 6, S. 899–910
- [Aubin 1996] AUBIN, J.E.: The Osteoblastic Lineage. In: *Principle of Bone Biology*. New York : Academia Press, 1996, S. 51–67
- [Avrameas 1969] AVRAMEAS, S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies. In: *Immunochemistry* 6 (1969), Nr. 1, S. 43–52
- [Balint u. a. 2003] BALINT, E. ; LAPOINTE, D. ; DRISSI, H. ; VAN DER MEIJDEN, C. ; YOUNG, D. W. ; VAN WIJNEN, A. J. ; STEIN, J. L. ; STEIN, G. S. ; LIAN, J. B.: Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. In: *J Cell Biochem* 89 (2003), Nr. 2, S. 401–26
- [Bancroft u. a. 2003] BANCROFT, G. N. ; SIKAVITSAS, V. I. ; MIKOS, A. G.: Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. In: *Tissue Eng* 9 (2003), Nr. 3, S. 549–54
- [Barnes 1975] BARNES, M. J.: Function of ascorbic acid in collagen metabolism. In: *Ann N Y Acad Sci* 258 (1975), S. 264–77
- [Bennett u. a. 1991] BENNETT, J. H. ; JOYNER, C. J. ; TRIFFITT, J. T. ; OWEN, M. E.: Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. In: *J Cell Sci* 99 (1991), S. 131–9
- [Benya u. a. 1978] BENYA, P. D. ; PADILLA, S. R. ; NIMNI, M. E.: Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. In: *Cell* 15 (1978), Nr. 4, S. 1313–21

- [Blunk u. a. 2002] BLUNK, T. ; SIEMINSKI, A. L. ; GOOCH, K. J. ; COURTER, D. L. ; HOLLANDER, A. P. ; NAHIR, A. M. ; LANGER, R. ; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. ; FREED, L. E.: Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage. In: *Tissue Eng* 8 (2002), Nr. 1, S. 73–84
- [Breckon u. a. 1999] BRECKON, J. J. ; PAPAIOANNOU, S. ; KON, L. W. ; TUMBER, A. ; HEMBRY, R. M. ; MURPHY, G. ; REYNOLDS, J. J. ; MEIKLE, M. C.: Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro. In: *J Bone Miner Res* 14 (1999), Nr. 11, S. 1880–90
- [Brittberg u. a. 1994] BRITTBERG, M. ; LINDAHL, A. ; NILSSON, A. ; OHLSSON, C. ; ISAKSSON, O. ; PETERSON, L.: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. In: *New Eng J Med* 331 (1994), Nr. 14, S. 889–95
- [Bruder u. a. 1997] BRUDER, S. P. ; JAISWAL, N. ; HAYNESWORTH, S. E.: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. In: *J Cell Biochem* 64 (1997), Nr. 2, S. 278–94
- [Bruder u. a. 1998] BRUDER, S. P. ; KRAUS, K. H. ; GOLDBERG, V. M. ; KADIYALA, S.: The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. In: *J Bone Joint Surg Am* 80 (1998), Nr. 7, S. 985–96
- [Bu u. a. 2003] BU, R. ; BORYSENKO, C. W. ; LI, Y. ; CAO, L. ; SABOKBAR, A. ; BLAIR, H. C.: Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. In: *Bone* 33 (2003), Nr. 5, S. 760–70
- [Buckwalter 1983] BUCKWALTER, J. A.: Articular cartilage. In: *Instr Course Lect* 32 (1983), S. 349–70
- [Burg u. a. 2000] BURG, K. J. L. ; PORTER, S. ; KELLAM, J. F.: Biomaterial developments for bone tissue engineering. In: *Biomaterials* 21 (2000), Nr. 23, S. 2347–2359
- [Canalis u. a. 2003] CANALIS, E. ; ECONOMIDES, A. N. ; GAZZERRO, E.: Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. In: *Endocr Rev* 24 (2003), Nr. 2, S. 218–35
- [Caplan und Bruder 2001] CAPLAN, A. I. ; BRUDER, S. P.: Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. In: *Trends Mol Med* 7 (2001), Nr. 6, S. 259–64
- [Chaplin und Grace 1975] CHAPLIN, A. J. ; GRACE, S. R.: Calcium oxalate and the von Kossa method with reference to the influence of citric acid. In: *Histochem J* 7 (1975), Nr. 5, S. 451–8

- [Chu u. a. 1995] CHU, C. R. ; COUTTS, R. D. ; YOSHIOKA, M. ; HARWOOD, F. L. ; MONOSOV, A. Z. ; AMIEL, D.: Articular cartilage repair using allogeneic perichondrocyte-seeded biodegradable porous polylactic acid (PLA): a tissue-engineering study. In: *J Biomed Mater Res* 29 (1995), Nr. 9, S. 1147–54
- [Colter u. a. 2000] COLTER, D. C. ; CLASS, R. ; DIGIROLAMO, C. M. ; PROCKOP, D. J.: Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000), Nr. 7, S. 3213–8
- [Digirolamo u. a. 1999] DIGIROLAMO, C. M. ; STOKES, D. ; COLTER, D. ; PHINNEY, D. G. ; CLASS, R. ; PROCKOP, D. J.: Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. In: *Br J Haematol* 107 (1999), Nr. 2, S. 275–81
- [Droppert 1990] DROPPERT, P. M.: The effects of microgravity on the skeletal system—a review. In: *J Br Interplanet Soc* 43 (1990), Nr. 1, S. 19–24
- [Elisseeff u. a. 2001] ELISSEEFF, J. ; MCINTOSH, W. ; FU, K. ; BLUNK, B. T. ; LANGER, R.: Controlled-release of IGF-I and TGF-beta1 in a photopolymerizing hydrogel for cartilage tissue engineering. In: *J Orthop Res* 19 (2001), Nr. 6, S. 1098–104
- [Eyre 2002] EYRE, D.: Collagen of articular cartilage. In: *Arthritis Res* 4 (2002), Nr. 1, S. 30–5
- [Fassina u. a. 2005] FASSINA, L. ; VISAI, L. ; ASTI, L. ; BENAZZO, F. ; SPEZIALE, P. ; TANZI, M. C. ; MAGENES, G.: Calcified matrix production by SAOS-2 cells inside a polyurethane porous scaffold, using a perfusion bioreactor. In: *Tissue Eng* 11 (2005), Nr. 5-6, S. 685–700
- [Feldman u. a. 1975] FELDMAN, D. ; DZIAK, R. ; KOEHLER, R. ; STERN, P.: Cytoplasmic glucocorticoid binding proteins in bone cells. In: *Endocrinology* 96 (1975), Nr. 1, S. 29–36
- [Fischer u. a. 2003] FISCHER, E. M. ; LAYROLLE, P. ; VAN BLITTERSWIJK, C. A. ; DE BRUIJN, J. D.: Bone formation by mesenchymal progenitor cells cultured on dense and microporous hydroxyapatite particles. In: *Tissue Eng* 9 (2003), Nr. 6, S. 1179–88
- [Fischer 2005] FISCHER, M.: *Grundlegende Untersuchungen des Einflusses von BMP-2 auf Wachstum und Differenzierung von Fibroblasten*, Hannover, Diplomarbeit, 2005
- [Freed u. a. 1993] FREED, L. E. ; MARQUIS, J. C. ; NOHRIA, A. ; EMMANUAL, J. ; MIKOS, A. G. ; LANGER, R.: Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. In: *J Biomed Mater Res* 27 (1993), Nr. 1, S. 11–23

- [Freed und Vunjak-Novakovic 1997] FREED, L. E. ; VUNJAK-NOVAKOVIC, G.: Microgravity tissue engineering. In: *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 33 (1997), Nr. 5, S. 381–5
- [Frondoza u. a. 1996] FRONDOZA, C. ; SOHRABI, A. ; HUNGERFORD, D.: Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture. In: *Biomaterials* 17 (1996), Nr. 9, S. 879–88
- [Ganss u. a. 1999] GANSS, B. ; KIM, R. H. ; SODEK, J.: Bone sialoprotein. In: *Crit Rev Oral Biol Med* 10 (1999), Nr. 1, S. 79–98
- [Goldstein u. a. 2001] GOLDSTEIN, A. S. ; JUAREZ, T. M. ; HELMKE, C. D. ; GUSTIN, M. C. ; MIKOS, A. G.: Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds. In: *Biomaterials* 22 (2001), Nr. 11, S. 1279–88
- [Guett 2003] GUETT, S.: Collagen zukunftsträchtiges Biomaterial. In: *KI-Magazin* (2003)
- [Gutowska u. a. 2001] GUTOWSKA, A. ; JEONG, B. ; JASIONOWSKI, M.: Injectable gels for tissue engineering. In: *Anat Rec* 263 (2001), Nr. 4, S. 342–9
- [Hauschka u. a. 1989] HAUSCHKA, P. V. ; LIAN, J. B. ; COLE, D. E. ; GUNDBERG, C. M.: Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. In: *Physiol Rev* 69 (1989), Nr. 3, S. 990–1047
- [Hauselmann u. a. 1996] HAUSELMANN, H. J. ; MASUDA, K. ; HUNZIKER, E. B. ; NEIDHART, M. ; MOK, S. S. ; MICHEL, B. A. ; THONAR, E. J.: Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. In: *Am J Physiol* 271 (1996), Nr. 3 Pt 1, S. C742–52
- [Heng u. a. 2004] HENG, B. C. ; CAO, T. ; STANTON, L. W. ; ROBSON, P. ; OLSEN, B.: Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. In: *J Bone Miner Res* 19 (2004), Nr. 9, S. 1379–94
- [Hersel u. a. 2003] HERSEL, U. ; DAHMEN, C. ; KESSLER, H.: RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. In: *Biomaterials* 24 (2003), Nr. 24, S. 4385–415
- [Hildebrandt 2005] HILDEBRANDT, C.: *Kultivierung von Knochenzellen verschiedener Herkunft und Analyse des Differenzierungsmusters*, Hannover, Diplomarbeit, 2005
- [Hollinger u. a. 1998] HOLLINGER, J. O. ; SCHMITT, J. M. ; BUCK, D. C. ; SHANNON, R. ; JOH, S. P. ; ZEGZULA, H. D. ; WOZNEY, J.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration. In: *J Biomed Mater Res* 43 (1998), Nr. 4, S. 356–64

- [Hubbell 1995] HUBBELL, J. A.: Biomaterials in tissue engineering. In: *Biotechnology* 13 (1995), Nr. 6, S. 565–76
- [Hutmacher u. a. 2000] HUTMACHER, D. W. ; TEOH, S. H. ; ZEIN, I. ; RANAWAKE, M. ; LAU, S.: Tissue engineering research: the engineer's role. In: *Med Device Technol* 11 (2000), Nr. 1, S. 33–9
- [Ishaug-Riley u. a. 1997] ISHAUG-RILEY, S. L. ; CRANE, G. M. ; GURLEK, A. ; MILLER, M. J. ; YASKO, A. W. ; YASZEMSKI, M. J. ; MIKOS, A. G.: Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery. In: *J Biomed Mater Res* 36 (1997), Nr. 1, S. 1–8
- [Ishaug-Riley u. a. 1998] ISHAUG-RILEY, S. L. ; CRANE-KRUGER, G. M. ; YASZEMSKI, M. J. ; MIKOS, A. G.: Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. In: *Biomaterials* 19 (1998), Nr. 15, S. 1405–12
- [Janssens u. a. 2005] JANSSENS, K. ; TEN DIJKE, P. ; JANSSENS, S. ; VAN HUL, W.: TGF-beta1 to the bone. In: *Endocr Rev* (2005)
- [Jorgensen u. a. 2004] JORGENSEN, N. R. ; HENRIKSEN, Z. ; SORENSEN, O. H. ; CIVITELLI, R.: Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. In: *Steroids* 69 (2004), Nr. 4, S. 219–26
- [Kaps u. a. 2004] KAPS, C. ; FUCHS, M. ; VETTERLEIN, S. ; KRENN, V. ; PERKA, C. ; SITTINGER, M.: Molekulare Charakterisierung von gezüchteten humanen dreidimensionalen Chondrozytentransplantaten. In: *Orthopaedie* 33 (2004), S. 76–84
- [Karsenty 1999] KARSENTY, G.: The genetic transformation of bone biology. In: *Genes Dev* 13 (1999), Nr. 23, S. 3037–51
- [Kim u. a. 2000] KIM, B. S. ; BAEZ, C. E. ; ATALA, A.: Biomaterials for tissue engineering. In: *World J Urol* 18 (2000), Nr. 1, S. 2–9
- [Kiseleva u. a. 1981] KISELEVA, E. M. ; TENNIKOVA, T. B. ; MOSKVICHEV, B. V.: Effect of polymeric modification on specific properties of soya bean inhibitor. In: *Biokhimiia* 46 (1981), Nr. 7, S. 1188–93
- [Langer und Vacanti 1993] LANGER, R. ; VACANTI, J. P.: Tissue engineering. In: *Science* 260 (1993), Nr. 5110, S. 920–6
- [Lesley 2002] LESLEY, Hyman R. Kincade P. W.: CD44 and its interaction with extracellular matrix. In: *Adv Immunol* (2002), Nr. 54, S. 271–335

- [Logeart-Avramoglou u. a. 2005] LOGEART-AVRAMOGLU, D. ; ANAGNOSTOU, F. ; BIZIOS, R. ; PETITE, H.: Engineering bone: challenges and obstacles. In: *J Cell Mol Med* 9 (2005), Nr. 1, S. 72–84
- [Lu u. a. 2001] LU, L. ; YASZEMSKI, M. J. ; MIKOS, A. G.: TGF-beta1 release from biodegradable polymer microparticles: its effects on marrow stromal osteoblast function. In: *J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1 (2001), Nr. Pt 2, S. S82–91
- [Mackay u. a. 1998] MACKAY, A. M. ; BECK, S. C. ; MURPHY, J. M. ; BARRY, F. P. ; CHICHESTER, C. O. ; PITTENGER, M. F.: Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. In: *Tissue Eng* 4 (1998), Nr. 4, S. 415–28
- [Marletta u. a. 2005] MARLETTA, G. ; CIAPETTI, G. ; SATRIANO, C. ; PAGANI, S. ; BALDINI, N.: The effect of irradiation modification and RGD sequence adsorption on the response of human osteoblasts to polycaprolactone. In: *Biomaterials* 26 (2005), Nr. 23, S. 4793–804
- [Martin u. a. 2004] MARTIN, I. ; WENDT, D. ; HEBERER, M.: The role of bioreactors in tissue engineering. In: *Trends Biotechnol* 22 (2004), Nr. 2, S. 80–6
- [Massague 1998] MASSAGUE, J.: TGF-beta signal transduction. In: *Annu Rev Biochem* 67 (1998), S. 753–91
- [Massague u. a. 1994] MASSAGUE, J. ; ATTISANO, L. ; WRANA, J. L.: The TGF-beta family and its composite receptors. In: *Trends Cell Biol* 4 (1994), Nr. 5, S. 172–8
- [Mattioli-Belmonte u. a. 1999] MATTIOLI-BELMONTE, M. ; GIGANTE, A. ; MUZZARELLI, R. A. ; POLITANO, R. ; DE BENEDITTIS, A. ; SPECCHIA, N. ; BUFFA, A. ; BIAGINI, G. ; GRECO, F.: N,N-dicarboxymethyl chitosan as delivery agent for bone morphogenetic protein in the repair of articular cartilage. In: *Med Biol Eng Comput* 37 (1999), Nr. 1, S. 130–4
- [Mauck u. a. 2003] MAUCK, R. L. ; NICOLL, S. B. ; SEYHAN, S. L. ; ATESHIAN, G. A. ; HUNG, C. T.: Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering. In: *Tissue Eng* 9 (2003), Nr. 4, S. 597–611
- [Mets und Verdonk 1981] METS, T. ; VERDONK, G.: In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. In: *Mech Ageing Dev* 16 (1981), Nr. 1, S. 81–9
- [Moulinex 1984] MOULINEX, J.P.: *Water Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behaviour*. Bd. 1. 1984

- [Nettles u. a. 2002] NETTLES, D. L. ; ELDER, S. H. ; GILBERT, J. A.: Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. In: *Tissue Eng* 8 (2002), Nr. 6, S. 1009–16
- [Ogata u. a. 2005] OGATA, K. ; IMAZATO, S. ; EHARA, A. ; EBISU, S. ; KINOMOTO, Y. ; NAKANO, T. ; UMAKOSHI, Y.: Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. In: *J Biomed Mater Res A* 72 (2005), Nr. 2, S. 127–35
- [Olmsted u. a. 2001] OLMSTED, E. A. ; BLUM, J. S. ; RILL, D. ; YOTNDA, P. ; GUGALA, Z. ; LINDSEY, R. W. ; DAVIS, A. R.: Adenovirus-mediated BMP2 expression in human bone marrow stromal cells. In: *J Cell Biochem* 82 (2001), Nr. 1, S. 11–21
- [Owen u. a. 1990] OWEN, T. A. ; ARONOW, M. ; SHALHOUB, V. ; BARONE, L. M. ; WILMING, L. ; TASSINARI, M. S. ; KENNEDY, M. B. ; POCKWINSE, S. ; LIAN, J. B. ; STEIN, G. S.: 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. In: *J Cell Physiol* 143 (1990), Nr. 3, S. 420–30
- [Paige u. a. 1996] PAIGE, K. T. ; CIMA, L. G. ; YAREMCHUK, M. J. ; SCHLOO, B. L. ; VACANTI, J. P. ; VACANTI, C. A.: De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. In: *Plast Reconstr Surg* 97 (1996), Nr. 1, S. 168–78; discussion 179–80
- [Panarin u. a. 1996] PANARIN, E. F. ; BAIKOV, V. E. ; TIMOFEEVSKY, S. L. ; NEZHENTSEV, M. V. ; VINOGRADOV, O. V. ; KALININ, G. V.: Polymer derivatives of glucocorticoid hormones. In: *Macromol Symp* 103 (1996), S. 229–242
- [Pemawansa und Khan 2002] PEMAWANSA, K. P. ; KHAN, I. M.: Non-covalent adducts of sodium poly(alpha,L-glutamate) with poly(N-vinyl pyrrolidone): Methods of preparation and characterization of structure. In: *Macromol Biosci* 2 (2002), Nr. 4, S. 170–178
- [Petrides 1997] PETRIDES, P.E.: Binde- und Stuetzgewebe. In: LOEFFLER, G. (Hrsg.) ; PETRIDES, P.E. (Hrsg.): *Biochemie und Pathobiochemie* Bd. 5. Auflage. Springer, 1997, S. 734–759
- [Pierschbacher und Ruoslahti 1984] PIERSCHBACHER, M. D. ; RUOSLAHTI, E.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. In: *Nature* 309 (1984), Nr. 5963, S. 30–3

- [Pittenger u. a. 1999] PITTENGER, M. F. ; MACKAY, A. M. ; BECK, S. C. ; JAISWAL, R. K. ; DOUGLAS, R. ; MOSCA, J. D. ; MOORMAN, M. A. ; SIMONETTI, D. W. ; CRAIG, S. ; MARSHAK, D. R.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science* 284 (1999), Nr. 5411, S. 143–7
- [Plow u. a. 2000] PLOW, E. F. ; HAAS, T. A. ; ZHANG, L. ; LOFTUS, J. ; SMITH, J. W.: Ligand binding to integrins. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 29, S. 21785–8
- [Pulat u. a. 2003] PULAT, M. ; MEMIS, E. ; GUMUSDERELIOGLU, M.: Adsorption of bovine serum albumin onto surface-modified polyhydroxyethyl methacrylate beads. In: *J Biomater Appl* 17 (2003), Nr. 3, S. 237–48
- [Qiu u. a. 1999] QIU, Q. Q. ; DUCHEYNE, P. ; AYYASWAMY, P. S.: Fabrication, characterization and evaluation of bioceramic hollow microspheres used as microcarriers for 3-D bone tissue formation in rotating bioreactors. In: *Biomaterials* 20 (1999), Nr. 11, S. 989–1001
- [Ranucci u. a. 2000] RANUCCI, E. ; TARABIC, M. ; GILBERTI, M. ; ALBERTSSON, A. C.: New ester and lactone end-functionalized N-vinyl-2-pyrrolidinone oligomers. In: *Macromolecular Chemistry and Physics* 201 (2000), Nr. 12, S. 1219–1225
- [Roelen und Dijke 2003] ROELEN, B. A. ; DIJKE, P.: Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF-Beta family members. In: *J Orthop Sci* 8 (2003), Nr. 5, S. 740–8
- [Rose und Oreffo 2002] ROSE, F. R. ; OREFFO, R. O.: Bone tissue engineering: hope vs hype. In: *Biochem Biophys Res Commun* 292 (2002), Nr. 1, S. 1–7
- [Saito und Takaoka 2003] SAITO, N. ; TAKAOKA, K.: New synthetic biodegradable polymers as BMP carriers for bone tissue engineering. In: *Biomaterials* 24 (2003), Nr. 13, S. 2287–93
- [Salgado u. a. 2004] SALGADO, A.J. ; COUTINHO, O.P. ; REIS, R.L.: Bone tissue engineering: state of the art and future trends. In: *Macromol Biosci* 4 (2004), Nr. 8, S. 743–65
- [Saltzman und Baldwin 1998] SALTZMAN, W. M. ; BALDWIN, S. P.: Materials for protein delivery in tissue engineering. In: *Adv Drug Deliv Rev* 33 (1998), Nr. 1-2, S. 71–86
- [Samanta und Kessler 2004] SAMANTA, J. ; KESSLER, J. A.: Interactions between ID and OLIG proteins mediate the inhibitory effects of BMP4 on oligodendroglial differentiation. In: *Development* 131 (2004), Nr. 17, S. 4131–42

- [Scheda u. a. 1998] SCHEDEA, M. ; HELLER, R. A. ; THERIAULT, T. P. ; KONRAD, K. ; LACHENMAEIER, E. ; DAVIS, R. W.: Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. In: *Trends Biotechnol* 16 (1998), Nr. 7, S. 301–6
- [Scheufler u. a. 1999] SCHEUFLER, C. ; SEBALD, W. ; HULSMEYER, M.: Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. In: *J Mol Biol* 287 (1999), Nr. 1, S. 103–15
- [Schwarz u. a. 1992] SCHWARZ, R. P. ; GOODWIN, T. J. ; WOLF, D. A.: Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. In: *J Tissue Cult Methods* 14 (1992), Nr. 2, S. 51–7
- [Sebald u. a. 2004] SEBALD, W. ; NICKEL, J. ; ZHANG, J. L. ; MUELLER, T. D.: Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. In: *Biol Chem* 385 (2004), Nr. 8, S. 697–710
- [Shin u. a. 2005] SHIN, H. ; TEMENOFF, J. S. ; BOWDEN, G. C. ; ZYGOURAKIS, K. ; FARACH-CARSON, M. C. ; YASZEMSKI, M. J. ; MIKOS, A. G.: Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells cultured on Arg-Gly-Asp modified hydrogels without dexamethasone and beta-glycerol phosphate. In: *Biomaterials* 26 (2005), Nr. 17, S. 3645–54
- [Shu u. a. 2003] SHU, R. ; MCMULLEN, R. ; BAUMANN, M. J. ; MCCABE, L. R.: Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. In: *J Biomed Mater Res A* 67 (2003), Nr. 4, S. 1196–204
- [Sikavitsas u. a. 2003] SIKAVITSAS, V. I. ; BANCROFT, G. N. ; HOLTORF, H. L. ; JANSEN, J. A. ; MIKOS, A. G.: Mineralized matrix deposition by marrow stromal osteoblasts in 3D perfusion culture increases with increasing fluid shear forces. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 25, S. 14683–8
- [Sikavitsas u. a. 2002] SIKAVITSAS, V. I. ; BANCROFT, G. N. ; MIKOS, A. G.: Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. In: *J Biomed Mater Res* 62 (2002), Nr. 1, S. 136–48
- [Sikavitsas u. a. 2001] SIKAVITSAS, V. I. ; TEMENOFF, J. S. ; MIKOS, A. G.: Biomaterials and bone mechanotransduction. In: *Biomaterials* 22 (2001), Nr. 19, S. 2581–93
- [Sinha u. a. 2002] SINHA, R. K. ; SHAH, S. A. ; HUME, E. L. ; TUAN, R. S.: The effect of a 5-day space flight on the immature rat spine. In: *Spine J* 2 (2002), Nr. 4, S. 239–43

- [Solovskij und Panarin 1999] SOLOVSKIJ, M. ; PANARIN, E.: Polymer water-soluble derivatives of polypeptide antibiotic, gramicidin-S based on reactive copolymers of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide. In: *Journal of Controlled Release* 58 (1999), Nr. 1, S. 1–8
- [Solovskij u. a. 1996] SOLOVSKIJ, M. V. ; DENISOV, V. M. ; PANARIN, E. F. ; PETUKHOVA, N. A. ; PURKINA, A. V.: Synthesis of water-soluble biologically active phenol (or catechol) containing copolymers of N-vinyl-2-pyrrolidone. In: *Macromolecular Chemistry and Physics* 197 (1996), Nr. 6, S. 2035–2046
- [Stark 2004] STARK, Y.: *Einsatz von Kollagenmatrices im Tissue engineering*, Hannover, Diplomarbeit, 2004
- [Stark u. a. 2005] STARK, Y. ; SUCK, K. ; KASPER, C. ; WIELAND, M. ; VAN GRIENSVEN, M. ; SCHEPER, T.: Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering (im Druck). In: *Exp Toxicol Pathol* (2005)
- [Suck u. a. 2005] SUCK, K. ; KASPER, C. ; HILDEBRANDT, C. ; DIEDERICH, S. ; FISCHER, M. ; SCHEPER, T. ; VAN GRIENSVEN, M.: Cultivating cells of different origin for 3D bone constructs considering physiological conditions (im Druck). In: SMITH, R. (Hrsg.): *ESACT PROC: Cell Technology Processes for Cell Products*. Springer, 2005
- [Suda u. a. 1999] SUDA, T. ; TAKAHASHI, N. ; UDAGAWA, N. ; JIMI, E. ; GILLESPIE, M. T. ; MARTIN, T. J.: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. In: *Endocr Rev* 20 (1999), Nr. 3, S. 345–57
- [Sudo u. a. 1983] SUDO, H. ; KODAMA, H. A. ; AMAGAI, Y. ; YAMAMOTO, S. ; KASAI, S.: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. In: *J Cell Biol* 96 (1983), Nr. 1, S. 191–8
- [Suh und Matthew 2000] SUH, J. K. ; MATTHEW, H. W.: Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. In: *Biomaterials* 21 (2000), Nr. 24, S. 2589–98
- [Tabata 2003] TABATA, Y.: Tissue regeneration based on growth factor release. In: *Tissue Eng* 9 Suppl 1 (2003), S. S5–15
- [Takaoka u. a. 1991] TAKAOKA, K. ; KOEZUKA, M. ; NAKAHARA, H.: Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein. In: *J Orthop Res* 9 (1991), Nr. 6, S. 902–7

- [Takuwa u. a. 1991] TAKUWA, Y. ; OHSE, C. ; WANG, E. A. ; WOZNEY, J. M. ; YAMASHITA, K.: Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. In: *Biochem Biophys Res Commun* 174 (1991), Nr. 1, S. 96–101
- [Temenoff und Mikos 2000] TEMENOFF, JS ; MIKOS, AG: Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. In: *Biomaterials* 21 (2000), Nr. 23, S. 2405–2412
- [Tenenbaum 1981] TENENBAUM, H. C.: Role of organic phosphate in mineralization of bone in vitro. In: *J Dent Res* 60 Spec No C (1981), S. 1586–9
- [Tennikova u. a. 1980] TENNIKOVA, T. B. ; MOSKVICHEV, B. V. ; SAMSONOV, G. V.: Study of the Physicochemical Properties of the Proteolytic-Enzyme Terrilytin, Modified by a Co-Polymer Based on Vinylpyrrolidone. In: *Biochemistry-Moscow* 45 (1980), Nr. 3, S. 328–336
- [Urist 1965] URIST, M. R.: Bone: formation by autoinduction. In: *Science* 150 (1965), Nr. 698, S. 893–9
- [Urist und Strates 1971] URIST, M. R. ; STRATES, B. S.: Bone morphogenetic protein. In: *J Dent Res* 50 (1971), Nr. 6, S. 1392–406
- [Vacanti und Upton 1994] VACANTI, C. A. ; UPTON, J.: Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. In: *Clin Plast Surg* 21 (1994), Nr. 3, S. 445–62
- [van Griensven u. a. 2002] VAN GRIENSVEN, M. ; ZEICHEN, J. ; TSCHERNIG, T. ; SEEKAMP, A. ; PAPE, H. C.: A modified method to culture human osteoblasts from bone tissue specimens using fibrin glue. In: *Exp Toxicol Pathol* 54 (2002), Nr. 1, S. 25–9
- [Vlakh u. a. 2005] VLAKH, E. G. ; PANARIN, E. F. ; TENNIKOVA, T. B. ; SUCK, K. ; KASPER, C.: Development of multifunctional polymer-mineral composite materials for bone tissue engineering. In: *J Biomed Mater Res A* 75 (2005), Nr. 2, S. 333–41
- [Vunjak-Novakovic u. a. 1996] VUNJAK-NOVAKOVIC, G. ; FREED, L. E. ; BIRON, R. J. ; LANGER, R.: Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage. In: *AIChE J.* 42 (1996), S. 850–860
- [Wang u. a. 2003] WANG, Y. ; UEMURA, T. ; DONG, J. ; KOJIMA, H. ; TANAKA, J. ; TATEISHI, T.: Application of perfusion culture system improves in vitro and in vivo osteogenesis of bone marrow-derived osteoblastic cells in porous ceramic materials. In: *Tissue Eng* 9 (2003), Nr. 6, S. 1205–14

- [Weber u. a. 1996] WEBER, G. F. ; ASHKAR, S. ; GLIMCHER, M. J. ; CANTOR, H.: Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). In: *Science* 271 (1996), Nr. 5248, S. 509–12
- [Wiemann u. a. 2002] WIEMANN, M. ; JENNISSEN, H. P. ; RUMPF, H. ; WINKLER, L. ; CHATZINIKOLAIDOU, M. ; SCHMITZ, I. ; BINGMANN, D.: A reporter-cell assay for the detection of BMP-2 immobilized on porous and nonporous materials. In: *J Biomed Mater Res* 62 (2002), Nr. 1, S. 119–27
- [Wozney u. a. 1988] WOZNEY, J. M. ; ROSEN, V. ; CELESTE, A. J. ; MITSOCK, L. M. ; WHITTERS, M. J. ; KRIZ, R. W. ; HEWICK, R. M. ; WANG, E. A.: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. In: *Science* 242 (1988), Nr. 4885, S. 1528–34
- [Wrana u. a. 1994] WRANA, J. L. ; ATTISANO, L. ; WIESER, R. ; VENTURA, F. ; MASSAGUE, J.: Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. In: *Nature* 370 (1994), Nr. 6488, S. 341–7
- [Yamaguchi u. a. 2000] YAMAGUCHI, A. ; KOMORI, T. ; SUDA, T.: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. In: *Endocr Rev* 21 (2000), Nr. 4, S. 393–411
- [Yang u. a. 2001a] YANG, S. ; LEONG, K. F. ; DU, Z. ; CHUA, C. K.: The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. In: *Tissue Eng* 7 (2001a), Nr. 6, S. 679–89
- [Yang u. a. 2001b] YANG, X. B. ; ROACH, H. I. ; CLARKE, N. M. ; HOWDL, S. M. ; QUIRK, R. ; SHAKESHEFF, K. M. ; OFFREO, R. O.: Human osteoprogenitor growth and differentiation on synthetic biodegradable structures after surface modification. In: *Bone* 29 (2001b), S. 523–31
- [Zhang u. a. 2003] ZHANG, J. Y. ; DOLL, B. A. ; BECKMAN, E. J. ; HOLLINGER, J. O.: Three-dimensional biocompatible ascorbic acid-containing scaffold for bone tissue engineering. In: *Tissue Eng* 9 (2003), Nr. 6, S. 1143–57

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name	Kirstin Suck, geb Kitzler
Geburtsdatum	07.04.1975
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Verheiratet

### **Schulbildung**

1981-1985	Grundschule Neuschönningstedt
1985-1992	Gymnasium Glinde
1992-1994	Gymnasium Klosterschule, Abschluss Abitur

### **Studium**

1995-2002	Studium der Biochemie, Universität Hannover
2002-2005	Doktorand im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover