

Dynamische Kultivierungsmethoden für das *Tissue*
Engineering von Knochen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

Dipl.-Biochem. Solvig Diederichs
geboren am 11.06.1979 in Dresden

2008

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper
Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

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

Tag der Promotion: 03.06.2008

Erklärung

Ich versichere, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Arbeit wurde nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, Juni 2008

Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper und Herrn Prof. Dr. Martijn van Griensven für die Möglichkeit, am TCI eine Promotionsstelle antreten und ein hoch aktuelles Thema bearbeiten zu können. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martijn van Griensven für die nachhaltige Unterstützung in fachlichen Fragen. Frau PD Dr. Cornelia Kasper danke ich für Einsatzbereitschaft und Förderung.

Frau MMag. Anja Peterbauer vom Österreichischen Roten Kreuz in Linz verdanke ich die wunschgemäße und wiederholte Sendung mesenchymaler Stammzellen. Ebenso danke ich ihr für die geduldige Beantwortung meiner Nachfragen.

Herrn Prof. Dr. Hoffmeister und den Mitarbeitern der Zellwerk GmbH danke ich für die Materialbereitstellung und die Möglichkeit, eine Kultivierung in diesem Unternehmen durchzuführen.

Herrn Dr. Wieland von der Dr. Suwelack Skin & Health Care AG danke ich für die freundliche Kooperation und Bereitstellung von Material.

Den Mitarbeitern der Feinmechanikwerkstatt und der Elektronikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover danke ich für Bau und Reparatur der Stimulationsmaschinen und dafür, dass sie immer wieder auf meine Wünsche und Vorstellungen eingegangen sind.

Allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, danke ich, ohne sie hier namentlich aufzuführen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	X
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1. Einleitung	3
2. Aufgabenstellung	5
3. Theoretische Grundlagen	7
3.1. Knochen	7
3.2. <i>Tissue Engineering</i> von Knochen	11
3.2.1. Biomaterialien	11
3.2.2. Biologische Stimuli	13
3.2.3. Zellen	19
3.3. Mesenchymale Stammzellen	20
3.4. Mechanische Stimulation	26
4. Praktische Arbeiten	31
4.1. Analyse der osteogenen Differenzierung	32
4.1.1. Untersuchung der osteogenen Differenzierung mittels DNA-Chip-Technologie	37
4.1.2. Entwicklung eines Protein-Chips zum Nachweis der osteogenen Differenzierung	50
4.2. Mechanische Stimulation	62
4.2.1. Stimulation mesenchymaler Stammzellen auf einer zweidimensionalen Kulturoberfläche	65
4.2.2. Stimulation einer Modellzelllinie in einem dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk	71
4.3. Kultivierung im Bioreaktor	86
4.3.1. Zellwachstum auf Sponceram	87
4.3.2. Funktionalisierung der Oberfläche von Sponceram	89
4.3.3. Kultivierung in einem Drehbettbioreaktor	97
5. Zusammenfassung und Ausblick	113
Literatur	118
Anhang	131

Abbildungsverzeichnis

3.1. Knochenaufbau	9
3.2. Bioreaktoren im <i>Tissue Engineering</i>	15
3.3. Mechanotransduktion	28
4.1. Phasen der osteogenen Differenzierung	33
4.2. adMSCs: Aktivität der Alkalischen Phosphatase	35
4.3. adMSCs: Färbung mineralisierter extrazellulärer Matrix nach von Kossa bzw. mit Alizarinrot	36
4.4. DNA-Chip: Knochen-Knorpel-Chip von MG-63	38
4.5. PCR: Genexpression typischer Knochenmarker in adMSCs (huF 35)	41
4.6. PCR: Genexpression typischer Knochenmarker in MG-63-Zellen	49
4.7. Protein-Chip: Glycidylmethacrylat-co-Ethylenglycoldimethacrylat	51
4.8. Protein-Chip: Immobilisierungsreaktion von Proteinen auf einer Poly(GMA-EDMA)-Oberfläche	52
4.9. Protein-Chip: Schematische Zeichnung des Maus-IgG-Modellsystems und des Nachweissystems für Osteopontin bzw. Kollagen I	53
4.10. Protein-Chip (Maus-IgG): Abhängigkeit des Signals von aufgebrachtter Proteinmenge, <i>Spotting</i> -Puffer und Immobilisierungs-Temperatur	55
4.11. Protein-Chip (Maus-IgG): Verbesserung der Signalqualität durch Blocken	56
4.12. Protein-Chip (Maus-IgG): Abhängigkeit des Signals vom immobilisierten Volumen	57
4.13. Protein-Chip (Maus-IgG): Abhängigkeit des Signals von der Waschzeit nach der Immobilisierung	57
4.14. Protein-Chip (Maus-IgG): Vergleich der GMA-EDMA-Oberfläche mit einem Glasträger mit Aldehydgruppen	58
4.15. Protein-Chip (Knochenmarker): Nachweis von Osteopontin (und Kollagen I) in einer Standardlösung und Kulturmedium	59
4.16. Protein-Chip: Layout mit 16 separaten Feldern	60
4.17. Protein-Chip (Maus-IgG): Feld-zu-Feld-Unterschied auf dem Protein-Chip mit 16 Feldern	61

4.18. Mechanische Stimulation: Einspannvorrichtung	63
4.19. Mechanische Stimulation: Finite Elemente Analyse	64
4.20. Mechanische Stimulation: Silikonschale	65
4.21. Mechanische Stimulation (adMSCs auf Silikon): Viabilität (MTT-Test)	66
4.22. Mechanische Stimulation (adMSCs auf Silikon): Genexpression typischer Knochenmarker (PCR)	67
4.23. Mechanische Stimulation (adMSCs auf Silikon): Aktivität der Alkalischen Phosphatase	70
4.24. Mechanische Stimulation: Silikonschale mit Kollagen-Boden	71
4.25. Mechanische Stimulation (MG-63 in Kollagen): Viabilität (MTT-Test) und Aktivität der Alkalischen Phosphatase	73
4.26. Mechanische Stimulation (MG-63 in Kollagen): Genexpression typischer Knochenmarker (PCR) 1	76
4.27. Mechanische Stimulation (MG-63 in Kollagen): Genexpression typischer Knochenmarker (PCR) 2	77
4.28. Mechanische Stimulation (MG-63 in Kollagen): Immunhistochemischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase	80
4.29. Mechanische Stimulation (MG-63 in Kollagen): Färbung mit Alizarinrot und Calcein	82
4.30. Sponceram [®]	86
4.31. Sponceram [®] : Mikro-Computertomographie	87
4.32. Sponceram [®] : Elektronenmikroskopie	88
4.33. Viabilität von MG-63 und adMSCs auf Sponceram [®] (MTT-Test)	89
4.34. Oberflächenmodifikation: N-Methacrylamidoglukose	90
4.35. Oberflächenmodifikation: Poly(Methacrylamidoglukose- <i>co</i> -Vinylpyrrolidon- <i>co</i> -Acrolein)	91
4.36. Oberflächenmodifikation: Zytotoxizität der Polymere	92
4.37. Oberflächenmodifikation: Zytotoxizität der Polymer <i>spacer</i> adsorbiert an Sponceram [®]	93
4.38. Oberflächenmodifikation: Zytotoxizität der Komposite	94
4.39. Oberflächenmodifikation: Adhäsion auf Kompositen	95
4.40. Z [®] RP-Bioreaktor	97
4.41. Z [®] RP-Bioreaktorsystem	98
4.42. Z [®] RP (SAOS-2): Glukoseverbrauch und Laktatproduktion	100
4.43. Z [®] RP (SAOS-2): Färbung mit Toluidinblau bzw. DAPI	101
4.44. Z [®] RP (SAOS-2): Färbung mit Alizarinrot bzw. nach von Kossa	102
4.45. Z [®] RP (SAOS-2): Färbung mit Calcein	103

4.46. Z [®] RP (SAOS-2): Elektronenmikroskopie der dynamischen Kultivierung	104
4.47. Z [®] RP (SAOS-2): Elektronenmikroskopie der statischen Kultivierung	105
4.48. Z [®] RP (adMSCs): Glukoseverbrauch und Laktatproduktion	106
4.49. Z [®] RP (adMSCs): Aktivität der Alkalischen Phosphatase	106
4.50. Z [®] RP (adMSCs): Färbung mit Toluidinblau bzw. DAPI	107
4.51. Z [®] RP (adMSCs): Färbung mit Alizarinrot bzw. nach von Kossa	108
4.52. Z [®] RP (adMSCs): Färbung mit Calcein	109
4.53. Z [®] RP (adMSCs): Elektronenmikroskopie der dynamischen Kultivierung	110
4.54. Z [®] RP (adMSCs): Elektronenmikroskopie der statischen Kultivierung	111
B.1. Färbung mineralisierter extrazellulärer Matrix nach von Kossa	138
B.2. Färbung mineralisierter extrazellulärer Matrix mit Alizarinrot	139
B.3. DNA-Chip: regulierte Gene in den adMSCs huF 35	148
B.4. DNA-Chip: regulierte Gene in den adMSCs huF 53	149
B.5. DNA-Chip: regulierte Gene in MG-63	150
B.6. Format der Objektträger für die Protein- <i>Microarrays</i>	154
C.1. Mechanische Stimulation: Technische Zeichnung der Einspannvorrichtung	159
C.2. Mechanismen der Mechanotransduktion	165
D.1. Z [®] RP-Bioreaktor: Aufbauskitze	169

Tabellenverzeichnis

4.1. DNA-Chip: Genexpression typischer Knochenmarker in adMSCs (huF 35) . . .	39
4.2. DNA-Chip: Genexpression typischer Knorpelmarker in adMSCs (huF 35) . . .	43
4.3. DNA-Chip: Genexpression typischer Knochenmarker in adMSCs (huF 53) . . .	46
4.4. DNA-Chip: Genexpression typischer Knorpelmarker in adMSCs (huF 53) . . .	47
4.5. DNA-Chip: Genexpression typischer Knochenmarker in MG-63-Zellen	48
4.6. DNA-Chip: Genexpression typischer Knorpelmarker in MG-63-Zellen	50
4.7. Mechanische Stimulation (MG-63 in Kollagen): Immunhistologischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase	81
4.8. Mechanische Stimulation (MG-63 in Kollagen): Nachweis von Calciumablage- rungen durch Färbung mit Alizarinrot und Calcein	82
B.1. Quellen der adMSCs	133
B.2. DNA-Chip: Abkürzungen der Genbezeichnungen	151

Abkürzungen

adMSC	mesenchymale Stammzelle aus dem Fettgewebe
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMP	Knochenmorphogenese-Protein, <i>bone morphogenetic protein</i>
BMSC	mesenchymale Stammzelle aus dem Knochenmark, <i>bone marrow derived mesenchymal stem cell</i>
BSA	Rinderserumalbumin, <i>bovine serum albumin</i>
BSP	Knochensialoprotein, <i>bone sialo protein</i>
<i>Cbfa-1</i>	core binding factor $\alpha 1$
CV	normierte Standardabweichung, <i>coefficient of variation</i>
DAAC	Acrolein-Diethylacetal
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDMA	Ethylenglykoldimethacrylat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor, <i>fibroblast growth factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GMA	Glycidylmethacrylat
GMP	Gute Herstellungspraxis, <i>good manufacturing practice</i>
GvHD	Transplantat-Wirt-Reaktion, <i>graft versus host disease</i>
HA	Hydroxylapatit
IGF	Insulin-artiger Wachstumsfaktor, <i>insulin-like growth factor</i>
IgG	Immunglobulin G
LDH	Laktatdehydrogenase
MAG	N-Methacrylamidoglukose
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MC3T3-E1	murine Fibroblasten-artige Zelllinie (DSMZ ACC 210)
MG-63	humane Osteoblasten-artige Zelllinie (ECACC Nr. 86051601)
MSC	mesenchymale Stammzelle
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid

NM	Normalmedium (=Standard-Proliferationsmedium)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	Plättchen-entstammender Wachstumsfaktor, <i>platelet-derived growth factor</i>
pLL	poly-L-Lysin
pMAG	Poly(N-Methacrylamidoglukose)
pMVA	Poly(Methacrylamidoglukose-co-Vinylpyrrolidon-co-Acrolein)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RNA	Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
SAOS-2	humane Knochenzelllinie (DSMZ ACC 243)
SM	mittlere Signalintensität, <i>signal mean</i>
SNR	Signal-Rausch-Verhältnis, <i>signal to noise ratio</i>
β -TCP	β -Tricalciumphosphat
TGF	transformierender Wachstumsfaktor, <i>transforming growth factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor, <i>vascular endothelial growth factor</i>
VP	N-Vinylpyrrolidon

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

Zusammenfassung

Obwohl Knochengewebe generell die Fähigkeit zur Selbstheilung besitzt, treten häufig Knochendefekte kritischen Ausmaßes auf, bei denen eine Transplantation von Ersatzgewebe erforderlich ist, um die Integrität des Knochens wiederherzustellen. Auf dem Gebiet des *Tissue Engineerings* von Knochen wird daran geforscht, funktionales Knochengewebe im Labor herzustellen, um der limitierten Verfügbarkeit von Knochentransplantaten zu begegnen.

In dieser Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe als Zellquelle für die Herstellung funktionalen Knochengewebes eingesetzt. Zunächst wurde ihre Differenzierbarkeit zu Knochengewebe mittels eines Enzymaktivitätstests, Standard-Färbemethoden und der DNA-Chip-Technologie untersucht. Für die weiterführende Analyse der osteogenen Differenzierung wurde ein Protein-Chip entwickelt, mit dem typische Knochenmarker im Kulturmedium von Zellen auf Proteinebene qualitativ und quantitativ untersucht werden können.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der dynamischen Kultivierung, die gegenüber der üblichen statischen Kultivierung die Qualität des konstruierten Gewebes deutlich verbessert. Mesenchymale Stammzellen und eine Modellzelllinie wurden einer mechanischen Stimulation in Form von zyklischer Dehnung (5 %, 1 Hz) auf einem planaren Silikonsubstrat und in einem Kollagen-Netzwerk unterworfen. Unterschiedliche zeitliche Muster von kurzzeitiger bis zu wiederholter Langzeitstimulation ließen erkennen, dass bereits kurze Stimulation die osteogene Differenzierung beeinflusst. Längere und wiederholte Stimulation führten zu einer Anpassung der Zellen an die aktive Umgebung, wobei sich besonders eine kontinuierliche Steigerung der mechanischen Belastung eignete.

Um ein Knochengewebekonstrukt herzustellen, wurden mesenchymale Stammzellen auf der keramischen Gerüstsubstanz Sponceram[®] kultiviert. Die Oberfläche der Keramik wurde funktionalisiert, indem bioaktive Moleküle zur Verbesserung der Zelladhäsion (Poly-L-Lysin und ein RGD-Peptid) und zur Unterstützung der osteogenen Differenzierung (BMP-2) über polymere Abstandshalter (*Spacer*) immobilisiert wurden. Die Tauglichkeit von Polyvinylsacchariden als *Spacer* für den Einsatz in der Zellkultur wurde nachgewiesen.

Mesenchymale Stammzellen wurden auf Sponceram[®] in dem Drehbettbioreaktor des Z[®] RP-Systems unter osteogenen Differenzierungsbedingungen kultiviert. Nach sechswöchiger Kultivierung war das Konstrukt gewebeartig hochdicht mit Zellen bewachsen, die in mineralisierte extrazelluläre Matrix eingebettet waren. Gegenüber der statischen Vergleichskultivierung wiesen die Zellen im Bioreaktor zu jeder Zeit deutlich erhöhte Wachstumsraten auf, was die Effizienz der dynamischen Kultivierung im Bioreaktor verdeutlichte.

Schlagworte: mesenchymale Stammzellen, *Tissue Engineering*, Knochen, mechanische Stimulation, Bioreaktor

Abstract

Although bone tissue is generally capable of self healing, in the case of critical size bone defects a transplantation of bone tissue or bone substitutes may be necessary to regain bone integrity. Bone tissue engineering is aiming to grow functional bone tissue *in vitro* in order to overcome transplantable organ and tissue shortage.

The objective of this study was the growth of functional bone tissue basing on adipose tissue derived mesenchymal stem cells. Initially, osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells was investigated using an enzyme activity test, standard staining methods of calcified extracellular matrix and the DNA microarray technology. For deeper analysis of osteogenic differentiation processes a protein microarray was developed aiming to detect typical bone markers in cell culture medium at protein level qualitatively and quantitatively.

The main focus of this study were dynamic cultivation strategies which enhance tissue quality of statically produced constructs. Cyclic elongation (5%, 1 Hz) was applied to mesenchymal stem cells and a model cell line grown on a planar silicone substrate and in a collagen network, respectively. The application of different time schemes including short time strain as well as repeated and long time strain revealed promotion of osteogenesis by short time strain and adaption by repeated and long time strain. For cellular adaption to physically active surroundings, a continually increasing strain time was exceptionally effective.

To grow a three-dimensional bone tissue construct, mesenchymal stem cells were cultured on the ceramic Sponceram[®] substrate. The surface of this ceramic material was functionalised by immobilisation of bioactive molecules coupled to polymer spacers in order to enhance cell adhesion (Poly-L-lysine and an RGD peptide) and osteogenic differentiation (BMP-2). Poly-vinylsaccharides were proven to be suitable spacer molecules for cell culture application.

A bone tissue construct was grown using mesenchymal stem cells cultivated on Sponceram[®] carrier discs in a rotating bed bioreactor system with osteogenic medium. After six weeks of cultivation in the Z[®] RP bioreactor system a construct with extraordinarily high cell densities was achieved where cells were embedded in thick layers of mineralized extracellular matrix. Compared to the static control culture cells in the bioreactor had considerably higher growth rates demonstrating the efficiency of the dynamic bioreactor cultivation.

Keywords: mesenchymal stem cells, tissue engineering, bone, mechanical stimulation, bioreactor

1. Einleitung

Knochengewebe besitzt generell eine hohe Selbstheilungskapazität. Trotzdem treten häufig Knochendefekte kritischer Größe auf, die vom Körper selbst nicht wieder aufgefüllt und geheilt werden können. Chirurgisch werden solche Defekte in der Regel mit einem autologen Transplantat gefüllt. Dabei wird dem Patienten ein Stück Knochen (meistens aus dem Beckenkamm) entnommen und in die Defektstelle eingesetzt. Bei diesen autologen Transplantaten besteht kaum ein Risiko der Krankheitsübertragung oder einer Immunreaktion. Die Menge an Knochengewebe, die für eine Entnahme zur Verfügung steht, ist jedoch stark limitiert und es wird eine zweite Operation zur Gewebeentnahme notwendig. Bei Fällen, in denen das autologe Knochenmaterial nicht ausreicht oder z. B. eine Knochenkrankheit die Entnahme von Gewebe verhindert, kann auf allogene Transplantate aus Spenderknochen zurückgegriffen werden. Hierbei besteht die Gefahr einer Immunreaktion und infolgedessen einer Transplantatabstoßung sowie der Übertragung von Krankheitserregern. Alternativ zu Allotransplantaten werden auch künstliche Transplantate aus Keramiken oder Biopolymeren eingesetzt. Für spezifische therapeutische Applikationen ist eine Vielzahl solcher synthetischer oder natürlicher Ersatzstoffe erhältlich. Ihre Fähigkeit, die Bildung von Knochengewebe zu induzieren (Osteoinduktion), ihre Integration in das Empfängergewebe, ihre mechanischen Fähigkeiten und ihr Überdauern nach der Transplantation sind bisher jedoch noch nicht vollständig zufriedenstellend.

Auf dem Gebiet des *Tissue Engineerings* wird intensiv daran gearbeitet, funktionelle Gewebeimplantate im Labor herzustellen. Die grundlegende Strategie zur Generierung solcher funktionaler Konstrukte ist die Besiedelung von Trägermaterialien mit Zellen⁹⁸. Diese synthetisieren ihre eigene spezifische extrazelluläre Matrix und modifizieren so die mechanischen Eigenschaften des gesamten Konstruktes. Indem bereits von vornherein ein gewebeartiges Konstrukt implantiert wird, muss die Besiedelung nicht erst im Körper erfolgen, und die Heilung wird entscheidend beschleunigt. Die Zellen auf dem Konstrukt fördern überdies die Integration des Implantates in das umliegende Gewebe.

Forschungsschwerpunkte auf dem Gebiet des *Tissue Engineerings* sind heute vor allem auf die zu verwendenden Zellen, die Eignung von Biomaterialien und die Bedingungen der Kultivierung von Zellen und zellbesiedelten Konstrukten gerichtet. Um Immunreaktionen und die Übertragung von Krankheiten zu verhindern, wird in der Regel eine autologe Zellquel-

le verwendet¹⁰². Für die Isolierung von Knochenzellen ist jedoch wiederum die Entnahme von Knochengewebe erforderlich. Darüberhinaus proliferieren primäre Knochenzellen nur in geringem Maße, so dass sich eine Expansion bis zu gewebeähnlichen Zelldichten schwierig gestaltet. Hervorragend für das *Tissue Engineering* von Knochen geeignet sind mesenchymale Stammzellen – nicht festgelegte Vorläuferzellen, die zu Knochenzellen differenzieren können. Mesenchymale Stammzellen können aus verschiedenen Geweben, darunter Fettgewebe und Knochenmark, autolog gewonnen werden und weisen *in vitro* ein hohes Proliferationspotenzial auf³⁴.

Biomaterialien werden nach Gesichtspunkten der Biokompatibilität, der Zelladhäsion und ihrer mechanischen Eigenschaften ausgewählt. Häufig kommen im *Tissue Engineering* von Knochen Keramiken, Metalle und synthetische wie natürliche Polymere zum Einsatz²⁹. Die Oberfläche der Trägermaterialien kann zusätzlich zu den bei der Herstellung angewandten Techniken zur Oberflächengestaltung biochemisch funktionalisiert werden. Über die Immobilisierung bioaktiver Moleküle wie Adhäsions- und Wachstumsfaktoren können spezifische Signale an die Zellen übermittelt, und zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung gezielt gesteuert werden.

Ein entscheidender Schritt bei der Herstellung künstlichen Gewebes ist die Kultivierung der Zellen und des zellbesiedelten Konstruktes. Übliche statische Kultivierungsmethoden unterliegen hauptsächlich zwei Limitierungen. Einerseits hat sich gezeigt, dass in statischer Kultur hergestellte Gewebekonstrukte gegenüber dem nativen Gewebe deutlich verminderte mechanische Eigenschaften aufweisen². Indem während der Kultivierung eine mechanische Stimulation appliziert wird, können die Zellen an ihre zukünftige mechanisch aktive Umgebung gewöhnt werden. Für Knochenzellen haben sich dabei besonders die zyklische Dehnung und die flüssigkeitsinduzierte Scherbeanspruchung bewährt. Dies sind auch die im nativen Knochen vorherrschenden Kräfte. Die Kontraktion von Muskeln übt eine Zugkraft gegen den Knochen aus, an dem sie über Sehnen verankert sind. In den kleinen Kanälchen (Canaliculi) des Knochens spielen vor allem Flüssigkeitsströmungen eine Rolle, die eine Scherbeanspruchung auf die angrenzenden Knochenzellen ausüben. Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die mechanische Stimulation selbst auch differenzierend auf mesenchymale Stammzellen wirken kann⁷. Andererseits basieren in statischen Systemen die Nähr- und Sauerstoffversorgung und der Abtransport von metabolischen Abfallprodukten auf Diffusionsprozessen, die für Zellen in dicht und mehrschichtig bewachsenen Konstrukten nicht mehr ausreichend sind. Dieser Beschränkung statischer Kultivierung wird mit speziell entwickelten Bioreaktoren begegnet. Über unterschiedliche Ansätze zur Durchmischung und Zirkulation des Kulturmediums wird die Diffusionslimitierung minimiert. Durch die Verwendung von Bioreaktoren können hochdichte dreidimensionale Gewebekonstrukte generiert werden, in denen die Zellen in ihre gewebetypische extrazelluläre Matrix eingebettet sind¹⁶⁴.

2. Aufgabenstellung

Gegenstand dieser Arbeit ist die Generierung funktionaler Knochenkonstrukte im Rahmen des *Tissue Engineerings*. Als Zellquelle für diese Konstrukte finden mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (adMSCs) Verwendung, die zu Knochengewebe differenziert werden. Diese osteogene Differenzierung wird zunächst mittels der DNA-Chip-Technologie auf Genexpressionsebene detailliert analysiert. Die für die Differenzierung der Zellen erforderlichen Kultivierungsbedingungen werden ermittelt, indem die Effektivität unterschiedlicher osteoinduktiver Zusätze zum Kulturmedium verglichen wird.

Um die osteogene Differenzierung nicht erst am Endpunkt einer Kultivierung bestimmen zu können, sondern auch durch Messung im Kulturüberstand den zellulären Status ermitteln zu können, soll ein Protein-Chip entwickelt und etabliert werden. Mit diesem sollen spezielle, für Knochen spezifische Markerproteine qualitativ und quantitativ nachzuweisen sein. Die Oberfläche des Chips soll aus dreidimensional strukturiertem porösen Polymethacrylat aufgebaut werden. Zunächst ist die Eignung einer solchen Oberfläche für den Einsatz in der Protein-Chip-Technologie zu untersuchen. Im Folgenden soll dann ein Nachweissystem für knochenspezifische, ins Kulturmedium sekretierte Proteine aufgebaut werden.

Der thematische Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf dem Einsatz dynamischer Kultivierungsbedingungen für die Entwicklung funktionaler Gewebestrukturen. Ein System zur Applikation von mechanischer Stimulation in Form von zyklischer Dehnung wird in Zusammenarbeit mit der Feinmechanik- und Elektronikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover in der Tierzellkultur eingeführt. Mit diesem System wird im Folgenden der Einfluss zyklischer Dehnung auf zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung untersucht. Die Effektivität unterschiedlicher zeitlicher Stimulationsmuster wird in Hinblick auf die Induktion von zellulären Differenzierungs- und Anpassungsmechanismen verglichen. Die Dehnung erfolgt zunächst auf einem Silikonsubstrat mit planarer Oberfläche und soll dann auf ein Trägermaterial mit dreidimensionaler Struktur ausgeweitet werden.

Ein weiterer wichtiger Schritt für die Generierung eines Knochenkonstruktes ist die dynamische Kultivierung der Zellen in einem Bioreaktorsystem auf einer geeigneten Trägersubstanz. Die mesenchymalen Stammzellen werden auf Sponceram[®] – einer von der Zellwerk GmbH entwickelten Zirkondioxid-Keramik – kultiviert. Sponceram[®] soll überdies funktio-

nalisiert werden, indem bioaktive Liganden, gebunden an polymere *Spacer*moleküle, auf der Oberfläche immobilisiert werden. Die Eignung von oxidiertes Polymethacrylamidoglucose und von Poly(Methacrylamidoglucose-*co*-Vinylpyrrolidon-*co*-Acrolein) als *Spacer* für den Einsatz in der Zellkultur soll untersucht werden. Kompositmaterialien aus Sponceram[®] und Polymer*spacern*, an die bioaktive Liganden gekoppelt waren, werden in der Zellkultur getestet. Als bioaktive Liganden kommen einerseits Poly-L-Lysin und ein RGD-Peptid zum Einsatz, um die Zelladhäsion auf dem Trägermaterial zu verbessern und andererseits BMP-2, um der Keramik osteoinduktive Eigenschaften zu verleihen.

Das Z[®] RP-Bioreaktorsystem (entwickelt von der Zellwerk GmbH) soll angewandt werden, um dreidimensionale Knochenkonstrukte aus mesenchymalen Stammzellen auf Sponceram[®]-Trägern zu generieren. Unterschiedliche Fütterungsstrategien sollen dabei angewandt und verglichen werden. Ziel ist eine Gewebestruktur bestehend aus hochdicht wachsenden Zellen, die in selbstproduzierte knochenspezifische extrazelluläre Matrix eingebettet sind.

Mit dieser Arbeit werden verschiedene Aspekte des *Tissue Engineerings* vereint. Unter Verwendung mesenchymaler Stammzellen und eines funktionalisierten Trägermaterials werden unter dynamischen Kultivierungsbedingungen gewebeartige Knochenkonstrukte hergestellt. Mechanische Stimulation in Form von zyklischer Dehnung wird appliziert, um die biophysikalischen Eigenschaften des Knochengewebes zu verbessern, während die Kultivierung im Drehbettbioreaktor das Gewebewachstum optimiert.

3. Theoretische Grundlagen

3.1. Knochen

Knochengewebe ist ein dynamisches, hochgradig vaskularisiertes Gewebe mit einer intrinsischen Kapazität zur Heilung und zur Umstrukturierung (*Remodeling*)²⁸. Seine Hauptrolle besteht in der Stützfunktion, er dient aber auch als Calciumspeicher. Darüber hinaus unterstützt das Skelett die Muskelkontraktion und schützt die inneren Organe. Abgesehen vom Zahnmateriale ist der Knochen das härteste Gewebe des menschlichen Körpers. Eine Kombination aus mineralischer Hartschubstanz und flexiblen organischen Fasern verleihen dem Knochengewebe Härte, ohne dass es dabei spröde ist.

Die Knochenzellen (Osteozyten) liegen einzeln in Lakunen (Höhlen) umgeben von harter Matrix und sind untereinander durch lange dünne Ausläufer netzartig verbunden. Die Interzellularsubstanz oder extrazelluläre Matrix besteht zu 50 Prozent aus anorganischer Substanz, zu 25-30 Prozent aus organischer Substanz und zu 20-25 Prozent aus Wasser. Die organische Substanz setzt sich hauptsächlich aus Kollagen Typ I (95 %) und einem geringen Anteil an Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen zusammen. Die anorganische Matrix besteht im Wesentlichen aus Mineralsalzen, wobei Calciumphosphat in Form von Hydroxylapatit-Kristallen $[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$ den Hauptteil ausmacht (86 %). Die restliche anorganische Matrix umfasst Calciumcarbonat (10 %) und geringe Mengen an Magnesiumphosphat, Calciumfluorid, Calciumchlorid und Alkalisalze. Die Apatitkristalle liegen in Längsanordnung parallel zu den Kollagenfasern, wobei die anderen organischen Bestandteile der extrazellulären Matrix verbindend wirken¹²³. Die Knochensubstanz wird von Osteoblasten gebildet, den Vorläufern der Osteozyten. Diese sondern in exozytotischen Vesikeln an Phospholipide und Proteine komplexartig gebundenes Calcium ab sowie Phosphatasen (Alkalische Phosphatase und Pyrophosphatase), die Phosphat-Ionen von im Blut transportierten Phosphorsäureestern abspalten. Die Phosphat-Ionen und das Calcium der Vesikel bilden intravesikulär Calciumphosphat $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$, aus dem größere Hydroxylapatit-Kristalle entstehen. Durch das Kristallwachstum platzen die Vesikel, und die Apatitkristalle werden an Kollagenfasern angelagert, wo sie als Kristallisationskeime für nachfolgend gebildetes Hydroxylapatit wirken. Die Kollagenfasern werden auf diese Weise komplett von Hydroxylapatit umgeben⁶³. Die

Knochenmatrix dient dem Körper als Calciumspeicher und ist ständigem Auf- und Abbau unterworfen. Das gesamte Knochencaesium des Körpers wird binnen ca. 200 Tagen einmal ausgetauscht.

Die Knochenbildung läuft in zwei unterschiedlichen Prozessen ab. Bei der desmalen Ossifikation differenzieren unspezifische mesenchymale Vorläuferzellen zu Osteoblasten, die zunächst eine nicht mineralisierte Matrix (Osteoid) abscheiden. In diese werden gebündelte Kollagenfasern eingebaut, an denen dann die Mineralisierung stattfindet. Knochen, die durch die desmale Ossifikation entstehen, sind das Schädeldach und das Schlüsselbein. Die meisten Knochen werden jedoch indirekt über den Umbau von hyalinem Knorpel gebildet (enchondrale Ossifikation). Diese beginnt schon während der Embryonalzeit und endet erst beim ausgewachsenen Menschen^{159,123}.

Noch während der Embryonalentwicklung wird das primär gebildete Knochengewebe (Geflechtknochen) in bleibenden Knochen (Lamellenknochen) umgewandelt. Im primären Geflechtknochen liegen die Kollagenfasern ohne besondere Orientierung vor, während im Lamellenknochen parallel angeordnete Kollagenfasern in Schichten arrangiert sind. Für diesen Umbau schaffen Osteoklasten (Knochenabbauzellen) Kanäle, an deren Wänden sich Osteoblasten ansiedeln und Knochenmatrix abscheiden. Darin werden Kollagenfasern parallel und spiralg steigend eingelagert und von Hydroxylapatit-Kristallen umgeben. Die Osteoblasten der ersten Lage teilen sich mitotisch und die Tochterzellen lagern innen eine zweite Lamelle auf die erste auf, wobei die Kollagenfasern gegenläufig gekreuzt zu denen der ersten Lamelle orientiert sind. Auf diese Weise werden weitere Lamellen gebildet, bis das Kanallumen so eng ist, dass nur noch die zur Ernährung notwendigen Blutgefäße und etwas Bindegewebe Platz finden. Das gebildete System aus fünf bis zwanzig (und mehr) ineinandergeschachtelten Röhrenlamellen mit einem zentralen Kanal (Haversscher Kanal) heißt Haverssches System oder Osteon. Die Osteoblasten werden, sobald sie sich selbst vollständig mit Knochenmatrix umgeben haben, zu mitotisch inaktiven Osteozyten und sondern auch keine Knochenmatrix mehr ab. Die Osteozyten liegen flach und komprimiert zwischen den einzelnen Lamellen. Über dünne Ausläufer, die in winzigen Kanälen (Canaliculi) verlaufen, bleiben sie mit benachbarten Zellen (auch über die Beschränkung der Lamellen hinweg) in Kontakt^{159,123}.

Bei Langknochen, wie Oberarm- und Oberschenkelknochen, Schien- und Wadenbein, ist nur die äußere Schicht aus harten, kompakten Haversschen Systemen (Compacta) aufgebaut. Das Innere besteht aus einem Schwammwerk (Spongiosa) feiner Knochenbälkchen, dessen Maschen mit Knochenmark gefüllt sind. Die großen Röhrenknochen haben in ihrem Schaft eine von Knochensubstanz freie Markhöhle, während in der Nähe der Knochenenden (Epiphysen) und in diesen selbst das Knocheninnere von Spongiosa durchzogen ist, wie es auch in den kurzen Knochen der Fall ist. Das ursprüngliche, primäre Knochenmark besteht aus dem Mesenchym,

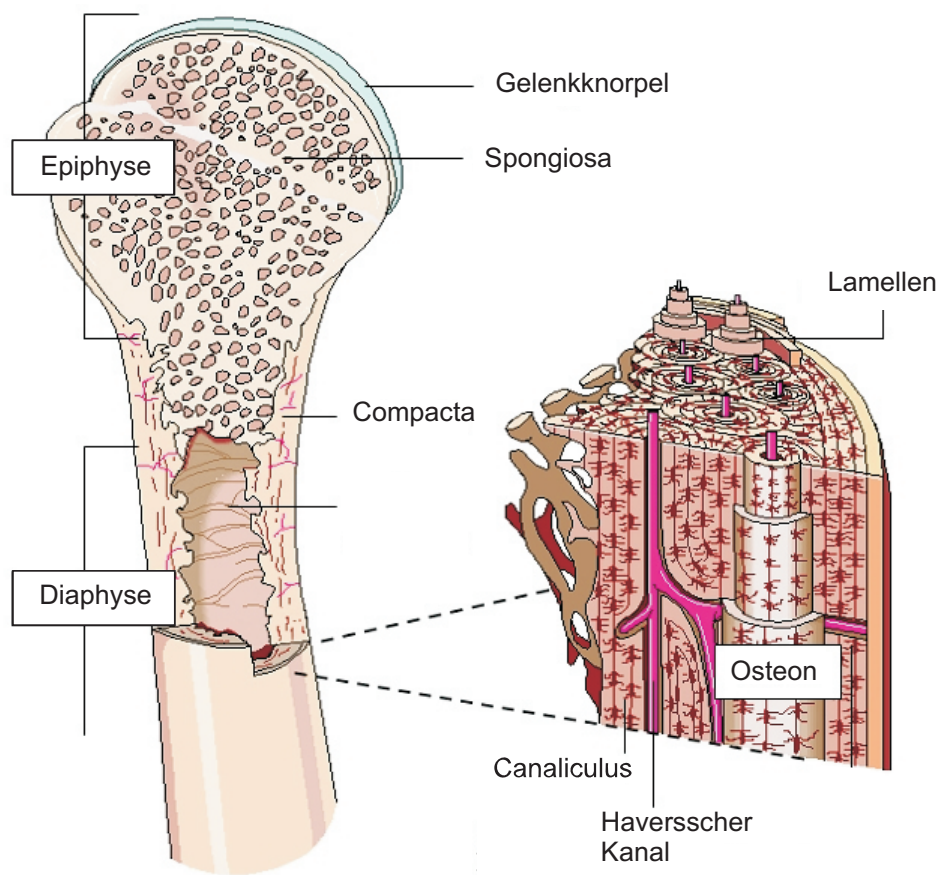


Abbildung 3.1.: Aufbau von Langknochen. Die Epiphyse ist komplett gefüllt mit Spongiosa, während die Epiphyse außen aus kompaktem Knochengewebe besteht und innen zur Markhöhle hin überzogen ist mit einer dünnen Schicht Spongiosa. Die Compacta ist aufgebaut aus Haversschen Systemen, die aus Lamellen (Kollagenfasern und Hydroxylapatit), dazwischenliegenden Osteozyten und dem zentralen Haversschen Kanal mit der Blutversorgung bestehen. Quelle: atlasofanatomy.com.

das während der enchondralen Ossifikation in den knorpeligen Vorläufer einwandert und sich einerseits an der Knochenbildung beteiligt und andererseits Blutzellen hervorbringt. Blutbildendes und daher rotes Mark bleibt bis ins Alter nur in den Knochen des Stammes vorhanden, während das Mark in den Knochen der Extremitäten verfettet (gelbes oder weißes Mark)¹²³.

Der Umbau des Knochengewebes endet nicht mit Abschluss des Knochenwachstums, sondern findet auch noch im Knochengewebe des Erwachsenen statt, allerdings immer weniger mit zunehmendem Alter. Dadurch wird eine Anhäufung von Mikroschäden im Knochengewebe verhindert. Durch Aufbau, Resorption und strukturellen Umbau kann sich dabei das Knochengewebe den Erfordernissen der Belastung anpassen²⁸. Wird durch erhöhte Belastung (Training) die Muskulatur kräftiger, reagiert der Knochen mit entsprechendem Dickenwachstum. Nicht allein die Druckbelastung, sondern vor allem die Zugbeanspruchung durch die Muskulatur beeinflusst wesentlich die Architektur des Knochens und seine äußere Formung^{123,159}.

Knochengewebe verfügen über eine intrinsische Fähigkeit zur Selbstheilung. So können die äußere Knochenhaut (Periost) und die innere Knochenhaut (Endost, zwischen Compacta und Spongiosa) jederzeit neue Knochensubstanz bilden. Die Heilung von Knochenbrüchen erfolgt hauptsächlich durch die Beteiligung der Knochenhäute. Durch den Reiz der Verletzung, mit der jeweils auch eine Blutung (aus Gefäßen des Periosts und den Haversschen Gefäßen) verbunden ist, bilden sie einen Kallus (überschüssig gebildeter jugendlich geflechtartiger Knochen), der die Bruchstücke miteinander verbindet. Der primär gebildete Geflechtknochen wird wieder in Lamellenknochen umgebaut^{159,28}.

Größere Knochendefekte können jedoch nicht mehr ohne weiteres repariert werden und bedürfen einer Knochentransplantation. Defekte kritischer Größe (*critical size defects*), bei denen mehrere Zentimeter Gewebe ersetzt werden müssen, können infolge eines Traumas, einer Infektion, einer Tumorerkrankung oder der Entfernung von orthopädischen Implantaten auftreten. Derzeitige Behandlungsstrategien basieren entweder auf autologen oder allogenen Transplantaten oder auf Metallen, Keramiken bzw. Polymeren. Die autologe Transplantation ist dabei der klinische „Goldstandard“. Dabei wird eine Knochensektion vom Patienten selbst in den Defekt transplantiert. Ein solches Transplantat liefert osteogene Zellen zusammen mit den essentiellen osteoinduktiven – die Knochenbildung induzierenden – Faktoren. Gegenüber einer allogenen Transplantation von Spenderknochen haben autologe Transplantate den Vorteil, dass keine Immunreaktion hervorgerufen wird, die in einer Implantatabstoßung resultieren kann. Auch die Übertragung von Krankheiten und die „Transplantat-Wirt-Reaktion“ (*graft versus host disease*, GvHD) treten nicht auf. Die Entnahme von Gewebe zur Transplantation (meistens aus dem Beckenkamm) ist jedoch ein zusätzlicher Eingriff und kann zu langwierigen Beschwerden führen. Außerdem ist die Menge an Knochen für die Entnahme limitiert.

Eine interessante Alternative zu Allo- und Autotransplantaten sind Biomaterialien wie Keramiken und Biopolymere, da sie nicht den Limitierungen von Spenderknochen unterliegen. Für spezifische therapeutische Applikationen ist eine Vielzahl synthetischer Ersatzstoffe erhältlich. Ihre Einsetzbarkeit ist jedoch durch einige Defizite eingeschränkt: Sie verfügen nicht in ausreichendem Maße über die Fähigkeit, die Bildung von Knochengewebe zu induzieren. Ihre Integration in das Empfängergewebe ist nur gering, ihre mechanischen Eigenschaften müssen noch verbessert werden und ihre Lebensspanne nach der Transplantation ist deutlich zu niedrig.

Eine Lösung für die genannten Schwierigkeiten wird in dem Feld der künstlichen Gewebekultur, dem *Tissue Engineering*, angestrebt. Hierbei werden zur Herstellung von Implantaten Biomaterialien mit Zellen kombiniert, um die Geweberekonstruktion entscheidend zu unterstützen.

3.2. Tissue Engineering von Knochen

Beim *Tissue Engineering* wird die Herstellung funktionaler Gewebe *in vitro* angestrebt, um sie als biologische Ersatzmaterialien für verletzte oder erkrankte Gewebe und Organe *in vivo* zu implantieren⁹⁸. Konzepte basierend auf dem *Tissue Engineering* werden nicht nur für die Regeneration von Knochen, sondern für nahezu alle Gewebe verfolgt, darunter auch Knorpel¹⁰⁸, Leber¹¹⁸, Muskel^{51,196}, Haut¹²², Blutgefäße⁸ und Herzklappen⁹⁸. Der generelle Ansatz im *Tissue Engineering* ist dabei, geeignete Zellen auf einem Gerüstmaterial anzusiedeln, das die Form und die mechanischen Eigenschaften des fertigen Konstruktes bestimmt. Biologische Stimuli bestehend aus Wachstumsfaktoren oder mechanischen Faktoren steuern die Organisation, Proliferation und Differenzierung der Zellen.

3.2.1. Biomaterialien

Gewebe bestehen grundsätzlich aus Zellen, die mehr oder weniger stark in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Die Matrix ist dabei nicht nur reine Gerüstsubstanz, sondern fungiert vor allem als gewebespezifische Umgebung, die Nährstoffe und Wasser liefert und über Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiv an der Signaltransduktion teilnimmt. Im *Tissue Engineering* müssen die einzelnen chemischen, biologischen, physikalischen und strukturellen Eigenschaften des Gerüstmaterials daher spezifisch an das jeweilige Zielgewebe angepasst werden. Fundamentale Eigenschaften müssen aber unabhängig vom Zielgewebe für jede Applikation gewährleistet sein.

Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Integration des Konstruktes in das Empfängergewebe ohne eine Immunreaktion hervorzurufen ist die Biokompatibilität. Offenporige Strukturen erlauben das Einwachsen von Zellen und gewährleisten die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff sowie den Abtransport von metabolischen Nebenprodukten. Auch für die Vaskularisierung ist die Porosität notwendig. Die Poren dürfen nicht zu klein sein, da sie sonst durch Zellen verstopfen können, was die Penetration von Zellen ins Innere verhindert bzw. zum Absterben innerer Zellschichten durch Minderernährung führt. Zu große Poren hingegen vermindern die mechanische Stabilität des Konstruktes. Für die Konstruktion eines Knochenersatzgewebes haben sich Porengrößen von 200–900 μm bewährt^{189,29}. Die Oberfläche selbst muss eine gewisse Rauigkeit aufweisen, um die Zelladhäsion zuzulassen, ein Vorgang, der zusätzlich durch chemische und biologische Modifikationen der Oberfläche beeinflusst werden kann. Die mechanische Stabilität muss den Anforderungen des jeweiligen Gewebes angeglichen werden. Das Konstrukt muss dem hydrostatischen Druck im Gewebe standhalten, ohne dass seine Porenstruktur kollabiert. Die in der Klinik häufig eingesetzten Implantate aus Keramiken und Metallen werden im Körper kaum abgebaut und bleiben immer ein Fremdkörper. Im

Tissue Engineering wird ein bioabbaubares Ersatzmaterial angestrebt. Die Abbauraten müssen dabei jedoch genau gesteuert werden, da ein zu schneller Abbau die Geweberegeneration behindern würde und außerdem zu einer Anhäufung von Abbauprodukten des Konstruktes führt, die in höheren Konzentrationen toxisch sein können (z. B. Calcium-Ionen). Ein zu langsamer Abbau hingegen verringert das Einwachsen von Gewebe, was wiederum zu einer verlangsamten Regeneration führt. Erschwerend kommt hinzu, dass die Resorptionsraten entscheidend beeinflusst werden von individuellen Faktoren wie dem Gesundheitszustand und Alter des Empfängers. Solange die Bioabbaubarkeit nicht punktuell und individuell gesteuert werden kann, werden auch weiterhin nicht (oder nur sehr langsam) abbaubare Biomaterialien Einsatz finden.

Für die *In-vitro*-Herstellung funktionalen Knochengewebes steht im Hinblick auf die Stützfunktion von Knochen vor allem die mechanische Stabilität bei der Wahl eines geeigneten Biomaterials im Vordergrund. Weitere entscheidende Faktoren sind die Fähigkeit, die Migration osteogener Zellen zur Implantatoberfläche zu unterstützen (Osteokonduktion) sowie Stammzellen und Knochenvorläufer zu rekrutieren und deren osteogene Differenzierung zu steuern (Osteoinduktion)⁵. Hauptsächlich kommen Metalle, Keramiken und natürliche oder synthetische Polymere zum Einsatz, wobei Metalle und die meisten Keramiken biologisch nicht abbaubar sind.

Metalle wie Titan sind biokompatibel und können für Hartgewebe eingesetzt werden^{4,23}. Ihre Effizienz kann durch Beschichtungen mit bioaktiven Molekülen verbessert werden. So können Komponenten der extrazellulären Matrix die osteogene Differenzierung unterstützen.

Viele Arbeiten zeigten Erfolge mit natürlichem oder synthetischem Hydroxylapatit^{95,156,191} und β -Tricalciumphosphat¹²⁰, die über hervorragende osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften verfügen. Hydroxylapatit ist hochgradig stabil und fest, aber nicht resorbierbar und verbleibt über Jahre an der Transplantationsstelle. β -Tricalciumphosphat dagegen ist deutlich besser resorbierbar, aber leicht brüchig. Viele Studien beschäftigen sich daher mit Kompositmaterialien aus Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat in unterschiedlichen Zusammensetzungen^{10,27}.

Polymere haben gegenüber Metallen und den meisten Keramiken den Vorteil, bioabbaubar zu sein. Beim *Tissue Engineering* von Knochen kommen einige natürliche Polymere zum Einsatz, die ein geringes immunogenes Potenzial aufweisen und möglicherweise bioaktiv sind. So sind Kollagen^{150,166}, Fibrinogen^{100,132}, Chitosan¹, Stärke¹⁵⁵, Hyaluronsäure²¹ und Polyhydroxybutyrat¹⁰³ als Gerüstsubstanz im *Tissue Engineering* von Knochen beschrieben worden. Synthetische Polymere haben gegenüber den natürlichen den Vorteil, dass ihre Materialeigenschaften ohne weiteres gesteuert und modifiziert werden können. Bekannte Vertreter sind vor allem Polyhydroxycarbonsäuren (Poly-L-Milchsäure PLA²², Polymilch-*co*-glykolsäure PLGA⁸²) und Poly(ϵ -caprolacton)⁴¹.

3.2.2. Biologische Stimuli

Um die Verteilung, Proliferation und Differenzierung von Zellen auf einem Gerüst zu steuern, können biologische Stimuli wie Hormone und Zytokine (z. B. Wachstums- und Adhäsionsfaktoren) oder auch mechanische Signale eingesetzt werden. Bioaktive Moleküle können an der Oberfläche der Gerüstsubstanz immobilisiert bzw. in die poröse Struktur eingebracht und im Idealfall kontrolliert freigesetzt werden. Dadurch sind sie längere Zeit verfügbar als bei einer einmaligen Applikation. Die Biomoleküle, die beim *Tissue Engineering* von Knochen häufig zum Einsatz kommen, sind Knochenmorphogenese-Proteine¹ (*bone morphogenetic proteins*, BMPs), transformierender Wachstumsfaktor- β ¹⁹⁴ (*transforming growth factor- β* , TGF- β), Insulin-artige Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factors*, IGF)¹⁴⁰, vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (*vascular endothelial growth factor*, VEGF)⁹, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (*fibroblast growth factor-2*, FGF-2)¹¹¹ und Plättchen-entstammender Wachstumsfaktor (*platelet-derived growth factor*, PDGF)¹³⁹.

Die Entdeckung der BMPs geht zurück auf Urist, der 1965 die Entdeckung machte, dass demineralisierte Knochenmatrix eine Knochenbildung an einer für Knochen untypischen Gewebestelle auslösen kann (ektopische Knochenformierung)¹⁷⁶. Diese Eigenschaft wurde später auf die in der Knochenmatrix enthaltenen BMPs zurückgeführt. Sie gehören zu der TGF- β -Superfamilie und bilden eine Gruppe von Signalproteinen, von denen BMP-2, -4, -6 und -7 diejenigen mit der stärksten osteoinduktiven Wirkung sind¹⁹⁰. BMPs werden generell in die Knochenmatrix eingebaut und verstärkt während der frühen Phase der Knochenheilung exprimiert. Dabei ist ihre Hauptaufgabe die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen und deren Differenzierung zu Knochenzellen. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber BMP-2 wird eine Rolle bei der Expression osteogener Marker wie Alkalischer Phosphatase und Osteocalcin zugeschrieben. Dies erfolgt vermutlich durch Beeinflussung des Signaltransduktionswegs der Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen). Außerdem ist BMP-2 wohl auch involviert in die Expression des Transkriptionsfaktors *Cbfa-1/Runx2*, der früh in der Knochenbildung exprimiert wird. BMP-2 wurde bereits erfolgreich in präklinischen und klinischen Studien eingesetzt^{26,42}. Unter dem Namen InductOs[®] ist rekombinant hergestelltes BMP-2 als Medikament zur unterstützenden Behandlung bei Knochenfrakturen Bandscheibenerkrankungen zugelassen.

TGF- β ist ein Wachstumsfaktor mit vielfältiger Wirkung. Unter anderem stimuliert er die Proliferation und die Kollagenproduktion von Osteoblast-artigen Zellen^{145,169}. IGF wird nach einer Knochenverletzung im heilenden Gewebe gefunden, wo es die Synthese von Kollagen I und die Matrixbildung fördert⁸⁸. Als potenter angiogener Faktor tritt VEGF verstärkt in hochgradig vaskularisierten Geweben auf. Im *Tissue Engineering* wird VEGF hauptsächlich eingesetzt, um die Angiogenese im Implantat zu fördern¹⁵⁴. FGF-2 reguliert im Körper das Gleich-

gewicht zwischen knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) und knochenresorbierenden Zellen (Osteoklasten). *In vitro* wird es eingesetzt bei der Expansion mesenchymaler Stammzellen, wo es die Proliferation fördert und die Zellen in einem undifferenzierten Zustand hält^{111,173}. PDGF spielt insbesondere eine große Rolle bei der Angiogenese, ist aber wahrscheinlich auch an der Knochenregeneration beteiligt⁷³. Von Osteoblasten, Blutplättchen und Makrophagen produziert, beeinflusst PDGF wahrscheinlich die Migration mesenchymaler Stammzellen zur Wundheilungsstelle¹⁵⁴.

Neben biologisch aktiven Molekülen werden auch mechanische Faktoren während der Kultivierung *in vitro* eingesetzt, um die Proliferation und Differenzierung von Zellen zu steuern. Eine gezielte physikalische Belastung bestehend aus Dehnung, Kompression, Flüssigkeitsscherstress oder ähnlichem kann Einfluss nehmen auf den zellulären Differenzierungsstatus. Außerdem können Zellen so auf eine zukünftige, mechanisch aktive, Umgebung im Körper vorbereitet werden (vgl. Abschnitt 3.4 Mechanische Stimulation, Seite 26). Bioreaktoren werden im *Tissue Engineering* hauptsächlich eingesetzt, um die Ernährung von dicht besiedelten Zellkonstrukten zu gewährleisten. In Bioreaktoren können Kultivierungsparameter wie pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur reguliert und an die aktuellen Bedürfnisse der Zellen angepasst werden, wodurch Gewebe reproduzierbar hergestellt werden können. Darüber hinaus kann eine Bioreaktorkultivierung direkt kombiniert werden mit der Applikation einer mechanischen Stimulation (z. B. flüssigkeitsinduzierter Scherstress in einem Perfusionsbioreaktor, s.u.).

Bioreaktoren

Die klassischen Anwendungen für Bioreaktoren sind die industrielle Fermentation, die Aufarbeitung von Brauchwasser und die Produktion pharmazeutischer Substanzen und rekombinanter Proteine wie Antikörper, Wachstumsfaktoren, Vakzine und Antibiotika. Die Erfahrung mit diesen Reaktoren wurde übertragen auf die Entwicklung miniaturisierter Reaktoren speziell für die Applikation im *Tissue Engineering*. Hier werden sie eingesetzt, um die Versorgung von Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport metabolischer Nebenprodukte zu optimieren. Bei der herkömmlichen statischen Zellkultur in Petrischalen, speziellen Kulturflaschen oder Mikrotiterplatten sind die Transportprozesse rein diffusionskontrolliert. Mit dieser Beschränkung können nur sehr kleine Konstrukte ausreichend versorgt werden. Bei größeren Konstrukten werden vor allem die Zellen im Inneren unterversorgt und sterben ab. Auf der Oberfläche des Gerüsts verbleibt eine Schicht aus Zellen in der von ihnen abgesonderten extrazellulären Matrix. Eine gleichmäßig dreidimensionale Verteilung von Zellen wird so nicht erreicht und die morphologischen und biomechanischen Eigenschaften des Konstruktes sind denen von nativem Gewebe weit unterlegen. Eine frühe Modellrechnung bestätigte diese experimentellen Daten und sagte voraus, dass die maximal erreichbare Dicke

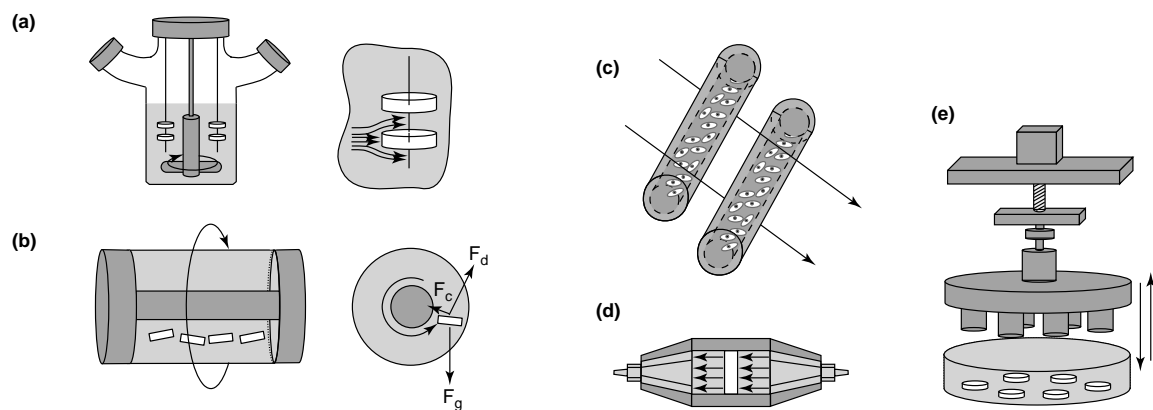


Abbildung 3.2.: Bioreaktoren im *Tissue Engineering*. (a) Spinnerflasche, (b) Bioreaktor mit rotierender Gefäßwand, (c) Hohlfaserreaktor, (d) Perfusionsreaktor, (e) Bioreaktor zur Applikation einer physikalischen Kraft (hier Druck). Quelle: Martin *et al.*¹¹².

eines Gewebes nur einen Millimeter beträgt, sofern der Transport allein diffusionskontrolliert ist¹⁸¹. Um ein Gewebe mit einer klinisch geeigneten Dicke zu generieren, ist die Modulation des Massentransportes ein essentieller Schlüsselfaktor für die Nährstoffversorgung und den Abtransport metabolischer Nebenprodukte und damit für die Vitalität der Zellen im Inneren eines großen Gerüsts. In einem Bioreaktor wird der diffusionskontrollierte Transport um konvektive Prozesse ergänzt, was die Versorgung der Zellen optimiert. Bioreaktoren ließen erstmalig die Herstellung von Konstrukten zu, die dicker als einen Millimeter waren^{137,53}.

Darüber hinaus soll ein Bioreaktor eine geeignete Umgebung für die Zellproliferation und -differenzierung schaffen. Grundsätzliche Kultivierungsparameter wie pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und Temperatur müssen also regulierbar sein. Die kontrollierten Kultivierungsparameter in einem Bioreaktor ermöglichen eine reproduzierbare Herstellung von Geweben.

In einem Bioreaktor können überdies mechanische Stimuli appliziert werden, die den mechanisch aktiven Bedingungen *in vivo* ähneln und Einfluss nehmen auf Proliferation und Differenzierung der Zellen. Die biologischen und mechanischen Eigenschaften des generierten Gewebes können auf diese Weise entscheidend verbessert werden.

Damit die Gewebekonstrukte für klinische Versuche und einen späteren Einsatz in der Therapie akzeptabel sind, muss die Kultivierung unter Einhaltung der Regeln der Guten Herstellungspraxis (*good manufacturing practice*, GMP) durchgeführt werden. Die GMP-Richtlinien setzen einen Standard an die Produktionsabläufe und -räume und sichern somit die Qualität der Produkte ab.

Spinnerflaschen Die häufigsten für einen Einsatz im *Tissue Engineering* beschriebenen Bioreaktortypen sind Spinnerflaschen, Perfusionssysteme und Reaktoren mit rotierender Gefäßwand (*rotating wall vessel*, RWV, vgl. Abbildung 3.2). Spinnerflaschen werden in der Regel

verwendet für die Kultivierung von Suspensionszellen. Das Medium und die in ihm suspendierten Zellen werden mit einem Magnetrührkern am Flaschenboden gerührt. Für die Kultivierung von Konstrukten aus adhärennten Zellen auf einer Gerüstsubstanz wurden modifizierte Spinnerflaschen beschrieben. Beispielsweise können die zellbesiedelten Gerüstsubstanzen in einem Körbchen oder mit Nadeln am Deckel befestigt im Medium hängen (vgl. Abbildung 3.2 (a)). Die turbulente Vermischung der Nährstoffe in der Spinnerflasche verbessert die biochemische Zusammensetzung und die Morphologie der hergestellten Gewebekonstrukte durch Verringerung der Konzentrationsgrenzschicht an der Oberfläche des Konstruktes. Verglichen mit der statischen Zellkultur wiesen Konstrukte aus Spinnerflaschen höhere Zelldichten und eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen im Konstrukt auf¹⁷⁹. Die turbulente Strömung und der damit verbundene erhöhte Scherstress induzieren häufig um das Konstrukt herum die Bildung einer fibrösen Kapsel, die die Ernährung interner Zellen unterbindet. Obwohl die Turbulenzen einen nützlichen Effekt für den Massentransport haben, existiert ein empfindliches Gleichgewicht zwischen der Erhöhung des Massentransfers und einer schädlichen Stärke des entstehenden Scherstress¹¹³.

Hauptsächlich werden Spinnerflaschen im *Tissue Engineering* für eine dynamische Besiedelung eingesetzt, bei der Zellen durch Kollision mit der Gerüstsubstanz auf diese aufgebracht werden⁶⁴. Eine einheitliche Besiedelung legt den Grundstein für ein späteres gleichmäßig durchwachsenes Konstrukt, wird allerdings auch in einer Spinnerflasche nicht erreicht. Die Effizienz der Besiedelung in der Spinnerflasche ist häufig gering und die Zellen wachsen hauptsächlich an der Oberfläche, was vermutlich auf eine ineffiziente Konvektion der Zellen in die innere Region des Gerüsts zurückzuführen ist.

Rotating Wall Vessel In Bioreaktoren mit rotierenden Gefäßwänden, die ursprünglich von der NASA entwickelt worden sind, werden die Konstrukte in einem dauerhaften Schwebezustand kultiviert (vgl. Abbildung 3.2, (b)). Die nach unten gerichtete Schwerkraft wird dabei von der Zentrifugalkraft, die durch die Rotation der Gefäßwand verursacht wird, aufgehoben². Die Drehung der Gefäßwand verursacht eine laminare Mediumströmung, in der die Konstrukte einer sehr geringen Scherbeanspruchung ausgesetzt sind. Auf dieser Technik basierende Systeme werden hauptsächlich für die Generierung von Weichgeweben eingesetzt, die auch *in vivo* keinen größeren Flüssigkeitsscherstress erfahren. Für die Herstellung von Knorpelkonstrukten hat sich dieses System im Vergleich mit Spinnerflaschen und anderen Bioreaktoren besonders bewährt, was sich in einer Förderung der chondrogenen Differenzierung und des Wachstums von Knorpelgewebe auswirkte^{151,178}. Knorpelzellen auf *Microcarriern* assemblierten spontan zu größeren gewebeähnlichen Strukturen und erreichten eine Dicke von bis zu fünf Millimetern⁵³. Für die Generierung von Hartgeweben wie Knochen allerdings hat sich diese Technik im Vergleich als weniger leistungsfähig herausgestellt. Sikavitsas *et al.* führten eine vergleichende Studie durch, bei der die Osteogenese mesenchymaler Stammzellen in drei verschiedenen

Kultursystemen untersucht wurde¹⁵⁸. Eine Nährstofflimitierung wurde in allen drei Systemen beobachtet: im statischen System, in der Spinnerflasche und im Reaktor mit rotierender Gefäßwand. Zellwachstum und Mineralisierung fanden hauptsächlich auf der Oberfläche der Konstrukte statt. Im Reaktor mit rotierender Gefäßwand war die Differenzierung der Zellen sehr gering, was mit den geringen mechanischen Stimuli in Zusammenhang gebracht wurde. Im statischen System war das Hauptproblem die limitierte Versorgung der Zellen in der Abwesenheit von Flüssigkeitsströmen. Trotzdem war hier die Differenzierung weiter fortgeschritten als im Reaktor mit rotierender Gefäßwand. In der Spinnerflasche waren die Konstrukte am weitesten ausgereift, die Zellzahl war am höchsten, Mineralisierung und Differenzierung waren am weitesten fortgeschritten. Demnach hat sich dieses Bioreaktorsystem mit rotierender Wand für die Herstellung großer Gewebekonstrukte als wenig geeignet erwiesen.

Hohlfaserreaktoren Hohlfaserreaktoren werden hauptsächlich für die Proteinproduktion durch Säugetierzellen eingesetzt^{39,92} und bestehen aus Hohlfasern, in denen die Zellen kultiviert werden, umspült von Medium, aus dem die Zellen Nährstoffe entnehmen und an das sie die produzierten Proteine abgeben (vgl. Abbildung 3.2 (c)). Modifizierte Hohlfaserreaktoren wurden auch für die Herstellung von Säugergewebe *in vitro* vorgeschlagen. Ein solcher Hohlfaserreaktor besteht in seiner einfachsten Form aus einem geschlossenen Gefäß gefüllt mit Medium und Zellen, in die ein Bündel semipermeabler Hohlfasern eingebracht ist. Die Hohlfasern stellen den Zellen Nährstoffe zur Verfügung und transportieren Stoffwechselnebenprodukte ab; sie spielen also eine ähnliche Rolle wie Blutgefäße *in vivo*. Der Hauptvorteil eines solchen Reaktors ist, dass Nährstoffe ins Innere eines Gewebes gebracht werden können. Allerdings entstehen an den Hohlfasern bedeutende Gradienten von Nährstoffen und Stoffwechselnebenprodukten, was wiederum zu einer heterogenen Verteilung von Zellen führt^{185,39}. Unmittelbar um die Hohlfaser herum entsteht eine gut versorgte Zellschicht, mit steigendem Abstand jedoch nimmt die Versorgung ab. Davon sind Zelldichte, Morphologie und Differenzierung betroffen. Für eine homogene Zellpopulation ist daher eine sehr hohe Zahl an Hohlfasern notwendig. Potter *et al.* berichteten von der Herstellung eines ein Millimeter dicken Knorpelkonstruktes in einem Hohlfaserreaktor¹³⁷. Dies stellt jedoch nur eine geringe Verbesserung gegenüber Reaktoren basierend auf einem Rührgefäß dar.

Für die Herstellung von Hartgewebe ist ein Hohlfaserreaktor jedoch wenig geeignet: Knochenzellen können durch Einlagerung von Calcium in die extrazelluläre Matrix eine Diffusionssperre errichten, die eine Ernährung der nächstäußeren Zellschicht stark behindert.

Perfusionsbioreaktoren Das Konzept des Hohlfaserreaktors wurde ausgeweitet auf ein System, in dem Medium kontinuierlich durch eine dreidimensionale offenporige Gerüstsubstanz strömt, die mit Zellen besiedelt ist (vgl. Abbildung 3.2 (d)). Der diffusionskontrollierte Massentransport wird hierbei nicht nur an der Peripherie des Konstruktes sondern auch im Inneren

des Konstruktes um konvektive Prozesse ergänzt. Zusätzlich wird durch die Flüssigkeitsströmung eine mechanische Stimulation in Form von Scherbeanspruchung induziert. Die Tatsache, dass Flüssigkeitsscherstress die Osteogenese *in vivo* bekanntermaßen fördert, hat dazu geführt, dass Perfusionssysteme häufig bei der Entwicklung von Knochengewebekonstrukten Einsatz finden^{15,2}. Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark, die parallel unter statischen Bedingungen und in einem Perfusionssystem kultiviert wurden, zeigten einen stark erhöhten Mineralisierungsgrad der von den Zellen im Perfusionsreaktor abgeschiedenen extrazellulären Matrix¹⁵. Auf dem statisch kultivierten Konstrukt hatten sich die Zellen nur auf der Oberfläche angesiedelt, während Zellen und extrazelluläre Matrix in dem Konstrukt im Perfusionssystem homogen verteilt waren.

Perfusionsreaktoren werden nicht nur zur Kultivierung sondern auch zur Besiedelung von Gerüstsubstanzen genutzt¹⁸². Gegenüber der konventionellen statischen Besiedelungsmethode führt die dynamische Besiedelung im Perfusionssystem zu höheren anfänglichen Zelldichten und zu einer einheitlichen Verteilung von Zellen und extrazellulärer Matrix im Konstrukt¹⁰⁴. Die guten Ergebnisse mit Perfusionsreaktoren zeigten, dass eine angemessene Perfusion für die Generierung funktionaler Knochenkonstrukte förderlich ist. Auch *in vivo* werden die Umbauprozesse des Knochens von der Strömung interstitieller Flüssigkeit beeinflusst.

Mechanisch stimulierende Reaktoren Mechanische Dehnung, Beugung, Torsion, Kompression und zyklischer hydrostatischer Flüssigkeitsdruck sind wichtige Regulatoren der Zellphysiologie und beeinflussen die Genexpression und die Synthese extrazellulärer Matrix. Vor allem beim muskuloskelettalen *Tissue Engineering* können sie die Gewebekonstruktion unterstützen.

Die Applikation einer physikalischen Stimulation in einem Bioreaktor muss spezifisch an das zu generierende Gewebe angepasst werden. Für die Herstellung von Blutgefäßen wurden zum Beispiel glatte Muskelzellen auf einem tubulären Gerüst pulsatil radial gedehnt, was die strukturelle Organisation des Blutgefäßes erhöhte und dafür sorgte, dass es nach der Implantation offen blieb¹²⁹. Auch zyklische Dehnung verbesserte die Gewebeorganisation und die Elastinexpression von glatten Muskelzellen und erhöhte die mechanischen Eigenschaften von Geweben aus Skelettmuskelzellen⁹¹. Kompression und Scherung von Chondrozyten eingebettet in eine dreidimensionale Umgebung stimulierte die Synthese von Glucosaminoglykanen⁴⁵ und verbesserte die mechanischen Eigenschaften des resultierenden Knorpels¹¹⁴. Translational- und Rotationsstimulation mesenchymaler Stammzellen in einem Kollagen-Gel induzierte die Ausrichtung der Zellen und die Bildung orientierter Kollagenfasern⁷. Sehnenspezifische Gene wurden vermehrt exprimiert.

Für die Herstellung funktionalen Knochengewebes hat sich besonders der flüssigkeitsinduzierte Scherstress in Perfusionsreaktoren als vorteilhaft erwiesen. Auch andere Reaktortypen, die mit mechanischer Dehnung oder Beugung arbeiten, zeigten Erfolge bei der Knochenbildung^{8,115}.

Eine spezifische mechanische Stimulierung kann nicht nur die Entwicklung eines Gewebes unterstützen und seine mechanischen Eigenschaften verstärken, sondern auch direkt die Differenzierung multipotenter Zellen in Richtung spezieller Gewebe fördern (vgl. Abschnitt 3.4, Seite 26).

3.2.3. Zellen

Neben Biomaterial und Kultivierungsbedingungen ist die Wahl der Zellquelle der entscheidende Schritt für die Konstruktion eines künstlichen Gewebes. Da die Zellen die biologischen und mechanischen Eigenschaften des Gewebes bedeutend beeinflussen, müssen die verwendeten Zellen dieselben oder zumindest sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen wie diejenigen, die im nativen Gewebe vorliegen. Um ein Knochengewebe herzustellen, kommen also im engeren Sinne nur Knochenzellen in Frage.

Die Quelle für die Zellen kann autolog sein (patienteneigene Zellen) oder allogon (Spenderzellen). Autologe Zellen haben den Vorteil, dass sie weder eine Immunreaktion auslösen noch das Implantat selbst auf den Empfänger reagiert (*graft versus host disease*, GvHD). Die Übertragung von Infektionskrankheiten kann ebenfalls weitgehend ausgeschlossen werden, sofern nicht bei der Kultivierung Erreger eingeschleppt werden (z. B. über Tierseren). Der Nachteil der autologen Zellquelle ist, dass die Zellen in einer separaten Operation gewonnen werden müssen, was nicht nur ein höheres Risiko für den Patienten darstellt, sondern auch zu ernsthaften Beschwerden an der Explantationsstelle führen kann. Außerdem ist die Zahl der Zellen, die vom Patienten selbst gewonnen werden können, häufig limitiert. Für Knorpel z. B. steht kaum Spendergewebe zur Verfügung, für Knochen nur in geringem Maße. Bei ungenügender Zellzahl kann auf eine allogene Zellquelle ausgewichen werden, wobei dann aber auf die genannten Vorteile der patienteneigenen Zellen verzichtet werden muss. Es besteht ein erhöhtes Risiko der Implantatabstoßung und der Übertragung von Infektionskrankheiten.

Die terminal differenzierten Zellen, die aus dem Spendergewebe isoliert werden, verfügen häufig nur über ein eingeschränktes Proliferationspotenzial¹⁴. Eine Expansion solcher Zellen zu gewebeähnlichen Zelldichten *in vitro* kann schwierig werden. Eine Alternative zu terminal differenzierten Zellen stellen Stammzellen dar, da diese im Prinzip über eine beinahe uneingeschränkte Proliferationskapazität verfügen. Stammzellen werden über zwei für sie typische Eigenschaften definiert: die Fähigkeit, über lange Zeiträume identische Kopien ihrer selbst zu erzeugen (Selbsterneuerung) und außerdem Zellen unterschiedlicher Gewebezugehörigkeit hervorzubringen¹⁴⁶. Je nachdem, wieviele unterschiedliche Arten von Gewebezellen sie hervorbringen können, werden sie als toti-, pluri- oder multipotent bezeichnet. Die Stammzellforschung hat gezeigt, dass Stammzellen auch *in vitro* gezielt zu gewebespezifischen Zellen differenziert werden können. Damit werden sie zu einer interessanten Zellquelle für das *Tissue*

Engineering, da sie zunächst im undifferenzierten Zustand vervielfältigt werden können, um sie dann, angepasst an das jeweils zu bildende Gewebe, zielgerichtet zu differenzieren.

Das Interesse der Forschung hat sich zunächst auf die embryonalen Stammzellen gerichtet, die als innere Zellen der Blastozyste alle Gewebe eines Embryos bilden können (Pluripotenz). Die Gewinnung embryonaler Stammzellen ist aber in Deutschland aufgrund ethischer Aspekte nicht zulässig (weltweit existieren allerdings keine einheitlichen gesetzlichen Regelungen). Basierend auf diesen Erwägungen wurden vermehrt alternative Zellquellen untersucht. Auch im erwachsenen Organismus existieren Stammzellen, die jedoch in ihrem Differenzierungspotenzial eingeschränkt sind. Diese adulten Stammzellen sind verantwortlich für Geweberegeneration und Umstrukturierungsprozesse, indem sie neue Zellen hervorbringen, die differenzieren und die alten Zellen ersetzen. Adulte Stammzellen sind für jedes Gewebe beschrieben worden, sogar für Nervengewebe, dessen Regenerationspotenzial sehr eingeschränkt ist¹⁷⁰. Große Aufmerksamkeit erhalten zurzeit die mesenchymalen Stammzellen. Diese Zellen können mit einfachen Methoden aus verschiedenen Geweben isoliert werden und zu allen Geweben mesenchymalen Ursprungs (Knochen, Knorpel, Sehnen, Bänder, Muskeln und ähnliche) differenzieren. Damit können sie als Zellquelle für das *Tissue Engineering* verschiedener Gewebe dienen. Gegenüber den embryonalen Stammzellen haben sie (neben ethischen Gesichtspunkten) den Vorteil, dass sie autolog gewonnen werden können, was die Kompatibilität des Implantats deutlich erhöht.

3.3. Mesenchymale Stammzellen

Die Entdeckung der mesenchymalen Stammzellen geht zurück auf Arbeiten der Gruppe von Friedenstein, die im Knochenmark neben den blutbildenden (hämatopoetischen) Zellen auch eine Population adhärenter Zellen entdeckten⁵⁶. Kulturen dieser Zellen bildeten kleine Kolonien von zwei bis vier Zellen, die einige Tage inaktiv blieben und dann begannen, sich rasch zu vervielfältigen. Friedenstein nannte diese Zellen fibroblastäre koloniebildende Einheiten (*fibroblast colony forming units* CFU-F). Nach mehreren Passagen wiesen die Zellen eine einheitliche spindelförmige Morphologie auf. Außerdem beobachteten Friedenstein *et al.*, dass die Zellen zu knochen- oder knorpelähnlichen Kolonien differenzieren konnten.^{60,56,58,54,59,57,55}

Die Arbeiten von Friedenstein wurden in den 1980er Jahren von mehreren Arbeitsgruppen aufgenommen und weitergeführt, wobei sich zeigte, dass die durch Friedensteins Methode isolierten Zellen multipotent waren und zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren konnten. Zusammen mit ihrer Adhärenz zu Zellkulturplastik und ihrem Potenzial zur Selbsterneuerung wurde dieses Differenzierungspotenzial zum Charakteristikum für eine Zellpopulation, die im Verlauf der weiteren Jahre eine Vielzahl von Namen erhielt. Heute wer-

den solche Zellen entweder nach ihrer Herkunft als Knochenmarkstromazellen (*marrow stromal cells*, MSCs) oder aufgrund ihres Differenzierungspotenzials als mesenchymale Stammzellen (*mesenchymal stem cells*, MSCs) bezeichnet. Letztere Bezeichnung wurde ursprünglich von Caplan vorgeschlagen³³.

Genauere Untersuchungen der mesenchymalen Stammzellen zeigten, dass es sich nicht um homogene Kulturen, sondern um Mischpopulationen von Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften handelt. Es fanden sich Zellen unterschiedlicher Morphologie, die ungleiche Proliferationsraten aufwiesen und auch bezüglich ihres Differenzierungspotenzials voneinander abwichen. Kulturen mesenchymaler Stammzellen sind in der Regel zusammengesetzt aus Zellen, die in ihrer Differenzierung unterschiedlich weit vorangeschritten sind. Neben undifferenzierten Stamm- und Progenitorzellen sind auch solche Vorläuferzellen enthalten, die bereits auf eine bestimmte Differenzierungsrichtung festgelegt und nur noch wenige Schritte von einer terminalen Differenzierung entfernt sind^{143,195}.

Nachdem sie zunächst über ihre Fähigkeit, *in vitro* in Knochen, Fett und Knorpel zu differenzieren, identifiziert worden waren, zeigten weitere Studien eine Differenzierung von MSCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in nahezu alle Gewebe mesenchymalen Ursprungs, darunter auch Sehne, Muskel und die Hämatopoese unterstützendes Stroma¹³⁶.

Lange Zeit wurde angenommen, dass adulte Stammzellen in ihrer Entwicklung so weit festgelegt sind, dass aus ihnen nur Zellen desjenigen Gewebes entstehen können, aus dem sie selbst stammen. Dieses deterministische Prinzip geriet allerdings ins Wanken, nachdem Transdifferenzierungen von hämatopoetischen Stammzellen zu Leberzellen¹³³ und von neuronalen Zellen zu hämatopoetischen Zellen¹⁸ gelungen sind. Auch für mesenchymale Stammzellen wird mittlerweile eine solche Stammzellplastizität postuliert und ihre Transdifferenzierung zu Zellen neuroektodermalen Ursprungs und entodermalen Ursprungs (neuronale Zellen, Endothelzellen¹⁴² und spontan zuckende Myotuben¹⁸⁰) für möglich gehalten. Die meisten Studien, die die Bildung von neuronalen oder Gliazellen aus MSCs zeigten, wurden allerdings *in vitro* durchgeführt^{71,6}. Nur wenige Studien zeigten *in vivo* eine Differenzierung zu Zellen mit neuronalen Eigenschaften^{11,107}. Hofstetter *et al.* berichteten, dass die „neuronalen“ Zellen keine spannungsgesteuerten Ionenkanäle aufwiesen, die für die Generierung von Aktionspotenzialen nötig sind⁷². Damit können diese Zellen kaum als echte Neuronen klassifiziert werden. Trotzdem häufen sich weiterhin Studien, die eine Bildung von Zellen des Nervengewebes wie Neuronen, Astrozyten¹⁸⁶, Oligodendrozyten⁷¹ und Schwannzellen⁹⁰ *in vitro* aus MSCs berichten. Über die Mechanismen dieser Differenzierung ist eine intensive Debatte entstanden, in der die tatsächliche Differenzierung einzelner mesenchymaler Stammzellen zu Neuronen oder auch Myoblasten der Hypothese gegenübersteht, dass eine Fusion einer mesenchymalen Stammzelle mit einer somatischen gewebespezifischen Zelle (Neuron oder Myoblast) ausschlaggebend für die neuen neuronalen oder myoblastären Eigenschaften ist.

Mittlerweile wurden MSCs und MSC-ähnliche Zellen aus verschiedenen Geweben isoliert, darunter Fettgewebe¹⁹⁷, peripheres Blut¹⁹⁹, Haut⁴⁰, Spongiosa des Knochens¹⁶², Periost¹²⁴, Plazenta⁷⁹, Amnionflüssigkeit¹⁶⁸, Nabelschnurblut⁴⁹, Nabelschnurgewebe¹⁴⁷ und auch aus verschiedenen fetalen Geweben wie Amnionmembran⁹, Blut, Knochenmark, Leber und Lunge^{167,32}. Die Hypothese wurde aufgestellt, dass Zellen mit charakteristischen mesenchymalen Stammzeleigenschaften in offenbar allen postnatalen Geweben und Organen ansässig sind.

Aufgrund der Heterogenität der Kulturen konzentrieren sich viele Untersuchungen auf die Charakterisierung von MSC-Kulturen. Dabei stellte sich heraus, dass der Oberflächenantigenphänotyp der MSCs nicht einzigartig ist, sondern Eigenschaften mesenchymaler, endothelialer, epithelialer und Muskelzellen vereint. Dabei ist bis heute weder ein einzelner noch eine Kombination von Markern gefunden worden, die spezifisch auf MSCs exprimiert werden. Daher steht formal der Beweis der Existenz von mesenchymalen Stammzellen in ihrer Stammzellnische *in vivo* noch aus.

Die meisten Studien stimmen darüber überein, dass MSCs die Oberflächenantigene CD13, CD29, CD31, CD44, CD54, CD63, CD71, CD73 (SH3/4), CD90, CD105 (SH2), CD106, CD140b, CD166 und Stro-1 exprimieren, während sie die typischen hämatopoetischen Marker (CD11, CD14, CD34, CD45) nicht aufweisen^{69,136,161}. Abweichungen in der Expression der Oberflächenantigene können in Abhängigkeit von der Gewebeherkunft der Zellen, der Isolierungs- und der Kultivierungsmethoden auftreten. CD106 zum Beispiel wird auf Knochenmark-MSCs (*bone marrow stromal cells*, BMSCs) exprimiert, auf MSCs aus dem Fettgewebe (*adipose tissue derived* MSCs, adMSCs) hingegen nicht¹⁹⁸. Im Knochenmark ist CD106 funktional mit der Hämatopoese in Zusammenhang gebracht worden, so dass sein Fehlen auf adMSCs mit der Lokalisation dieser Zellen in einem nicht-hämatopoetischen Gewebe im Einklang steht. Außerdem treten Begleitzellen auf, die zunächst bei der Isolierung nicht abgetrennt wurden und erst während der folgenden Passagen in Kultur verschwinden. Diese können Faktoren ausschütten, die die Expression der Oberflächenmarker beeinflussen. Das Oberflächenantigenprofil von MSCs *in vitro* muss daher nicht unbedingt mit den Bedingungen *in vivo* übereinstimmen.

Die Expression bestimmter Oberflächenantigene wird häufig neben den bekannten Eigenschaften von MSCs als zusätzliches Selektionskriterium zur Isolierung oder Anreicherung von MSCs eingesetzt. Dabei werden mit einer unterschiedlichen Auswahl an Antikörpern vermutlich leicht unterschiedliche Zellpopulationen isoliert. Mittlerweile gibt es unzählige Methoden zur Isolierung und Expansion von MSCs. Mangels Standardisierung ist der Vergleich von publizierten Daten verschiedener Gruppen schwierig. Zusätzlich ist noch zu beachten, dass auch Alter, Geschlecht und physische Kondition der Spender einen Einfluss auf das Expressionsprofil haben.

Die autologe Verfügbarkeit von MSCs, ihre relativ einfache Isolierung und Expansion in Zellkultur und die Tatsache, dass MSCs *in vitro* in verschiedene Zelltypen differenziert werden können, machen MSCs zu einer vielversprechenden Stammzellquelle für klinische Applikationen im Bereich des *Tissue Engineerings*. In der Tat sind MSCs eine der wenigen Stammzellpopulationen, die bereits in der Klinik eingesetzt werden. Infolge ihres osteogenen und chondrogenen Differenzierungspotenzials wurden MSCs bereits eingesetzt, um die Reparatur großer Knochen- und Knorpeldefekte zu unterstützen. Ermutigende Resultate mit Implantaten und *ex vivo* kultivierten BMSCs (zunächst im Nacktmausmodell und dann in größeren Tieren^{27,95,134}) führten zu ersten klinischen Versuchen bei Patienten mit verschiedenen segmentalen Defekten von Langknochen (zwischen 4 und 7 cm Länge), bei denen alle traditionellen therapeutischen Ansätze erfolglos gewesen waren¹³⁸. Den Patienten wurde Knochenmark entnommen, aus dem BMSCs isoliert wurden. Ein dreidimensionales Hydroxylapatit-Gerüst der Größe und Gestalt des jeweils fehlenden Knochenfragments wurde mit den *ex vivo* expandierten Zellen besiedelt und mit externer Fixierung in den Defekt implantiert. Die Implantate zeigten eine gute Integration und die Genesung wurde deutlich früher erreicht als bei Patienten, die mit Standardmethoden behandelt wurden. Eine Nachfolgeuntersuchung sechs bis sieben Jahre nach der Implantation zeigte keine Komplikationen, keine Zeichen von Schmerzen, Schwellungen oder Infektionen in der Gegend des Implantats¹¹⁰. Das Implantat war gut in das benachbarte Gewebe integriert und es traten keine sekundären Frakturen auf. Dies belegt die Stabilität eines solchen Konstruktes über lange Zeit.

Von einem weiteren klinischen Einsatz mesenchymaler Stammzellen berichteten Lendeckel *et al.*¹⁰⁰. Sie reparierten bei einem siebenjährigen Mädchen einen großflächigen Schädeldefekt, der nach einer schweren Kopfverletzung zurückgeblieben war. Da sie nicht genügend autologes Knochengewebe entnehmen konnten, isolierten sie autologe MSCs aus dem Fettgewebe und brachten sie in den Schädeldefekt ein, wo sie durch Fibrinkleber gehalten wurden. Eine mechanische Fixierung wurde erreicht durch zwei große resorbierbare poröse Implantate. Der postoperative Verlauf wurde als ereignislos beschrieben und Computertomografie-Bilder zeigten die Bildung neuen Knochens und einen nahezu gleichmäßigen Schädelknochen drei Monate nach der Operation.

Helder *et al.* schlugen ein experimentelles Operationskonzept vor, bei dem in einer einstufigen zwei- bis dreistündigen Operation Fettgewebe isoliert wird, die adMSCs daraus aufgearbeitet, mit bioaktiven Agenzien osteogen stimuliert und auf einem Gerüst aus Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat in den Defekt implantiert werden. Bei einer Spinalfusion (lokale Versteifung der Wirbelsäule durch Fusionierung zweier Wirbel) im Ziegenmodell haben Helder *et al.* diese Prozedur bereits erfolgreich durchgeführt⁷⁰.

Eine etwas anders geartete Therapie eines Knochendefektes führten Horwitz *et al.* durch. Sie schlugen eine Behandlung der genetischen Krankheit Osteogenesis imperfecta mit Knochen-

markstammzellen vor⁷⁵. Dieser Krankheit liegt eine Genmutation von Kollagen I zugrunde, wodurch das zugehörige Protein nicht korrekt gebildet werden kann. Patienten mit Osteogenesis imperfecta leiden an Knochendeformationen, einer starken Brüchigkeit der Knochen („Glasknochenkrankheit“) und weisen eine insgesamt geringe Knochenmasse und ein verlangsamtes Wachstum auf. Auch andere Bindegewebe sind betroffen, da das Vorkommen von Kollagen I nicht auf Knochengewebe beschränkt ist. Horwitz *et al.* zeigten zunächst, dass eine allogene Knochenmarktransplantation bei Kindern mit schwerer Osteogenesis imperfecta Knochenwachstum und -mineralisierung beschleunigen können⁷⁶. Während der Mineralgehalt des Knochengewebes auch über längere Zeit mit dem gleichaltriger Kinder vergleichbar blieb, hielt das beschleunigte Wachstum jedoch nicht lange an. Etwas später behandelten Horwitz *et al.* Kinder mit schwerer Osteogenesis imperfecta, die bereits eine Knochenmarktransplantation erhalten hatten, mit einer zweimaligen Infusion von allogenen mesenchymalen Stammzellen⁷⁴. Bei fünf von sechs Kindern integrierten sich die Zellen in ein oder mehrere Gewebe und die Wachstumsgeschwindigkeit der Kinder nahm zu.

Bedeutend für die klinische Anwendung sind die neuesten Berichte über die immunologischen Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen. Sie werden als nicht oder nur gering immunogen betrachtet, was bedeutet, dass sie der Detektion durch das Immunsystem des Empfängers eventuell entgehen können. Dies könnte eine allogene Transplantation ohne Immunsuppression ermöglichen. MSCs exprimieren zwar geringe Level von MHC-Klasse-I-Molekülen, was zu einer Aktivierung von T-Zellen führen könnte, aber die für die Immunreaktion nötigen kostimulierenden Faktoren (CD40, CD80, CD86) werden nicht exprimiert, so dass kein sekundäres Signal auftritt und die T-Zellen inaktiv bleiben⁸³. MHC-Klasse-II-Moleküle werden von MSCs überhaupt nicht gebildet.

Neben der niedrigen Immunogenität werden den MSCs auch immunmodulatorische und immunsuppressive Eigenschaften zugeschrieben. Zahlreiche Studien zeigen, dass MSCs fähig sind, die Funktion verschiedener Immunzellen *in vitro* zu modulieren^{128,16,187}. Sie können die T-Zellaktivierung und -proliferation inhibieren, die Reifung und Funktion dendritischer Zellen vermindern und die Proliferation, Differenzierung und Chemotaxis von B-Zellen inhibieren^{3,84,17,43}. Diese Eigenschaften verleihen den MSCs die Fähigkeit, eine bereits ausgelöste Immunreaktion zu unterdrücken.

Die Aufklärung der Mechanismen, die den möglichen immunmodulatorischen Effekten der MSCs zugrunde liegen, bleibt eine kritische und ungelöste Aufgabe. Die bisher bekannten Daten zu den immunologischen Eigenschaften der MSCs sind noch nicht ausgereift und beinhalten noch Widersprüche. So wird meistens die humane MSC-vermittelte Immunsuppression gegenüber aktivierten T-Lymphozyten auf die Sekretion antiproliferativer löslicher Faktoren zurückgeführt^{128,19}. Es wurden aber auch Hinweise gefunden, dass ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig ist, so dass zumindest ein Teil der immunsuppressiven Effekte der humanen MSCs

gegenüber aktivierten T-Zellen auf Zell-Zell-Kontakten basiert^{97,187}. Eine Hypothese ist, dass MSCs nach Transplantation oder systemischer Applikation zu anderen Geweben und Organen wandern (*homing*). Tatsächlich wurde in Tierstudien beobachtet, dass MSCs zu lymphoiden Organen migrieren¹⁹³ und an Stellen mit Gewebeschaden oder Tumorwachstum anwachsen¹⁶³. Die immunsuppressiven Fähigkeiten der MSCs haben ein klinisches Interesse geweckt für eine mögliche unterstützende Anwendung bei der Organtransplantation und der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Eine Applikation von MSCs wird als potenzielle Zelltherapie angesehen für die Verhinderung von Implantatabstoßung und Behandlung der *graft versus host disease* (GvHD). Die Fähigkeit der MSCs, GvHD zu unterdrücken oder rückgängig zu machen, wurde bereits mehrfach beschrieben. Eine systemische Infusion *ex vivo* expandierter adMSCs konnte bei Mäusen nach der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen eine letale GvHD kontrollieren¹⁶⁵. Die Einsetzbarkeit von MSCs zur Immunmodulation oder -suppression wird derzeit in mehreren europäischen klinischen Studien (Phase I–III) getestet. Dabei werden hämatopoetische Stammzelltransplantate in Kombination mit *in vitro* expandierten MSCs eingesetzt und der therapeutische Nutzen von MSCs für die Prävention akuter GvHD nach einer allogenen Stammzelltransplantation untersucht. Ein Rückschlag war allerdings die Beobachtung einer Abstoßungsreaktion humaner MSCs bei Ratten mit intaktem Immunsystem, während das Transplantat bei immunologisch nicht-kompetenten Ratten akzeptiert wurde⁶⁶. Diese Studien unterstützen die Auffassung, dass allogene MSCs nur bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem oder an immunprivilegierten Stellen anwachsen können, aber bei Patienten mit intaktem Immunsystem eine Immunreaktion auslösen. Aufgrund ihrer Fähigkeit, Immunreaktionen zu modulieren und außerdem die Gewebereparatur zu unterstützen, wurden MSCs als potenzielle Behandlung für verschiedene Autoimmunkrankheiten vorgeschlagen. Tatsächlich wurden MSCs in experimentellen Tiermodellen von Multipler Sklerose und Diabetes erfolgreich eingesetzt, allerdings weniger erfolgreich für Rheumatoide Arthritis¹⁷⁴. Außerdem könnte die Infusion von MSCs protektive Wirkungen haben auf Neuronen bei einer Rückenmarksverletzung⁷², einem Schlaganfall³⁸ oder amyotropher Lateralsklerose¹¹⁶. In den hierzu durchgeführten Studien schienen die therapeutischen Effekte der MSCs nicht mit einer direkten neuronalen Differenzierung assoziiert zu sein. Trotz der vielen Hinweise, dass MSCs zu fast allen Zelltypen differenzieren können, schienen therapeutische Effekte meistens mit ihrer immunmodulatorischen Kapazität verbunden zu sein und der Stimulation des Überlebens und der funktionalen Genesung von ansässigen Zellen in den verletzten Organen. Dabei spielt vermutlich die Produktion trophischer Faktoren eine Rolle, die das Überleben und die Reparatur geschädigter Zellen unterstützen sowie lokale Vorläuferzellen rekrutieren¹⁰⁶. Mögliche negative Aspekte der Immunsuppression von MSCs könnten sein, dass sie das Wiederauftreten der Leukämie ermöglichen könnten, bei deren Behandlung mit hämatopoetischen

Zellen sie unterstützend eingesetzt wurden. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die Immunsuppression das Auftreten letaler Infektionen zulassen¹⁰⁶. Daten, die solche Effekte belegen, gibt es bisher allerdings nicht.

Wenig ist bekannt über das Überleben von MSCs *in vivo* und es gibt keine klinischen Studien, die berichten, ob MSCs nach der Transplantation im Gewebe vorhanden bleiben. Obwohl die wenigen bisher durchgeführten klinischen Studien die Sicherheit der MSC-Infusion bestätigen, könnte das Fehlen nachteiliger Effekte auf ein limitiertes Überleben der MSCs zurückzuführen sein. In Tierexperimenten sind öfter unerwartete Effekte aufgetreten. So wurden kürzlich Calcifizierungen in Mauserzen gefunden, die nach einem Infarkt mit MSCs behandelt worden waren (ektopische Knochenbildung)²⁰. Einige Studien mit Mäusen deuten an, dass durch spontane Mutationen von mesenchymalen Stammzellen Tumore entstehen können. Beim Menschen ist dieses Phänomen bisher noch nicht beschrieben worden¹¹⁹. Bei humanen adMSCs und murinen BMSCS wurde eine spontane Transformation in Langzeitkulturen beobachtet. Humane adMSCs können sicher durch die Standard-*ex vivo*-Expansionsperiode von sechs bis acht Wochen gebracht werden. Bei einer Langzeitkultivierung *in vitro* (vier bis fünf Monate) können sie jedoch eine spontane Transformation durchlaufen.¹⁴⁹ Für den klinischen Einsatz von MSCs bleiben also Bedenken bezüglich ihres bisher zu wenig untersuchten Potenzials systemischer Immunsuppression. Eine ektopische Gewebebildung und maligne Transformation müssen unbedingt ausgeschlossen werden¹²⁵.

3.4. Mechanische Stimulation

Knochen ist wie viele andere Gewebe mechanisch aktiv, indem er nicht nur der Schwerkraft unterworfen ist, sondern vor allem als Ankerpunkt für die Muskulatur dient, die bei der Kontraktion Zugkräfte auf das Skelett ausübt¹²³. An Art, Stärke und Häufigkeit der auftretenden physikalischen Kräfte passt sich das Skelett durch Umstrukturierungsprozesse an. Wird die Muskulatur durch vermehrtes Training verstärkt, so reagiert der Knochen mit Dickenwachstum. Auf der anderen Seite nimmt die Knochenmasse ab, wenn die körperliche Bewegung eingeschränkt wird. Besonders stark sind diese Auswirkungen bei Astronauten nach längerem Aufenthalt in der Schwerelosigkeit zu beobachten^{28,159}.

Der Mechanismus der Mechanotransduktion, also die Art, wie die physikalischen Kräfte von den Knochenzellen wahrgenommen und weitergeleitet werden und letztendlich zu einer zellulären Antwort führen, ist derzeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die Zellen, die eine mechanische Belastung des Knochens wahrnehmen, verarbeiten und weiterleiten und damit die Rolle von Mechanosensoren übernehmen, sind höchstwahrscheinlich die Osteozyten^{30,48}. Wahrgenommen wird von ihnen nicht nur die primäre Deformation (Zugkräfte von Muskeln,

Kompressionskräfte durch Stauchung) des Knochens, sondern vor allem Flüssigkeitsströme, die durch die Belastung in der extrazellulären Matrix ausgelöst werden¹⁴⁴. Ein Strom von interstitieller Flüssigkeit durch die Lakunen, in denen die Zellkörper der Osteozyten liegen, und die Canaliculi, durch die sich deren dünne Ausläufer erstrecken, verursacht Scherkräfte (Flüssigkeitsscherstress) und induziert elektrische Potenziale (Strömungspotenziale). Über mechanosensitive Ionenkanäle^{35, 153}, Fokalkontakte^{80, 109} (bestehend aus Integrinen, über die das Zytoskelett der Zelle an der extrazellulären Matrix verankert ist) und einen putativen G-Proteingekoppelten Mechanotransduktor¹⁴¹ gelangt das Signal in das Zellinnere, wo Signaltransduktionskaskaden letztendlich im Zellkern die Genexpression modifizieren. Der zytoplasmatische Calciumspiegel wird schnell erhöht durch Einstrom von Calcium-Ionen über aktivierte Calciumkanäle der Plasmamembran und durch die Aktivität der Phospholipase C und den Inositol-1,4,5-trisphosphat-(IP₃)-Signaltransduktionsweg, der die Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern induziert. Calcium-abhängige Kinasen wie die Proteinkinase C und Ras aktivieren Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK), die zusätzlich auch von der fokalen Adhäsions-Kinase (FAK) aktiviert werden¹⁰⁵. Auch die ATP-Ausschüttung von Knochenzellen, die innerhalb einer Minute nach einer mechanischen Stimulation auftritt⁶², ist über G-Proteine gekoppelt an die Signalwirkung intrazellulärer Calcium-Ionen⁸⁶ (ausführliche Abbildung der Signaltransduktionswege, siehe Anhang C.2, Seite 165). Die einzelnen Signalwege führen letztlich zu einer Aktivierung (oder Deaktivierung) bestimmter Transkriptionsfaktoren, die in den Zellkern wandern und dort die Genexpression beeinflussen. So führt die mechanische Stimulation zur vermehrten Bildung von Wachstumsfaktoren wie IGF (I und II), VEGF, TGF- β 1, BMP-2 und -4, die über autokrine und parakrine Mechanismen benachbarte und weiter entfernte Zellen beeinflussen¹⁰⁵. Über die entsprechenden Rezeptoren lösen sie dann ihrerseits Signaltransduktionskaskaden aus. Diese interzelluläre Weiterleitung der Signale, an der auch Prostaglandine und Stickstoffmonoxid beteiligt sind^{62, 117}, verstärkt die Reaktion auf die mechanische Belastung.

Im *Tissue Engineering* hat die Applikation physikalischer Kräfte Einsatz gefunden, nachdem festgestellt wurde, dass in statischer Kultur hergestellte Gewebekonstrukte häufig eine deutlich geringere mechanische Stabilität aufwiesen als das native Gewebe². Durch mechanische Stimulationen während der Kultivierung *in vitro* sollen die Zellen an ihre zukünftige aktive Umgebung gewöhnt werden. Außerdem zeigte sich, dass Differenzierungsprozesse und Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen durch mechanische Stimulation *in vitro* beeinflusst werden können⁷.

Technisch wurden viele unterschiedlichen Möglichkeiten realisiert, wie kultivierte Zellen physikalischen Kräften unterworfen werden können. Die Wahl des mechanischen Stimulus ist dabei abhängig von dem jeweiligen Zielgewebe und wird in der Regel an die *in vivo* vorherrschenden Kräfte angepasst. So werden Endothelgewebe, die *in vivo* die Auskleidung von Blutgefäßen bil-

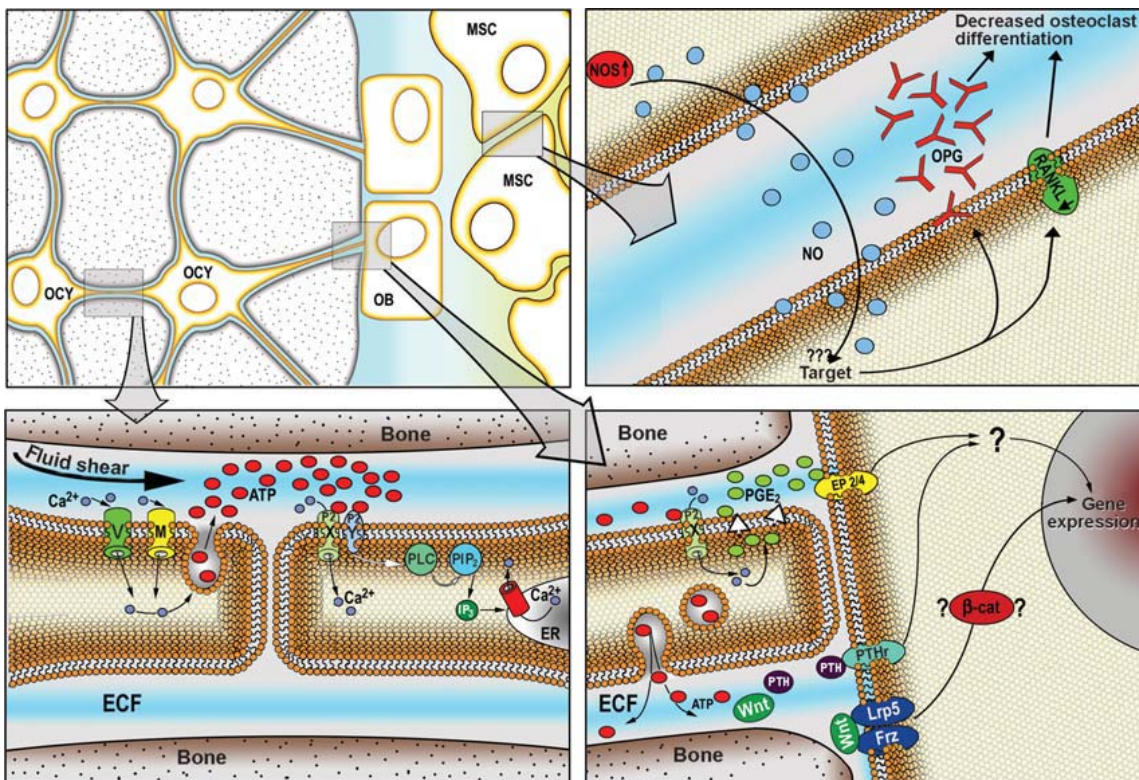


Abbildung 3.3.: Modell der Mechanotransduktion im Knochen. Flüssigkeitsscherstress an Osteozyten (OCY) induziert einen Influx extrazellulärer Calcium-Ionen durch spannungsgesteuerte (V) und evtl. mechanosensitive (M) Ionenkanäle. Der Scherstress führt zu einer Ausschüttung von ATP, das an die Purinozeptoren P₂X (ionotroph) und P₂Y (metabotroph) benachbarter Zellen bindet. Die folgenden Signaltransduktionskaskaden erhöhen den intrazellulären Calciumpegel und führen zu der Ausschüttung von Prostaglandin E₂ (PGE₂), das wiederum die Knochenbildung fördert. Auch Parathormon (PTH) und Wnt sind an der mechanisch induzierten Knochenbildung beteiligt. Stickstoffmonoxid (NO), gebildet von der NO-Synthase (NOS), ist ein starker Inhibitor der Knochenresorption und wirkt wahrscheinlich durch die Inhibition der RANKL-Expression und Verstärkung der Osteoprotegerin-(OPG)-Produktion. (RANKL verstärkt die Osteoklastendifferenzierung, während OPG diesen Prozess unterdrückt.) Quelle: Robling *et al.*¹⁴⁴.

den, mit Medium überströmt, wodurch ein Scherstress induziert wird. Das *Tissue Engineering* von Sehnen und Bändern bedient sich dagegen hauptsächlich der Dehnung. Eine Kompression wiederum wird für die Herstellung von Knorpelkonstrukten verwendet. Für die Generierung von Knochenkonstrukten werden in der Regel Flüssigkeitsscherstress (in Anlehnung an die Flüssigkeitsströme in den Canaliculi) und / oder Dehnung bzw. Beugung (basierend auf den durch die Muskulatur ausgeübten Kräften) angewandt.

Die einfachste technische Realisierung ist die Dehnung eines zellbesiedelten elastischen Substrates. Sind die Zellen fest auf dem gedehnten Material verankert, so wirkt sich die Dehnung des Substrats in einer Zugkraft auf die Zellen aus. Gleichzeitig sind die Zellen bei einem sol-

chen Versuchsaufbau einem flüssigkeitsinduzierten Scherstress unterworfen, vermittelt durch die Bewegung des Mediums, die wiederum von der zyklischen Dehnung des Substrats hervorgerufen wird.

Als Kulturoberfläche ist prinzipiell jedes elastische Material geeignet, auf dem Zellen adhären wachen, ohne in ihrer Proliferations- oder Differenzierungskapazität beeinträchtigt zu sein. Beschrieben wurden Dehnungsversuche auf Elastin¹⁰¹, Kollagen⁷, Polyurethan²⁴ und Silikon¹²⁶. Der Einsatz von Polymeren bietet den Vorteil, dass die Zellen nicht nur in zweidimensionaler Umgebung kultiviert, sondern auch in ein Gel eingebettet werden können, in dem sie dreidimensional wachsen, oder auf ein dreidimensionales Polymernetzwerk aufgebracht werden können.

Die Biotechnologiefirma Gencompare hat mit Flexercell[®] ein System auf den Markt gebracht, das eine runde Silikonmembran und darauf adhärente Zellen radial dehnt, indem am Rand der Membran ein Vakuum angelegt wird. Die Produktpalette ist inzwischen ausgeweitet worden auf die Stimulation von Zellen eingebettet in ein (Kollagen-)Gel und andere Stimulationsmodi wie Kompression und Scherstress (Quelle: www.gencompare.com).

Die Applikation von mechanischer Dehnung erfolgt in der Regel zyklisch in Anlehnung an die Vorgänge *in vivo*. Auch die Muskelkontraktion im Körper ist keine statische Belastung. Vielmehr setzt sich die Anspannung eines kompletten Muskels zusammen aus einer periodischen Folge von Kontraktion und Entspannung einzelner Muskelfasern. Die Frequenz einer solchen zyklischen Stimulation wird meistens *in vitro* basierend auf den physiologischen Werten auf einen Wert von einem Hertz festgelegt, die von Kaspar *et al.* als optimal ermittelt wurde⁸⁹.

Viele Studien befassten sich mit der Stärke der Dehnung, wobei sich herausstellte, dass *in vitro* eine Dehnung von mindestens zwei Prozent notwendig ist, um messbare biochemische Effekte auszulösen. Im Knochengewebe beträgt jedoch die Deformation, die durch Bewegung erzeugt wird, normalerweise nur ein Zehntel dieses Wertes, während größere Belastungen *in vivo* zu Frakturen führen würde. Eine von You *et al.* vorgeschlagene Hypothese erklärt diese Diskrepanz mit einer Verstärkung der Belastung auf zellulärer Ebene, induziert von Flüssigkeitsströmen durch die feinen Canaliculi, deren ohnehin geringes Volumen fast vollständig von den Ausläufern der Osteozyten eingenommen wird. Obwohl durch nur geringe Deformation des gesamten Gewebes ausgelöst, könnten die Strömungen durch die engen Kanälchen auf die Aktinbündel der Osteozytenfortsätze eine viel stärkere Stimulation ausüben, die ausreicht, um intrazelluläre Signalkaskaden auszulösen¹⁹². *In vivo* führt eine zu starke Belastung zu Frakturen. *In vitro* kann eine übertriebene mechanische Belastung zunächst an einer Induktion zellulärer Reparaturmechanismen erkannt werden und später an einer erhöhten Apoptoserate^{183,13}. Die *in vitro* verwendeten Dehnungsstärken liegen basierend auf vielen Experimenten zumeist zwischen einem und zehn Prozent^{94,148,166}. In diesem Bereich können messbare zelluläre Reaktionen induziert werden, ohne eine Zellschädigung hervorzurufen.

Während sich für die Frequenz und die Stärke einer zyklisch applizierten mechanischen Stimulation relativ einheitliche Bereiche etabliert haben, variiert die Dauer einer mechanischen Belastung *in vitro* stark. Es sind Experimente beschrieben worden, bei denen schon kurzzeitige Stimulationen von wenigen Minuten zelluläre Effekte zeigten²⁵. Andere Autoren applizierten eine mechanische Belastung entweder kontinuierlich oder mit mehr oder weniger langen Pausen über Wochen^{7,78}.

Für das *Tissue Engineering* sind viele unterschiedliche Strategien entwickelt worden. Mesenchymale Stammzellen sind als Zellquelle für die Generierung funktionalen Knochengewebes optimal geeignet. Auf einem adäquaten Trägergerüst werden sie unter dynamischen Bedingungen expandiert und osteogen differenziert. Die dynamische Kultivierung erfüllt dabei mehrere Funktionen. Einerseits wird im Bioreaktor die Nährstoffversorgung optimiert, so dass in kürzester Zeit gewebeähnlich dicht bewachsene Konstrukte hergestellt werden können. Durch mechanische Stimulation kann andererseits ein osteogen differenzierender Stimulus übermittelt werden und das Gewebe wird auf die zukünftige physikalisch aktive Umgebung konditioniert.

4. Praktische Arbeiten

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind eine hervorragend geeignete Zellquelle für das *Tissue Engineering* von Knochen. Sie lassen sich leicht isolieren, in Kultur vermehren und zu Knochenzellen differenzieren. MSCs können aus verschiedenen Geweben isoliert werden, wobei Knochenmark auch heute noch die meist gebrauchte Quelle ist und die Knochenmark-MSCs (BMSCs) am besten charakterisiert sind. Die Entnahme von Knochenmark ist jedoch häufig begleitet von Beschwerden und dauerhaften Schmerzen, während die Ausbeute an Zellen relativ gering ist. Alternativ sind MSCs aus vielen verschiedenen Geweben isoliert worden, wobei sich Nabelschnurblut bzw. -gewebe und Fettgewebe als die praktikabelsten und erfolgreichsten herausgestellt haben. Nabelschnüre werden nach der Geburt in der Regel verworfen, was sie als Quelle für Zellen interessant macht. Allerdings stehen Nabelschnur-MSCs zurzeit nur selten autolog zur Verfügung, was weiterhin als Nachteil anzusehen ist, bis die immunologischen Eigenschaften der MSCs vollständig charakterisiert sind. Fettgewebe kann in größeren Mengen (bis zu einem Liter) gewonnen werden als Knochenmark, und außerdem ist die Ausbeute an MSCs aus Fettgewebe (1–3 % der kernhaltigen Zellen⁵²) viel höher als bei Knochenmark (0,01–0,0001 % der kernhaltigen Zellen^{46,152}). Im Vergleich zu einer Knochenmarkaspiration ist eine Fettabsaugung ein leichter Eingriff. Auch bei plastischen Operationen kann eine große Menge an Fettgewebe anfallen. MSCs aus Fettgewebe (adMSCs) wurden mit denen aus Knochenmark (BMSCs) verglichen und es zeigte sich, dass sie in den wesentlichen Eigenschaften wie Proliferationskapazität und Differenzierungspotenzial übereinstimmten¹⁷⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurden adMSCs für die Herstellung von Knochengewebe *in vitro* eingesetzt. Die adMSCs wurden vom Österreichischen Roten Kreuz in Linz bzw. vom Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie in Wien bezogen, wo sie isoliert und grundcharakterisiert worden waren. Im Vordergrund der Arbeit stand die mechanische Stimulation, die im *Tissue Engineering* eingesetzt werden kann, um die Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen wie MSCs zu beeinflussen. Zusätzlich kann eine mechanische Stimulation während der Kultivierung die Zellen auf ihre künftige mechanisch aktive Umgebung *in vivo* vorbereiten. Insbesondere wurde hier die Auswirkung einer zyklischen Dehnung auf die osteogene Differenzierung von adMSCs untersucht.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war eine dynamische Kultivierung von adMSCs in einem Drehbettbioreaktor. In diesem speziellen Reaktor werden die auf einer Matrix adhären

wachsenden Zellen abwechselnd durch das Kulturmedium und die gasgefüllte Kopfraumatmosphäre rotiert. Bioreaktoren spielen im *Tissue Engineering* eine große Rolle, da bei der herkömmlichen (statischen) Kultivierung Zelldichten, die denen im nativen Gewebe entsprechen, nicht erreicht werden können. Die Ernährung der Zellen ist in einer statischen Kultur durch den diffusionskontrollierten Transport der Nährstoffe im Medium limitiert, so dass bei einer hohen Zellzahl und bei dicken Zellschichten, die Ernährung nicht mehr gewährleistet werden kann.

4.1. Analyse der osteogenen Differenzierung

Die osteogene Differenzierung von MSCs ist in der Literatur ausführlich beschrieben. Die Entwicklungsprozesse von einer Stammzelle zu einem Matrix synthetisierenden Osteoblasten werden in der Regel in drei Phasen eingeteilt: Proliferationsphase – Entwicklung und Reifung der extrazellulären Matrix (Matrixmaturation) – Mineralisierung der extrazellulären Matrix¹⁷². Während sich die Zellen immer weiter spezialisieren, verlieren sie ihre typischen „Stammzeleigenschaften“ und damit die Fähigkeit, identische Kopien ihrer selbst hervorzu- bringen (Selbsterneuerung) und ihr breites Differenzierungspotenzial. Auch die Proliferationsrate selbst sinkt. Bei der Analyse der osteogenen Differenzierung werden in der Regel die Genexpression und Synthese typischer „Knochenmarker“ untersucht, deren Rolle im Knochengewebe weitgehend bekannt ist. Kollagen I, Alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin, Knochen-Sialoprotein-2 (*bone sialoprotein-2*), *core binding factor- α 1* (*Cbfa-1/Runx2*) und Parathormonrezeptor 1 werden während der Differenzierung der Zellen bzw. der Reifung und Mineralisierung der Matrix unterschiedlich reguliert. *Cbfa-1/Runx2* ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedener knochenspezifischer Gene reguliert. Daher ist er während der osteogenen Differenzierung eines der ersten Gene, die exprimiert werden. Das wohl am häufigsten untersuchte Protein ist die Alkalische Phosphatase, die im Knochen die Phosphat-Ionen für die Mineralisierung liefert. Während der Differenzierung wird sie bereits frühzeitig verstärkt synthetisiert. In der Mineralisierungsphase jedoch lässt ihre Genexpression deutlich nach. Osteopontin ist ein stark saures, Calcium bindendes, glykosyliertes Phosphoprotein, das von Knochenzellen in die Matrix sekretiert wird. Die Osteopontinproduktion weist einen biphasischen Verlauf auf und Osteopontin wird zunächst noch während der Proliferationsphase synthetisiert. Später, bei fortgeschrittener Differenzierung, wird es erneut verstärkt gebildet und zwar noch vor anderen Matrixproteinen wie Knochen-Sialoprotein-2 und Osteocalcin. Knochen-Sialoprotein-2 ist ein Sialinsäure-haltiges Protein der extrazellulären Knochenmatrix. Bereits zu einem frühen Zeitpunkt während der Differenzierung wird es vorübergehend (transient) gebildet. Mit fortschreitender Differenzierung geht seine Synthese wieder zurück, bis es in differenzierten, Matrix produzierenden Osteoblasten erneut

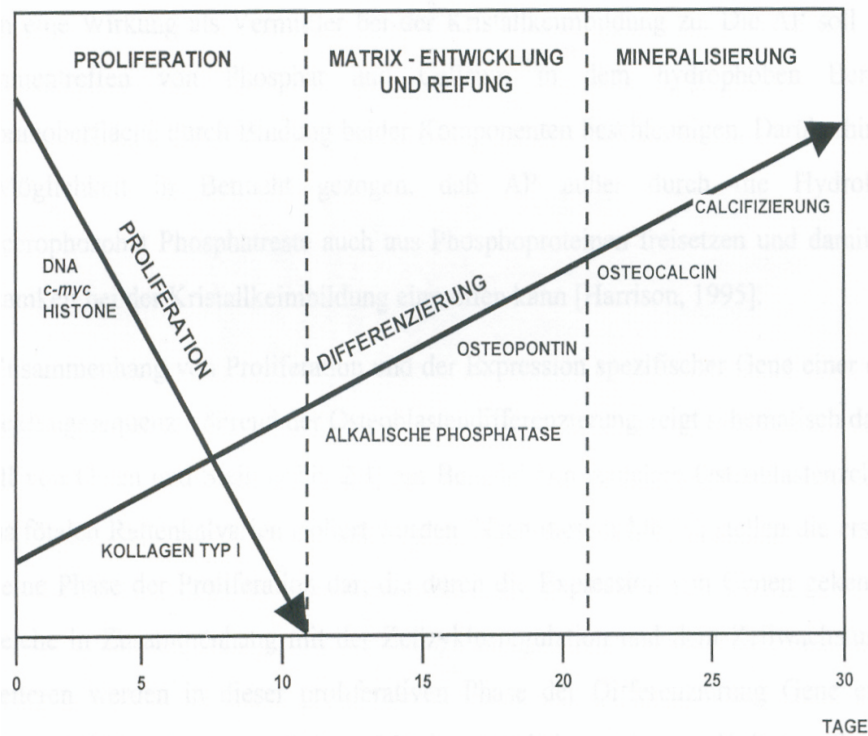


Abbildung 4.1.: Phasen der osteogenen Differenzierung und Expression typischer Knochenmarker. Quelle: Owen *et al.*¹³⁰.

verstärkt gebildet und in die extrazelluläre Matrix eingebaut wird. Ein weiteres knochenspezifisches Protein ist Osteonectin, das an Hydroxylapatit und Kollagen bindet und dadurch die organischen Matrixkomponenten mit der mineralischen Knochenmatrix verbindet. In nativem Knochengewebe initiiert es vermutlich die aktive Mineralisierung¹⁷¹. Osteocalcin, das 10–20 % des Gesamt-Knochen-Proteins ausmacht, wird erst sehr spät in der osteogenen Differenzierung, nämlich in der Mineralisierungsphase synthetisiert¹². Mit seinen carboxylierten Glutaminsäure-Resten bindet es an das kristalline Calcium und begrenzt damit die Knochenbildung, wie Gen-Deletions-Experimente bei Mäusen nahelegten.

Bevor die adMSCs für die eigentlichen Experimente (mechanische Stimulation und Bioreaktorkultivierung) eingesetzt wurden, erfolgte eine Charakterisierung hinsichtlich ihrer osteogenen Differenzierbarkeit. Um Erfolg und Fortschritt der osteogenen Differenzierung zu beurteilen, wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch Färbungen mit Alizarinrot und nach von Kossa nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Expression einiger typischer Knochenmarker mittels einer RT-PCR überprüft. Mit der DNA-Chip-Technologie wurde die Expression von etwa 250 Genen, die mit der osteochondralen Entwicklung in Beziehung stehen, gleichzeitig untersucht. Für diese Versuche wurden die Zellen auf Standardzellkulturplastik (T-Flaschen und Mikrotiterplatten) kultiviert.

Die Signale, die zur Differenzierung von Stammzellen *in vivo* führen, sind bis heute nicht vollständig erforscht. In der Zellkultur kann die osteogene Differenzierung von MSCs durch Zugabe von Dexamethason, Ascorbinsäure und einer Phosphatquelle induziert werden. Dexamethason ist ein synthetisches Glucocorticoid und als pharmazeutisches Präparat zur innerlichen und äußerlichen Anwendung als Antiphlogistikum, Antiarthritikum und Antiallergikum im Handel. In Abhängigkeit von der Konzentration, in der Dexamethason zu einer MSC-Kultur gegeben wird, kann es die osteogene, adipogene oder chondrogene Differenzierung induzieren⁶⁵. Für eine osteogene Differenzierung sind äußerst geringe Konzentrationen (meistens 10 nM) ausreichend. Ascorbinsäure wird zugesetzt, da die Kollagensynthese Vitamin-C-abhängig ist. Ascorbinsäure ist an der Hydroxylierung von Prolin zu Hydroxyprolin und von Lysin zu Hydroxylysin beteiligt, die beide zur strukturellen Stabilisierung von Kollagen beitragen. Während der osteogenen Differenzierung wird Hydroxylapatit in die extrazelluläre Matrix eingebaut. Die dafür nötigen Calcium-Ionen sind in den meisten Kultivierungsmedien ausreichend vorhanden, während Phosphat zusätzlich zugegeben werden muss. Als Phosphatlieferant kann Ascorbinsäurephosphat eingesetzt werden, üblich ist aber auch (wie hier) die Zugabe von β -Glycerolphosphat. Auch Wachstumsfaktoren wie die Knochenmorphogenese-Proteine, insbesondere BMP-2, werden häufig verwendet, um die osteogene Differenzierung zu induzieren.

Von MSCs ist bekannt, dass sie in Kultur stark vermehrt werden können. Langzeitige Kultivierung *in vitro* allerdings geht einher mit einem reduzierten Proliferationspotenzial und führt letztendlich zur Einstellung des Wachstums⁴⁷. Diese replikative Seneszenz ist ein generelles Phänomen, das bei den meisten somatischen diploiden Zellen beobachtet wird. Zurückzuführen ist sie auf die Telomerverkürzung während der Mitose. Zusätzlich verlieren MSCs mit zunehmender Kultivierungsdauer an Differenzierungspotenzial.

Die adMSCs wurden vom Österreichischen Roten Kreuz bzw. dem Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie in einer frühen Passage (P 0 oder P 1) bezogen und über einige Passagen expandiert. Alle Experimente wurden mit adMSCs von frühen Passagen (P 3 - P 5) durchgeführt, damit ausreichend Zellen vorhanden waren, ohne dass bereits Veränderungen des Differenzierungs- und Proliferationspotenzials bestanden.

Alkalische Phosphatase AdMSCs wurden zunächst expandiert und anschließend durch Zugabe osteogener Zusätze in das Kultivierungsmedium zur Differenzierung angeregt (genaue Zusammensetzung des Mediums s. Anhang B.1, Seite 134). Bei den osteogenen Stimulantien handelte es sich um Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat und Dexamethason (10 nM: DM-10 bzw. 1 μ M: DM-1000). Darüber hinaus wurden unterschiedliche Konzentrationen des Wachstumsfaktors BMP-2 zugegeben (10 ng/mL: BMP 10, 20 ng/ml: BMP 20, 50 ng/ml: BMP 50). Als Vergleich wurden außerdem adMSCs in Standard-Proliferationsmedium (NM) kultiviert.

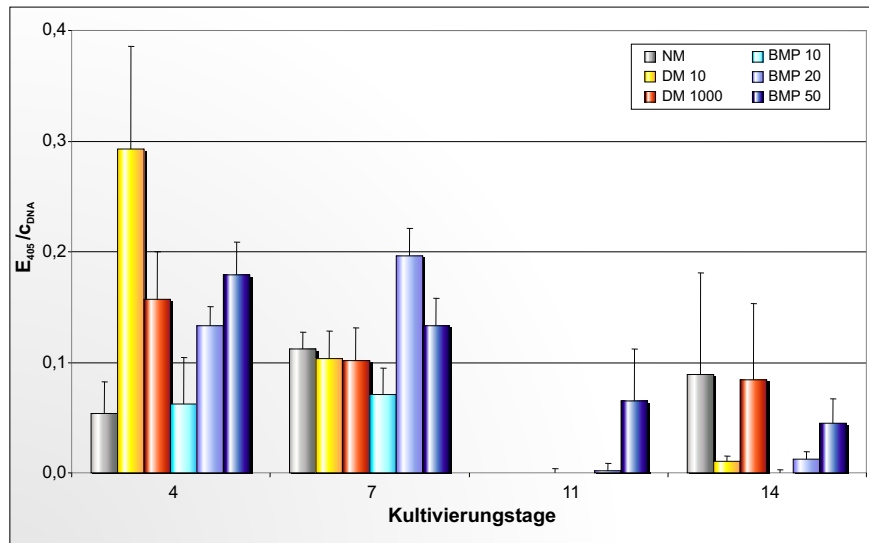


Abbildung 4.2.: Aktivität der Alkalischen Phosphatase von adMSCs kultiviert in Standard-Proliferationsmedium (NM) und mit osteogenen Differenzierungsmedien unter Zusatz von Dexamethason (10 nM: DM-10 bzw. 1 μ M: DM-1000) und unterschiedlichen Konzentrationen BMP-2 (10 ng/mL: BMP-10, 20 ng/mL: BMP-20, 50 ng/mL: BMP-50). Die auf die DNA-Konzentration normalisierten Daten sind angegeben als Mittelwerte von vier Einzelerperimenten \pm Standardfehler. Signifikant unterschiedliche Ergebnisse ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde durch eine einfache kolorimetrische Methode bestimmt, bei der ein farbloses Substrat (p-Nitrophenylphosphat) zu einem gelben Farbstoff umgesetzt wird (Versuchsdurchführung s. Anhang B.1.1, Seite 134). Die Inkubationszeit mit dem Substrat wurde konstant gehalten, so dass die Farbstoffkonzentration (photometrisch bestimmt) als Maß für die Enzymaktivität dienen konnte.

Nach vier und sieben Tagen Kultivierung mit den verschiedenen osteogenen Medien zeigten die adMSCs eine messbare Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Abbildung 4.2). Nach elf Tagen bzw. zwei Wochen war die Aktivität wieder abgeklungen. Dieses Ergebnis steht mit dem Fortschritt der Mineralisierungsphase der osteogenen Differenzierung in Einklang, in der wie oben beschrieben die Alkalische Phosphatase nicht mehr gebildet wird. Ein Vergleich der Auswirkungen der unterschiedlichen osteogen stimulierenden Medien zeigt, dass nach vier Tagen der Kultivierung die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei Zugabe von 10 nM Dexamethason am höchsten war. Die höhere Dexamethasonkonzentration (1 μ M) wirkte sich nach vier Tagen in einer geringeren Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase aus. Die Zugabe von BMP-2 bewirkte eine steigende Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei steigender BMP-2-Konzentration an Tag vier der Kultivierung. Interessanterweise wiesen auch die Vergleichszellen, die in Standard-Proliferationsmedium kultiviert worden waren, eine messbare Aktivität der Alkalischen Phosphatase auf. Diese Beobachtung der Bildung von Alkalischer Phosphatase in Zellen, die ohne osteogen stimulierende Substanzen kultiviert worden waren,

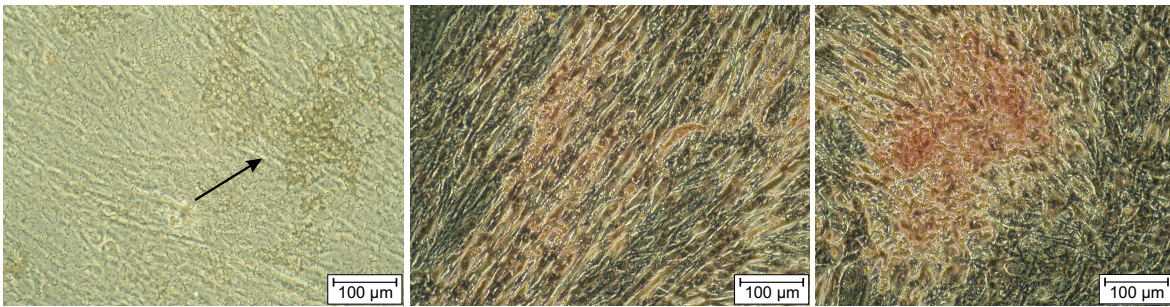


Abbildung 4.3.: Färbung mineralisierter extrazellulärer Matrix von adMSCs nach 14-tägiger Kultivierung nach von Kossa bzw. mit Alizarinrot. **Links:** Von-Kossa-Färbung von adMSCs kultiviert mit 10 nM BMP-2. Der Pfeil markiert eine Stelle mit angefärbter extrazellulärer Matrix. **Mitte:** Alizarinrot-Färbung von adMSCs kultiviert mit 20 nM BMP-2. **Rechts:** Mineralisierungsknoten in einer adMSC-Kultur mit 50 nM BMP-2 angefärbt mit Alizarinrot.

ist wahrscheinlich auf die hohe Zelldichte im Experiment zurückzuführen. Auch in der Literatur ist beschrieben worden, dass mesenchymale Stammzellen spontan differenzieren können und Alkalische Phosphatase produzieren, wenn sie konfluent – in einer dichten Schicht – wachsen¹²⁷. An Tag sieben der Kultivierung war die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei den Zellen mit 10 nM und 1 μ M Dexamethason bereits rückläufig. Die BMP-2-Zusätze bewirkten an Tag sieben bei 20 ng/mL eine Erhöhung der Enzymaktivität gegenüber Tag vier, während bei 50 ng/mL BMP-2-Zugabe die maximale Aktivität bereits überschritten war. 10 ng/mL BMP-2 reichten nicht aus, die Alkalische Phosphatase nennenswert zu stimulieren.

Bereits geringe Mengen an Dexamethason (in Gegenwart von Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat) sind also ausreichend, um die mesenchymalen Stammzellen, mit denen hier gearbeitet wurde, zur Produktion von Alkalischer Phosphatase anzuregen. BMP-2 hingegen, das starke osteoinduktive Eigenschaften aufweist, führte zu einer weniger starken Anregung der Alkalischen-Phosphatase-Synthese. Zur weiteren Charakterisierung der osteogenen Differenzierung wurden im Folgenden die Calcifizierung der extrazellulären Matrix und die Genexpression von Knochenmarkern untersucht.

Mineralisierung Zusätzlich zu der Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde untersucht, ob die extrazelluläre Matrix der adMSCs, kultiviert mit den unterschiedlichen Differenzierungsmedien, mineralisiert wurde. Die Matrixmineralisierung ist die letzte Phase der osteogenen Differenzierung. Zu Beginn dieser Phase wird die Produktion von Alkalischer Phosphatase eingestellt. Daher wurden für die Anfärbung mineralisierter Matrix die Zellen für längere Zeiträume kultiviert, in denen die Alkalische Phosphatase bereits rückläufig war. Nach sieben, elf und vierzehn Tagen wurden die Zellen mit Alizarinrot bzw. nach von Kossa angefärbt (Durchführung s. Anhang B.1.3, Seite 135).

Nach sieben Tagen zeigte keine der Färbungen mineralisierte extrazelluläre Matrix (Bilder aller Färbungen befinden sich im Anhang B.1.3, Seite 138f.). Nach elf Tagen waren beide Färbungen leicht positiv und nach vierzehn Tagen waren die Färbungen bei allen Medien deutlich positiv (Abbildung 4.3). In den Medien mit 20 ng/mL und 50 ng/mL BMP-2 waren Strukturen sichtbar, die besonders stark angefärbt wurden (Abbildung 4.3 rechts). An solchen „Mineralisierungsknoten“ (*bone nodules*) wird die Mineralisierung stark initialisiert und pflanzt sich von dort aus fort.

Die Färbung der extrazellulären Matrix zeigte, dass die Zellen weitgehend unabhängig vom Medium ihre Matrix nach zwei Wochen Kultur mineralisierten. In den konfluenten Kulturen fand eine spontane Differenzierung der adMSCs statt, die insofern als osteogen-ähnlich bezeichnet werden kann, als sie in einer messbaren Synthese von Alkalischer Phosphatase und in einer leichten Mineralisierung der extrazellulären Matrix resultierte. Eine starke Matrixmineralisierung wurde nach zwei Wochen nur in den mit BMP-2 versetzten Medien beobachtet. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die geringe Aktivität der Alkalischen Phosphatase in diesen Medien auf eine schon fortgeschrittene osteogene Differenzierung zurückzuführen war. Demnach förderte das als DM-10 bezeichnete Medium mit 10 nM Dexamethason die Differenzierung von adMSCs besser als DM-1000, während BMP-2 schon in geringsten Konzentrationen die osteogenen Prozesse beschleunigte. Diese Ergebnisse stehen mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen im Einklang, die ähnliche Effekte von BMP-2 berichten¹⁹¹. Auch Jørgensen *et al.* berichteten, dass die Aktivität der Alkalischen Phosphatase durch BMP-2 nicht beeinflusst wurde, aber die Expression von Osteocalcin und die Matrixmineralisierung verstärkt wurden⁸⁷. BMP-2 führte also (im gleichen Zeitraum) zu einem deutlich fortgeschritteneren osteogenen Phänotyp als die alleinige Zugabe von Dexamethason.

Mit der Alkalischen Phosphatase und der Matrixmineralisierung wurden ein sehr früher und ein sehr später Marker der osteogenen Differenzierung untersucht. Im Folgenden wurden mit RT-PCR und DNA-Chip-Technologie die Genexpression weiterer typischer Knochenmarker analysiert.

4.1.1. Untersuchung der osteogenen Differenzierung mittels DNA-Chip-Technologie

Die molekularbiologische Technologie der DNA-Chips erlaubt die gleichzeitige Analyse tausender Gene. Durch den hohen Parallelisierungsgrad können komplexe genetische Vorgänge untersucht werden, was ein breites Anwendungsspektrum – vom Lebensmittelbereich über Medizin und Pharmakologie bis hin zur Umwelttechnik – eröffnet. Insbesondere können auch Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge in Zellkulturen untersucht werden, indem ein Genexpressionsprofil der Zellen aufgenommen wird und zelluläre Antworten auf Genexpressionsebene untersucht werden.

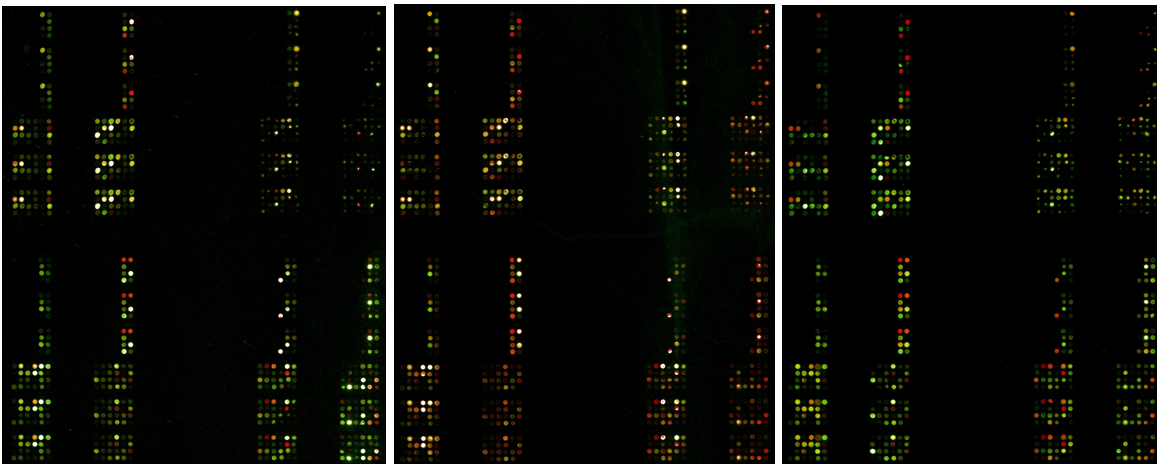


Abbildung 4.4.: Knochen-Knorpel-Chip der Zelllinie MG-63. Die einzelnen Gensonden liegen jeweils in Tripletts vor. **Links:** Standard-Proliferationsmedium (NM) gegen osteogenes Differenzierungsmedium (DM). **Mitte:** NM gegen BMP-2-haltiges osteogenes Differenzierungsmedium (BMP). **Rechts:** DM gegen BMP.

Ein DNA-Chip besteht aus einem Glasträger, auf dem Oligonukleotide bekannter Sequenz als Sensormoleküle immobilisiert sind. Die zu untersuchende DNA wird mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und auf den DNA-Chip gegeben, wo sie an die Moleküle mit komplementärer Sequenz bindet. Zur Untersuchung zweier unterschiedlicher Proben werden diese mit verschiedenen Fluorophoren markiert und können dann zugleich auf einem Chip verglichen werden. In dieser Arbeit wurde ein DNA-Chip mit hauptsächlich knochen- und knorpelspezifischen Genen eingesetzt, um die osteogene Differenzierung von adMSCs zu untersuchen. Dieser DNA-Chip wurde am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelt und hergestellt. Etwa 250 Oligonukleotidsequenzen von Genen, die vorwiegend bei osteochondralen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen eine Rolle spielen, wurden immobilisiert.

adMSCs Mit dem DNA-Chip wurde untersucht, welchen Einfluss die unterschiedlichen osteogenen Medien bei adMSCs auf die Expression knochenspezifischer Gene haben. Dazu wurden adMSCs (interne patientenspezifische Bezeichnung huF 35, vgl. Anhang B.1, Seite 133) parallel mit den osteogenen Medien DM-10 und BMP 10 kultiviert, sowie zum Vergleich mit Standard-Proliferationsmedium (NM). Die Gesamt-RNA wurde aus den jeweiligen Zellen isoliert und die mRNA in cDNA revers transkribiert, wobei jeweils entweder an Fluorescein oder an Biotin gekoppeltes dCTP eingebaut wurde (genaue Durchführung s. Anhang B.3, Seite 145). Durch die spezifische reverse Transkription der Boten-RNA (mRNA) repräsentiert die cDNA den Expressionsstatus der Zellen, also alle zum Zeitpunkt der Isolierung aktiven

Tabelle 4.1.: DNA-Chip-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knochenmarker in adMSCs (huF 35), die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt).
(– Nicht exprimiert, ↑ schwach exprimiert, ↑↑ mittelstark exprimiert, ↑↑↑ stark exprimiert.)

	NM	DM	BMP
Kollagen I α 1	↑↑	↑↑	↑↑
Kollagen I α 2	↑↑↑	↑↑	↑↑
Alkalische Phosphatase	–	–	↑
<i>Cbfa-1/Runx2</i>	–	–	–
Osteocalcin	–	–	↑
Osteopontin	–	–	–
Osteonectin	↑	↑	↑↑
BMP-2	–	–	–
BMP-4	–	–	↑
BSP-2	–	–	↑

Gene. Die markierte cDNA wurde aufgereinigt und auf den Chip aufgetragen. Dabei wurden jeweils zwei zu vergleichende Proben mit einem unterschiedlichen Marker (Fluorescein bzw. Biotin) gelabelt und auf einen Chip aufgetragen, wo die Sonden mit den entsprechenden Nukleotidsequenzen der cDNA hybridisieren, sofern das zugehörige Gen in den Zellen exprimiert worden war. Bei der anschließenden Tyramid-Signalamplifikationsreaktion (TSA-System) wurde über einen Fluoresceinantikörper bzw. über Streptavidin Peroxidase an die hybridisierte cDNA gebunden. Die Peroxidase reagiert mit Tyramid – gebunden an Cyanin 3 bzw. Cyanin 5 – und erzeugt dabei ein starkes Fluoreszenzsignal.

Die DNA-Chips wurden in einem Fluoreszenzscanner eingelesen, wobei Scans mit unterschiedlichen Laserstärken und verschiedenen Einstellungen der Vorspannung des Fotomultipliers (*gain*) durchgeführt wurden. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Spots wurde im Folgenden für jeden Scan mittels eines Programmes ausgewertet, das Cornelia Repenning im Rahmen ihrer Doktorarbeit am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelt hat. Dabei wurden auch die Sättigungseffekte der Fluoreszenzintensität berücksichtigt. Auf dem Chip sind alle Gensonden als Triplets angeordnet (vgl. Abbildung 4.4). Die Fluoreszenzintensitäten dieser Triplets wurden gemittelt und nach einer Hintergrund-Bereinigung auf Laserstärke und *gain* normiert. Mit einem studentischen *t*-Test wurde die Genexpression der Zellen, die unter verschiedenen Differenzierungsbedingungen (Standard-Proliferationsmedium NM, dexamethasonhaltiges osteogenes Differenzierungsmedium DM, BMP-2-haltiges osteogenes Differenzierungsmedium BMP) kultiviert worden waren, miteinander verglichen.

Zunächst wurde gezielt die Expressionsstärke der bekannten Knochenmarker ausgewertet, darunter Kollagen I, Alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, BMP-2, BMP-4, *Cbfa-1/Runx2* und Knochen-Sialoprotein-2 (BSP-2). Von Kollagen I waren auf dem Chip Sonden für die Gene beider Ketten ($\alpha 1$ und $\alpha 2$), aus denen das Molekül aufgebaut ist. Die Regulation der beiden Ketten kann durchaus unterschiedlich sein. In allen drei Proben (NM, DM-10, BMP) wurden die beiden Kollagenketten, und Osteonectin exprimiert. Alkalische Phosphatase, Osteocalcin, BMP-4 und BSP-2 wurden nur in den Zellen, die mit BMP-2 differenziert worden waren, nachgewiesen (Tabelle 4.1).

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde zusätzlich von denselben RNA-Proben eine RT-PCR durchgeführt. Dafür wurde aus der isolierten Gesamt-RNA die mRNA in cDNA umgeschrieben und diese in PCRs mit verschiedenen *Primern* für knochenspezifische Gene eingesetzt (Durchführung s. Anhang B.2, Seite 140 f.). Dabei wurden Kollagen I, Alkalische Phosphatase, *Cbfa-1/Runx2*, Osteocalcin, Osteopontin und BMP-4 nachgewiesen (Abbildung 4.5). Mit der PCR wurden also einige Knochenmarker nachgewiesen, die auf dem DNA-Chip negativ waren. Bei der PCR wird die eingesetzte DNA-Menge (theoretisch) in jedem Zyklus verdoppelt, so dass auch geringste DNA-Spuren detektiert werden können. Auch bei dem DNA-Chip wurde mittels des TSA-Systems eine Signalverstärkung erreicht, die Sensitivität reicht jedoch nicht an die der PCR heran. Parallel betrachtet, zeigten die Ergebnisse der RT-PCR und des DNA-Chip-Experiments, dass adMSCs sich durch das Differenzierungsmedium (DM) zu Knochenzellen entwickelten und die typischen Knochenmarker exprimierten. Die Zugabe von BMP-2 verstärkte den osteogenen Phänotyp der Zellen dahingehend, dass die Expressionsraten mehrerer Knochenmarker (Alkalische Phosphatase, Osteocalcin, Osteonectin, BMP-4 und BSP-2) deutlich höher waren als ohne BMP-2. Die Detektion von Knochenmarkern in den NM-Proben in der PCR deutete auch hier wieder auf eine spontane Differenzierung von Zellen ohne eigentlichen osteogenen Stimulus hin. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich (wie auch bei dem Test der Aktivität von Alkalischer Phosphatase) auf hohe Zelldichten zurückzuführen. Die Zellen waren nahezu bis zur Konfluenz kultiviert worden, um ausreichend RNA isolieren zu können.

Zusätzlich zu den typischen bekannten Knochenmarkern wurden diejenigen Gene ausgewertet, die in den adMSCs mit den drei Kultivierungsmedien unterschiedlich reguliert waren (vollständige Auflistung der regulierten Gene und der benutzten Abkürzungen s. Anhang B.3, Seite 148). Dabei wurde deutlich, dass durch BMP-2 die Expression einer Vielzahl von Knochen- und Knorpel-assoziierten Genen beeinflusst wurde. Gegenüber dem Standard-Proliferationsmedium (NM) waren durch BMP-2 32 Gene verstärkt exprimiert (hoch reguliert) und im Vergleich mit dem Dexamethason-haltigen Differenzierungsmedium ohne BMP-2 (DM) 11 Gene. Durch DM waren deutlich weniger Gene hoch reguliert, nämlich sechs im Vergleich zum BMP-Medium und sieben im Vergleich zum Standardmedium. Im Standard-

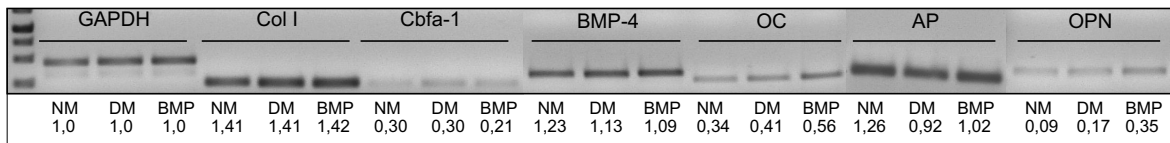


Abbildung 4.5.: PCR-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knochenmarker in adMSCs (huF 35), die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt). GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ColI: Kollagen I, OC: Osteocalcin, AP: Alkalische Phosphatase, OPN: Osteopontin. Die relative Bandenstärke, bezogen auf diejenige der GAPDH, ist unter den einzelnen Banden angegeben.

Proliferationsmedium (NM) waren gegenüber dem Differenzierungsmedium ohne BMP-2 nur drei Gene und gegenüber dem BMP-2-Medium lediglich zwei Gene hochreguliert.

Die durch die Zusätze zum Kulturmedium regulierten Gene codierten hauptsächlich für Proteine der extrazellulären Matrix und der Signaltransduktion. BMP-2 erhöhte z. B. die Genexpression des Knochenmatrixproteins BSP-2. Auch die Expression des Prokollagen-C-Endopeptidase-Verstärker-Proteins (*procollagen C-endopeptidase enhancer protein*, PCOLCE) war hochreguliert. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, das an Prokollagen I – eine Kollagen-I-Vorstufe – bindet und dessen Prozessierung fördert, indem es die Aktivität der C-Proteinase erhöht. Die enzymatische Abspaltung der amino- und der carboxyterminalen Peptidsequenz, die als N- und C-Propeptid bezeichnet werden, ist Auslöser für die Sekretion von Prokollagen und führt zu den hochstrukturierten tripelhelikalen Fibrillen des Kollagens. BMP-1, dessen Expression ebenfalls durch BMP-2 stimuliert wurde, ist kein enger Verwandter der anderen BMPs der TGF- β -Superfamilie. Vielmehr ist es eine Prokollagen-C-Proteinase, eine in den extrazellulären Raum sekretierte Metallo-Protease, die unter Bindung von Calcium die C-terminalen Peptide von Prokollagen I, II und III schneidet. Reguliert wird seine Aktivität von PCOLCE. Außerdem kann BMP-1 an BMP-2 und BMP-4 binden und deren Signalwirkung regulieren. BMP-1 spielt damit sowohl bei der Knochen- als auch bei der Knorpelbildung eine Rolle.

Zu den durch BMP-2 induzierten Signaltransduktoren gehören CYR61, IL6ST, LECT2 und TIP39. Der Cystein-reiche angiogene Induktor 61 (*cysteine-rich angiogenic inducer 61*, CYR61) wird von einem *immediate early gene* (IEG) codiert, das von verschiedenen Wachstumsfaktoren induziert werden kann. (IEGs sind schnell und transient durch einen Stimulus aktivierte Gene, im Gegensatz zu *late response genes*, die erst deutlich später – meist durch ein IEG-Produkt – aktiviert werden.) Bei der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen spielt CYR61 bekanntermaßen eine bedeutende Rolle¹⁵⁷. Der Interleukin-6-Signaltransduktor (*interleukin 6 signal transducer*, IL6ST) wird von vielen Zytokinen durch

Bindung an ihren Rezeptor aktiviert. Seine Aktivierung fördert die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen⁵⁰. LECT 2 (*leukocyte cell-derived chemotaxin 2*) ist ein Protein mit vielen Funktionen. Unter anderem stimuliert es das Wachstum von Chondrozyten und Osteoblasten und ist an der Skelettentwicklung, Knorpelbildung und der osteogenen Differenzierung beteiligt¹⁸⁸. TIP 39 (*tuberoinfundibular 39 residue protein precursor*) ist mit dem Parathormon verwandt, das beim Calciummetabolismus und der Knochenentwicklung eine Schlüsselrolle spielt.

Neben den erwähnten knochenspezifischen Genen wurden durch BMP-2 auch viele allgemeine Signaltransduktoren und Moleküle der extrazellulären Matrix verstärkt exprimiert: CAV 1, IGFBP 2 und 4, NF γ B, ADAM 10 und 17, DPT, HAS 1 und MMP 17. Caveolin 1 (CAV 1) inhibiert die BMP-Signaltransduktion, indem es an eine Typ-II-BMP-Rezeptorkette (BMPR-II) bindet. Die Signaltransduktion der BMPs wird aktiviert, indem BMP an eine Typ-II-Rezeptorkette bindet, wodurch diese aktiviert wird und nun die Typ-I-Rezeptorkette phosphorylieren kann. Durch diese Transaktivierung werden die intrazellulären Signalkaskaden in Gang gesetzt¹²¹. Eine gentechnische Überexpression von Caveolin 1 in mesenchymalen Stammzellen unterdrückt die adipogene Differenzierung¹³¹. Darüber hinaus spielt Caveolin 1 bei den morphologischen Änderungen der Seneszenz eine bedeutende Rolle, indem es die Aktivität der fokalen Adhäsionskinase und die Bildung der Aktinstressfasern reguliert³⁷. Die hier beobachtete erhöhte Expression von CAV 1 durch BMP-2 im Kulturmedium hängt nicht unbedingt mit Seneszenz zusammen. Eine auf die BMP-2-Kulturen beschränkte Seneszenz erscheint wenig wahrscheinlich und wird auch nicht von anderen Daten gestützt. Vielmehr stand hier die Regulierung der Caveolin 1-Expression entweder mit einer Unterdrückung der adipogenen Differenzierung in Zusammenhang oder aber die Zellen steuerten der dauerhaften Anwesenheit von BMP-2 entgegen, indem sie die BMP-Rezeptoren über Caveolin 1 blockierten. Zellen reagieren häufig auf eine dauerhafte Aktivierung von Rezeptoren durch Bindung der zugehörigen Liganden mit einer veränderten Rezeptorexpression. Die Bindungsproteine der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factor binding protein*, IGFBP) regulieren die Aktivität der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren, die bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen eine große Rolle spielen. Der Transkriptionsfaktor NF- γ ist ein trimerer Komplex und bindet an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotor-Region vieler Gene und reguliert dadurch eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Die Familie der ADAM-Metallo-Peptidasen (*a disintegrin and metalloprotease*) besteht aus Zelloberflächenproteinen mit potenziellen Adhäsions- und Protease-Domänen. ADAM 10 und 17 sind an der Konversion von Tumornekrose-Faktor α beteiligt, ein zentrales Zytokin mit pleiotroper Wirkung. Dermatopontin (DPT) ist ein Protein der extrazellulären Matrix vieler Gewebe und spielt bei Zell-Matrix-Interaktionen und dem Matrixaufbau eine Rolle. Postuliert wird eine modifizierende Wirkung auf die Aktivität von TGF- β , zu dessen Superfamilie auch BMP-2 gehört.

Tabelle 4.2.: DNA-Chip-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knorpelmarker in adMSCs (huF 35), die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt, NM: Standard-Proliferationsmedium; COMP: *cartilage oligomeric matrix protein*).

(– Nicht exprimiert, ↑ schwach exprimiert, ↑↑ mittelstark exprimiert, ↑↑↑ stark exprimiert.)

	NM	DM	BMP
Aggrecan	↑↑	↑↑	↑↑
Versican	↑	–	↑
Kollagen II $\alpha 1$	↑↑↑	↑↑↑	↑↑
Kollagen IX $\alpha 1$	↑	↑	↑
Kollagen IX $\alpha 2$	↑	↑	↑
Kollagen IX $\alpha 3$	–	–	–
Kollagen X $\alpha 1$	–	–	↑
Kollagen XI $\alpha 1$	↑↑	↑↑	↑↑
Kollagen XI $\alpha 2$	↑	–	↑
COMP	–	–	–

Matrix-Metallo-Proteinasen sind eine Familie Struktur-ähnlicher Metalloproteasen, die bei einem Gewebe-Umbau die extrazelluläre Matrix abbauen. MMP 17 aktiviert MMP 2 (Gelatinase A), die Kollagen IV abbaut. Kollagen IV ist der Hauptbestandteil der Basallamina, einer dünnen, festen Matrix-Schicht, die hauptsächlich zwischen Epithel- und Bindegewebe gebildet wird. Die Basallamina übt wahrscheinlich einen Einfluss auf die Differenzierung von Zellen aus und bildet ein Gerüst, an dem Zellen entlangwandern und sich anlagern können. Die Hyaluronan-Synthase 1 (HAS 1) wird in mesenchymalen Progenitorzellen exprimiert³¹. Ihre verstärkte Expression in den BMP-2-stimulierten Zellen zeigt, dass die osteogene Differenzierung noch nicht abgeschlossen sein kann.

Bei den wenigen Genen, die durch Differenzierungsmedium ohne BMP-2-Zusatz (DM) bzw. durch das Standard-Proliferationsmedium reguliert wurden, handelte es sich weitgehend um Signaltransduktoren und um einige Moleküle der extrazellulären Matrix, ohne dass jedoch ein direkter Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung nachgewiesen werden konnte.

Einige der verstärkt exprimierten Gene in den drei unterschiedlichen Medien waren typisch für Knorpel. Daher wurde, wie zuvor bei Knochenmarkern, auch die Expressionsstärke von typischen Knorpelmarkern (Aggrecan, Versican, Kollagen II, IX, X und XI und COMP) untersucht. Aggrecan und Versican gehören zur gleichen Familie von Proteoglykanen – hochmolekularen Bestandteilen der extrazellulären Matrix, bei denen an einem Proteinrückgrat viele Kohlenhydratkomponenten gebunden sind. Die Proteoglykane bilden die gelartige, aber stabile extrazelluläre Matrix von Knorpel. Wie in allen anderen Bindegeweben sind auch im Knorpel Kollagene in der extrazellulären Matrix zu finden. Als knorpelspezifisch werden im Allgemeinen die Kollagene II, IX, X und XI betrachtet. Das oligomere Knorpelmatrix-Protein

(*cartilage oligomeric matrix protein*, COMP) ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix im Knorpel und wird als Knorpel-Differenzierungsmarker betrachtet, der spezifischer ist als Kollagen II.

In den adMSCs wurde die Genexpression einiger Knorpelmarker wie Aggrecan, Kollagen II und Kollagen XI nachgewiesen, der hochspezifische Knorpelmarker COMP war allerdings negativ (Tabelle 4.2).

Auch unter den regulierten Genen fanden sich einige, die mit Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen im Knorpel in Zusammenhang stehen. So wurden durch BMP-2 Aggrecan, ADAMTS 1, die Kollagene VI, IX und X verstärkt exprimiert. Die ADAM-Metallo-Peptidase mit Thrombospondin-Typ-1-Motiv 1 baut die extrazelluläre Knorpelmatrix ab, indem es Aggrecan spaltet. Die Genexpression anderer Knorpelproteine wie Kollagen XI und Matrix-Metall-Proteinase 1, die Kollagen I, II und III degradiert, wurde durch BMP-2 herunter reguliert.

Zusammenfassend zeigte dieses DNA-Chip-Experiment, dass die adMSCs in der Zellkultur sehr leicht osteogen differenziert werden können. Die Zugabe von Dexamethason oder BMP-2 zum Zellkulturmedium bewirkte die Expression von Knochenmarkern. Bereits konfluentes Wachstum der adMSCs war ausreichend, um eine Differenzierung zu induzieren. Die Untersuchung der Aktivität von Alkalischer Phosphatase und die Färbung von Calciumablagerungen in der extrazellulären Matrix zeigten aber, dass die Zugabe von Dexamethason oder BMP-2 nötig war, um auch diese Eigenschaften von Knochenzellen bei den adMSCs hervorzurufen. Der DNA-Chip zeigte, dass es sich bei der hier beobachteten Differenzierung wahrscheinlich um eine osteochondrale Differenzierung handelt, bei der Knorpel gebildet wurde, der dann verknöcherte. Dies erklärt die Beobachtung des gemischten Knochen-Knorpel-Phänotyps der adMSCs im DNA-Chip-Experiment. Bei der Beurteilung der DNA-Chip-Ergebnisse muss beachtet werden, dass es sich bei den mesenchymalen Stammzellen um Mischpopulationen unterschiedlicher Zellen mit individuellem Phänotyp handelt, die in ihrer Differenzierung verschieden weit fortgeschritten sind. Auf externe Stimuli reagieren die einzelnen Zellen vermutlich unterschiedlich und die Ergebnisse aller Experimente mit adMSCs – sofern sie nicht auf Einzelzellniveau durchgeführt werden – sind immer als Mittelung über verschiedene Reaktionen einzelner Zellen zu interpretieren.

Die Eigenschaften und das Verhalten von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* ist nicht nur davon abhängig, welche Zusammensetzung an einzelnen Subpopulationen isoliert wurde, sondern auch von Alter, Geschlecht und Allgemeinzustand des Patienten zur Entnahmezeit. Um zu überprüfen, inwiefern auch die osteogene Differenzierung von diesen Faktoren abhängt, wurde ein weiteres DNA-Chip-Experiment mit Zellen einer anderen Patientin durchgeführt (hier huF 53, oben huF 35, vgl. Anhang B.1, Seite 133). Auch diese adMSCs ließen sich sehr leicht differenzieren, indem sie mit Dexamethason-haltigem Medium (DM-10) oder unter Zusatz von

BMP-2 (50 ng/mL) kultiviert wurden. Die wichtigsten Knochenmarker wurden exprimiert, wobei sich ein ähnliches Muster ergab wie für die huF35 beschrieben wurde (vgl. Tabelle 4.3 und Tabelle 4.1, Seite 39). Allerdings waren insgesamt deutlich weniger Gene reguliert als bei dem vorigen Experiment und es handelte sich bei ihnen beinahe ausschließlich um Komponenten der extrazellulären Matrix (Darstellung aller regulierten Gene s. Anhang B.3.1, Seite 148). BMP-2 regulierte die Genexpression von Kollagen I, der Hauptkomponente der organischen Knochenmatrix, hoch. Auch Osteonectin und Kollagen V, das häufig in Verbindung mit Kollagen I gefunden wird, wurden durch BMP-2 verstärkt exprimiert. Weiterhin waren Fibronectin, ein extrazelluläres Glykoprotein, und Vitronectin, das in mineralisierter Matrix gefunden wird, hochreguliert. Mit Kollagen XI wurde durch BMP-2 auch ein typischer Knorpelmarker verstärkt exprimiert. Das einzige Signaltransduktionsprotein, das unter BMP-2-Bedingungen eine höhere Expression aufwies, war *WNT1 inducible signaling pathway protein 2* (WISP2), welches zur Familie der Bindegewebswachstumsfaktoren gehört. Dabei handelt es sich um Signaltransduktionsfaktoren, die verschiedene Entwicklungsprozesse regulieren. WISP2 wird in Knochengewebe stark exprimiert und spielt vermutlich eine Rolle im Umbau von Knochen. Im Differenzierungsmedium ohne BMP-2-Zusatz (DM) waren ebenfalls einige Komponenten der extrazellulären Matrix und Signaltransduktoren hoch reguliert. Von diesen stehen Decorin und Pleiotrophin im Zusammenhang mit Knochen. Decorin ist ein kleines zelluläres oder auch perizelluläres Matrixproteoglycan, das im Bindegewebe an Kollagen-I-Fibrillen bindet. Decorin ist am Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt, indem es Synthese und Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix reguliert und vor allem die Fibrillenbildung von Kollagenen steuert. Außerdem kann es als Bindeglied zwischen Kollagen I und Kollagen VI dienen. Pleiotrophin (OSF1, PTN), das ebenfalls in DM verstärkt exprimiert war, spielt eine große Rolle bei der Knochenmineralisierung. So wurde in OSF1-transgenen Mäusen eine Zunahme der Knochenmasse beobachtet⁶⁸. Weitere, nicht knochenassoziierte Gene, deren Expression in osteogenem Differenzierungsmedium verstärkt wurde, umfassten das gewebeunspezifische Kollagen VI, die Matrix-Metallo-Proteinase 2, Metallothionein 2A – ein Kupfer- und Zink-bindendes Protein mit weitgehend ungeklärter Funktion – und Cardiotrophin 1 – ein Regulatorprotein, das in Zusammenhang mit der Entwicklung von Nerven- und Muskelgewebe steht, aber auch bei der Signaltransduktion in Adipozyten eine Rolle spielt.

Im Standard-Proliferationsmedium (NM) waren nur Kollagen II, das in Knorpel den Hauptteil der kollagenen Matrix ausmacht, und das gewebeunspezifische Kollagen IV verstärkt exprimiert.

Die Analyse der Expression typischer Knorpelmarker ergab ein ähnliches Bild wie in dem vorigen Experiment (vgl. Tabelle 4.4 mit Tabelle 4.2). Hauptsächlich wurden Kollagen II und XI exprimiert, in DM-Medium zusätzlich Aggrecan und Kollagen IX, in BMP-2-Medium auch COMP.

Tabelle 4.3.: DNA-Chip-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knochenmarker in adMSCs (huF 53), die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt).
(– Nicht exprimiert, ↑ schwach exprimiert, ↑↑ mittelstark exprimiert, ↑↑↑ stark exprimiert.)

	NM	DM	BMP
Kollagen I α 1	↑	↑	↑↑
Kollagen I α 2	↑↑	↑↑	↑↑
Alkalische Phosphatase	–	↑	↑
<i>Cbfa-1/Runx2</i>	–	–	–
Osteocalcin	–	↑	–
Osteopontin	–	–	–
Osteonectin	↑	↑	↑↑
BMP-2	–	–	–
BMP-4	–	↑↑	↑
BSP-2	–	–	–

Die beiden Kulturen mesenchymaler Stammzellen zeigten im Wesentlichen ähnliche Reaktionen auf die verschiedenen Kulturmedien. Ein Vergleich der beiden DNA-Chip-Experimente im Hinblick auf spenderbedingte Unterschiede ist nur bedingt zulässig, da die beiden Versuche nicht parallel durchgeführt wurden und daher nicht exakt dieselben Parameter zugrunde lagen. Der Nachweis von Knochenmarkern auf Expressionsebene zeigte, dass die Zellen bereits durch geringe Mengen an Dexamethason im Medium (in Anwesenheit von Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat) differenziert werden können. Der Zusatz von BMP-2 verstärkte bzw. beschleunigte die Differenzierung, erwies sich aber nicht als unbedingt für eine osteogene Differenzierung notwendig. Die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase und die Färbung der Matrixmineralisierung bestätigten die Untersuchungen auf Genexpressionsebene. Die beobachteten Unterschiede der Genregulation können einerseits spenderbedingt sein, andererseits aber auch durch leichte Abweichungen der Kultivierungsbedingungen verursacht worden sein.

MG-63 Da es sich bei den mesenchymalen Stammzellen um eine Mischpopulation handelt, deren Zusammensetzung und biologische Eigenschaften abhängig waren von Alter, Geschlecht und Allgemeinzustand des Spenders, können die Ergebnisse der DNA-Chip-Experimente nur bedingt verallgemeinert und vorsichtige Rückschlüsse auf die Regulation der osteogenen Differenzierung gezogen werden. Aus diesem Grund wurde ein weiteres DNA-Chip-Experiment durchgeführt, bei dem eine Modellzelllinie untersucht wurde. Dabei wurde die Zelllinie MG-63 gewählt – humane immortalisierte Zellen, ursprünglich isoliert aus einem Osteosarkom – die in der Literatur als Knochenvorläuferzelllinie beschrieben wird. Die MG-63 wurden wie die adMSCs mit Dexamethason-haltigem Differenzierungsmedium mit und ohne zusätzlichem

Tabelle 4.4.: DNA-Chip-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knorpelmarker in adMSCs (huF 53), die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium, DM: Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt; COMP: *cartilage oligomeric matrix protein*). (– Nicht exprimiert, ↑ schwach exprimiert, ↑↑ mittelstark exprimiert, ↑↑↑ stark exprimiert.)

	NM	DM	BMP
Aggrecan	–	↑	–
Versican	–	–	–
Kollagen II α 1	↑↑	↑↑	↑↑↑
Kollagen IX α 1	–	–	↑
Kollagen IX α 2	–	↑	↑
Kollagen IX α 3	–	↑	–
Kollagen X α 1	–	–	–
Kollagen XI α 1	↑	↑↑	↑↑
Kollagen XI α 2	–	–	–
COMP	–	–	↑

BMP-2 (50 ng/mL) osteogen differenziert. Die Genexpression der Zellen in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium wurde mit einem DNA-Chip untersucht. Zusätzlich wurde aus denselben Proben eine RT-PCR für typische Knochenmarker durchgeführt. Zunächst wurde auf den DNA-Chips die Expression der typischen Knochenmarker ausgewertet (Tabelle 4.5) und mit der RT-PCR (Abbildung 4.6) verglichen. PCR und DNA-Chip stimmten darin überein, dass in allen Medien die typischen Knochenmarker stark exprimiert wurden. Kollagen I, Alkalische Phosphatase, *Cbfa-1/Runx2*, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, BMP-2, BMP-4 und BSP-2 wurden relativ unabhängig vom Kultivierungsmedium exprimiert. Auch die Zellen in Standard-Proliferationsmedium ohne osteogene Stimuli wiesen also einen Knochenphänotyp auf und waren in ihrer Differenzierung bereits fortgeschritten. MG-63 reagierten also sehr leicht auf externe Stimuli mit einer osteogenen Differenzierung und bereits konfluentes Wachstum führte zu einem Knochenphänotyp. Damit werden auch die in der Literatur voneinander abweichenden Beschreibungen der Zellen als Vorläufer- bzw. als Knochenzellen erklärt.

Unabhängig vom Knochenphänotyp wurde auch in den MG-63-Zellen durch verschiedene osteogene Zusätze zu den Kulturmedien die Genexpression unterschiedlich reguliert. Wie auch bei den adMSCs handelte es sich bei den regulierten Genen hauptsächlich um Komponenten der extrazellulären Matrix und von Signaltransduktionswegen (vollständige Auflistung der regulierten Gene s. Anhang B.5, Seite 150). BMP-2 stimulierte die Genexpression der osteoinduktiven Proteine BMP-2 und Pleiotrophin (OSF1), beides Proteine, die in der Knochenentwicklung eine bedeutende Rolle spielen. Außerdem waren zwei regulierende Bindungsproteine für den insulinähnlichen Wachstumsfaktor verstärkt exprimiert. Mit Thrombospondin 1 war auch ein Protein der extrazellulären Matrix hoch reguliert. Interessanterweise wurde durch BMP-2 auch Smad 3 verstärkt exprimiert, das die von BMP-2 und *Cbfa-1/Runx2* induzierten

Tabelle 4.5.: DNA-Chip-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knochenmarker in MG-63-Zellen, die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt).
(– Nicht exprimiert, ↑ schwach exprimiert, ↑↑ mittelstark exprimiert, ↑↑↑ stark exprimiert.)

	NM	DM	BMP
Kollagen X $\alpha 1$	↑↑↑	↑↑↑	↑↑
Kollagen X $\alpha 2$	↑↑	↑↑	↑↑
Alkalische Phosphatase	↑↑	↑↑	↑↑
<i>Cbfa-1/Runx2</i>	↑↑	↑↑	↑↑
Osteocalcin	↑↑	↑↑	↑↑
Osteopontin	↑↑	↑↑	↑↑
Osteonectin	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
BMP-2	↑↑	↑↑	↑↑
BMP-4	↑↑	↑↑	↑↑
BSP-2	↑	↑↑	↑↑

transkriptionalen Aktivitäten inhibiert und damit die Zelldifferenzierung hemmt. Dies ist eine zelluläre Reaktion auf die permanente Anwesenheit des Differenzierungsfaktors BMP-2 und bewirkt eine zusätzliche Regulierung seiner Effekte. Eine ähnliche Auswirkung war auch bei den adMSCs beobachtet worden, wo im BMP-2-haltigen Medium Caveolin 1 verstärkt exprimiert war.

Im Differenzierungsmedium ohne BMP-2-Zusatz waren einige Matrixkomponenten verstärkt exprimiert, darunter die Kollagene II, III, XVI und XIX, Matrilin 1 und Dermatotin. Kollagen II ist ein typisches Knorpelkollagen und die Kollagene XVI und XIX treten zumeist in Verbindung mit Kollagen I oder II auf. Kollagen III hingegen kommt in dehnbaren Geweben wie der Lunge oder auch in Narbengewebe vor. Auch bei Matrilin 1 handelt es sich um ein knorpelspezifisches Protein. Es wird auch als *cartilage matrix protein* bezeichnet und ist am Aufbau des filamentösen Netzwerkes in der extrazellulären Matrix beteiligt. Zu den im Dexamethason-haltigen Medium verstärkt exprimierten Signaltransduktoren gehörten keine, die direkt mit Differenzierungsprozessen im Knochen oder Knorpel in Verbindung stehen. Die Expression von Knochenmarkern, sowohl mit dem DNA-Chip als auch mit der RT-PCR nachgewiesen, belegte eindeutig den osteogenen Phänotyp der MG-63-Zellen, nachdem sie in Dexamethason-haltigem Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Einige der durch Dexamethason regulierten Gene standen in Zusammenhang mit Knorpel, was eine enchondrale Ossifikation andeutete.

Anders als bei den adMSCs war bei den MG-63-Zellen auch im Standard-Proliferationsmedium eine Reihe von Genen der Signaltransduktion und von Komponenten der extrazellulären Matrix verstärkt exprimiert. Einige der regulierten Matrixkomponenten waren typisch

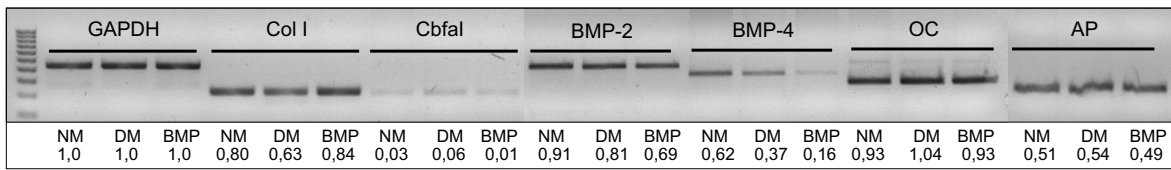


Abbildung 4.6.: PCR-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knochenmarker in MG-63-Zellen, die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt). GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ColI: Kollagen I, OC: Osteocalcin, AP: Alkalische Phosphatase, OPN: Osteopontin. Die relative Bandenstärke, bezogen auf diejenige der GAPDH, ist unter den einzelnen Banden angegeben.

für Knorpel, darunter Kollagen II und XI, von Knorpel abgeleitetes Morphogenese-Protein 1 (*cartilage-derived morphogenetic protein-1*, CDMP1), ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie. Bei den Signaltransduktoren waren einige knorpelspezifische Faktoren reguliert, darunter SOX 4 (*sex determining region γ -box 4*), ein Mediator der Parathormoneffekte. Auch das in Knochengewebe stark exprimierte WISP2 war im Standardmedium verstärkt exprimiert. Obwohl die Expressionsstärke der Knochenmarker in allen Proben vergleichbar war, unterschied sich also der Differenzierungsstatus in nicht osteogen stimulierten MG-63-Zellen von dem der gezielt differenzierten Zellen. Einige Komponenten der extrazellulären Matrix, die typisch für Knorpel sind, waren im Standard-Proliferationsmedium (NM) verstärkt exprimiert, während bei den Transkriptionsfaktoren die osteogen wirkenden hoch reguliert waren. Bei einer zellulären Reaktion auf einen externen Stimulus ist die Expression von Transkriptionsfaktoren immer einer der ersten Effekte. Die Transkriptionsfaktoren können dann wiederum die Expression von anderen Genen, wie z. B. solche, die für Komponenten der extrazellulären Matrix codieren, beeinflussen. Obwohl die MG-63 unter NM-Bedingungen also bereits einen Knochenphänotyp aufwies, bildeten sie immer noch zusätzlich Knorpelmatrix, die im Rahmen der enchondralen Ossifikation in Knochenmatrix umzubauen war. Die zugehörige Osteogenese wurde offensichtlich gerade initiiert, indem einige Transkriptionsfaktoren gebildet wurden, die die Knochenbildung fördern. In den osteogenen Medien DM und BMP war dieser Prozess bereits weiter fortgeschritten.

Die Untersuchung der Expression typischer Knorpelmarker zeigte in allen hier verwendeten Medien eine deutliche Expression von Genen, die für Proteine der extrazellulären Matrix von Knorpel codieren (Tabelle 4.6). Im osteogenen Differenzierungsmedium mit und ohne BMP-2-Zusatz waren aber andere mit Knorpel und der chondrogenen Differenzierung in Zusammenhang stehende Gene herunter reguliert. Die osteochondrale Differenzierung wurde hier also mittlerweile abgeschlossen und die Umwandlung des gebildeten Knorpels zu Knochen wurde verstärkt.

Tabelle 4.6.: DNA-Chip-Ergebnisse für die Genexpression typischer Knorpelmarker in MG-63, die mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt; COMP: *cartilage oligomeric matrix protein*). (– Nicht exprimiert, ↑ schwach exprimiert, ↑↑ mittelstark exprimiert, ↑↑↑ stark exprimiert.)

	NM	DM	BMP
Aggrecan	↑↑	↑↑	↑↑
Versican	↑↑	↑↑	↑↑
Kollagen II $\alpha 1$	↑↑↑	↑↑↑	↑↑
Kollagen IX $\alpha 1$	↑↑	↑↑	↑↑
Kollagen IX $\alpha 2$	↑↑↑	↑↑↑	↑↑
Kollagen IX $\alpha 3$	↑↑	↑↑	↑↑
Kollagen X $\alpha 1$	↑↑	↑↑	↑↑
Kollagen XI $\alpha 1$	↑↑	↑↑	↑
Kollagen XI $\alpha 2$	↑↑	↑	↑↑
COMP	↑	↑	↑

Die Vorversuche zur osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe *in vitro* haben gezeigt, dass diese sehr leicht durch den Zusatz von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat zum Kulturmedium zu Knochenzellen differenziert werden konnten. Diese Differenzierung war dabei keine reine Induktion der Expression von Knochenmarkern, sondern wurde von der Expression von typischen Knorpelmarkern begleitet. Es handelte sich also um eine osteochondrale Differenzierung bzw. eine enchondrale Ossifikation. Ein konfluentes Wachstum führte bei den adMSCs bereits zur Expression von Knochenmarkern, was bei den folgenden Experimenten bedacht werden musste. Für die Expansion der Zellen im undifferenzierten Zustand wurden die Zellen daher deutlich subkonfluent kultiviert. Die Messung der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase und die Färbung calcifizierter extrazellulärer Matrix zeigten, dass osteogene Stimulantien erforderlich sind, um diese typischen Eigenschaften von Knochenzellen zu induzieren. Konfluentes Wachstum allein war nicht ausreichend, um diese Effekte zu erzielen. Die Zugabe von BMP-2 führte bereits in niedriger Konzentration zu einer beschleunigten Osteogenese.

4.1.2. Entwicklung eines Protein-Chips zum Nachweis der osteogenen Differenzierung

Eine weit verbreitete Methodik bei biologischen Fragestellungen ist die Untersuchung der Expression relevanter Gene mittels RT-PCR oder auch DNA-Chip-Technologie, um aus Änderungen der Genexpression auf biologische Prozesse zu schließen. Die Transkription ist aber nur der erste Schritt der komplexen Regulation der Proteinbiosynthese. Die gebildete RNA kann vor der eigentlichen Translation unterschiedlich prozessiert werden (*Splicing*). Besonders

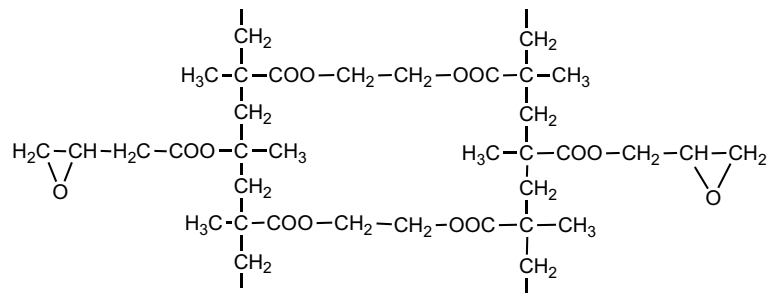


Abbildung 4.7.: Chemische Struktur von Glycidylmethacrylat-co-Ethylenglycoldimethacrylat (GMA-EDMA).

extrazelluläre Proteine werden nach der Translation zusätzlich modifiziert, indem sie z. B. glykosyliert werden oder indem einzelne Peptidsequenzen herausgeschnitten werden, bevor die Proteine sekretiert werden. Bei jedem einzelnen dieser genannten Schritte kann die Zelle regulierend eingreifen. Die Aktivierung eines Gens und die Synthese von mRNA ist daher zwar ein deutliches Zeichen für eine Änderung von zellulären Prozessen, jedoch ist erst der Nachweis des (aktiven) Proteins ein sicherer Beleg für die Aktivierung zellulärer Mechanismen.

Um ein bestimmtes Protein auch in Anwesenheit vieler anderer nachzuweisen, wird häufig eine Immundetektion verwendet, bei der die hochspezifische Antigen-Antikörper-Bindung ausgenutzt wird. Typische auf einer Immundetektion basierende Techniken sind Western-Blot, ELISA und Immunhistochemie.

Eine relativ neue, mit den etablierten Verfahren konkurrierende Methode zum Protein-Nachweis sind Protein-Mikrochips. Sie vereinen die Technologie der Immundetektion mit dem hohen Parallelisierungsgrad, der Quantifizierbarkeit und der Sensitivität der DNA-Chip-Technologie. Im Hinblick auf verschiedene Fragestellungen sind diverse Realisierungsmöglichkeiten für Protein-Chips vorgeschlagen worden. Ihnen allen liegt zugrunde, dass auf einer Trägeroberfläche Proteine aus einer Probe mit Hilfe spezifischer Antikörper gebunden und über einen Fluoreszenzmarker detektiert werden. Häufig finden Antikörper-Chips Anwendung, bei denen gut charakterisierte Antikörper auf einer Oberfläche immobilisiert sind und dort das Zielprotein binden. Für die Immobilisierung eines Antikörpers auf dem Chip werden grundsätzlich zwei Trägersysteme eingesetzt. Entweder wird eine Glasoberfläche chemisch so modifiziert, dass die Proteinbindung unterstützt wird, oder aber es wird eine spezielle Membran oder ein Hydrogel auf einer Glas- oder Polymer-Oberfläche fixiert. Solche dreidimensionale Trägersysteme verfügen aufgrund der größeren Oberfläche über eine höhere Bindungskapazität. Zusätzlich wurde in vielen Studien eine erhöhte Stabilität der Antikörper in der raumstrukturierten Mikroumgebung von dreidimensional gestalteten Oberflächen beschrieben. Damit gewinnen die dreidimensionalen Oberflächen an Sensitivität und der dynamische Bereich der Detektion ist größer.



Abbildung 4.8.: Immobilisierungsreaktion von Proteinen auf einer Poly(GMA-EDMA)-Oberfläche.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protein-Chip zur Analyse von knochenspezifischen Proteinen im Zellkulturüberstand entwickelt. Diese Arbeiten entstanden in enger Kooperation mit Marina Slabospitskaya vom Institut für Makromolekulare Verbindungen der Russischen Wissenschaftsakademie in Sankt Petersburg und Johanna Walter vom Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover im Rahmen ihrer Dissertationen. Als Oberfläche zur Immobilisierung eines Antikörpers wurde ein makroporöses Polymethacrylat aus Glycidylmethacrylat (GMA) und Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA, Struktur in Abbildung 4.7) verwendet. Polymethacrylate werden dank ihrer chemischen Stabilität häufig als Chromatographiematerial eingesetzt. Sie können mit einer porösen Struktur hergestellt werden, die auch im trockenen Zustand stabil ist. Diese poröse Struktur bietet den Proteinen ein dreidimensionales Gerüst, an das sie binden können. Die Bindung von Proteinen bzw. des gesamten Komplexes aus einem oder mehreren Antikörpern, Analyt und Fluoreszenzmarker ist nur in ausreichend großen Poren möglich. Andererseits verringern große Poren die mechanische Stabilität des Polymers.

In dieser Arbeit wurde ein Copolymer aus GMA und EDMA eingesetzt, das aus untereinander verbundenen Polymer-Mikroglobuli aufgebaut war, die von Poren separiert wurden. Die Porengröße betrug etwa $1\ \mu\text{m}$ und die strukturelle Festigkeit des Materials wurde durch einen erheblichen Grad an Quervernetzung gewährleistet. An die Polymethacrylat-Oberfläche können Proteine in einer einfachen einstufigen Reaktion kovalent binden, indem eine Aminogruppe eines Proteins mit dem Epoxid des Glycidylmethacrylats reagiert. Auf diese Weise können Proteine dauerhaft auf dem Polymethacrylat immobilisiert werden (Abbildung 4.8). Die ersten Polymethacrylat-Chips waren von Marina Slabospitskaya in Sankt Petersburg hergestellt worden, indem mit Fluorwasserstoffsäure zunächst eine zentrale Vertiefung ($18 \times 60\ \text{mm}$) in einen herkömmlichen Objektträger geätzt wurde, in der dann Methacrylatmonomere polymerisiert wurden. Damit das Methacrylat fest mit dem Glas verbunden war, wurde die Glasoberfläche vor der Polymerisierung mit Methacrylsäure-[3-(trimethylsilyl)-propylester] aktiviert, wodurch Methacrylsäure an die Glasoberfläche gebracht wurde, an deren Doppelbindung die Polymerisierung startete.

Die Verwendbarkeit der Glasträger mit Polymethacrylat-Oberfläche als Protein-Mikrochip wurde zunächst mit einem Modellsystem aus Maus-Immunglobulin G (IgG) und an ein Fluorophor gekoppeltes Anti-Maus-IgG getestet. Mit diesem System wurden zunächst grundlegen-

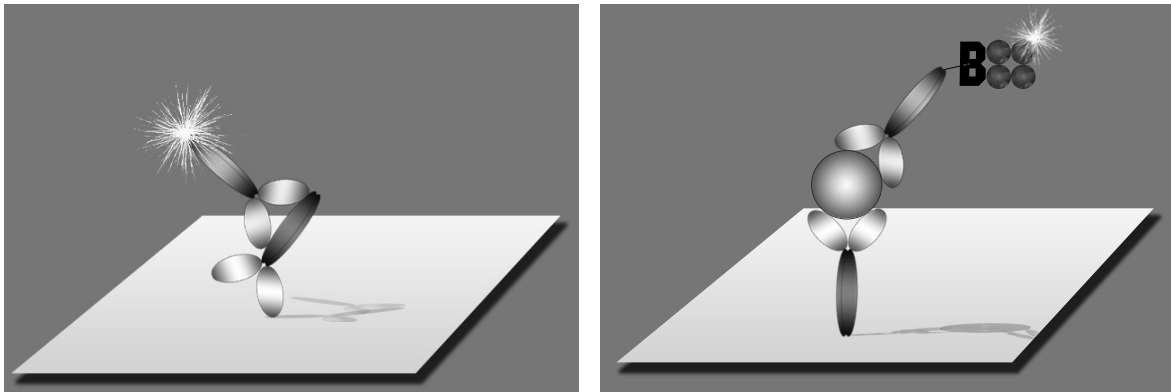


Abbildung 4.9.: Schematische Zeichnung der Antikörpersysteme des Protein-Chips. **Links:** Maus-IgG immobilisiert auf der Chipoberfläche, daran Anti-Maus-IgG mit dem Fluorophor (Alexa-555). **Rechts:** Sandwich aus Fänger-Antikörper, Analyt und biotinyliertem Detektionsantikörper gebunden von Fluorophor (Cy3 / Cy5)-gekoppeltem Streptavidin.

de Versuche zur Methodenentwicklung durchgeführt. Später wurden dann exemplarisch zwei Systeme aufgebaut, mit denen die (humanen) Knochenproteine Kollagen I und Osteopontin nachgewiesen wurden (Abbildung 4.9).

Die (monoklonalen) „Fänger“-Antikörper (Maus-IgG, bzw. Anti-Osteopontin oder Anti-Kollagen I), die spezifisch den Analyten (Osteopontin bzw. Kollagen I) aus einer komplexen Proteinlösung an die Chip-Oberfläche binden, wurden in einem Kontakt-Druckverfahren auf die Oberfläche gebracht (*gespottet*). Dabei taucht ein Ring in die Antikörper-Lösung, so dass sich im Ring ein Flüssigkeitsfilm bildet. Eine dünne Nadel (*Pin*) durchsticht diesen Film und setzt auf die zu bedruckende Oberfläche auf, wobei sie 100 pL Flüssigkeit auf der Oberfläche hinterlässt. In der Regel wurden 500 pL pro *Spot* aufgebracht, indem die Nadel fünfmal aufsetzte. Auf die Oberfläche wurden jeweils zehn *Spots* derselben Lösung gedruckt, deren Fluoreszenzintensität bei der Auswertung gemittelt wurde. Für die eigentliche Immobilisierungsreaktion fand nach dem Drucken eine Inkubation statt, während der die Antikörper kovalent an das Polymethacrylat banden (genaue Durchführung s. Anhang B.4, Seite 155 f.). Auf diese Protein-Chips wurden dann die zu analysierenden Proben (Anti-Maus-IgG gebunden an Alexa Fluor 555 bzw. Lösungen mit Osteopontin oder Kollagen I) gebunden. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen *Spots* wurde mit einem Fluoreszenzscanner gemessen, wobei jeder Chip mit unterschiedlicher Vorspannung des Fotomultipliers (*gain*) eingelesen wurde, um Sättigungseffekte der *Spots* berücksichtigen zu können.

Methodenentwicklung Für die Entwicklung der Methodik und des Umgangs mit den neuartigen Polymethacrylat-Mikrochips wurde Maus-IgG und an Alexa Fluor 555 gekoppeltes Anti-Maus-IgG als Modellsystem verwendet. Die erste Fragestellung betraf grundlegende Parameter der Durchführung wie Pufferwahl, zu immobilisierende Proteinmenge und Inkuba-

tionstemperatur. Die reaktiven Gruppen des Polymethacrylats sind Epoxid-Gruppen, an die Aminogruppen der Proteine nukleophil angreifen können. Eine solche Reaktion läuft bevorzugt in einer basischen Umgebung ab, während andererseits das pH-Optimum der meisten Proteine im neutralen Bereich liegt. Als Puffer für das zu immobilisierende Protein wurden daher Borat-Puffer (pH 9,5), Carbonat-Puffer (pH 9,5) und PBS (pH 7,5) getestet. Die Konzentration des zu immobilisierenden Proteins (hier Maus-IgG) wurde in einem Bereich von 0,2–1 mg/mL variiert, wobei jeweils 500 pL der einzelnen Lösungen auf je zehn *Spots* des Chips aufgebracht wurden, was einer Proteinmenge von 0,1–0,5 ng pro *Spot* entsprach. Die eigentliche Immobilisierungsreaktion wurde durch 17-stündige Inkubation zum Vergleich bei zwei Temperaturen (4° C bzw. bei 37° C) durchgeführt (genaue Durchführung s. Anhang B.4.2, Seite 155). Anschließend wurde die Oberfläche mit Alexa-Fluor-555-Anti-Maus-IgG inkubiert und die mittlere Signalintensität (*signal mean SM*) und das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal to noise ratio*, SNR, s. Anhang B.4.3, Seite 156) ausgewertet.

Nachweisbar war Maus-IgG in allen Puffersystemen ab einer Konzentration von 0,4 mg/mL im *Spotting*-Puffer, im PBS-Puffer auch schon bei 0,2 mg/mL (Abbildung 4.10). Als Nachweisgrenze galt dabei ein Signal-Rausch-Verhältnis oberhalb von drei. Es zeigte sich, dass alle drei Puffer geeignet waren und keinen nennenswerten Einfluss auf die mittlere Signalintensität hatten. Da sich ein höherer pH-Wert nicht als förderlich erwiesen hatte, wurde für alle folgenden Experimente PBS als *Spotting*-Puffer gewählt. Die Immobilisierungstemperatur hatte einen deutlichen Einfluss auf die mittlere Signalintensität, die nach Immobilisierung bei 37° C deutlich höher war als bei 4° C. Daher wurde bei allen weiteren Experimenten die Immobilisierung bei 37° C durchgeführt.

Eine Verbesserung der Signalqualität kann in der Regel durch Blocken der Oberfläche erreicht werden. Dazu wurde der Chip vor der Hybridisierung des Analyten mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumin* BSA) inkubiert, das unspezifisch an die Oberfläche bindet, so dass im Folgenden weder Analyt noch Detektionsantikörper kovalente Bindungen mit der Methacrylat-Oberfläche eingehen konnten. Dadurch wurde die Hintergrundintensität deutlich verringert, was sich in einer Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses auswirkte (Abbildung 4.11).

Die Abhängigkeit der Signalintensität von der immobilisierten Proteinmenge wurde noch einmal genauer untersucht, indem unterschiedliche Volumina einer Maus-IgG-Lösung auf einen Chip *gespottet* wurden. Wie zu erwarten, stieg die mittlere Signalintensität zunächst linear an, flachte dann aber ab und strebte einem Grenzwert zu, bei dem die Oberfläche mit Protein gesättigt war (Abbildung 4.12). Das Signal-Rausch-Verhältnis zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf, bei dem zunächst ein linearer Anstieg aufgrund steigender Signalthöhe bei gleichbleibendem Hintergrund auftrat, gefolgt von einer Abflachung durch die Sättigung der Oberfläche. Um eine möglichst hohe mittlere Signalintensität und ein maximales Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten, wurden für die folgenden Experimente 0,5 ng/*Spot* immobilisiert.

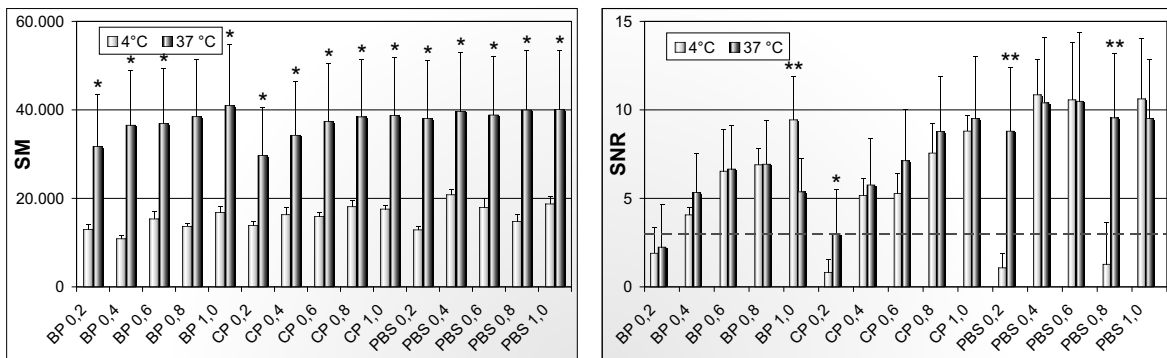


Abbildung 4.10.: Protein-Chip mit Maus-IgG. Mittlere Signalintensität (SM) und Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) in Abhängigkeit von Puffer und Konzentration des zu immobilisierenden Proteins und der Immobilisierungstemperatur. Die eingesetzten Puffer waren Boratpuffer (BP), Carbonatpuffer (CP) und PBS, das Protein lag in den Konzentrationen 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL und 1,0 mg/mL vor. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 10 einzelnen *Spots* \pm Standardabweichung. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. Die Nachweisgrenze ist als unterbrochene Linie dargestellt (-).

An die Immobilisierung des Fänger-Antikörpers schloss sich ein Waschvorgang an, der nicht kovalent gebundene Antikörper entfernen sollte. Unspezifisch gebundener Antikörper kann genau wie kovalent gebundener Antikörper an den Analyten binden. Allerdings kann der Antikörper-Analyt-Komplex während der folgenden Waschvorgänge von der Oberfläche entfernt werden, so dass die mittlere Signalintensität sinkt. Auch eine Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses kann auftreten, wenn der Komplex innerhalb der Oberfläche diffundiert und so die Hintergrundfluoreszenz erhöht. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Chip-Oberfläche zunächst mit PBS, danach mit einer Kochsalzlösung und erneut mit PBS gewaschen. Die Dauer dieser drei einzelnen (gleich langen) Waschgänge wurde mit dem Maus-IgG-System optimiert, indem unterschiedliche Waschzeiten (5 min, 20 min, 40 min, 60 min) verglichen wurden. Die mittlere Signalintensität stieg zunächst bei Erhöhung der Waschzeit an und erreichte nach 40-minütigem Waschen ein Plateau, während das Signal-Rausch-Verhältnis bereits bei 20-minütigem Waschen sein Maximum erreichte (Abbildung 4.13). Der Anstieg der Signalintensität bei Verlängerung der Waschzeit erklärt sich dadurch, dass unspezifisch gebundener Fänger-Antikörper entfernt wurde, bevor er den Analyten binden konnte. Bei späteren Waschgängen wurde auf diese Weise kein Analyt von der Oberfläche entfernt. Dadurch stieg das molare Verhältnis von Analyt zu Fänger-Antikörper und folglich auch die Menge an gebundenem Analyt. Das Signal-Rausch-Verhältnis stieg, da die Diffusion unspezifisch gebundener Antikörper innerhalb der Oberfläche verhindert wurde.

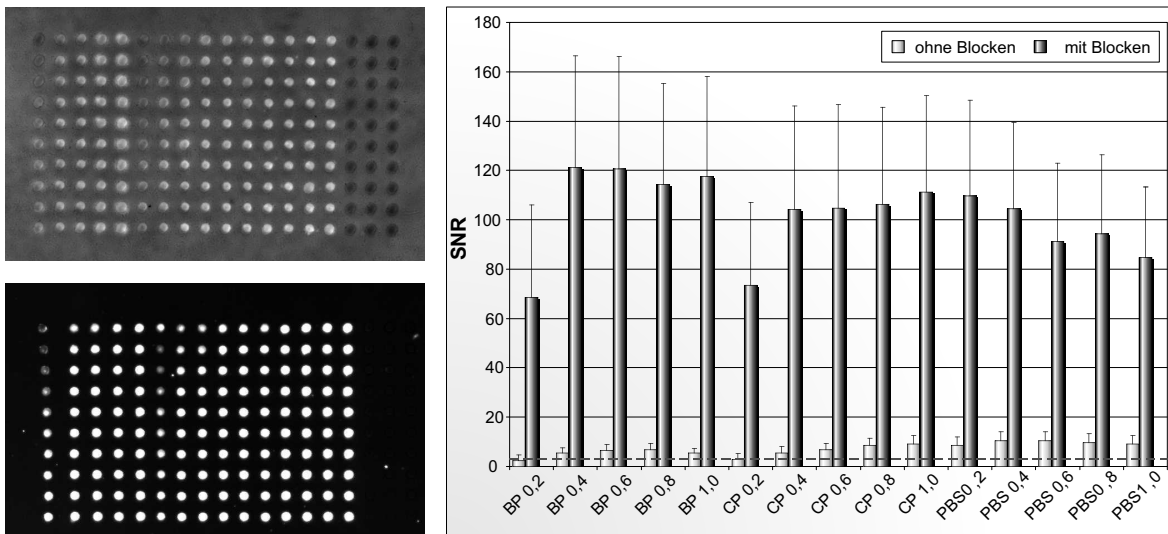


Abbildung 4.11.: Verbesserung der Signalqualität durch Blocken der Oberfläche des Protein-Chips mit BSA. **Links:** Fluoreszenzsignale auf der ungeblockten (oben) und geblockten Oberfläche (unten). **Rechts:** Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) der Signale mit und ohne Blocken. Maus-IgG wurde in den Konzentrationen 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL und 1,0 mg/mL und unterschiedlichen Puffern immobilisiert: Boratpuffer (BP), Carbonatpuffer (CP) und PBS. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 10 einzelnen *Spots* \pm Standardabweichung. Alle Werte waren nach dem Blocken signifikant höher als ohne Blocken ($p < 0,001$). Die Nachweisgrenze ist als unterbrochene Linie dargestellt (---).

Der soweit optimierte Polymethacrylat-Chip wurde verglichen mit einem kommerziellen Chip mit planarer (zweidimensionaler) Oberfläche und funktionellen Aldehyd-Gruppen. Für diesen „Aldehyd-Chip“ wurde das Protokoll an die Herstellerangaben zur Durchführung mit kürzerer Immobilisierungs- und Waschzeit angepasst (Durchführung s. Anhang B.4.2, Seite 155). Signalintensität und Signal-Rausch-Verhältnis waren auf der Methacrylat-Oberfläche deutlich höher als auf der Glasoberfläche mit Aldehydgruppen (Abbildung 4.14). Die höhere Signalintensität korrelierte mit der höheren Bindungskapazität der dreidimensionalen Oberfläche. Dieser Vergleich vermittelt einen Eindruck des Potenzials der Methacrylat-Oberfläche, die offensichtlich gut geeignet ist für die Anwendung in der Protein-Chip-Technologie.

Nachweis von Knochenmarkern Nach den erfolgreichen Versuchen mit dem Maus-IgG-Modellsystem, wurden Nachweissysteme für zwei exemplarische Knochenmarker (Osteopontin und Kollagen I) aufgebaut. Für den Nachweis von Knochenmarkern wurde auf den klassischen Sandwich-Assay zurückgegriffen, bei dem der Analyt durch einen Fänger-Antikörper auf der Oberfläche immobilisiert und dann durch einen markierten Detektions-Antikörper nachgewiesen wird (Abbildung 4.9). Für beide Antikörper kommen theoretisch monoklonale und polyklonale Antikörper in Frage. Für den Fänger-Antikörper ist jedoch ein monoklonaler Antikörper besser geeignet, da dieser eine definierte spezifische Bindungsstärke für den Analyten

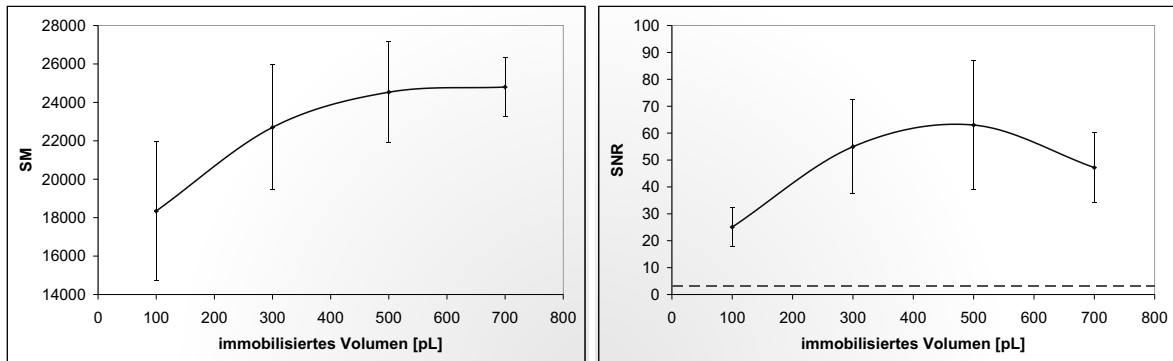


Abbildung 4.12.: Abhängigkeit der mittleren Signalintensität (SM) und des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) vom immobilisierten Volumen an Maus-IgG. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 10 einzelnen *Spots* \pm Standardabweichung. Die Nachweisgrenze ist als unterbrochene Linie dargestellt (- -).

aufweist, die in jedem *Spot* gleich ist. Für die Detektion des auf der Oberfläche gebundenen Analyten ist zu beachten, dass die Epitope des Analyten nicht durch den Fänger-Antikörper abgedeckt sind. Es kann daher zwar ein weiterer monoklonaler Antikörper zur Detektion eingesetzt werden, jedoch müssen die Epitope des Analyten für diesen Antikörper räumlich von der Bindungsstelle zum Fänger-Antikörper weit entfernt sein. Zur Vermeidung dieser Komplikation kommt als Detektionsantikörper häufig ein polyklonaler Antikörper zum Einsatz, so dass die Wahrscheinlichkeit der Epitopverdeckung gering ist. Überdies besitzen polyklonale Antikörper häufig eine höhere Affinität und sind preisgünstiger als monoklonale Antikörper. Ausgehend von diesen Überlegungen wurden für den Nachweis von Knochenmarkern am Beispiel von Osteopontin und Kollagen I monoklonale Fänger-Antikörper zur Immobilisierung auf der Chip-Oberfläche eingesetzt und polyklonale Detektionsantikörper. Letztere waren biotiny-

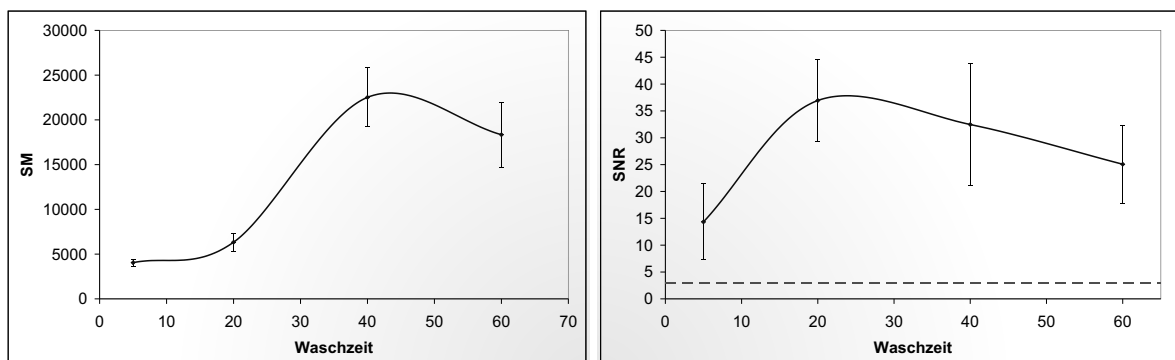


Abbildung 4.13.: Abhängigkeit der mittleren Signalintensität (SM) und des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) von der Waschzeit nach der Immobilisierung von Maus-IgG. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von 10 einzelnen *Spots* \pm Standardabweichung.

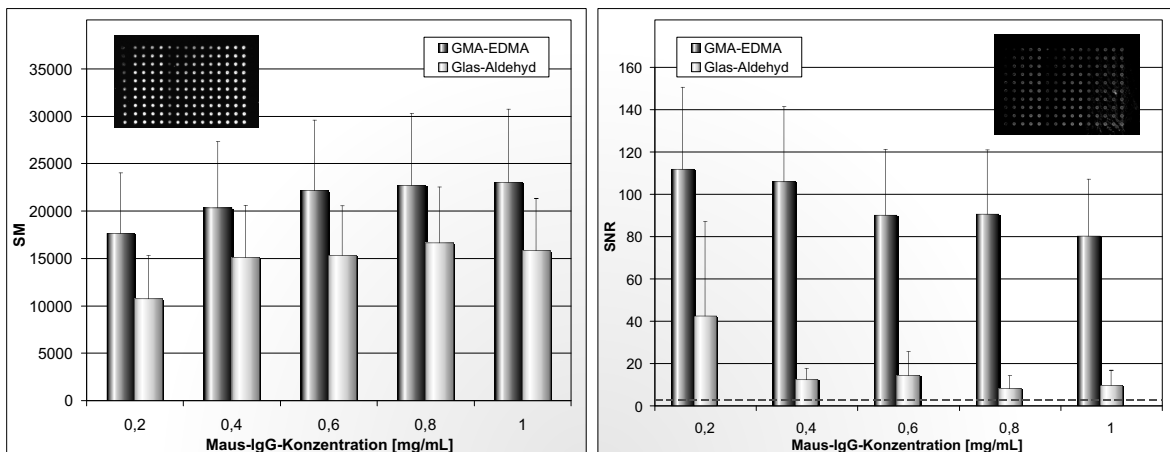


Abbildung 4.14.: Vergleich der GMA-EDMA-Oberfläche mit einem Glasträger mit Aldehydgruppen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Signalintensität (SM) und des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) von 10 einzelnen *Spots* \pm Standardabweichung. Die Nachweisgrenze ist als unterbrochene Linie dargestellt (- -). Die kleinen Abbildungen zeigen die Signale auf der GMA-EDMA-Oberfläche (**links**) bzw. auf der Aldehyd-Oberfläche (**rechts**).

liert, so dass beide Knochenmarker durch Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff (z. B. Cyanin 3 oder Cyanin 5) gekoppeltem Streptavidin gleichzeitig detektiert werden konnten.

Mit diesem Detektionssystem wurden erste Experimente durchgeführt, bei denen Osteopontin und Kollagen I in Standard-Lösungen ($0,01 \mu\text{g/mL}$ und $1 \mu\text{g/mL}$) nachgewiesen wurden. Zusätzlich erfolgte ein Nachweis der beiden Proteine im Zellkulturüberstand. Dafür wurde der Überstand der humanen Knochenzelllinie SAOS-2 und undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen verwendet. In SAOS-2-Zellen war die Expression dieser beiden Knochenmarker mit einer RT-PCR nachgewiesen worden (Ergebnisse nicht dargestellt), während undifferenzierte adMSCs kein Osteopontin produzieren und nur minimale Mengen an Kollagen I. Die Zellen waren jeweils fünf Tage lang ohne zwischenzeitlichen Mediumwechsel oder Passagieren kultiviert worden, bevor vom Medium eine Probe für den Protein-Chip gezogen wurde. Bei diesen Versuchen wurden Osteopontin und Kollagen I zunächst auf getrennten Chips nachgewiesen.

Osteopontin war in der Standard-Lösung mit $1 \mu\text{g/mL}$ nachweisbar (Abbildung 4.15), jedoch nicht mehr bei $0,01 \mu\text{g/mL}$. Auch im Zellkulturüberstand von SAOS-2-Zellen wurde Osteopontin nachgewiesen, jedoch wie erwartet nicht im Kulturmedium undifferenzierter adMSCs (Ergebnisse nicht dargestellt). Kollagen I lieferte in der Standard-Lösung mit $1 \mu\text{g/mL}$ und im Kulturmedium der SAOS-2-Zellen ein deutliches Signal, wurde aber weder in der Standard-Lösung geringerer Konzentration noch im Überstand der MSCs detektiert. Allerdings war die Hintergrundintensität auf dem Kollagen-Chip so hoch, dass das Signal-Rausch-Verhältnis auch bei den deutlichen Signalen der Standard-Lösung und des SAOS-Mediums unterhalb der Nachweisgrenze lag. Der hohe Hintergrund des Kollagen I-Chips deutete eine nicht zu

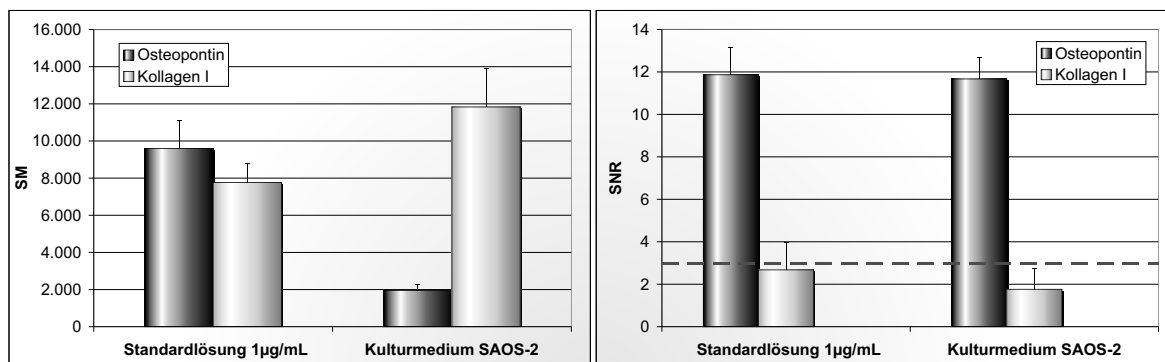


Abbildung 4.15.: Nachweis von Osteopontin (und Kollagen I) in einer Standardlösung und Kulturmedium von SAOS-2-Zellen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Signalintensität (SM) und des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) von 10 einzelnen *Spots* \pm Standardabweichung. Die Nachweisgrenze ist als unterbrochene Linie dargestellt (-).

vernachlässigende unspezifische Bindung des zugehörigen Detektionsantikörpers an. Für weitere Experimente, besonders für einen Chip, auf dem beide (oder später noch mehr) Proteine parallel nachgewiesen werden, ist ein spezifischerer Detektionsantikörper erforderlich. Das zugrunde liegende Versuchsprinzip wurde mit diesen Experimenten erfolgreich angewandt. Für die Detektion von Osteopontin steht hiermit ein spezifischer Assay zur Verfügung, der mit demselben Prinzip auf viele andere Proteine übertragen werden kann.

Quantifizierung Mit dem bisherigen Layout des Proteinchips mit einer großflächigen Polymethacrylatschicht ist nur eine qualitative Aussage über die Anwesenheit des Analyten möglich. Zwar ist in der mittleren Signalintensität prinzipiell eine quantitative Information enthalten, doch muss diese zunächst über eine interne Standardreihe kalibriert werden, bevor aus der Fluoreszenzintensität auf die Analytkonzentration in Lösung geschlossen werden kann. Um eine Standardreihe mitführen zu können, wurde das Format der Proteinchips grundlegend abgeändert. In herkömmliche Glas-Objektträger (75 mm \times 25 mm) wurden in der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover mit einem Diamantfräskopf 16 rechteckige Vertiefungen (6 mm \times 6 mm, 200 μ m tief) gefräst, in denen die Methacrylat-Monomere polymerisiert wurden. Dadurch ergaben sich auf einem Chip 16 separate Felder, auf die jeweils gleiche oder unterschiedliche Proteine immobilisiert werden konnten. Mit Hilfe einer speziellen Hybridisierungskammer konnten die einzelnen Felder mit unterschiedlichen Analytlösungen (Standards bzw. Proben) hybridisiert werden. Mit diesem Layout können auf einem einzigen Chip mehrere unterschiedliche Proben (oder Mehrfachbestimmungen einer Probe) gemessen werden und gleichzeitig kann eine Standardreihe zur Kalibrierung auf mehreren Feldern mitgeführt werden. Für die Fixierung der Hybridi-

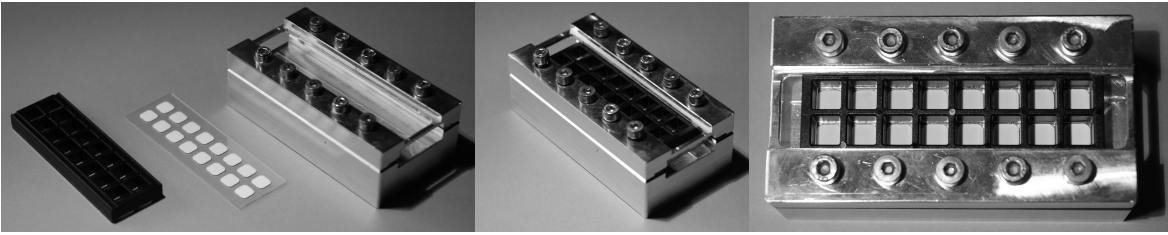


Abbildung 4.16.: Protein-Chip mit Methacrylat-Oberfläche in Form von 16 separaten Feldern. Mit der Hybridisierungskammer (ganz links) können die einzelnen Felder mit unterschiedlichen Lösungen inkubiert werden. Der Metallblock dient zur Fixierung der Hybridisierungskammer auf dem Chip.

sierungskammer wurde in der Feinmechanikwerkstatt eigens ein Metallblock hergestellt, in dem die Kammer durch relativ gleichmäßigen Druck auf dem Chip befestigt wurde, ohne dass dieser brach (Abbildung 4.16).

Auf einem Chip mit 16 separaten Feldern wurden die Feld-zu-Feld-Unterschiede mit dem Maus-IgG-System untersucht, indem auf jedes Feld zehn *Spots* mit Maus-IgG aufgebracht wurden und die Felder getrennt voneinander mit der gleichen Anti-Maus-IgG-Lösung inkubiert wurden. Die mittlere Signalintensität der einzelnen Felder zeigte teilweise große Abweichungen (Abbildung 4.17) mit einer Feld-zu-Feld-Standardabweichung (*coefficient of variation* CV, s. Anhang B.4, Seite 156) von 30–70%. Grund für diese hohen Abweichungen einzelner Felder sind wahrscheinlich Unregelmäßigkeiten im Polymethacrylat, die entweder von Unebenheiten der gefrästen Glasoberfläche verursacht werden oder beim Polymerisieren durch eine ungleichmäßige Verteilung der UV-Strahlung verursacht wurden.

Um die Polymerisierung und damit die Monolith-Oberfläche zu optimieren, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Die Polymerisierung wurde in einer Kammer mit weißen Wänden zur Reflexion der UV-Strahlen durchgeführt und die Entfernung der UV-Lampe vom Chip wurde verändert, ohne dass die Ergebnisse sich wesentlich verbesserten. Um eine möglichst plane und gleichmäßige Oberfläche zu erhalten, wurde der Chip während der Polymerisierung von einer stabilen Folie abgedeckt, so dass der Flüssigkeitspegel nicht mehr konkav, sondern plan war. Auf diese Weise wurde außerdem während der Polymerisierung der Radikalfänger Sauerstoff ausgeschlossen. Die daraus entstandenen Monolith-Oberflächen waren zwar plan, jedoch waren sie so brüchig, dass die Oberfläche bereits beim *Spotten* brach. Ein anderer Ansatz war, die Felder mit Monomerenlösung zu überfüllen und das überschüssige Polymer abzuschleifen, wobei spezielles Schleifpapier eingesetzt wurde, das die Glasoberfläche nicht schädigt. Die so gebildeten Monolith-Oberflächen waren so plan, dass sie durch Tasten nicht mehr vom Glas zu unterscheiden waren. Aber auch hier wurde eine hohe Brüchigkeit festgestellt, so dass die Oberfläche beim *Spotten* brach. Durch Abdecken während der Polymerisierung und durch das

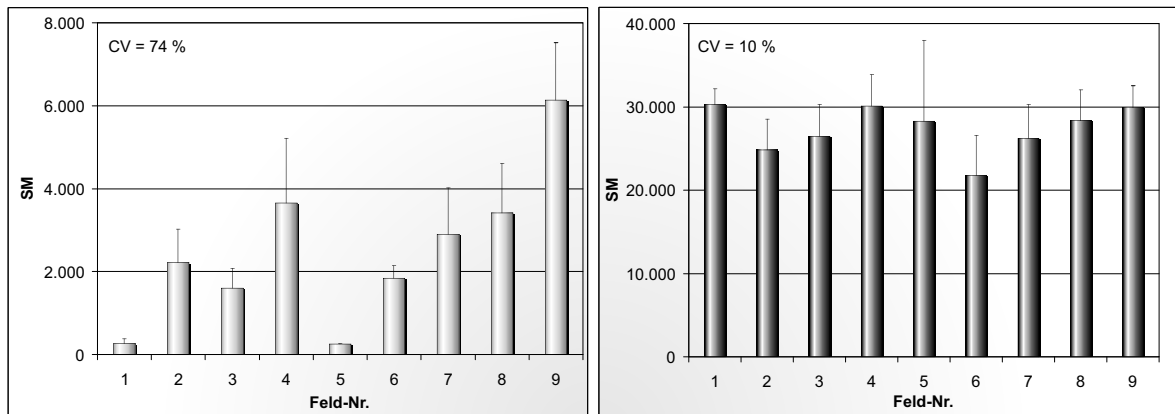


Abbildung 4.17.: Feld-zu-Feld-Unterschied auf dem Protein-Chip mit 16 Feldern. **Links:** Chip mit großer Abweichung zwischen den einzelnen Feldern ($CV = 74\%$). **Rechts:** optimierter Chip mit geringerer Abweichung zwischen den einzelnen Feldern ($CV = 10\%$). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der Signalintensität (SM) von 10 einzelnen *Spots* auf einem Feld \pm Standardabweichung.

Abschleifen wurde offensichtlich die Porenstruktur des Polymethacrylats in Mitleidenschaft gezogen, so dass die mechanische Stabilität nicht mehr gegeben war. Der Boden der Vertiefungen des Objektträgers konnte etwas planer gestaltet werden, indem beim Fräsen ein engerer Fräsweg gefahren wurde, so dass zunächst entstandene Grate teilweise weggeschliffen wurden. Auch ein weiterer Fräsgang zur Entfernung der zunächst entstandenen Grate wurde in Betracht gezogen. Durch Kombination dieser Methoden konnten Chips hergestellt werden, bei denen die Feld-zu-Feld-Abweichung nur noch 10–20% betrug. Diese Werte liegen bereits im Bereich der in der Literatur beschriebenen minimalen Werten von ca. 10%. Jedoch gelang die Herstellung von Chips mit geringen Feld-zu-Feld-Unterschieden bisher nicht reproduzierbar. Die Methacrylat-Polymerisierung muss daher noch weiter optimiert werden.

In dieser Arbeit wurde ein Protein-Chip zum Nachweis von Knochenmarkern in Zellkulturüberständen entwickelt. Die monolithische Polymethacrylat-Oberfläche zeigte sich als sehr gut geeignet für die Immobilisierung von Proteinen und wurde erfolgreich eingesetzt zur Detektion zweier exemplarischer Knochenmarker (Osteopontin und Kollagen I). Das ursprüngliche Layout des Proteinchips mit einer großen zentralen Polymer-Oberfläche wurde in ein 16-Feld-Format geändert, mit dem prinzipiell auch eine Quantifizierung möglich ist, indem eine Standardreihe zur Kalibrierung mitgeführt wird. Die Weiterentwicklung dieses Proteinchips zur quantitativen Detektion verschiedener Knochenmarker eröffnet die Möglichkeit, bereits während der Kultivierung (z. B. in einem Bioreaktor) den osteogenen Differenzierungszustand von Zellen zu analysieren.

4.2. Mechanische Stimulation

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der dynamischen Kultivierung von Knochenzellen bestehend aus mechanischer Stimulation und Bioreaktorkultivierung. Da Knochen wie die meisten Gewebe im Körper permanent physikalischen Kräften ausgesetzt ist, erscheint es plausibel, dass für die Generierung eines funktionalen Knochengewebes *in vitro* ebenfalls physikalische Kräfte förderlich sind. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass künstliche Knochenkonstrukte, die in statischer Zellkultur hergestellt worden waren, verglichen mit natürlichem Gewebe eine verminderte mechanische Stabilität aufwiesen². Eine mechanische Stimulation während der Kultivierung kann hingegen Zellen an ihre zukünftige mechanisch aktive Umgebung gewöhnen und dazu anregen, vermehrt stabilisierende Komponenten in die extrazelluläre Matrix einzubauen, wodurch das Konstrukt verfestigt wird. Stamm- und Progenitorzellen können bei einer dynamischen Kultivierung zur Differenzierung angeregt werden und je nach Stimulus zu Knochenzellen, Knorpelzellen oder auch Fibroblasten von Sehnen oder Bändern differenzieren. Die verwendeten Stimuli müssen also dem Zielgewebe angepasst werden und sind in der Regel den Bedingungen *in vivo* nachempfunden. Für Knorpelkonstrukte werden vorwiegend Kompressionskräfte eingesetzt, während für Fibroblasten Dehnung bevorzugt wird. Knochengewebe ist *in vivo* einerseits Kompressionskräften, die durch die Gravitation und durch stauchende Bewegungen entstehen, ausgesetzt. Andererseits dient das Skelett der Muskulatur als Ankerpunkt und erfährt durch diese Zugkräfte, die für die Umstrukturierung von Knochengewebe eine bedeutende Rolle spielen. Diese verformenden Kräfte wiederum lösen in den engen Canaliculi des Knochens Flüssigkeitsströmungen aus, die an den Zellausläufern der Osteozyten in den Canaliculi und den Zellkörpern in den Lakunen eine Scherbeanspruchung bewirken. Im *Tissue Engineering* von Knochen kommen daher häufig einerseits Perfusionsysteme zum Einsatz, bei denen ein Konstrukt von Medium durchspült wird, und andererseits unterschiedliche Systeme, bei denen Knochenzellen auf elastischen Substraten gedehnt werden. Im Gegensatz zu Geweben wie Haut oder Lunge ist für Knochen eine lineare Dehnung eher adäquat als eine radiale Dehnung. Neidlinger-Wilke *et al.* beschrieben 1994 eine technisch sehr einfache Realisierung einer linearen Dehnung, bei der rechteckige flexible Schalen aus einem zellkulturkompatiblen Silikon in einer speziellen Apparatur mit einem Exzenterantrieb gedehnt wurden¹²⁶. Van Griensven *et al.* übernahmen das generelle Layout dieses Systems und optimierten es dahingehend, dass einzelne Stimulationseinheiten einen eigenen Motor erhielten und getrennt von einander angetrieben werden konnten¹⁷⁷.

In der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover wurden angelehnt an den Prototyp der Arbeitsgruppe von Prof. M. van Griensven zehn Einspannvorrichtungen mit Schrittmotoren hergestellt, mit denen fixierte Silikonschalen zyklisch gedehnt werden konnten (Abbildung 4.18, technische Zeichnung in Anhang C, Sei-

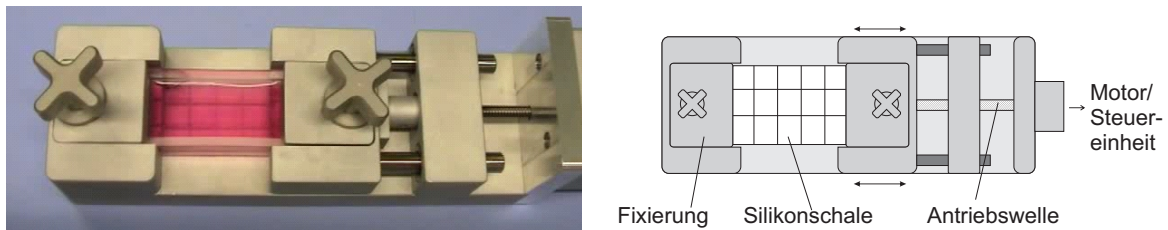


Abbildung 4.18.: Einspannvorrichtung für die mechanische Stimulation, mit der eine Silikonschale fixiert wird und über eine Antriebswelle von einem Motor an einer Seite gedehnt werden kann.

te 159). Jede Vorrichtung ist vorgesehen, eine Silikonschale beidseitig zu fixieren, wobei eine der Klemmbacken über eine Welle vom Schrittmotor vor und zurück bewegt wird. Die Motoren wurden über einen Wasserkreislauf gekühlt, so dass bei längerer Betriebszeit die entstehende Wärme abgeführt werden konnte. Für die Wasserkühlung und die Ansteuerung der Motoren wurden spezielle Anschlüsse in den Inkubator eingebaut. Die Steuerung der Maschinen wurde von der Elektronikwerkstatt der Technischen Chemie hergestellt. Über ein Steuerungsgerät und die dazu entwickelte Software konnten einzelne Maschinen unabhängig voneinander oder auch gleichzeitig angesteuert werden. Die Software wurde den Bedürfnissen wiederholt angepasst und eine Zeitsteuerung eingegliedert, über die einzelne Versuchsprofile programmiert werden konnten.

Die eigentliche mechanische Stimulation von kultivierten Zellen wurde verwirklicht, indem die Zellen in dehnbaren Silikonschalen kultiviert wurden und die gesamte Schale mit den adhären Zellen gedehnt wurde. Die Übertragung der Zugkraft von der Kulturoberfläche auf die Zellen basiert auf festen Kontaktpunkten der Zellen zur Kulturoberfläche. Neidlinger-Wilke *et al.* untersuchten die Übertragung der Dehnung auf die adhären Zellen und die Verteilung der applizierten Zugkraft über die Kulturoberfläche mittels Phasenkontrastmikroskopie. Eine Schale mit adhären Zellen wurde mit einem Raster versehen und im gedehnten und entspannten Zustand untersucht. Neidlinger-Wilke *et al.* charakterisierten die Kraftverteilung auf der Kulturoberfläche und schlossen auf nahezu homogene Kraftfelder auf der gedehnten Oberfläche. Die einseitige Elongation der Schale bewirkte eine biaxiale Kraft auf der Kulturoberfläche, die eine longitudinale Elongationskomponente und eine transversale Kontraktionskomponente aufwies. Die Dehnung einer Schale um drei Prozent bewirkte eine mittlere longitudinale Elongation der Oberfläche von 2,8 Prozent mit einer transversalen Kontraktion von 0,9 Prozent. Die transversale Kontraktion war über die gesamte Kulturoberfläche homogen verteilt und zeigte keine Unterschiede zwischen Mitte und Rand der Schale. Die Elongation der Kulturoberfläche wurde nahezu vollständig auf die adhären Zellen übertragen.

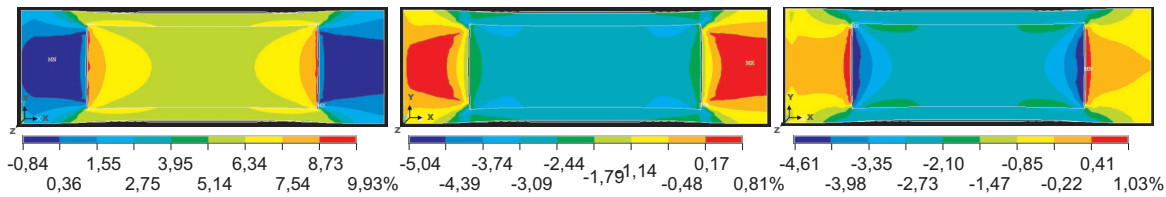


Abbildung 4.19.: Kräfteverteilung auf der Oberfläche einer Silikonschale (prozentual auf die Länge der Schale bezogen) simuliert auf Basis der Finiten-Elemente-Methode. **Links:** Longitudinale Komponente, **Mitte:** transversale Komponente, **rechts:** Wölbung (z-Komponente).

In Zusammenarbeit mit Daniel Riechers wurde mit einem Finite-Elemente-Verfahren die Dehnung einer Silikonschale entlang der Längsachse mit der Software Ansys um fünf Prozent simuliert und die Kräfteverteilung auf der Kulturoberfläche visualisiert (Abbildung 4.19). Die Simulation ergab, dass die Dehnung einer Silikonschale entlang der Längsachse sich nicht nur in einer longitudinalen Elongation auswirkt, sondern, wie auch von Neidlinger-Wilke *et al.* beschrieben, in einer transversalen Kontraktion. Zusätzlich ergab sich noch eine z-Komponente, bedingt durch eine Einwärtswölbung des Schalenbodens. Die Kräfteverteilung der longitudinalen Elongation auf der Kulturoberfläche zeigte sich in der Simulation weitgehend homogen mit Werten von etwa fünf Prozent. In der Nähe der Fixationsstellen allerdings waren die Kräfte stärker und die Elongation betrug sechs bis acht Prozent. Für die transversale Kontraktion ergab die Simulation eine homogene Kräfteverteilung und eine Auslenkung um etwa drei Prozent. Die z-Komponente, also die Wölbung des Schalenbodens war von Neidlinger-Wilke *et al.* vernachlässigt worden. Sie spielt auch nur dann eine Rolle, wenn sich große räumliche Gradienten der Wölbung ergeben. Eine weitgehend gleichmäßige Wölbung wirkt sich auf Zellen, die nur 10–50 μm groß sind, nicht aus. Die Simulation ergab, dass die Wölbung über den Großteil der Kulturoberfläche konstant ist und nur in der Nähe der Fixierungsstellen einen Gradienten bildet, der allerdings nicht so steil ist, dass er nennenswerte Effekte hervorruft.

Die Computersimulation basierend auf der Finite-Elemente-Methode zeigte also, dass bei der Dehnung einer Silikonschale entlang der Längsachse drei Kraftkomponenten auftreten. Die longitudinale Elongation weist keine hundertprozentig gleichmäßige Verteilung auf, ist aber in der Schalenmitte homogen und nur an den Schalenenden etwas höher. Die transversale Kontraktion macht einen höheren Anteil aus, als zunächst anzunehmen war. Bei einer fünfprozentigen Dehnung beträgt sie immerhin etwa drei Prozent und ist relativ gleichmäßig über die gesamte Kulturfläche verteilt. Die Wölbung des Schalenbodens ist im Vergleich zu den beiden anderen Kraftkomponenten vernachlässigbar. Die auf der Kulturfläche adhärenen Zellen erfahren also gleichzeitig Elongations- und Kontraktionskräfte. Außerdem verursacht die zyklische Dehnung der Schale Flüssigkeitsströme im Medium, die wiederum Scherstress auf die Zellen ausüben. Wie auch im Körper wirken in diesem Testsystem also komplex zusammengesetzte Kräfte auf die Zellen ein.

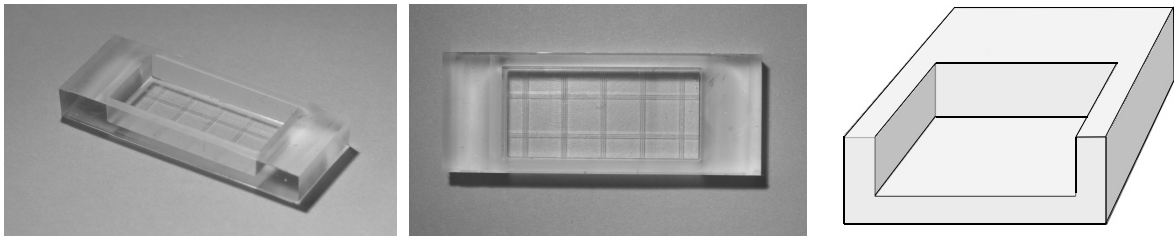


Abbildung 4.20.: Silikonschale für die zyklische Dehnung von Zellen. Außenmaße: 80 mm × 30 mm × 10 mm (Länge × Breite × Höhe). Zentrale Vertiefung: 50 mm × 23 mm.

4.2.1. Stimulation mesenchymaler Stammzellen auf einer zweidimensionalen Kulturoberfläche

Die Schalen für die Dehnungsexperimente wurden aus einem gießbaren additionsvernetzenden Zweikomponenten-Silikonkautschuk (Elastosil[®], Wacker Chemie AG) hergestellt, der biokompatibel und nicht zytotoxisch ist. Von der Feinmechanikwerkstatt wurden spezielle Gussformen gefertigt für die Herstellung von Schalen mit den Außenmaßen von 80 mm × 30 mm × 10 mm (Länge × Breite × Höhe) und einer zentralen Vertiefung für die Kultivierung von 50 mm × 23 mm (Abbildung 4.20). Um die sterile Handhabung zu gewährleisten wurden die Schalen mit einer semiokklusiven Folie verschlossen, die einen Gasaustausch zulässt, Keime und Wassertropfen aber zurückhält, so dass das Medium während des Versuches nicht verdunstet. Neue Schalen wurden autoklaviert und dann mehrere Tage lang in Medium ohne Serumzusatz inkubiert, um alle löslichen Bestandteile herauszuwaschen. Vor der Besiedelung mit Zellen erfolgte eine Inkubation der Kulturoberfläche mit Standard-Proliferationsmedium, wobei sich Proteine, Wachstums- und Adhäsionsfaktoren auf der Oberfläche absetzten, die die Adhäsion von Zellen unterstützen.

Mesenchymale Stammzellen wurden vor dem Stimulationsversuch eine Woche lang mit osteogenem Differenzierungsmedium (DM-10) kultiviert und dann in die Silikonschalen ausplattiert. Zur Synchronisierung des Zellzyklus wurde 24 Stunden vor Beginn der Stimulation die Serumkonzentration von zehn Prozent auf ein Prozent reduziert. Während des eigentlichen Versuches wurden die Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert (detaillierte Beschreibung der Durchführung s. Anhang C, Seite 159). Bei den Dehnungsexperimenten wurden die Schalen mit einer Frequenz von 1 Hz zyklisch um fünf Prozent gedehnt. Die Dauer der Stimulation wurde variiert und betrug 15 Minuten, 60 Minuten oder zwei Stunden. Jede Versuchsreihe war aufgebaut aus drei Gruppen mit jeweils sechs Schalen. Eine Gruppe wurde der jeweiligen Stimulation einmal unterzogen, eine weitere Gruppe wurde dreimal hintereinander stimuliert, wobei zwischendurch eine Regenerationszeit eingelegt wurde, die doppelt so lang war wie die vorangegangene Stimulation. Die dritte Gruppe diente als statische Kontrol-

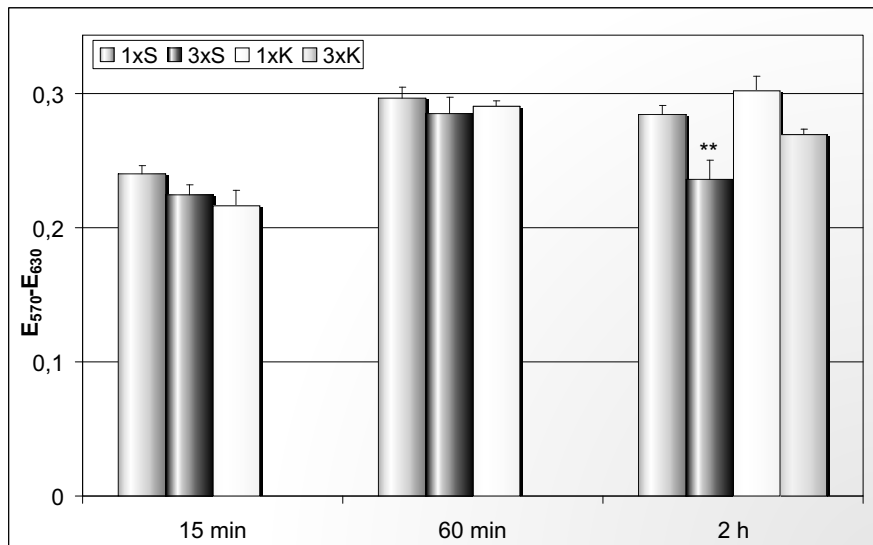


Abbildung 4.21.: Viabilität zyklisch gedehnter adMSCs. Silikonschalen mit adhärennten adMSCs wurden einmal (1xS) oder dreimal (3xS) für die angegebene Zeit (15 min, 60 min, 2 h) mit 1 Hz zyklisch um 5 % gedehnt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte von jeweils 6 Proben \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Abweichungen von den Kontrollwerten sind mit ** (für $p \leq 0,001$) gekennzeichnet.

le und wurde genauso behandelt wie die anderen Schalen, allerdings ohne dass sie stimuliert wurden. Bei der Versuchsreihe mit zweistündiger Stimulation wurden zwei getrennte Kontrollgruppen mitgeführt, jeweils eine für die einmalige und die dreimalige Stimulation. Dadurch wurde die um zwölf Stunden längere Kultivierungszeit der dreimalig stimulierten Zellen auf den Silikonschalen berücksichtigt.

Nach der mechanischen Stimulation wurde die Viabilität der Zellen mit einem MTT-Test untersucht, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt und die Expression von Knochenmarkern mit einer RT-PCR nachgewiesen. Durch den Vergleich aller Messwerte mit den statischen Kontrollen wurden zelluläre Reaktionen, die durch die Silikonoberfläche ausgelöst wurden, und sämtliche nicht beeinflussbaren Kultivierungsparameter (wie Schwankungen der Temperatur, der Mediumzusammensetzung, der Kultivierungszeit etc.) berücksichtigt.

Der MTT-Test ergab, dass die Viabilität der Zellen während der Dehnungsversuche erhalten blieb (Abbildung 4.21). Lediglich durch dreimalige Stimulation von zwei Stunden sank die Viabilität der Zellen etwas ab. Die zyklische Dehnung übte also keinen zellschädigenden Stress aus, der an einer verminderten Proliferationsrate zu erkennen wäre.

Das Expressionsmuster von Knochenmarkern zeigte sich abhängig vom angewandten Stimulationsprofil (Abbildung 4.22). Im 15-Minuten-Experiment war die Genexpression von Kollagen I in den einmalig stimulierten Zellen etwas geringer als in den dreimalig stimulierten und den

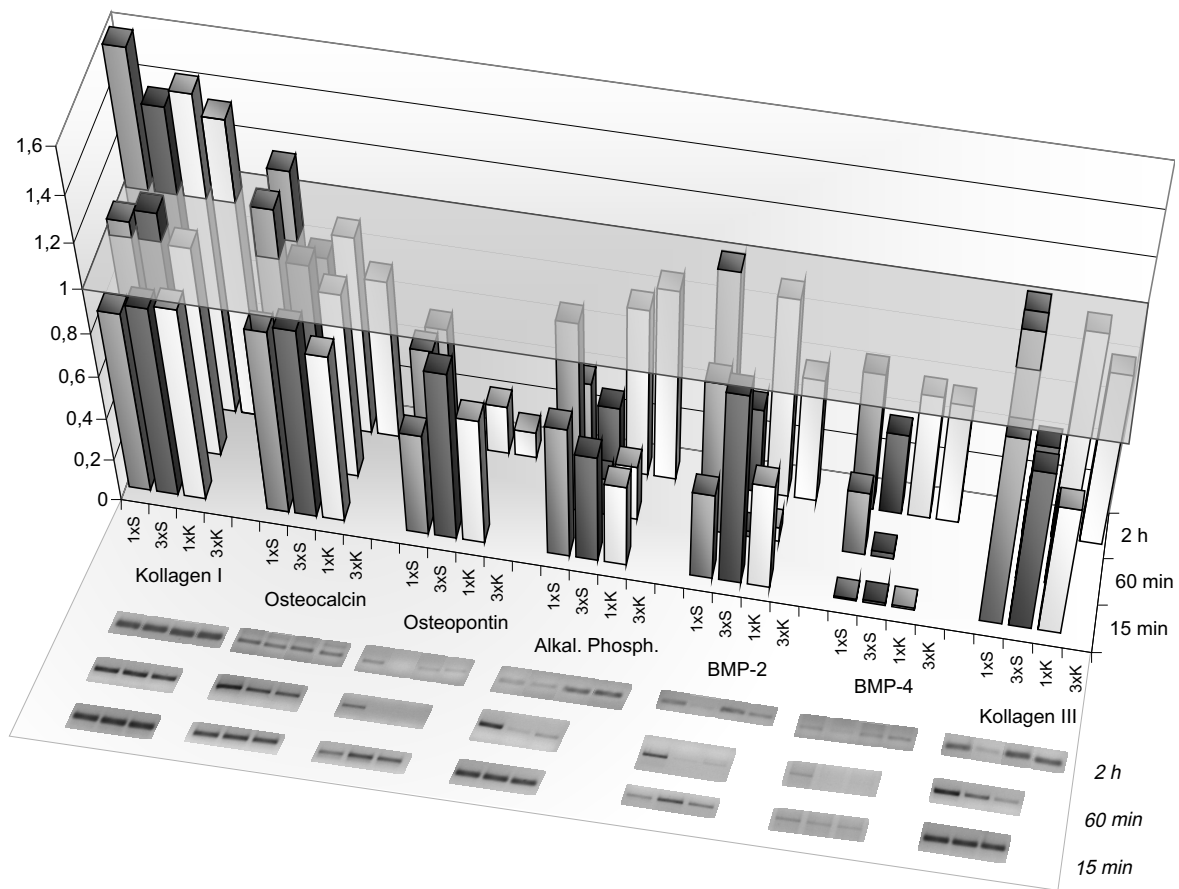


Abbildung 4.22.: Expressionsraten (RT-PCR) typischer Knochenmarker und Kollagen III in zyklisch gedehnten adMSCs. Silikonschalen mit adhärenierten adMSCs wurden einmal (1xS) oder dreimal (3xS) für die angegebene Zeit (15 min, 60 min, 2 h) mit 1 Hz zyklisch um 5 % gedehnt. Die Daten sind angegeben als experimentelle Mittelwerte aus jeweils 6 Proben, bezogen auf die Expression von GAPDH (dargestellt als transparente Ebene).

Zellen der Kontrollproben. Osteocalcin war in den stimulierten Zellen gegenüber den Kontrollen erhöht. Osteopontin und BMP-2 waren in den einmalig stimulierten Zellen etwas geringer exprimiert als in den Zellen der Kontrollproben, in den dreimalig stimulierten Zellen jedoch deutlich stärker. Die Alkalische Phosphatase war in den stimulierten Zellen stärker exprimiert als in den Kontrollen, wobei die Expressionsrate in den einmalig stimulierten Zellen höher war als bei der wiederholten Stimulation. BMP-4 war nur geringfügig exprimiert.

Bei dem Experiment mit 60-minütiger Stimulationszeit war die Expression der meisten Knochenmarker in den einmalig stimulierten Zellen deutlich höher als in den beiden anderen Versuchsgruppen. Besonders deutlich war dies bei Osteopontin, das nur in den einmalig stimulierten Proben nachzuweisen war, aber auch bei der Alkalischen Phosphatase, BMP-2 und BMP-4 war die Expression in den einmalig stimulierten Proben deutlich höher als bei den drei-

malig stimulierten Zellen und den statischen Kontrollen. Die Expression von Kollagen I war kaum von der Stimulation beeinflusst und in den beiden stimulierten Gruppen nur tendenziell höher als bei der statischen Kontrolle. Osteocalcin war ebenfalls in den einmalig stimulierten Proben am stärksten exprimiert, zeigte aber auch in den beiden anderen Gruppen eine beträchtliche Expressionsrate.

Einmalig zwei Stunden zyklische Dehnung führten verglichen mit der statischen Kontrolle zu einer leicht höheren Expression von Kollagen I und Osteocalcin und zu einer deutlich stärkeren Osteopontin-Expression. Die Expressionsraten von BMP-2 und BMP-4 waren bei einmalig stimulierten Zellen und den statischen Kontrollen vergleichbar. Alkalische Phosphatase war in den stimulierten Zellen deutlich geringer exprimiert als in den Zellen der Kontrollproben. Nach einer dreimaligen Stimulation waren die Expressionsraten von Kollagen I und Osteocalcin in derselben Größenordnung wie bei den statischen Kontrollen, während BMP-2 und BMP-4 nur geringfügig exprimiert waren und Osteopontin nicht detektierbar war.

Der Nachweis der typischen Knochenmarker Osteocalcin und Osteopontin, sowie BMP-2, BMP-4 und Kollagen I zeigte, dass die mesenchymalen Stammzellen zu Knochenzellen differenzierten. Maßgeblich dafür war die einwöchige Vordifferenzierung der Zellen mit osteogenem Medium. Der Nachweis von Osteocalcin, das erst mit Beginn der Mineralisierungsphase der osteogenen Differenzierung gebildet wird, weist darauf hin, dass der Differenzierungsstatus der Zellen bereits weit fortgeschritten war. Die mechanische Stimulation hatte spezifische Auswirkungen auf die Expression von Knochenmarkern. Dabei zeigte sich, dass die größten Effekte durch dreimalig 15 Minuten zyklische Dehnung und durch einmalig 60 Minuten erreicht wurden. Die übrigen Versuchsreihen zeigten geringere Auswirkungen auf die Knochenmarkerexpression. Ist also die Beeinflussung der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen das alleinige Ziel eines Versuches, so sind relativ kurze Stimulationszeiten ausreichend, um maximale Effekte auf die Genexpression zu bewirken. Längere Stimulationen bewirken offensichtlich keine dauerhafte Erhöhung der Expression knochenspezifischer Gene.

Kollagen III ist ein Protein, das vorwiegend in extrazellulärer Matrix dehnbarer Geweben wie der Lunge, aber auch in Narben vertreten ist. In Knochen tritt es unter normalen Umständen nicht auf. Wird es in mechanisch stimulierten Zellen gebildet, so kann dies als Zeichen dafür gedeutet werden, dass leichte Zellschäden aufgetreten und Reparaturmechanismen aktiviert worden sind. Kollagen-III-Produktion kann daher zur Abschätzung übermäßiger Stimulation herangezogen werden⁸¹. Einmalig 15 Minuten zyklische Dehnung resultierten gegenüber den statischen Kontrollen in einer deutlich erhöhten Kollagen-III-Expression (Abbildung 4.22). Nach dreimaliger 15-minütiger Stimulation war die Kollagen-III-Expression ebenfalls höher als in den Kontrollproben, aber deutlich geringer als in den einmalig stimulierten Zellen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei dem Experiment mit 60-minütiger Stimulation. Im 2-Stunden-Experiment hingegen war die Kollagen-III-Expression in den einmalig stimulierten Proben

im Bereich der Kontrollproben, während die dreimalig stimulierten Zellen eine deutlich geringere Kollagen-III-Expression aufwiesen. Allen drei Versuchsreihen war gemein, dass die Kollagen-III-Expression nach einmaliger Stimulation im Vergleich mit den Kontrollen erhöht war, die Erhöhung jedoch nach dreimaliger Stimulation weit geringer ausgeprägt war. Dieser Effekt deutet eine Anpassung der Zellen an die physikalisch aktive Umgebung an. Auslösend für diese Anpassung kann sowohl eine Verlängerung der Stimulationsdauer, als auch eine Repetition sein. Die Wiederholung der Stimulation führte in allen Fällen zu niedrigeren Expressionsraten von Kollagen III als eine einmalige Stimulation. Nach einmalig zweistündiger Stimulation war die Expression im Bereich der Kontrollproben und eine Wiederholung führte zu einer noch geringeren Expressionsrate als in den statischen Kontrollen. Um zu erreichen, dass sich Zellen an eine physikalisch aktive Umgebung gewöhnen, sind also längere Stimulationszeiten und / oder eine Wiederholung der Stimulation erforderlich. Zunächst reagieren die Zellen demnach, indem sie die Expression spezifischer Gene regulieren. Bei anhaltender / wiederholter Stimulation wird die Genexpression dann wieder auf geringere Expressionsraten zurückgefahren. Nach dreimalig zwei Stunden zyklischer Dehnung war keines der untersuchten Gene mehr stärker exprimiert als in statischen Kontrollen. Ein grundlegender Mechanismus, wie sich Zellen an eine physikalisch aktive Umgebung gewöhnen, ist also offensichtlich die Verstärkung der extrazellulären Matrix, um Gewebeschädigungen vorzubeugen. Bei erstmaliger Stimulation ist daher eine deutliche Verstärkung von Genexpression und Biosynthese von Komponenten der extrazellulären Matrix zu erwarten. Ist die Matrix stabil genug, um den physikalischen Kräften standzuhalten, ist bei anhaltender Stimulation nur noch eine basale Expression und Synthese stabilisierender Matrixkomponenten zu erwarten, damit die Stabilität aufrechterhalten werden kann. Wird die Stimulation eingestellt, so ist damit zu rechnen, dass auch Genexpression und Synthese der entsprechenden Matrixkomponenten zurückgeht. Dass längere Stimulationszeiten nicht mit einer permanent erhöhten Genexpression der untersuchten Knochenmarker einhergehen, ist also wahrscheinlich auf die Anpassung der Zellen an die aktive Umgebung zurückzuführen und muss nicht heißen, dass längere Stimulationszeiten weniger erfolgreich oder nicht nachhaltig wären.

Die erste Reaktion von Zellen auf äußere Stimuli ist die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere über Signaltransduktionsketten, die letztendlich im Zellkern die Genexpression steuern. Die Änderung der Genexpression ist damit die sekundäre Reaktion der Zellen auf den Stimulus. Daran schließt sich im Folgenden die Proteinbiosynthese an. Wirken sich externe Stimuli wie eine mechanisch aktive Umgebung auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix aus, so sind diese Änderungen nicht so unmittelbar messbar wie die Änderung der Genexpression. Vielmehr reflektiert die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix immer kumulierte Effekte über den Zeitraum der Lebensdauer der einzelnen Proteine.

Um nicht nur die Effekte der mechanischen Stimulation auf Genexpressionsebene zu untersu-

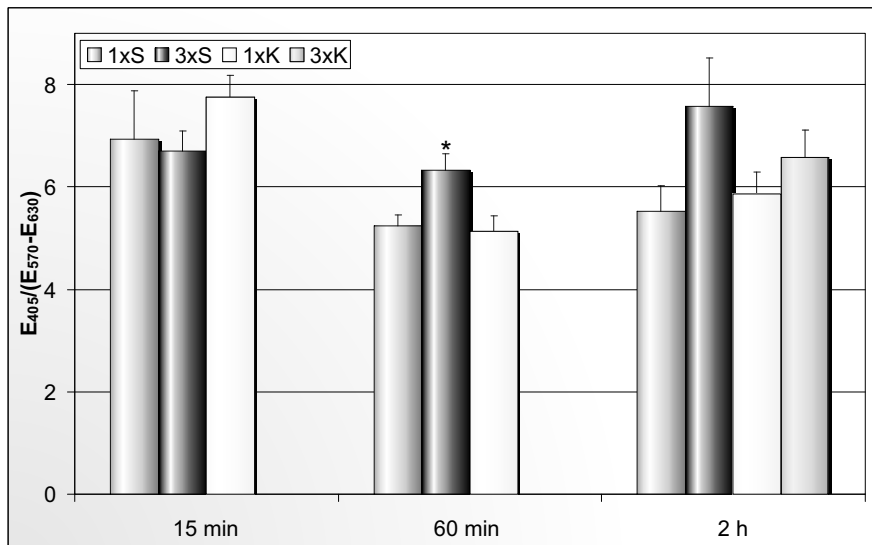


Abbildung 4.23.: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in zyklisch gedehnten adMSCs. Silikonschalen mit adhärenierten adMSCs wurden einmal (1xS) oder dreimal (3xS) für die angegebene Zeit (15 min, 60 min, 2 h) mit 1 Hz zyklisch um 5 % gedehnt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte von jeweils 6 Proben \pm Standardfehler, die Werte der Enzymaktivität sind normiert auf den MTT-Test. Statistisch signifikante Abweichungen von den Kontrollwerten sind mit * gekennzeichnet (für $p < 0,05$).

chen, wurde auch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt. Dabei wurde nicht die Enzymkonzentration im Medium bestimmt, wo geringfügige Änderungen nur schwer messbar sind, sondern das Enzym wurde im Zellpellet gemessen, wo sich Änderungen zeitlich früher manifestieren. Dazu wurden die Zellen nach der Stimulation von den Schalen gelöst und gewaschen. Die Zellmembrane wurden aufgeschlossen, so dass in die Membran eingelagerte Alkalische Phosphatase für den Test zugänglich war. Auf diese Weise wurde hauptsächlich membranverankerte und intrazelluläre (vesikuläre) Alkalische Phosphatase bestimmt. Da die extrazelluläre Matrix nicht abgetrennt wurde, floss auch die dort verankerte Alkalische Phosphatase mit in den Test ein.

Die mechanische Stimulation bewirkte bei kurzzeitiger Stimulation (einmal und dreimal 15 Minuten) zunächst eine niedrigere Aktivität der Alkalischen Phosphatase gegenüber den statischen Kontrollen (Abbildung 4.23). Bei längerer Stimulation (einmal 60 Minuten und einmal zwei Stunden) war die Enzymaktivität in den stimulierten und den Zellen der Kontrollproben im gleichen Bereich. Erst bei längerer und wiederholter Stimulation war dann eine höhere Aktivität in den stimulierten Zellen zu messen. Auf Proteinebene waren also die Auswirkungen einer zyklischen Dehnung erst bei deutlich längerer und wiederholter Stimulation zu messen, als auf der Ebene der Genexpression. Die geringere Enzymaktivität nach kurzzeitiger Stimulation (bezogen auf die statischen Kontrollen) ist wahrscheinlich auf eine nicht ausreichende

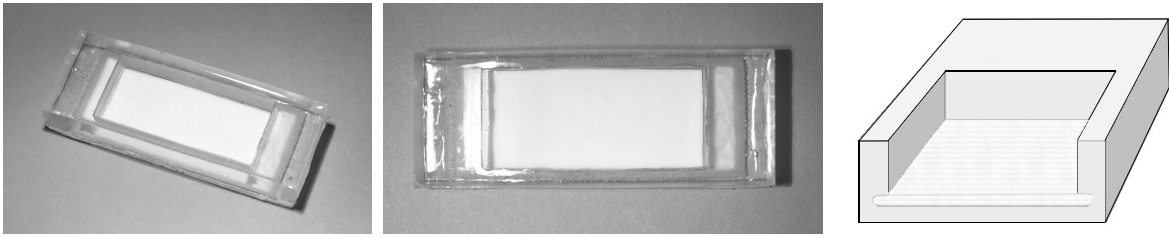


Abbildung 4.24.: Silikonschale mit einem Boden aus Matristypt® für die zyklische Dehnung von Zellen.

Stabilität der extrazellulären Matrix zurückzuführen. Zunächst verankerte Alkalische Phosphatase wurde durch stressinduzierte Läsionen der Matrix ins Medium abgegeben, so dass sie in den Aktivitätstest nicht mit einging. Die auf Genexpressionsebene gemessene verstärkte Synthese von Alkalischer Phosphatase führte nach längerer Stimulationszeit zunächst zu einer Enzymaktivität im Bereich der Kontrollen und bei längerer und wiederholter Stimulation zu der gemessenen erhöhten Aktivität. Die Expression des Alkalische-Phosphatase-Gens bei längerer Stimulation (dreimal eine Stunde bzw. einmal und dreimal zwei Stunden) hatte sich noch nicht auf der Proteinebene ausgewirkt und wäre wahrscheinlich erst zu einem späteren Zeitpunkt zu messen gewesen. Aus diesen Daten ist nicht ersichtlich, ob vielleicht auch eine kurzzeitige Stimulation auf Proteinebene ähnliche Effekte wie die längere zyklische Dehnung hat. Dazu wären Untersuchungen mit unterschiedlichen zeitlichen Abständen zur eigentlichen Stimulation erforderlich. Von Interesse wäre in diesem Zusammenhang auch die Untersuchung anderer Komponenten der extrazellulären Matrix, wobei der entwickelte Protein-Mikrochip erfolgreich Einsatz finden könnte.

Mit Hilfe der mechanischen Stimulation konnte auf die osteogene Differenzierung von adMSCs Einfluss genommen werden. Abhängig von der Stimulationsdauer zeigten sich spezifische Effekte auf Genexpressionsebene, die besonders nach kurzzeitiger Stimulation deutlich waren. Längere und wiederholte Stimulation führten dazu, dass sich die Zellen der physikalischen Aktivität anpassen.

4.2.2. Stimulation einer Modellzelllinie in einem dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk

In den Silikonschalen adhärten die Zellen auf einer planaren (zweidimensionalen) Oberfläche, wie es bei der Standardkultivierung adhärenter Zellen immer der Fall ist. Für die Konstruktion funktionaler Gewebe im Rahmen des *Tissue Engineerings* ist es notwendig, Zellen auf der Oberfläche dreidimensional strukturierter Gerüste zu kultivieren. Die im *Tissue*

Engineering von Knochen gängigsten Gerüstmaterialien sind Keramiken (Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat), die eine hohe mechanische Stabilität aufweisen, aber nicht flexibel sind und damit nicht in das hier verwendete System zur mechanischen Stimulation integriert werden können. Kollagen I, Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix, bot sich aufgrund seiner Flexibilität und Dehnbarkeit als Gerüstmaterial für mechanische Stimulationsversuche an. Von der Firma Dr. Suwelack Skin & Health Care AG wurde Matristypt[®] aus einem dreidimensionalen (bovinen) Kollagen-Netzwerk zur Anwendung bei der Blutstillung entwickelt. Dieses Material wurde in den folgenden Versuchen als dehnbarer Träger in Stimulationsversuchen eingesetzt. Die Silikonschalen wurden so modifiziert, dass die Kulturoberfläche aus zwei Millimeter dickem Matristypt[®] bestand, auf dem die Zellen kultiviert und mechanisch stimuliert wurden (Abbildung 4.24).

Bei den Stimulationsexperimenten im dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk wurden deutlich mehr Zellen pro Silikonschale ausplattiert, da die Kulturoberfläche nicht auf zwei Dimensionen beschränkt war und daher mehr Zellen aufnehmen konnte. Außerdem war für zufriedenstellende Ergebnisse der RNA-Isolierung eine möglichst hohe Zellzahl notwendig, da eine bedeutende Menge an Zellen bzw. RNA im Kollagen-Netzwerk zurückblieb. Um eine ausreichende Zellzahl in einer angemessenen Zeit zur Verfügung zu haben, wurden für diese Experimente die Knochenvorläuferzellen MG-63 als Modellzelllinie eingesetzt. Im Vergleich mit den mesenchymalen Stammzellen wachsen MG-63-Zellen deutlich schneller, so dass jederzeit ausreichend Zellen für die Experimente vorhanden waren. Die Zellen wurden eine Woche vor Versuchsbeginn auf das Kollagengerüst in den Silikonschalen ausplattiert. Auf diese Weise war die Kultivierungszeit in dem dreidimensionalen Netzwerk unabhängig von der Stimulationszeit bei allen Versuchsreihen etwa gleich lang und längere Kultivierungszeiten durch längere Stimulation fielen weniger ins Gewicht. Die Ergebnisse der Stimulationsexperimente auf Matristypt[®] entstanden im Rahmen der Diplomarbeit von Stefanie Böhm.

Wie bei den Stimulationsversuchen auf der Silikonoberfläche wurde jede Versuchsreihe in drei Gruppen aus jeweils sechs Schalen aufgeteilt, von denen eine Gruppe einmalig und eine dreimalig stimuliert wurde und die dritte Gruppe als statische Kontrolle diente. Es wurden insgesamt fünf Experimente mit unterschiedlicher Dauer der zyklischen Dehnung durchgeführt, die 15 Minuten, 60 Minuten, 2 Stunden, 4 Stunden und 8 Stunden betrug. Bei der Versuchsreihe mit achtstündiger Stimulation wurde eine weitere Kontrollgruppe mitgeführt, die parallel zu der dreimaligen Stimulation kultiviert wurde. Bei diesem Versuch verlängert sich die Kultivierungszeit der dreimaligen gegenüber der einmaligen Stimulation um 48 Stunden, was trotz der einwöchigen Vorkultivierung ins Gewicht fällt. Mit der zusätzlichen Kontrollgruppe wurde dies berücksichtigt. Zusätzlich wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, bei der die genannten Stimulationszeiten nacheinander appliziert wurden, wobei nach jeder Stimulation eine doppelt so lange Pause eingelegt wurde. In dieser Versuchsreihe wurden die Zellen wie

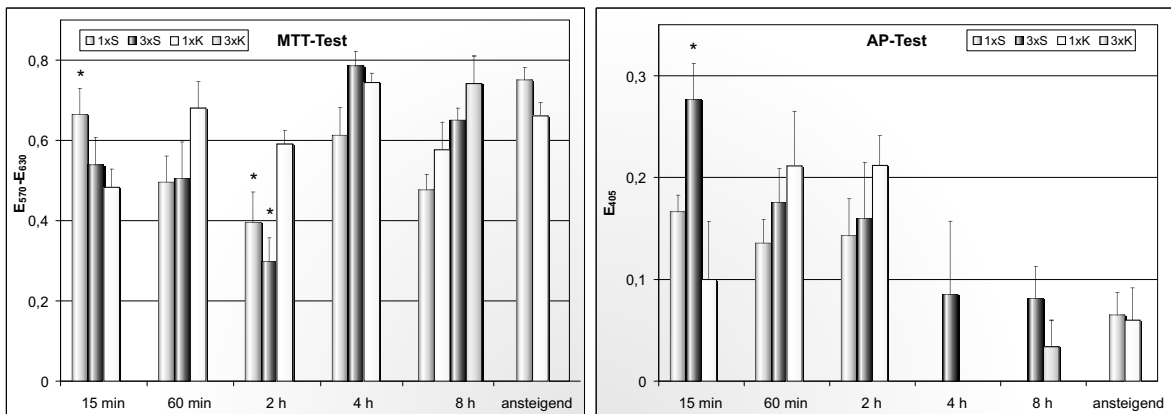


Abbildung 4.25.: Viabilität (**links**) und Aktivität der Alkalischen Phosphatase (**rechts**) in zyklisch gedehnten MG-63 im Kollagen-Netzwerk. Silikonschalen mit MG-63 auf Matristypt[®] wurden einmal (1xS) oder dreimal (3xS) für die angegebene Zeit (15 min–8 h bzw. alle Stimulationszeiten hintereinander in ansteigender Anordnung) mit 1 Hz zyklisch um 5 % gedehnt. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte von jeweils 6 Proben \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Abweichungen (mit $p < 0,05$) von den Kontrollwerten sind mit * gekennzeichnet.

im „Training“ Stimulationszyklen mit permanent steigender Dauer unterzogen.

Bei den auf Matristypt[®] stimulierten MG-63-Zellen wurden wie bei den obigen Versuchen mit adMSCs die Viabilität, die Genexpression spezifischer Knochenmarker und Kollagen III und die Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase im Vergleich mit den statischen Kontrollen untersucht. Zusätzlich wurde das Vorhandensein von Alkalischer Phosphatase und *Cbfa-1/Runx2* auf Proteinebene immunhistologisch untersucht und die Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch die Zellen durch Färbungen mit Alizarinrot und nach von Kossa überprüft.

Die Viabilität der MG-63 zeigte sich deutlich von der zyklischen mechanischen Dehnung beeinflussbar. Kurzzeitige Stimulation von 15 Minuten führte zunächst zu einer erhöhten Viabilität im Vergleich zu den statischen Kontrollen (Abbildung 4.25 links). Nach wiederholter 15-minütiger Stimulation war dieser Effekt jedoch schon wieder abgeklungen und die Viabilität von stimulierten Zellen war im Bereich der Zellen der Kontrollproben. Bei längerer Stimulation war die Viabilität der gedehnten Zellen deutlich geringer als die der Kontrollen und erst bei Langzeitstimulationen von dreimal vier bzw. acht Stunden oder der ansteigenden Stimulationsdauer war die Viabilität der stimulierten Zellen wieder im Bereich der Kontrollzellviabilität. Während die Viabilität von adMSCs durch die mechanische Stimulation kaum beeinflusst worden war, zeigten die MG-63-Zellen deutliche Viabilitätsunterschiede in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer. Wahrscheinlich steht diese Beobachtung in Zusammenhang mit den stark unterschiedlichen Teilungsraten der Zellen. MG-63 weisen eine Verdopplungs-

zeit von etwa 24 Stunden auf, die adMSCs hingegen von mehreren Tagen. Eine Änderung der Proliferationsrate ist daher für adMSCs innerhalb des Versuchszeitraums kaum messbar, da die Zellzahl kaum ansteigt. In den MTT-Test der adMSCs geht daher hauptsächlich die Stoffwechselaktivität der Zellen und ihre Sterberate ein. Die MG-63 hingegen teilen sich so schnell, dass zu Versuchsende in der Regel deutlich mehr Zellen vorhanden sind als zu Beginn. Dadurch fließen in den MTT-Test bei zunehmender Versuchsdauer neben der Stoffwechselaktivität und dem Zelltod vor allem die Proliferationsrate und ihre Änderungen ein. Auf die mechanische Stimulation reagierten MG-63 kurzzeitig mit einer Erhöhung der Proliferation / Viabilität. Dieser vorübergehende Effekt basiert wahrscheinlich auf der besseren Versorgung der Zellen, da die Bewegung des Mediums für eine bessere Durchmischung sorgt. Gradienten, die bei alleiniger Diffusion der Nähr- und Abfallstoffe entstehen, werden dabei abgebaut. Bei längerer zyklischer Dehnung hingegen sanken die Werte gegenüber den statischen Kontrollen deutlich ab. Vermutlich wurde in dieser Phase die Proliferation verlangsamt, um zunächst durch Synthese entsprechender Proteine die extrazelluläre Matrix und die Zellen selbst (Zytoskelett) zu stabilisieren. Erst nach ausreichender Anpassung an die mechanisch aktive Umgebung wurde dann die Proliferation wieder erhöht und die Werte des MTT-Tests stiegen wieder auf das Niveau der Zellen der Kontrollproben an. Bei der Versuchsreihe mit langsam ansteigender Stimulationsdauer liefen diese Prozesse offensichtlich schneller ab als bei einer einfachen Wiederholung einer längeren Stimulation. Die Viabilität / Proliferation war bei dem Versuch mit ansteigender Stimulationsdauer, der sich über knapp 30 Stunden erstreckt, bereits leicht über dem Wert der statischen Kontrollen, während nach dreimal vier Stunden Stimulation (Versuchszeitraum 38 Stunden) bzw. dreimal acht Stunden (Versuchszeitraum 56 Stunden) der Wert der Zellen der Kontrollproben nur knapp erreicht wurde. (Bei dem Vergleich zwischen dreimal stimulierten Zellen und Kontrollen bei vierstündiger Stimulationszeit war die um zwölf Stunden längere Kultivierung der stimulierten Zellen zu berücksichtigen.)

Die Analyse der Genexpression spezifischer Knochenmarker ergab auch bei den MG-63-Zellen spezifische Veränderungen durch unterschiedliche Stimulationsmuster (Abbildungen 4.26 und 4.27). Nach einmalig 15-minütiger Stimulation wurden nur geringe Effekte beobachtet. Die Expressionsraten von Kollagen I und Osteopontin waren gegenüber den statischen Kontrollen deutlich und die von Osteocalcin und der Alkalischen Phosphatase leicht erhöht. Nach dreimal 15 Minuten Stimulation war die Genexpression der untersuchten Knochenmarker im Bereich der Kontrollwerte. Osteopontin war leicht geringer exprimiert und die Alkalische Phosphatase höher als in den Zellen der Kontrollproben.

Im 60-Minuten-Experiment zeigten Kollagen I, Osteocalcin und Osteopontin in den stimulierten Zellen niedrigere Expressionsraten als in den Zellen der Kontrollproben, wobei die Expression nach einmaliger Stimulation am niedrigsten war. Im Fall der Alkalischen Phosphatase hingegen zeigten die Werte einen genau umgekehrten Trend mit der höchsten Expressionsra-

te in den einmalig stimulierten Zellen und der niedrigsten in den Zellen der Kontrollproben. BMP-4 war in den Zellen der Kontrollproben und in den einmalig stimulierten Zellen ähnlich stark exprimiert, nach dreimaliger Stimulation jedoch geringer.

Bei der Versuchsreihe mit zweistündiger Stimulationszeit war die Expression der meisten untersuchten Knochenmarker in den dreimalig stimulierten Zellen am höchsten: bei Kollagen I, Osteocalcin, Osteopontin, Alkalischer Phosphatase und bei BMP-4. Nur BMP-2 war in den einmalig stimulierten Zellen leicht stärker als in den wiederholt stimulierten Zellen exprimiert und in den statischen Kontrollen deutlich höher als in den stimulierten Zellen. Bei Kollagen I und Osteocalcin waren die Expressionsraten in den einmalig stimulierten Zellen gegenüber den Kontrollen verringert, bei Osteopontin und der Alkalischen Phosphatase lagen sie im gleichen Bereich und bei BMP-2 waren sie erhöht.

Beim Experiment mit vierstündiger Stimulation waren die Effekte weniger ausgeprägt als bei dem zwei-Stunden-Experiment. Für alle untersuchten Gene war die Expression in den einmalig stimulierten Zellen am höchsten. Kollagen I, Osteopontin und BMP-4 waren in den Zellen der Kontrollproben am geringsten exprimiert, während die Expressionsrate von Osteocalcin in den wiederholt stimulierten Zellen gleich hoch war wie in den Zellen der Kontrollproben und die von Alkalischer Phosphatase in den dreimalig stimulierten Zellen gegenüber den Kontrollen leicht verringert.

Eine einmalig achtstündige Stimulation wirkte sich gegenüber den Kontrollen verringerten Expressionsraten von Kollagen I und BMP-4 aus. Die Expression von Osteocalcin wurde nicht beeinflusst, die von Osteopontin erhöht. Dreimalig achtstündige zyklische Dehnung wirkte sich nicht auf die Expression von Kollagen I, Osteocalcin und BMP-4 aus. Osteopontin und Alkalische Phosphatase wurden nach der wiederholten Langzeitstimulation verstärkt exprimiert.

Bei der Versuchsreihe mit langsam ansteigender Stimulationsdauer zeigte die Genexpression aller untersuchten Knochenmarker keine Beeinflussung durch die zyklische Dehnung. Die Expressionsraten lagen in den stimulierten Zellen im gleichen Bereich wie in den Zellen der Kontrollproben.

Wie bei den mesenchymalen Stammzellen wurde durch die PCR der Phänotyp der Zellen als Knochenzellen untermauert. Der Nachweis von späten Knochenmarkern, vor allem Osteocalcin wies darauf hin, dass die Zellen bei Versuchsende bereits die Mineralisierungsphase der Differenzierung begonnen hatten. Die Modellzelllinie im dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk reagierte allerdings in Bezug auf die Expression von Knochenmarkern grundlegend anders als die adMSCs auf der planaren Silikonoberfläche. Die Genexpression der untersuchten Knochenmarker zeigte einen Trend dahingehend, dass durch mechanische Stimulation zunächst eine kurzzeitige Hochregulation ausgelöst wurde, die dann aber über einen längeren Zeitraum in eine verringerte Expressionsrate umschlug. Erst ab dreimalig zweistündiger Stimulation

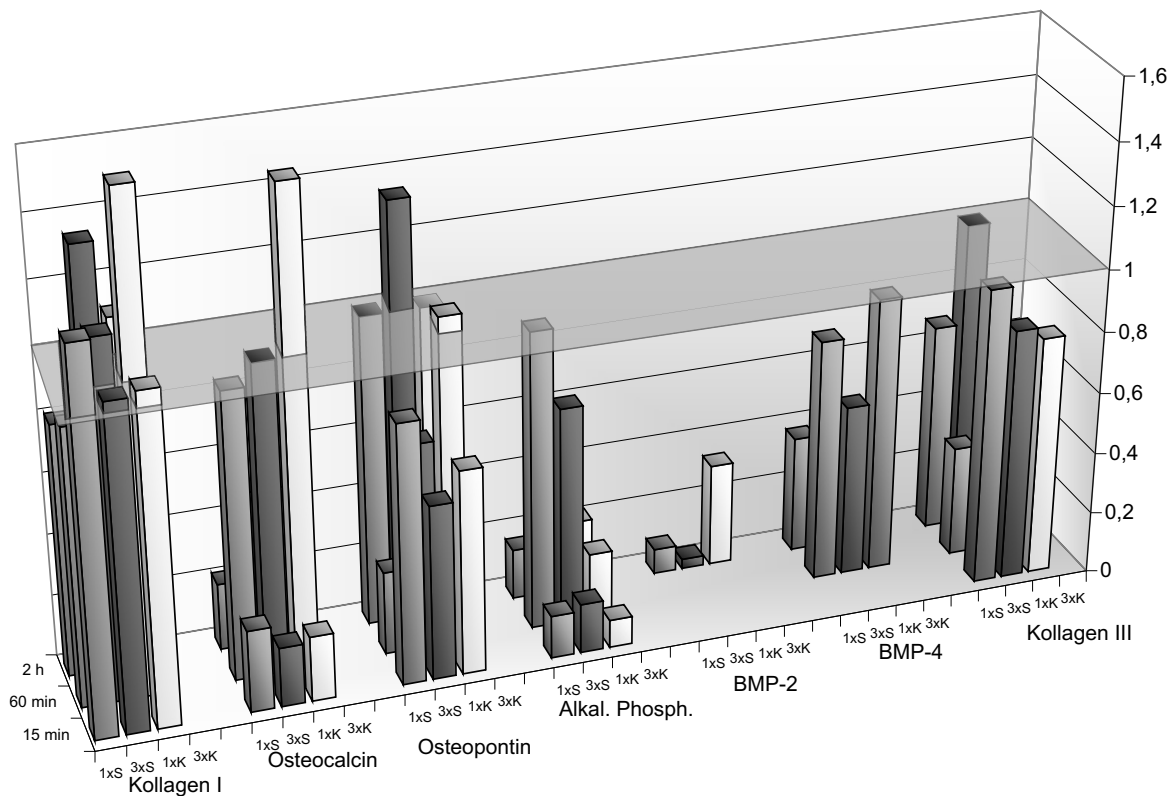


Abbildung 4.26.: Expressionsraten (RT-PCR) typischer Knochenmarker und Kollagen III in zyklisch gedehnten MG-63. Silikonschalen mit Boden aus Matristypt® und darin adhären MG-63 wurden einmal (1xS) oder dreimal (3xS) für die angegebene Zeit (15 min, 60 min, 2 h) mit 1 Hz zyklisch um 5 % gedehnt. Die Daten sind angegeben als experimentelle Mittelwerte aus jeweils 6 Proben, bezogen auf die Expression von GAPDH.

erreichte die Expression der Knochenmarker wieder die Kontrollwerte und war dann sogar gegenüber diesen deutlich erhöht (dreimal 2 Stunden und einmal 4 Stunden). Noch längere Stimulation führte dann dazu, dass sich die Genexpression wieder auf die Werte der statischen Kontrollen einpendelte (dreimal 8 Stunden und ansteigende Stimulationsdauer). Ähnliche zeitliche Abläufe hatte auch der MTT-Test ergeben, der zeigte, dass die Viabilität sich kurzzeitig erhöhte, dann unter das Kontrollniveau sank und erst bei langzeitiger Stimulation wieder das Niveau der Kontrollen erreichte. Die Versuche mit mesenchymalen Stammzellen auf der planaren Silikonoberfläche hatten konträre Ergebnisse erbracht. Die Genexpression der Knochenmarker war nach mittellanger Stimulation von ein bis zwei Stunden hochreguliert worden und bei längerer Stimulation wieder auf das Niveau der statischen Kontrollen gesunken. Im Kollagen-Netzwerk wurden die Knochenmarker der MG-63-Zellen jedoch im selben Zeitraum entgegengesetzt reguliert und waren schwächer exprimiert als in den Zellen der Kontrollproben. Erst längere Stimulationszeiten von vier Stunden resultierten in einer

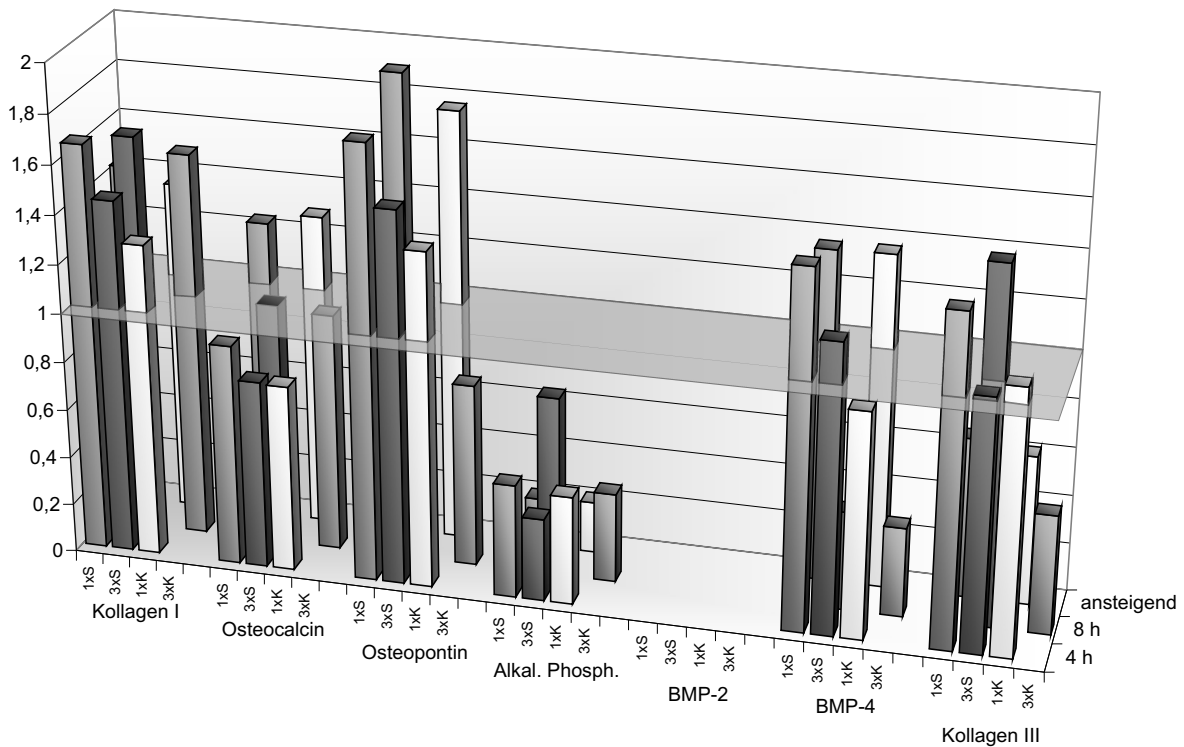


Abbildung 4.27.: Expressionsraten (RT-PCR) typischer Knochenmarker und Kollagen III in zyklisch gedehnten MG-63. Silikonschalen mit Boden aus Matristypt® und darin adhären MG-63 wurden einmal (1xS) oder dreimal (3xS) für die angegebene Zeit (4 h, 8 h bzw. alle Stimulationszeiten hintereinander in ansteigender Anordnung) mit 1 Hz zyklisch um 5% gedehnt. Die Daten sind angegeben als experimentelle Mittelwerte aus jeweils 6 Proben, bezogen auf die Expression von GAPDH.

erhöhten Genexpression der Knochenmarker. Dieser Erhöhung schloss sich dann wie bei den adMSCs auf Silikon eine Anpassung an die aktive Umgebung an und die Knochenmarkerexpression glich sich den Zellen der Kontrollproben an. Die beiden Versuchsreihen unterschieden sich grundsätzlich in zwei Dingen. Einerseits wurden verschiedene Zellen untersucht (primäre mesenchymale Stammzellen und eine Modellzelllinie), die unterschiedliche Proliferationsraten, Phänotyp und Genotyp aufwiesen. Andererseits wurde auf grundsätzlich verschiedenen Gerüstsubstanzen (planares Silikon – dreidimensionales Kollagen-Netzwerk) kultiviert. Zellart und Gerüstsubstanz hatten beide einen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse der Analysen. Im Kollagen-Netzwerk führten nur sehr kurze oder aber längere zyklische Dehnung zu erhöhten Genexpressionsraten von Knochenmarkern, während Stimulationszeiten mittlerer Länge verminderte Expressionsraten bewirkten. Diese Reaktion der Zellen könnte direkt auf das Kollagen-Netzwerk, an dem die Zellen verankert waren, zurückzuführen sein. Im Gegensatz zu den Zellen auf Silikon, die eine nur vergleichbar dünne Schicht extrazellulärer Matrix um

sich herum aufgebaut hatten und diese bei mechanischer Stimulation stabilisierten, befanden sich die MG-63-Zellen bereits in einem stabilen Netzwerk aus Kollagen, auf das sie während der einwöchigen Kultivierung vor der Stimulation ihre eigene Matrix aufgelagert hatten. Bei diesem Vergleich erscheint es plausibel, dass die Zellen erst bei länger anhaltender Stimulation mit vermehrter Matrixbildung reagieren (Trainingseffekt). Zuvor mussten sich die Zellen offensichtlich zunächst auf die herrschenden Bedingungen einstellen und hielten in ihrer bisherigen Matrixbildungstätigkeit inne, um die Matrix dann gezielt an die mechanischen Bedingungen anzupassen.

Ein weiterer Aspekt ist, dass die Dehnung des Kollagen-Netzwerkes nicht zu vergleichen ist mit der Dehnung der planaren Silikonoberfläche. In einem Netzwerk werden nur diejenigen Fasern, die parallel zur Dehnungsachse ausgerichtet sind, vollständig gedehnt. Die Dehnungskräfte, die auf die Zellen im Kollagen-Netzwerk wirken, sind deutlich komplexer als auf der planaren Silikonoberfläche.

Eine anhaltende Erhöhung der Expression von Knochenmarkern war nicht zu erwarten, weil die Expression aller Knochenmarker transient ist. Eine kurzzeitige Erhöhung der Knochenmarkerexpression hingegen ist ein Zeichen dafür, dass die osteogene Differenzierung beschleunigt wurde, was in der Regel von Dauer ist, auch wenn die Genexpression wieder rückläufig ist. Die verstärkte Expression der Knochenmarker nach 15-minütiger Stimulation wies daher auf eine beschleunigte Differenzierung der Zellen hin. Die im Folgenden rückläufigen Genexpressionsraten deuteten nicht etwa eine Dedifferenzierung an, die Zellen verringerten nur ihre Matrixsyntheseaktivität. Für die erneute Erhöhung der Genexpression nach vier Stunden Stimulation sind entweder Zellen, die sich bisher nicht differenziert haben, verantwortlich oder bereits in ihrer Differenzierung fortgeschrittene Zellen, die erneut Knochenmatrix synthetisieren. Die Nachhaltigkeit der stimulationsbedingten Effekte kann anhand der Genexpressionsrate nur vermutet werden. Die Verminderung der Expressionsraten bei längerer Stimulation deuteten eine Anpassung der Zellen an. Analysen auf Proteinebene, die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und der Grad ihrer Calcifizierung gaben weiteren Aufschluss (s. u.).

Die Expression von Kollagen III wurde von der mechanischen Stimulation ähnlich beeinflusst wie die der Knochenmarker. Auf einmalige Stimulation reagierten die Zellen in dem Kollagen-Netzwerk mit einer erhöhten Expression von Kollagen III gegenüber den statischen Kontrollen, was auf eine Schädigung von Zellen und Matrix hindeutete. Die Ausnahme war die zweistündige Stimulation, bei der die Kollagen-III-Expression das gleiche Niveau erreichte wie in den Zellen der Kontrollproben, und die achtstündige Stimulation, bei der Kollagen III nicht nachweisbar war. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die Zellen sich während einer zweistündigen Stimulation auf die Umgebungsaktivität einstellten. Nach vierstündiger Stimulation war die Expressionsrate wieder leicht höher als in den Kontrollen, die Zellen mussten also erneut nachbessern, um der zyklischen Dehnung standzuhalten. Nach acht Stunden zyklischer

Dehnung war die Kollagen-III-Expression dann offenbar vollständig zurückgegangen. Die Wiederholung der Stimulation hatte, abhängig von der Stimulationsdauer, unterschiedliche Effekte auf die Kollagen-III-Expression der Zellen. Die wiederholte kurzzeitige Stimulation führte zu einer Verminderung der anfänglich erhöhten Expressionsrate. Bei Kurzzeitstimulation war also eine Wiederholung ausreichend, um eine Anpassung der Zellen zu erreichen. Dieser Effekt wurde auch bei den Knochenmarkern beobachtet, die bei einmaliger Stimulation verstärkt exprimiert wurden, nach dreimaliger Stimulation aber wieder das Kontrollniveau erreicht hatten. Bei einer Stimulationsdauer von 60 Minuten hingegen zeigte sich ein anderes Bild. Hier verstärkte die Wiederholung die schon nach einmaliger Stimulation erhöhte Expression von Kollagen III. Eine zweimalige Wiederholung der Stimulation war hier nicht ausreichend, um eine Anpassung der Zellen an die Stimulation zu erreichen. Während der zweistündigen Stimulationsdauer hatten die Zellen dann offenbar ausreichend Zeit, sich an die Bedingungen anzupassen, was sich in einer Kollagen-III-Expressionsrate im Bereich der statischen Kontrollen zeigte. Auch die Knochenmarker waren gegenüber den Kontrollen nicht mehr so deutlich vermindert exprimiert. Die Wiederholung der zweistündigen Stimulation führte dann erneut zu einer Verstärkung der Expression von Kollagen III und der Knochenmarker. Hatten sich nach zweistündiger Stimulation die Expressionsraten von Kollagen III und der Knochenmarker weitgehend stabilisiert, so lösten weitere zwei Stunden Stimulation erneut die Erhöhung der Expressionsraten aus, wie es schon bei der kurzzeitigen Stimulation von 15 Minuten der Fall gewesen war. Auch hier wirkte sich dann eine Wiederholung in einem Rückgang der Expression auf das Kontrollniveau aus. Wurde die Stimulationsdauer noch einmal verlängert, so zeigten die Zellen (nach achtstündiger Stimulation) weitgehend ausgeglichene Expressionsraten beim Vergleich zwischen stimulierten Zellen und Kontrollen. Bei einer wiederholten Langzeitstimulation hingegen wurde eine stark erhöhte Kollagen-III-Expression beobachtet, während die Knochenmarkerexpression weitgehend im Bereich der statischen Kontrollen lag. Diese verstärkte Expression von Kollagen III deutete an, dass die wiederholte Langzeitstimulation ein Übermaß an mechanischer Aktivität bedeutete. Der MTT-Test hatte gezeigt, dass die angedeutete Schädigung allerdings nicht so stark war, dass eine stark verminderte Zellviabilität gemessen worden wäre. Die Expression von Kollagen III und der Knochenmarker wurde in der Versuchsreihe mit kontinuierlich steigender Stimulationsdauer nach Abschluss aller Stimulationsperioden nicht beeinflusst. Hier hatten sich die Zellen offensichtlich sehr gut an die mechanische Stimulation angepasst.

Die Untersuchung der Genexpression von Kollagen III und einiger typischer Knochenmarker zeigte, dass MG-63-Zellen im Kollagen-Netzwerk in mehrstufigen, komplexen Prozessen auf eine mechanische Stimulation reagierten. Die Expression von Knochenmarkern und Kollagen III (interpretierbar als Induktion von Reparaturmechanismen) wurde sporadisch induziert und wieder vermindert, bis eine optimale Anpassung an die mechanische Aktivität erreicht war.

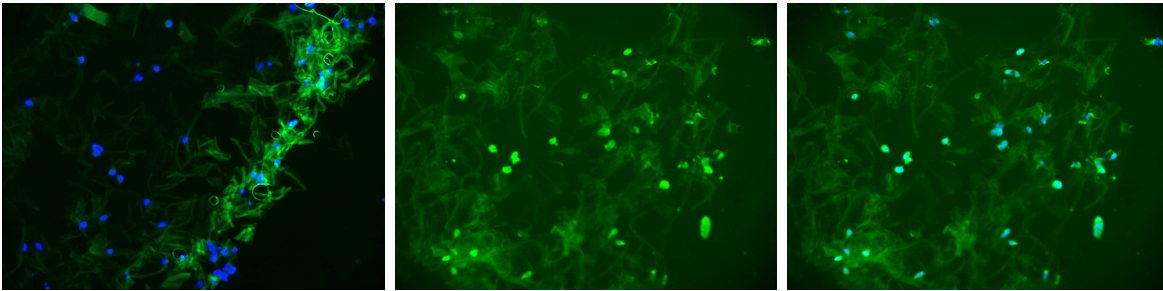


Abbildung 4.28.: Immunhistochemischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase in mechanisch stimulierten MG-63-Zellen im Kollagen-Netzwerk. Alkalische Phosphatase (AP) wird durch grüne Fluoreszenz angezeigt. Die Zellkerne fluoreszieren durch die Färbung mit DAPI blau. Das Kollagen-Netzwerk selbst zeigt eine schwache grüne Hintergrundfluoreszenz. **Links:** statische Kontrollen des 2h-Experiments, Überlagerung der AP-Färbung und der DAPI-Färbung. **Mitte** und **rechts:** Kontrolle des 4h-Experiments, AP-Färbung (**links**) und Überlagerung mit DAPI-Färbung (**rechts**).

Um eine solche Anpassung der Zellen zu erreichen, war eine Verlängerung der Stimulationszeit teilweise erfolgreich, während eine Wiederholung von langzeitiger Stimulation sogar eher nachteilige Effekte zeigte. Als optimal stellte sich für die Anpassung der Zellen eine kontinuierliche Steigerung der Stimulationsdauer heraus.

Auf Proteinebene wurde, wie auch bei den mesenchymalen Stammzellen auf Silikon, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen. Auf Genexpressionsebene war die Alkalische Phosphatase im 60-Minuten-Experiment gegenüber den Kontrollen erhöht, in allen anderen Versuchen aber eher im gleichen Bereich wie bei den Zellen der Kontrollproben. Im Aktivitätstest wurde hingegen nur anfänglich (im 15-Minuten-Experiment) eine erhöhte Aktivität gemessen (Abbildung 4.25, rechts). Nach ein- und zweistündiger Stimulation lag die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei niedrigeren Werten oder im Bereich der statischen Kontrollen. Nur nach dreimalig vier oder acht Stunden Stimulation war die Enzymaktivität erhöht. In der Versuchsreihe mit kontinuierlich ansteigender Stimulationsdauer war die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in stimulierten und Zellen der Kontrollproben gleich. Auf Proteinebene zeigten sich also im Vergleich zur Genexpression leicht abweichende Ergebnisse. Natürlich kann die Proteinbiosynthese auch nach der Genexpression noch reguliert sein, wodurch die Genprodukte nicht zu einem gereiften Protein umgesetzt werden. Andererseits bestand bei dem Aktivitätstest die zusätzliche Schwierigkeit, dass der von dem Enzym gebildete Farbstoff nicht komplett aus dem Kollagen-Netzwerk gelöst werden konnte und daher im Vergleich zu dem Test mit mesenchymalen Stammzellen von der Silikonoberfläche eine zusätzliche Fehlerquelle bestand.

Zur Absicherung wurde die Alkalische Phosphatase immunhistochemisch nachgewiesen. Dazu wurden von jeder Versuchsreihe Gefrierschnitte hergestellt, in denen die Alkalische Phosphatase nachgewiesen wurde, indem zunächst ein primärer Antikörper gegen Alkalische Phosphatase und dann ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen den Primärantikörper gebunden wurden. Gleichzeitig wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt (Durchführung s. Anhang C.2, Seite 162). Mit dieser Methode wurde Alkalische Phosphatase in den meisten Proben nachgewiesen (Abbildung 4.28, Tabelle 4.7). Der Nachweis von Alkalischer Phosphatase war positiv für die stimulierten Zellen des 15-Minuten-Versuches, für die Kontrolle und die einmalig stimulierten Zellen des 60-Minuten-Versuches, für dreimal stimulierte Zellen und Kontrollen des 2-Stunden-Versuches, für einmalig stimulierte Zellen und Kontrollen des 4-Stunden-Versuches, für die Kontrollen des 8-Stunden-Versuchs und für stimulierte Zellen und die der Kontrollproben bei der kontinuierlich ansteigenden Stimulationsdauer. Der immunhistochemische Nachweis der Alkalischen Phosphatase in den einzelnen Proben vermittelte in Verbindung mit der quantitativen Aussage des Aktivitätstests einen Eindruck von den Effekten der Stimulation auf die Alkalische Phosphatase. Bei gleichzeitiger Betrachtung der immunhistochemischen Ergebnisse und des Aktivitätstests zeigte sich, dass nach kurzzeitiger Stimulation von einmalig und wiederholt 15 Minuten der Alkalische-Phosphatase-Spiegel gegenüber den Zellen der Kontrollproben erhöht war. Längere Stimulationszeiten führten zu einer verringerten Synthese und die kontinuierlich ansteigende Stimulationsdauer führte zu gleichen Werten in den Zellen der Versuche und der Kontrollen. Obwohl die Daten aus PCR, Aktivitätstest und Immunhistochemie nicht völlig übereinstimmen, war eine gemeinsame Tendenz dahingehend erkennbar, dass kurzzeitige Stimulation zunächst zu einer vermehrten Expression und Synthese von Alkalischer Phosphatase führte. Bei längerer Stimulation war diese Erhöhung dann wieder rückläufig. Die kontinuierlich steigende Stimulation führte bei allen Analysen (Viabilität, Knochenmarker, Kollagen III) zu vergleichbaren Werten in stimulierten Zellen und Kontrollen.

Der Status der osteogenen Differenzierung der MG-63-Zellen nach den Stimulationsversuchen war anhand der untersuchten Knochenmarker abschätzbar. Während frühe Knochenmarker (besonders *Cbfa-1/Runx2*) weder in der PCR noch immunhistochemisch nachweisbar waren

Tabelle 4.7.: Immunhistologischer Nachweis von Alkalischer Phosphatase in MG-63 im Kollagen-Netzwerk, die mit dem angegebenen Zeitmuster stimuliert worden waren. + positive, – negative Nachweisreaktion.

15 min			60 min			2 h			4 h			8 h				ansteigd.	
1xS	3xS	K	1xS	3xS	K	1xS	3xS	K	1xS	3xS	K	1xS	3xS	1xK	3xK	1xS	K
+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+

Einfluss auf die Expression von Knochenmarkern in Knochenvorläuferzellen. Mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe reagierten schon auf kurzzeitige Stimulation mit einer verstärkten Expression von Knochenmarkern. Auf Proteinebene führte erst längere bzw. wiederholte Stimulation zu einer erhöhten Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Auch die Modellzelllinie MG-63 im dreidimensionalen Kollagen-Netzwerk reagierte sofort auf kurzzeitige Stimulation mit einer erhöhten Expression von Knochenmarkern. Längere Stimulationszeiten führten dann zu verringerten Expressionsraten, die bei noch längerer Stimulation erneut anstiegen und sich dann wieder dem Level der Kontrollen annäherten. Die Differenzierung erfolgte hier also in mehreren Schüben und die Zellen reagierten auf anhaltende mechanische Stimulation nicht kontinuierlich, sondern durch sporadische Regulierung.

Dass sich Zellen anhaltender bzw. wiederholter mechanischer Aktivität anpassen können, wurde anhand der Stärke der zellulären Reaktion auf kurzzeitige und längere bzw. wiederholte Stimulation abgeschätzt. Die nach kurzer Stimulation messbar angestiegenen Expressionsraten von Knochenmarkern wurden bei längerer Stimulation nicht aufrechterhalten. Eine Wiederholung der Stimulation führte nicht wieder zu einer ähnlich starken Reaktion. Zelluläre Reparaturmechanismen, zu denen die Synthese von Kollagen III zählt, aber zu einem gewissen Teil auch die Verstärkung der extrazellulären Matrix durch stabilisierende (knochenspezifische) Proteine, wurden hauptsächlich bei einmaliger Stimulation von relativ kurzer Dauer aktiviert. Längere und wiederholte Stimulationen führten zu einer verringerten Expression der zugehörigen Gene. Die vermehrte Kollagen-III-Expression bei wiederholter Langzeitstimulation deutete im Zusammenhang mit der leicht verringerten Zellviabilität auf ein Übermaß an Stress hin.

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung mechanischer Stimulation auf eine Population von Zellen untersucht. Im Fall der Zelllinie MG-63 handelte es sich um klonale Zellen und damit um eine weitgehend homogene Zellpopulation. Bei den mesenchymalen Stammzellen hingegen wurde mit einer Mischpopulation gearbeitet, die Zellen verschiedenen Phänotyps mit unterschiedlichem osteogenen Status und variierender Differenzierbarkeit enthielt. Die Effekte der Stimulation wurden nicht auf Einzelzellniveau untersucht, so dass die beobachteten Veränderungen der Viabilität und Genexpression grundsätzlich auf zwei Mechanismen beruhen kann. Der nach der Stimulation fortgeschrittenere Differenzierungszustand der gesamten Zellpopulation wurde entweder erreicht, indem die einzelnen Zellen differenzierten, oder aber indem der fortgeschrittenere Zelltypus selektiv angereichert wurde. Diese Fragestellung wird auch in der Literatur weitgehend vernachlässigt. Besonders vor dem Hintergrund des *Tissue Engineering* ist nicht der zugrunde liegende Mechanismus ausschlaggebend, sondern einzig das Ergebnis des fortgeschrittenen Differenzierungszustandes. Für die Grundlagenforschung zu den Mechanismen der osteogenen Differenzierung werden jedoch Studien an klonalen Zellen oder sogar auf Einzelzellniveau durchgeführt.

In der Literatur ist vielfach beschrieben, welche Auswirkungen eine mechanische Stimulation auf Knochenvorläuferzellen haben kann. Häufig wurden erhöhte Proliferationsraten und eine erhöhte Expression knochenspezifischer Gene (Alkalische Phosphatase, Kollagen I, Osteocalcin, Osteopontin) und auch eine verstärkte Mineralisierung gemessen^{85,44}. Die beobachteten Ergebnisse einzelner Arbeitsgruppen sind jedoch stark davon abhängig, welche Zellen eingesetzt wurden und wie die mechanische Stimulation realisiert wurde. Bei der mechanischen Stimulation hat sich bis heute kein Standard durchgesetzt und es gibt mit Flexercell[®] von Gencompare nur ein System auf dem Markt, das über ein relativ breites Anwendungsspektrum verfügt. Folglich benutzt jede Arbeitsgruppe ein anderes, zumeist selbst entwickeltes System. Bei der zyklischen Dehnung variieren das Substrat, auf dem gedehnt wird, und grundlegende Stimulationsparameter wie Frequenz, Dehnung und zeitliches Muster der Dehnung.

Nur wenige Arbeitsgruppen befassen sich mit einer zyklischen mechanischen Dehnung humaner mesenchymaler Stammzellen für die Entwicklung eines funktionalen Knochenkonstruktes. Simmons *et al.* beobachteten bei humanen MSCs eine verminderte Proliferationsrate und eine verstärkte Mineralisierung nach einer biaxialen zyklischen Dehnung um drei Prozent mit einer Frequenz von 0,25 Hz¹⁶⁰. Ignatius *et al.* führten eine uniaxiale Stimulation von Knochenvorläuferzellen in einem Kollagen-Gel durch und beobachteten eine Erhöhung der Proliferationsrate und der Knochenmarkerexpression (*Cbfa-1/Runx2*, Alkalische Phosphatase, Osteopontin, Osteocalcin und Kollagen I)⁷⁷. Nach einer zwei- bzw. dreiwöchigen zyklischen Dehnung (0,2 %, 1 Hz) von MSCs beobachteten Wiesman *et al.* eine Erhöhung der Genexpression von Kollagen I und Osteonectin¹⁸⁴. Nach drei Wochen war außerdem die Mineralisierung gegenüber den statischen Kontrollen signifikant erhöht. In zwei Studien fand wie in der vorliegenden Arbeit eine Stimulation auf einem Substrat aus Kollagen I statt. Sumanasinghe *et al.* dehnten MSCs in einem dreidimensionalen Kollagen-I-Gerüst um zehn und zwölf Prozent mit einer Frequenz von 1 Hz für vier, sieben und vierzehn Tage jeweils vier Stunden pro Tag ohne den Zusatz osteogener Substanzen. Die Viabilität der Zellen wurde während des Versuchszeitraums aufrechterhalten, die Proliferationsraten waren jedoch leicht rückgängig¹⁶⁶. Nach zweiwöchiger Stimulation war die Expressionsrate von BMP-2 gegenüber den statischen Kontrollen erhöht. Ward *et al.* beobachteten bei einer Dehnung um 3–5 % eine Verstärkung der Osteogenese (erhöhte Expressionsraten osteogener Marker), während adipogene, chondrogene und neurogene Marker geringer exprimiert wurden⁴⁴. Außerdem stieg die Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch die mechanische Stimulation an. Friedl *et al.* berichteten von einer verstärkten Expression früher Knochen- und Knorpelmarker (*Cbfa-1/Runx2*, Osteonectin, Osteopontin, Alkalische Phosphatase, sowie SOX9, Lumican und Decorin) nach dreitägiger Stimulation undifferenzierter MSCs um 0,3 %⁶¹. Haasper *et al.* stimulierten MSCs in der von van Griensven entwickelten Stimulationsapparatur in Silikonschalen um zwei bzw. acht Prozent mit einer Frequenz von 1 Hz für drei Tage jeweils zwei Stunden pro Tag⁶⁷. Sie beobachteten eine verstärkte

Expression von FosB, einem Transkriptionsfaktor, der bei der Regulation der osteogenen Differenzierung eine Rolle spielt, sowie von *Cbfa-1/Runx2* und Kollagen I.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur zyklischen Dehnung humaner mesenchymaler Stammzellen komplettieren die Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen. Anhand der Literaturstellen kann der Einfluss unterschiedlicher Stimulationsmuster auf mesenchymale Stammzellen nur abgeschätzt werden. Die einzelnen Versuchsparameter und auch die jeweiligen Zellen weichen so stark voneinander ab, dass die Ergebnisse nicht zu verallgemeinern sind. In der vorliegenden Arbeit wurden einzelne zeitliche Stimulationsmuster appliziert und die zellulären Reaktionen humaner mesenchymaler Stammzellen untersucht. Wie bei Sumansinghe *et al.* blieben die Zellen auch bei längerer Stimulation viabel. Für die Expressionsraten von Knochenmarkern hat sich gezeigt, dass tatsächlich, wie auch in der Literatur beschrieben, durch mechanische Stimulation eine verstärkte Expression und damit eine Steigerung der osteogenen Differenzierung erreicht werden kann. Verlängerung und Wiederholung der Stimulation führte zu einer Anpassung der Zellen an die mechanisch aktive Umgebung. Dafür stellte sich das zeitliche Muster mit kontinuierlich länger werdender Stimulation als besonders geeignet heraus.

Die mechanische Stimulation kann mit zwei unterschiedlichen Zielen angewandt werden, nämlich um Zellen an eine mechanisch aktive Umgebung zu gewöhnen und die mechanischen Eigenschaften künstlicher Gewebekonstrukte zu verstärken, oder aber um die Differenzierung von Stamm- und Progenitorzellen zu beeinflussen. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Differenzierung von Zellen schon durch kurzzeitige Stimulation angeregt werden kann. Nachhaltigere Effekte und insbesondere die Anpassung der Zellen wurden jedoch erst durch längere bzw. wiederholte Stimulation erreicht. Besonders hervorzuheben hat sich dabei ein zeitliches Stimulationsmuster, bei dem mit kurzzeitiger Stimulation begonnen und im Folgenden die Stimulationsdauer kontinuierlich gesteigert wurde. Wie auch bei der Genesung oder beim Training die körperliche Belastung langsam gesteigert wird, ist also offensichtlich auch auf zellulärer Ebene eine gesteigerte Belastung optimal.

Mit den durchgeführten Versuchen wurde das Potenzial von mechanischer Stimulation als Werkzeug im *Tissue Engineering* demonstriert. Bereits kurzzeitige Stimulation fördert die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen. Wiederholte und längere Stimulation führt dazu, dass sich die Zellen an eine aktive Umgebung anpassen. Dabei wird die extrazelluläre Matrix verstärkt, was die biologischen und physikalischen Eigenschaften eines Konstruktes entscheidend verbessern kann. Für das *Tissue Engineering* von Knochen kann die Applikation mechanischer Stimulation entscheidende Fortschritte bringen, indem die osteogene Differenzierung beschleunigt wird und die mechanischen Eigenschaften eines Gewebekonstruktes verbessert werden.



Abbildung 4.30.: Links: Sponceram®-Scheibe für die Bioreaktorkultivierung, Mitte: Sponceram®-Stückchen für Viabilitätstests, rechts: Mikrostruktur (Quelle: www.zellwerk.biz).

4.3. Kultivierung im Bioreaktor

Die grundlegende Strategie der Herstellung eines künstlichen Gewebes ist die Kultivierung geeigneter Zellen auf einem speziellen Gerüstmaterial. Die Wahl der Zellen und des Gerüsts ist dabei an das jeweilige Zielgewebe anzupassen. Im *Tissue Engineering* von Knochen sind die entscheidenden Ansprüche an das Gerüstmaterial Biokompatibilität und mechanische Stabilität. Damit Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sowie der Abtransport metabolischer Abfallstoffe auch im Inneren des Konstruktes gewährleistet sind, muss das Material porös sein. Osteokonduktion und Osteoinduktion sind förderliche Materialeigenschaften, die bei natürlichen Knochenmatrixbestandteilen wie Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat auftreten. In der Chirurgie kommen aber auch häufig inerte Metalle wie Titan zum Einsatz.

Sponceram® ist eine Keramik basierend auf dotiertem Zirkondioxid, die von der Zellwerk GmbH speziell für die Kultivierung adhärenter Zellen in einem Bioreaktorsystem entwickelt wurde. Zirkondioxid (auch Zirkonia) ist chemisch inert, mechanisch hart und äußerst stabil. Gegenüber anderen Keramiken weist Zirkondioxid deutlich bessere mechanische Eigenschaften auf und wurde daher schon früh als Biomaterial eingesetzt. *In-vitro*- und *In-vivo*-Tests haben gezeigt, dass Zirkondioxid biokompatibel ist und keine zytotoxischen Eigenschaften aufweist¹³⁵. Haupteinsatzgebiet von Zirkondioxid als Biomaterial sind künstliche Hüfttransplantate, aber auch als Material für Zahnimplantate wird es zunehmend verwendet. Die von der Zellwerk GmbH entwickelten Sponceram®-Zellträger sind stark porös mit Makro- und Mikroporen und werden mit unterschiedlichen Porengrößen (600 und 900 μm), sowie unterschiedlicher spezifischer Oberfläche (0,8–2,0 m^2/g) hergestellt. Zusätzlich können die Träger mit unterschiedlichen Beschichtungen, unter anderem auch Hydroxylapatit, versehen sein. In Abhängigkeit von der gewünschten Applikation werden Scheiben für die Anwendung in einem Bioreaktorsystem fabriziert oder auch verschiedene Implantatformteile hergestellt.

Für die Kultivierung von Knochenzellen auf Sponceram® als Trägermaterial wurde Spon-

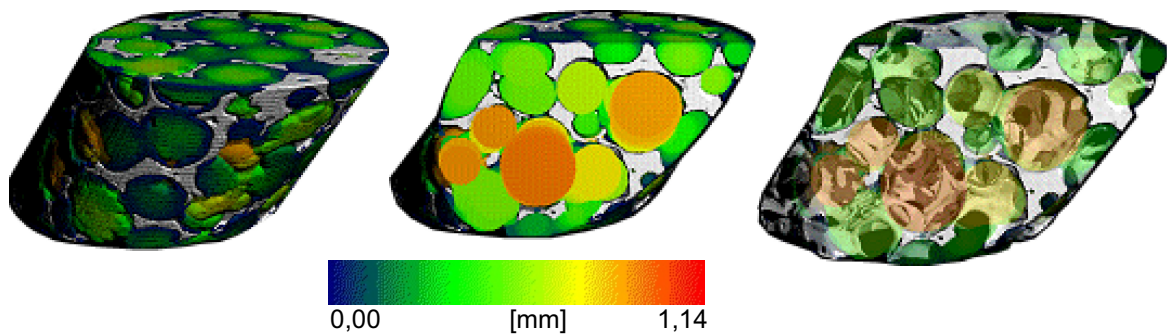


Abbildung 4.31.: Mikro-Computertomographie von Sponceram[®] 30-90, durchgeführt am Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie, Wien. Die Keramik ist grau dargestellt und die Poren durch Kugeln verschiedener Farbe simuliert. Die Farbcodierung von blau nach rot entspricht der Größe der simulierten Kugeln.

ceram[®] 30-90 mit einer Porengröße von $600\ \mu\text{m}$ (laut Hersteller) und einer spezifischen Oberfläche von $2,0\ \text{m}^2/\text{g}$ mit und ohne Hydroxylapatitbeschichtung eingesetzt. Die Mikro-Computertomographie-Aufnahmen, die am Ludwig Boltzmann Institut für experimentelle und klinische Traumatologie, Wien, unter der Leitung von Prof. Dr. Martijn van Griensven entstanden sind (Abbildung 4.31), vermitteln einen Eindruck von der offenporigen Struktur von Sponceram[®] 30-90, das eine gute Versorgung von Zellen gewährleisten kann. Etwa 80 % des Volumens von Sponceram[®] entfallen auf Poren (Herstellerangabe 85 %), die unterschiedliche Durchmesser von einigen Mikrometern bis zu knapp einem Millimeter aufweisen.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Sponceram[®] 30-90 (Abbildung 4.32) zeigen die oberflächlichen Makroporen (etwa $600\ \mu\text{m}$), die von untereinander verbundenen kleineren Poren unterbrochen sind. Eine starke Vergrößerung der Oberfläche zeigt eine Strukturierung der Oberfläche im Nanometerbereich. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von dem mit Hydroxylapatit beschichteten Material brachten stäbchenförmige Apatit-Ablagerungen zum Vorschein, die die Oberfläche in einer weitgehend gleichmäßigen Schicht von einigen Mikrometern Dicke bedecken.

4.3.1. Zellwachstum auf Sponceram

Bevor Sponceram[®] als Trägersubstanz für eine Bioreaktorkultivierung eingesetzt werden konnte, wurde das Wachstum der zu verwendenden Zellen auf Sponceram[®] untersucht. Dazu wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe (adMSCs) und Zellen der Linie MG-63 zunächst auf kleinen Stückchen (Durchmesser etwa 3 mm, bzw. 15–20 mg) Sponceram[®] und mit Hydroxylapatit beschichtetem Sponceram[®] (Sponceram[®]-HA) kultiviert. Die Zellviabilität wurde im Verlauf der Kultivierung zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem MTT-Test gemessen.

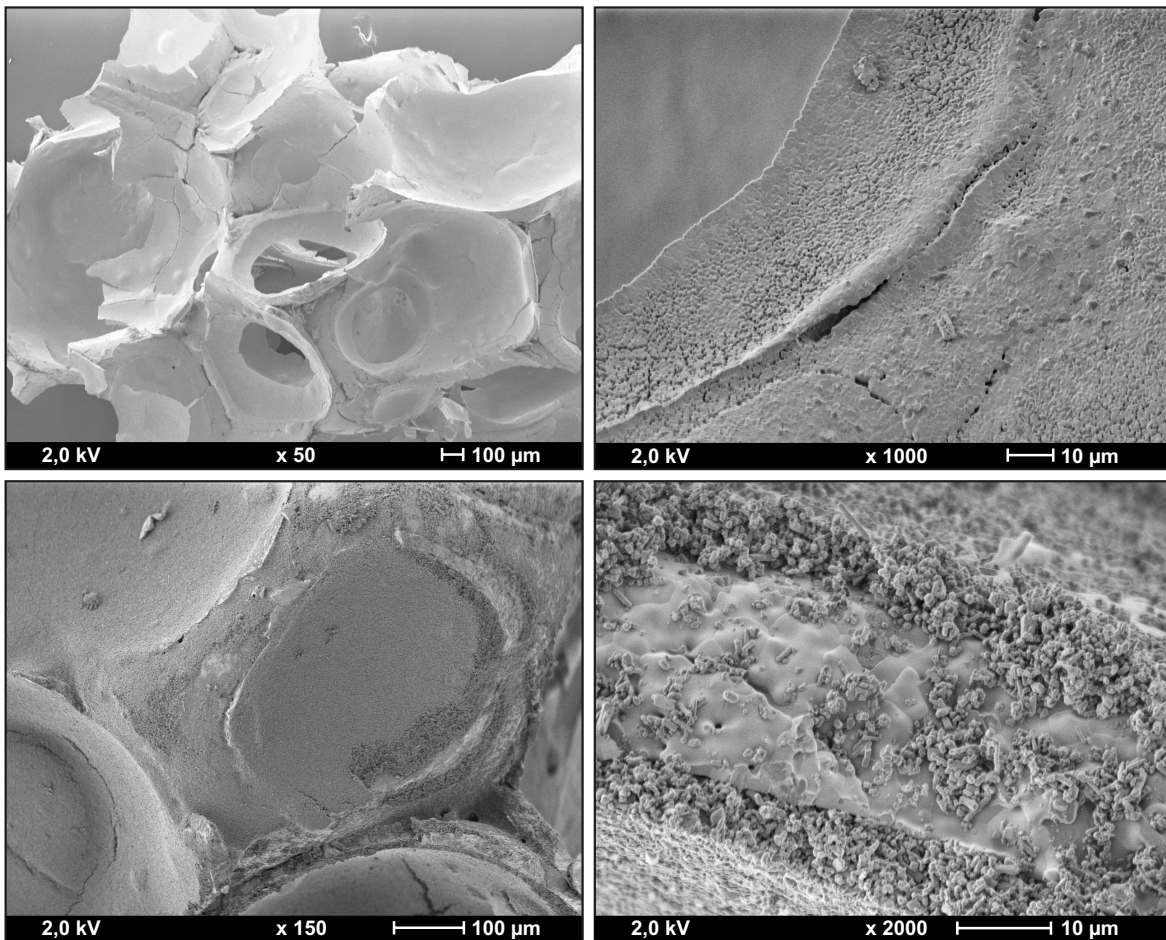


Abbildung 4.32.: Elektronenmikroskopie von Sponceram[®] 30-90 (**oben**) und mit Hydroxylapatit beschichtetem Sponceram[®] 30-90 (**unten**).

Sowohl adMSCs als auch MG-63 zeigten auf den Sponceram[®]-Stückchen ein gutes Wachstum, das weitgehend unabhängig von der Hydroxylapatitbeschichtung war (Abbildung 4.33). Die deutlich höheren absoluten Werte von MG-63 im MTT-Test waren auf die höhere Proliferationsrate dieser Zelllinie gegenüber den primären adMSCs zurückzuführen. Weitere Untersuchungen des Wachstums von MG-63 auf größeren Sponceram[®]-Scheiben zeigten, dass diese Zellen nicht fest genug adhärten, sondern sich durch geringe mechanische Beanspruchungen ablösten und als Zellcluster im Medium schwammen. Als Modellzelllinie für Untersuchungen auf Sponceram[®] war MG-63 daher nicht geeignet. Stattdessen wurde die Maus-Fibroblasten-Zelllinie MC3T3-E1 verwendet, deren Wachstum auf Sponceram[®] bereits ausführlich charakterisiert worden ist¹⁶⁴. MC3T3-E1-Zellen können ebenfalls leicht zu Knochenzellen differenziert werden.

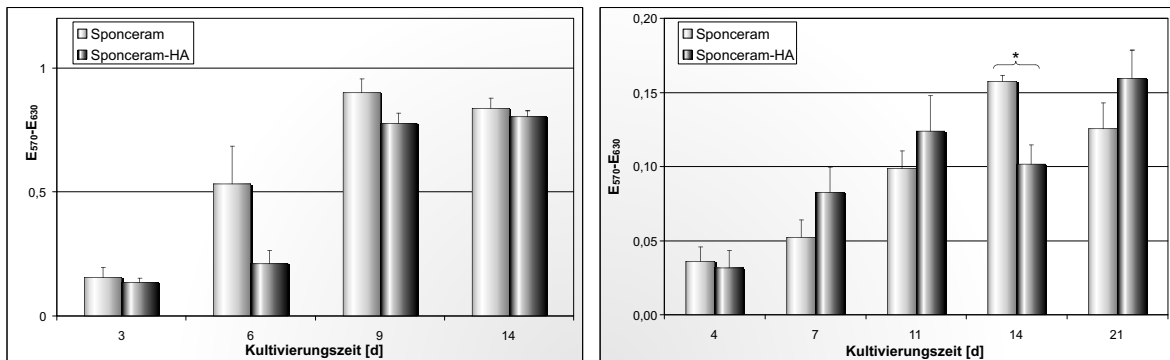


Abbildung 4.33.: Viabilität von MG-63 (**links**) und adMSCs (**rechts**) auf Sponceram[®] und Sponceram[®]-HA. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte von fünf Einzelexperimenten \pm Standardfehler. Signifikant unterschiedliche Ergebnisse ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

4.3.2. Funktionalisierung der Oberfläche von Sponceram

Das Trägermaterial muss in einem funktionalen Gewebekonstrukt nicht allein eine Gerüstfunktion übernehmen. Durch gezielte Modifikation von Gerüstsubstanzen können diese die Zelladhäsion aktiv verbessern und auch in zelluläre Mechanismen wie die Proliferation und Differenzierung eingreifen. Eine solche Funktionalisierung eines Trägermaterials kann durch die Bindung von bioaktiven Reagenzien erreicht werden. Adhäsions- und Wachstumsfaktoren können an die Gerüstsubstanz adsorptiv oder kovalent gebunden werden. Die Immobilisierung von Wachstumsfaktoren auf der Oberfläche eines Trägermaterials hat den Vorteil, dass auf eine dauerhafte Zugabe zum Kulturmedium verzichtet werden kann. Bioaktive Moleküle können auf der Oberfläche eines Implantates Signale an die Zellen auch nach der Implantation in den Körper übertragen und auf diese Weise Wachstum und Differenzierung der Zellen steuern. Die direkte Bindung bioaktiver Moleküle an die Oberfläche eines Trägermaterials führt oftmals zu einem Aktivitätsverlust der Moleküle, die so auf der Oberfläche angeordnet sind, dass ihre Rezeptorbindungsstelle verdeckt ist. Daher werden häufig „Abstandshalter“ (*Spacer*) eingesetzt, die selbst auf das Trägermaterial gebunden werden und an die wiederum das eigentliche bioaktive Molekül als Ligand gebunden wird. Um den nötigen Abstand von der Oberfläche zu gewährleisten, werden makromolekulare *Spacer* eingesetzt, in der Regel Polymere, die – wie auch das Gerüstmaterial selbst – biokompatibel und nicht immunogen sein müssen. Wasserlösliche Polymere haben den Vorteil, dass bei der Oberflächenmodifikation nicht auf organische Lösungsmittel zurückgegriffen werden muss, was die Biokompatibilität beeinträchtigen würde. Darüber hinaus sollten die Polymere nicht bzw. nur langsam oder reguliert bioabbaubar sein, um die bioaktiven Liganden über einen möglichst langen Zeitraum verfügbar zu halten.

Polyvinylsaccharide wurden bereits vielfach für ihren Einsatz in Gentherapien und als *drug delivery*-System erforscht. In der medizinischen und pharmazeutischen Industrie finden Poly-

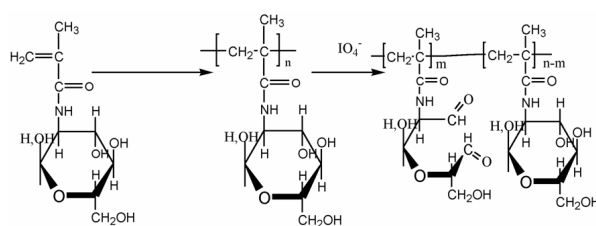


Abbildung 4.34.: Polymerisierung und Oxidation von N-Methacrylamidoglucose.

vinylsaccharide bereits breite Anwendung. Als *Spacer* sind Polymere mit Saccharidgruppen besonders interessant, weil sie auf der Gerüstoberfläche Strukturen bilden, die den Glykoproteinen auf der Zelloberfläche ähneln.

In dieser Arbeit wurden Polymere von N-Methacrylamidoglucose als *Spacer* eingesetzt, um verschiedene bioaktive Liganden auf der Oberfläche von Sponceram[®] zu immobilisieren. Poly-L-Lysin und ein RGD-Peptid wurden als bioaktive Liganden zur Verbesserung der Zelladhäsion an die Oberfläche gebracht. Poly-L-Lysin dient häufig als Beschichtung von Zelloberflächen und verbessert durch seine positiven Ladungen die erste Phase der Zelladhäsion (Bindung der Zellen an die Oberfläche). RGD steht für eine Sequenz aus drei Aminosäuren (Arginin–Glycin–Aspartat), die in vielen Molekülen der extrazellulären Matrix auftaucht und als Erkennungssequenz für die Bindung von Zellen durch Integrine dient. RGD-Sequenzen werden häufig verwendet, um die biochemischen Eigenschaften von Trägersubstanzen zu verbessern. Indem einem Material spezifische Eigenschaften von extrazellulärer Matrix – z. B. in Form eines RGD-Peptids – verliehen werden, können Verbesserungen der Biokompatibilität und der Integration des Materials in das Empfängergewebe erreicht werden. RGD-Peptide nehmen im Gegensatz zu Poly-L-Lysin nicht nur Einfluss auf die Bindung der Zellen an eine Oberfläche, sondern können auch die nächsten Phasen der Zelladhäsion – das Spreiten der Zellen, den Aufbau des Aktin-Zytoskeletts und die Ausbildung der Fokalkontaktpunkte – fördern⁹⁹. Um die osteogene Differenzierung zu steuern, wurde außer diesen Adhäsionsfaktoren auch BMP-2 immobilisiert, wodurch der Oberfläche eine osteoinduktive Wirkung verliehen werden sollte.

Für die Kopplung bioaktiver Liganden an das Polymer aus N-Methacrylamidoglucose (MAG) wurden in das Polymer Aldehydgruppen eingebracht, mit denen die Aminogruppen der Liganden zu Iminen (Schiff'sche Basen) reagieren können. Die C=N-Doppelbindung wurde in einer anschließenden Reduktion in die stabilere C–N-Einfachbindung konvertiert. Um Aldehydgruppen in die Polymere einzubringen, wurden zwei unterschiedliche Wege verfolgt. Zum einen wurde Poly-N-Methacrylamidoglucose mit Periodat oxidiert. Bei dieser Reaktion wird der Zuckerring unter Entstehung zweier Aldehydgruppen geöffnet (Abbildung 4.34). Alternativ zur Oxidation des Homopolymers wurde N-Methacrylamidoglucose mit Acrolein-Diethylacetal

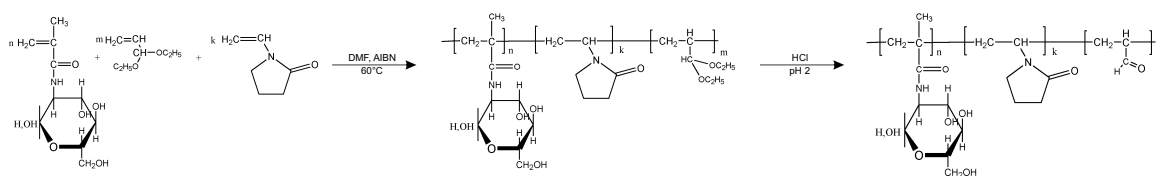


Abbildung 4.35.: Synthese und Abspaltung der Schutzgruppe von Poly(Methacrylamidoglucose-*co*-Vinylpyrrolidon-*co*-Acrolein). DMF: Dimethylformamid, AIBN: Azo-bis(isobutyronitril).

(DAAC) copolymerisiert. Die Acetalgruppe ist eine Schutzgruppe für das Aldehyd bei der Polymerisierung und wurde im Nachhinein wieder abgespalten. Es hat sich allerdings gezeigt, dass eine Copolymerisierung der beiden Monomere nicht zu dem gewünschten Produkt mit gleichmäßiger (statistischer) Verteilung der beiden Monomere führt. Vielmehr besteht das gebildete Polymer größtenteils aus N-Methacrylamidoglucose und weist nur geringe Spuren von Acrolein-Diethylacetal auf. Wird als drittes Monomer N-Vinylpyrrolidon eingeführt, entsteht ein ternäres Polymer, bei dem Methacrylat zwar immer noch den Hauptanteil ausmacht, in dem Acrolein aber ebenfalls erheblich vertreten ist (Abbildung 4.35). N-Vinylpyrrolidon findet wie N-Methacrylamidoglucose bereits breite Anwendung im pharmazeutischen und medizinischen Bereich.

Die Eignung der Polymere als *Spacer* für die Immobilisierung bioaktiver Liganden im *Tissue Engineering* von Knochen wurde in dieser Arbeit untersucht. Dafür wurde der Einfluss der einzelnen Komponenten des Polymers sowie der Konjugate (Kopplungsprodukte von Polymer und Ligand) und der vollständigen Kompositmaterialien (Konjugate adsorbiert an Sponceram[®]) auf die Viabilität von Zellen analysiert. Als Modellzelllinie wurden die Knochenvorläuferzellen MC3T3-E1 (Mausfibroblasten) eingesetzt. Diese Arbeiten entstanden im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit dem Institut für Makromolekulare Verbindungen der Russischen Wissenschaftsakademie in Sankt Petersburg (DFG Ka 1784 / 4-1), wo die Polymere synthetisiert wurden. Die ersten Kopplungsreaktionen bioaktiver Liganden an die Polymere und die Adsorption an Sponceram[®] wurden von Victor Korzhikov aus Sankt Petersburg während eines in seine Dissertation eingebundenen sechsmonatigen Gastaufenthalts am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Weitergeführt wurden diese Arbeiten von Stefanie Röker im Rahmen ihrer Doktorarbeit und Franziska Bode in ihrer Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie.

Zunächst wurde die Zytotoxizität der einzelnen Polymerbestandteile untersucht, indem die entsprechenden Polymere in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL und 0,7 mg/mL) dem Kulturmedium zugesetzt wurden. Die Entwicklung der Viabilität von MC3T3-E1-Zellen, kultiviert auf Zellkulturplastik, wurde über elf Tage beobachtet. Zum Einsatz kamen die folgenden Polymere: Polymethacrylamidoglucose im ursprünglichen Zustand

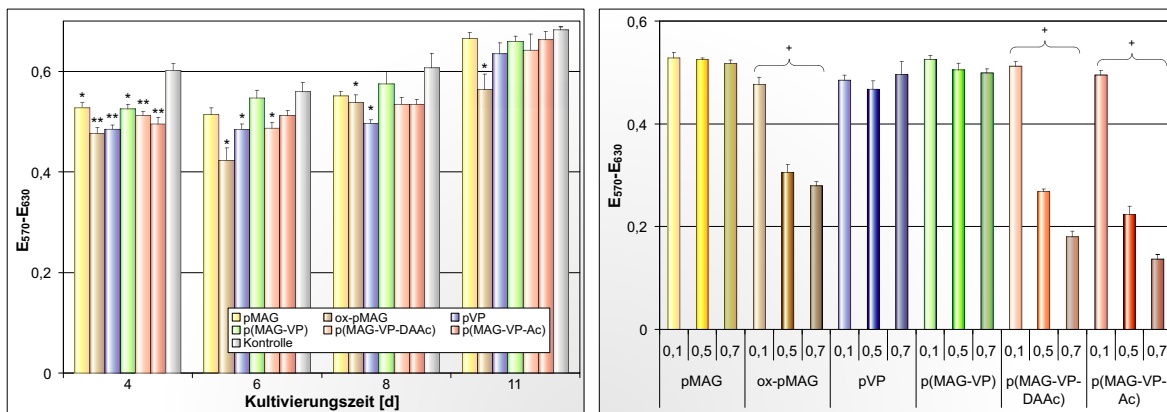


Abbildung 4.36.: Zytotoxizität von Polymethacrylamidoglukose (pMAG) und dem Oxidationsprodukt (ox-pMAG), Polyvinylpyrrolidon (pVP), Poly(Methacrylamidoglukose-*co*-Vinylpyrrolidon) p(MAG-VP), Poly(Methacrylamidoglukose-*co*-Vinylpyrrolidon-*co*-Acrolein-Diacetal) p(MAG-VP-DAAC) und Poly(Methacrylamidoglukose-*co*-Vinylpyrrolidon-*co*-Acrolein) p(MAG-VP-Ac). Die Polymere wurden in den Konzentrationen 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL und 0,7 mg/mL zum Kulturmedium von MC3T3-E1-Zellen zugefügt und zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten wurde ein MTT-Test durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert aus fünf Einzelwerten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet. **Links:** Polymerkonzentration 0,1 mg/mL. **Rechts:** unterschiedliche Polymerkonzentrationen, Kultivierungszeitpunkt Tag 4. Die mit + gekennzeichneten Werte sind linear abhängig von der eingesetzten Polymerkonzentration.

und als Oxidationsprodukt, Polyvinylpyrrolidon, das Copolymer aus Methacrylamidoglukose und Vinylpyrrolidon und das ternäre Polymer mit geschützter Aldehydgruppe und nach der Konversion zur Aldehydgruppe. Die Viabilität der Zellen wurde durch die Polymere in geringster Konzentration (0,1 mg/mL) nur anfänglich beeinträchtigt, bei längerer Kultivierung zeigten sich keine Unterschiede zu Zellen der Kontrollproben, die ohne jeglichen Zusatz von Polymeren zum Medium kultiviert worden waren (Abbildung 4.36 links). Auch in Anwesenheit höherer Konzentrationen von nicht oxidiertem Polymethacrylamidoglukose, Polyvinylpyrrolidon und dem Copolymer aus Methacrylamidoglukose und Vinylpyrrolidon blieb die Zellviabilität erhalten (Abbildung 4.36 rechts). Oxidierte Polymethacrylamidoglukose und die ternären Polymere mit Acrolein-Diethylacetal vor und nach der Entschützungsreaktion führten bei höheren Konzentrationen zu einer deutlich verminderten Zellviabilität. Ursache für die beobachteten zytotoxischen Effekte waren die Aldehydgruppen, die vermutlich mit Proteinen auf der Zelloberfläche reagierten und dadurch grundlegende Prozesse der Zellen störten. Das Diacetal war ebenso reaktiv wie die Aldehyde, was auf eine Abspaltung der Schutzgruppe hindeutete. Dafür könnten ubiquitale Glykosidasen verantwortlich sein. Für den Einsatz der Polymere als *Spacer* war demnach darauf zu achten, dass in Gegenwart von Zellen keine freien Aldehydgruppen auftraten. Die Aldehydgruppen wurden in das Polymer eingebracht, um

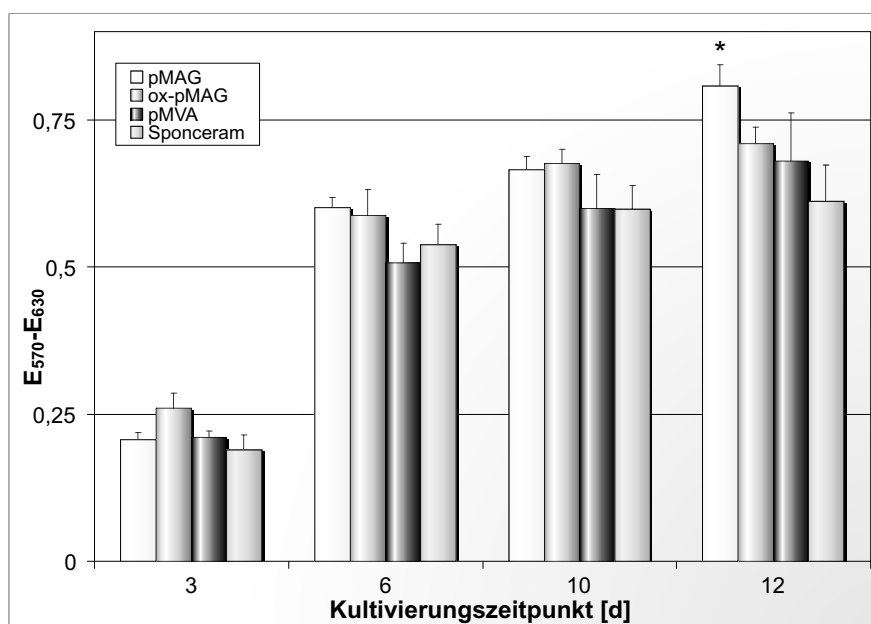


Abbildung 4.37.: Viabilität von MC3T3-E1 auf Polymerspacern (Polymethacrylamidoglucose pMAG, oxidiertes pMAG und Poly(Methacrylamidoglucose-co-Vinylpyrrolidon-co-Acrolein) pMVA) adsorbiert auf Sponceram[®]. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet.

bioaktive Liganden kovalent an den *Spacer* koppeln zu können. Nach der Kopplungsreaktion sollten daher die Aldehydgruppen nicht mehr frei vorliegen. Nur durch Abspaltung von Liganden könnten erneut Aldehydgruppen auftreten. Um dies zu vermeiden, wurde das Imin, das bei der Reaktion der Aminogruppe eines Liganden mit der Aldehydgruppe entsteht, in das stabilere Amin überführt.

Im nächsten Schritt wurden die polymeren *Spacer* – (oxidierte und nicht oxidierte) Polymethacrylamidoglucose und das ternäre Polymer aus Methacrylamidoglucose, Vinylpyrrolidon und Acrolein (nach Abspaltung der Diacetalgruppe) – auf Sponceram[®] adsorbiert. Die dabei entstandenen Komposite wurden kurze Zeit mit Medium inkubiert (genaue Durchführung s. Anhang D.2, Seite 166). Diese Prozedur ist üblich bei der Besiedelung von Trägermaterialien und führt zu einer unspezifischen Adsorption von Mediumbestandteilen. Dabei reagieren ungebundene Aldehydgruppen, die bei Zellkontakt zytotoxische Effekte haben, mit Proteinen des Mediums, so dass keine zytotoxischen Effekte zu erwarten waren. Die Komposite wurden im Folgenden mit Zellen besiedelt und deren Viabilität über einen Zeitraum von zwölf Tagen verfolgt (Abbildung 4.37). Dabei wurden keinerlei schädigende Effekte durch die Polymerspacer festgestellt, vielmehr war eine tendenzielle Erhöhung der Zellviabilität auf den Kompositmaterialien im Vergleich zu unmodifiziertem Sponceram[®] festzustellen.

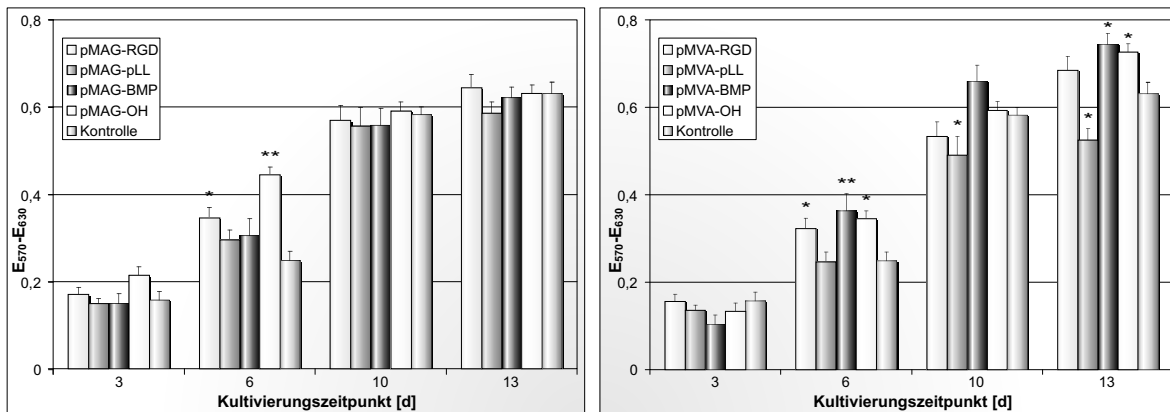


Abbildung 4.38.: Viabilität von MC3T3-E1 auf Kompositen aus Sponceram[®], Polymer-spacer (Polymethacrylamidoglukose pMAG, **links** bzw. Poly(Methacrylamidoglukose-*co*-Vinylpyrrolidon-*co*-Acrolein) pMVA, **rechts**) und bioaktiven Liganden (RGD-Peptid, Poly-L-Lysin pLL bzw. BMP-2) oder ohne Ligand (OH). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert aus fünf Einzelwerten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * für $0,001 < p < 0,05$ und ** für $p \leq 0,001$ gekennzeichnet.

Nachdem sich die Polymer-spacer im Komposit mit Sponceram[®] als biokompatibel und nicht zytotoxisch herausgestellt hatten, wurden die ersten Liganden an die Polymere gekoppelt, wobei zunächst jeweils nur ein Ligand ans Polymer gekoppelt wurde. Die entstandenen Konjugate aus Polymethacrylamidoglukose bzw. Poly(Methacrylamidoglukose-*co*-Vinylpyrrolidon-*co*-Acrolein) und Poly-L-Lysin, RGD-Peptid bzw. BMP-2 wurden an Sponceram[®] adsorbiert und die Komposite mit MC3T3-E1-Zellen besiedelt. Erneut wurde zunächst die Zellviabilität auf den Kompositen mit dem MTT-Test untersucht. Als Vergleich diente hier außer unmodifiziertem Sponceram[®] auch ein Komposit mit den Polymeren, die reduziert worden waren, um die Einflüsse des Polymers und der Liganden separat betrachten zu können (Abbildung 4.38). Obwohl sich zu einigen Zeitpunkten leichte Unterschiede zwischen einzelnen Materialien zeigten, hatten die Komposite über den gesamten Versuchszeitraum gesehen kaum Einfluss auf die Viabilität der MC3T3-E1-Zellen. Während des Versuchszeitraums von knapp zwei Wochen fand also offensichtlich keine Abspaltung von Liganden in einem solchen Maß statt, dass dabei entstehende Aldehydgruppen messbare zytotoxische Effekte auslösen würden. Die Biokompatibilität der Komposite ist damit *in vitro* nachgewiesen worden.

Mit den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass die Konjugate zur Funktionalisierung von Trägermaterialien im *Tissue Engineering* hervorragend geeignet sind. Sie sind überaus einfach in der Handhabung und haben sich als biokompatibel erwiesen. Über die Kopplung gewünschter bioaktiver Liganden an die Polymer-spacer können diverse Signale übertragen werden. Für den Einsatz im *Tissue Engineering* von Knochen wurden Liganden in Betracht gezogen, die entweder die Adhäsion von Zellen verbessern oder aber die osteogene Differen-

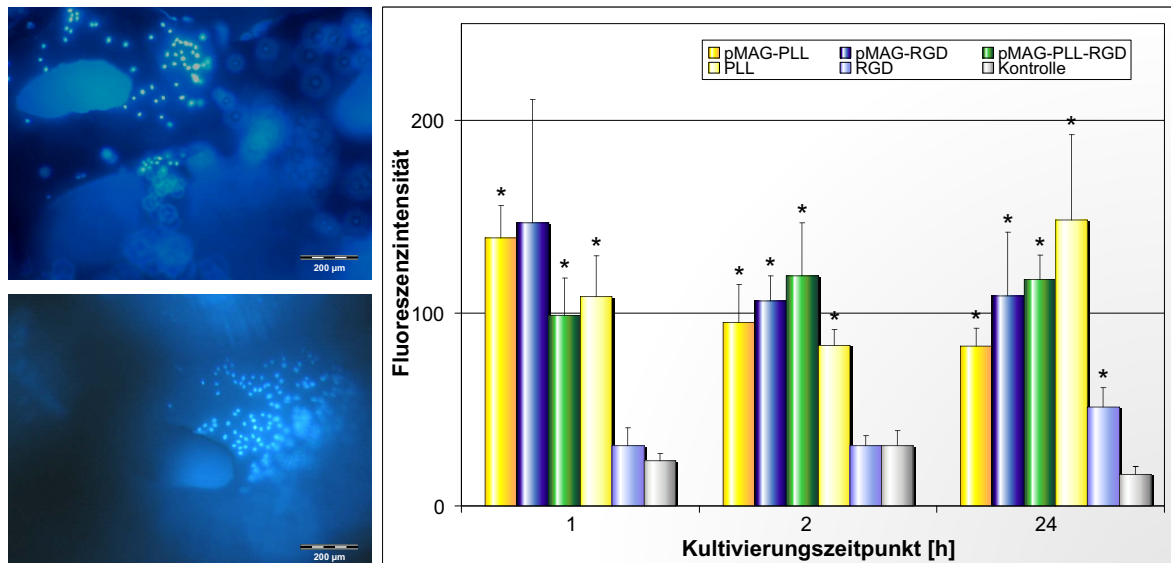


Abbildung 4.39.: DAPI-Färbung zur Untersuchung der Adhäsion von MC3T3-E1 auf Kompositen aus Sponceram[®], Polymerspacer (Polymethacrylamidoglukose pMAG) und bioaktiven Liganden (RGD-Peptid, Poly-L-Lysin pLL). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert aus drei Einzelexperimenten \pm Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit * für $p < 0,05$ gekennzeichnet. **Links:** DAPI-Färbung nach 1 h auf Sponceram[®] (**oben**) und auf dem Komposit mit pMAG-PLL (**unten**).

zierung unterstützen. Auf diesem Hintergrund wurden Poly-L-Lysin, ein RGD-Peptid und BMP-2 als Liganden gewählt. Victor Korzhikov und Stefanie Röcker ist es im Rahmen ihrer Dissertationen gelungen, diese Liganden nicht nur einzeln an die Polymere zu koppeln, sondern auch Doppel- und Tripelkonjugate herzustellen, die zwei oder drei unterschiedliche Liganden gleichzeitig tragen⁹⁶.

Die zukünftige Aufgabe in diesem Projekt ist es, die Aktivität dieser Liganden nachzuweisen und mit unmodifiziertem Sponceram[®] bzw. im Kulturmedium gelösten BMP-2 zu vergleichen. Erste Versuche in diese Richtung sind bereits im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden, indem der Einfluss von Poly-L-Lysin bzw. dem RGD-Peptid im Komposit auf die Adhäsion von Zellen untersucht wurde. Dazu wurden die entsprechenden Konjugate (Polymethacrylamidoglukose mit Poly-L-Lysin oder RGD und ein Doppelkonjugat mit beiden Liganden) auf Sponceram[®]-Scheiben (Durchmesser 1 cm) adsorbiert und MC3T3-E1-Zellen auf die Komposite gebracht. Zum Vergleich wurden auch Poly-L-Lysin und RGD ohne Spacer auf Sponceram[®] adsorbiert. Nach kurzer Zeit der Inkubation (eine Stunde und zwei Stunden) und nach 24 Stunden wurden die Kerne der auf dem Komposit adhären Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt und die Intensität der Fluoreszenz quantifiziert (Durchführung s. Anhang D.2, Seite 167). Die DAPI-Färbung zeigte, dass die Zahl der adhären Zellen auf den Kompositen deutlich höher war als auf unmodifiziertem Sponceram[®] (Abbil-

dung 4.39). Eine erhöhte Zellzahl wurde erreicht, indem Poly-L-Lysin mit und ohne *Spacer* immobilisiert wurde. Poly-L-Lysin ist selbst so groß, dass es bei der Adsorption keinen „Aktivitätsverlust“ erfährt. Da es selbst ein Homopolymer ist, werden bei der Adsorption keine Bindungsstellen für die Zellen verdeckt. Das viel kleinere RGD-Peptid hingegen zeigte kaum eine Wirkung auf die Zelladhäsion, wenn es allein auf Sponceram[®] adsorbiert wurde. Die RGD-Sequenz in dem kurzen Peptid wurde von den Zellen nach der Adsorption nicht mehr erkannt. Der *Polymer spacer* zeigte hier ausgezeichnete Wirkung. Die Zellzahl auf den Konstrukten mit dem Konjugat aus Polymethacrylamidoglukose und RGD-Peptid war deutlich höher als auf purem Sponceram[®] oder nach der alleinigen Adsorption des RGD-Peptids. Das Doppelkonjugat aus Polymethacrylamidoglukose und den beiden Liganden RGD und Poly-L-Lysin führte ebenfalls zu einer erhöhten Zellzahl, brachte aber gegenüber den Monokonjugaten bzw. Poly-L-Lysin allein keine weiteren Vorteile. Die Effekte der beiden Liganden wirkten also nicht additiv und die Erhöhung der Ligandenkonzentration im Polymer, die stattfand, wenn an das Konjugat mit Poly-L-Lysin RGD als zweiter Ligand gekoppelt wurde, wirkte sich nicht in einer weiteren Verstärkung der Effekte aus.

Die Effektivität eines Liganden gekoppelt an einen *Polymer spacer* und adsorbiert an Sponceram[®] wurde mit dem RGD-Peptid klar belegt. Der entsprechende Nachweis der Aktivität von BMP-2 als Ligand steht noch aus. Auch die Unterschiede zwischen dem Homopolymer aus Methacrylamidoglukose und dem ternären Polymer aus Methacrylamidoglukose, Vinylpyrrolidon und Acrolein sind noch nicht in ausreichendem Maß herausgearbeitet worden. Die Verwendung von zwei Adhäsionsfaktoren ist nach den bisherigen Ergebnissen nicht nötig, das weitaus preisgünstigere Poly-L-Lysin reicht aus, um die Zelladhäsion maximal zu fördern. Auf RGD kann daher für die hier beschriebene Anwendung zur Besiedelung von Sponceram[®] mit Knochenzellen verzichtet werden. Für andere Anwendungen kann die Verwendung von RGD-Peptiden trotzdem durchaus sinnvoll sein, da eine selektive Zelladhäsion ermöglicht wird. Dabei wurde deutlich gezeigt, dass für die erfolgreiche Verstärkung der Adhäsion mit RGD-Peptid ein *Spacer* notwendig ist, um die Peptidsequenz für die Zellen zugänglich zu machen. Das hier untersuchte System zur Funktionalisierung von Trägermaterialien für den Einsatz im *Tissue Engineering* zeigte deutlich das Potenzial solcher Funktionalisierungen auf. Die Eigenschaften von Gerüstsubstanzen können optimiert und modifiziert werden. Speziell im Hinblick auf die Herstellung von Implantaten können über die Funktionalisierung eines Konstrukts zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung gesteuert werden, was über eine systemische Applikation von Wachstumsfaktoren nur eingeschränkt möglich ist. Über die Abbauraten von *Polymer spacers* kann die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren auf der Konstruktoberfläche gesteuert werden und mehrphasig regulierte Signalkaskaden werden ermöglicht. Auf ähnliche Weise können auch so genannte *Controlled-Release-Systeme* entwickelt werden.

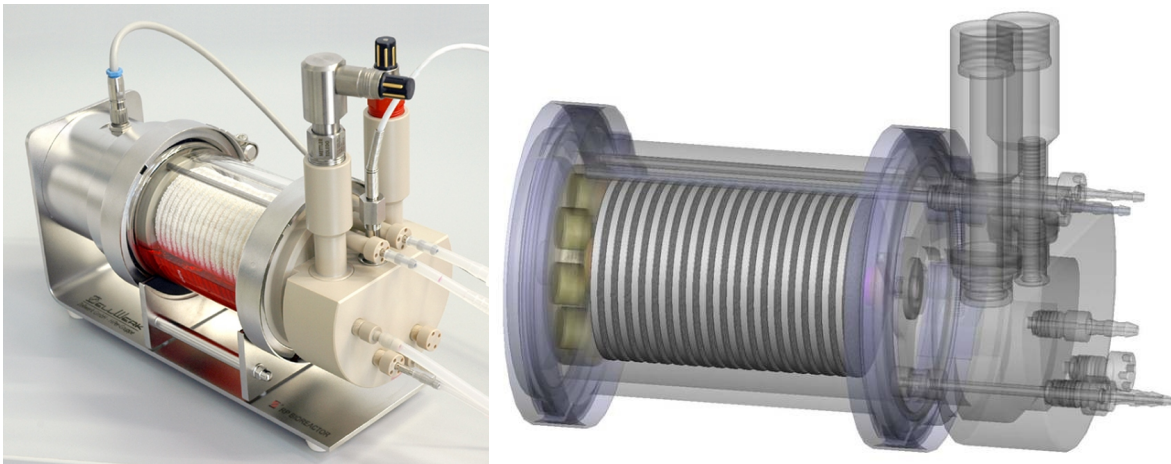


Abbildung 4.40.: Z[®] RP-Bioreaktor mit 20 Sponceram[®]-Scheiben auf einer Welle, die magnetgekoppelt angetrieben wird. Im vorderen Bereich pO₂-, pH- und Temperatursensoren sowie Anschlüsse für Medium und Begasung. Quelle: www.Zellwerk.biz.

4.3.3. Kultivierung in einem Drehbettbioreaktor

In statischer Zellkultur ist der Transport von Nährstoffen und Metaboliten rein diffusionskontrolliert. Mit dieser Beschränkung sind in statischer Kultur gewebeartige Konstrukte mit dichten und vielschichtig gewachsenen Zellen kaum erreichbar, die um sich herum dicke Schichten extrazellulärer Matrix ablagern. Um die Versorgung solcher Konstrukte mit Nährstoffen und Sauerstoff sicherzustellen, muss unter dynamischen Bedingungen kultiviert werden. Speziell für diese Anwendung sind diverse Bioreaktoren entwickelt worden. Die Firma Zellwerk GmbH hat ein Bioreaktorsystem für die Kultur adhärenter Zellen entwickelt. Ursprünglich für die Produktion von Erythropoetin entwickelt, wurde das Einsatzgebiet des Z[®] RP-Systems auf die schnelle und kontrollierte Expansion adhärenter Zellen unter verschiedenen Aspekten, wie Zellexpansion für eine Zelltherapie, Produktion von Biopharmaka oder Herstellung von Implantaten für die Regenerative Medizin ausgeweitet. Dr. Kirstin Suck hat anhand der Zelllinie MC3T3-E1 eindrucksvoll nachgewiesen, dass bei der Kultivierung im Z[®] RP-Bioreaktor hochdichte 3-D-Kulturen erreicht werden, bei denen die Zellen gewebeartig in extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Darüber hinaus wurde die osteogene Differenzierung der MC3T3-E1-Zellen allein durch die Kultivierungsbedingungen induziert, ohne dass osteogene Zusätze ins Medium gegeben wurden¹⁶⁴.

Im Z[®] RP-Bioreaktor werden Sponceram[®]-Scheiben auf einer Welle fixiert, die durch einen Magnetantrieb berührungslos in Rotation versetzt wird (Drehbettreaktor). Das Kulturgefäß aus Glas wird zur Hälfte mit Kulturmedium gefüllt, so dass sich die Zellen auf den rotierenden Scheiben abwechselnd im Medium und in dem gasgefüllten Kopfraum befinden. Auf diese



Abbildung 4.41.: Z[®] RP-Bioreaktor-System aus Bioreaktor im *Breeder* und der Kontroll-einheit. Quelle: www.Zellwerk.biz.

Weise wird eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen aus dem Medium und mit Sauerstoff aus der Kopfraumatmosphäre sichergestellt. Der Reaktor erlaubt weitreichende Modifikationen und ist anpassbar an die Kultivierung von Zellen auf speziellen Implantat-Formteilen. Der Bioreaktor wird im Z[®] RP GMP-*Breeder* betrieben, einer beheizbaren Sterilwerkbank, über die einerseits die Reaktortemperatur reguliert wird und die andererseits eine sterile Manipulation am Bioreaktor (wie die Ansaat von Zellen, Probenahme, Wechsel von Medium-Flaschen, Schlauchwechsel, Sensortausch oder Zellernte) erlaubt. In Kombination mit dem *Breeder* ist eine Kultivierung unter GMP-Bedingungen durchführbar. Im vorderen (dem Motor gegenüberliegenden) Reaktorteil befinden sich die Anschlüsse für die Sensoren (pH, pO₂, Temperatur), den Mediumzu- und -ablauf und die Begasung des Kopfraums (perforiertes Begasungsrohr) sowie des Mediums (*Sparger*). Die Regelung aller Kultivierungsparameter (pH-Wert, pO₂-Wert, Temperatur im Medium und Mediumzufuhr) erfolgt über die Z[®] RP-Kontrolleinheit. Die Einstellung des pH-Wertes im Medium findet über eine geregelte Zufuhr von CO₂ in Abhängigkeit von dem aktuellen pH-Wert statt, der vom pH-Sensor im Reaktor gemessen wird. Der Volumenstrom des CO₂ ist über ein Manometer an der Front der Kontrolleinheit manuell einstellbar. CO₂ kann entweder über den *Sparger* direkt in das Kulturmedium oder aber in die Kopfraumatmosphäre geleitet werden. Bei zu geringem pH-Wert kann mit Base entgegen geregelt werden. Die Kopfraumatmosphäre wird in der Regel mit Luft versorgt, deren Volumenstrom von der Kontrolleinheit über einen Massendurchflussregler (*mass flow controller*) eingestellt wird, kann aber auch manuell durch ein Manometer an der Front der Kontrolleinheit angepasst werden. In die Kopfraumatmosphäre können außerdem Sauerstoff,

Stickstoff und CO₂ eingeleitet werden. Der Volumenstrom von Sauerstoff und Stickstoff wird in der Kontrolleinheit ebenfalls durch einen Massendurchflussregler eingestellt und ist durch ein Manometer manuell anpassbar. Sauerstoff und Stickstoff können, wie auch CO₂, sowohl in den Kopfraum als auch durch den *Sparger* ins Medium geleitet werden. Das Medium wird während der Kultivierung durchgängig in einem Zirkulationskreislauf geführt, indem es im unteren Reaktorteil abgezogen und über ein Mediumrohr, das parallel zum Begasungsrohr in den Kopfraum ragt, wieder eingetropft wird. Zu dem zirkulierenden Medium kann kontinuierlich oder nach Bedarf frisches Medium aus einer Reservoir-Flasche zugeführt werden. Ein Mediumablauf, der sich auf halber Höhe befindet, sorgt dafür, dass der Füllstand des Reaktors niemals die Hälfte übersteigt. Bei höherem Füllstand würden sich sonst Zellen im Zentrum der Sponceram[®]-Scheibe permanent im Medium befinden, ohne über die Kopfraumatmosphäre mit Sauerstoff versorgt zu werden.

Einen sehr ähnlichen Bioreaktor entwickelten auch Chen *et al.* für die Generierung von Knorpel-Zell-Gerüst-Konstrukte werden mit Nadeln auf einem rotierenden Schaft befestigt, so dass sie sich wie die Zellen im Z[®] RP-System alternierend durch die Gasphase im Kopfraum und das Medium bewegen³⁶. In diesem Reaktor war allerdings keinerlei Sensorik vorgesehen, die für die kontrollierte Kultivierung unabdingbar ist.

Die Kultivierung im Bioreaktor erfolgte zunächst mit der Modellzelllinie SAOS-2, bei der es sich um eine humane Knochenzelllinie aus einem Osteosarkom handelt. Die Zellen wurden extern auf eine unbeschichtete Sponceram[®]-Scheibe und auf eine mit Hydroxylapatit beschichtete Scheibe (Sponceram[®]-HA) gesiedelt und nach Adhäsion über Nacht in den Bioreaktor eingesetzt. Als Vergleich wurden parallel zwei Scheiben (Sponceram[®] und Sponceram[®]-HA) statisch kultiviert (genaue Durchführung s. Anhang D.3, Seite 168). Als Kultivierungsparameter wurden eine Temperatur von 37° C, ein Soll-pH-Wert von 7,3 und ein Sauerstoffpartialdruck von minimal 70 % vorgegeben. CO₂ wurde durch ein kurzes perforiertes Rohr (statt *Sparger*) ins Medium geleitet. Eine Regulation mit Base wurde nicht durchgeführt. Der Kopfraum wurde mit Luft begast. Bei einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes unter den Minimalwert war die Zudosierung von Sauerstoff vorgesehen (was bei dieser Kultivierung nicht auftrat). Die Rotation der Scheiben betrug 1 rpm.

Während der Kultivierung wurden regelmäßig Glukose- und Laktatgehalt des Mediums gemessen. Glukose wird von den Zellen bei anaerobem Stoffwechsel zu Laktat metabolisiert. Da Laktat in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkt, wurde bei zu hoher Laktatkonzentration (oberhalb von 1,7 mg/mL) das Kulturmedium teilweise durch frisches ersetzt. Es erfolgte keine kontinuierliche Zugabe von frischem Kulturmedium. Die SAOS-2-Zellen wurden über einen Zeitraum von 35 Tagen im Bioreaktor (bzw. statisch als Kontrollen) kultiviert. Nach dieser Zeit wurde der Reaktor geöffnet und die Scheiben entnommen. Für einen Überblick über die Zellzahl auf den Scheiben wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und ein Stück

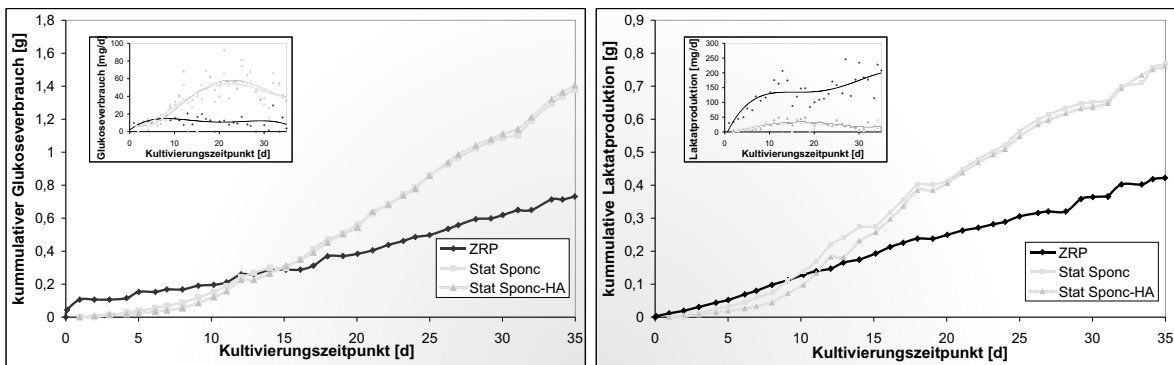


Abbildung 4.42.: Glukoseverbrauch (**links**) und Laktatproduktion (**rechts**) bei der Kultivierung von SAOS-2 im Z[®] RP-System. Dargestellt sind die kumulativen Raten bzw. die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

jeder Scheibe mit Toluidinblau angefärbt. Einlagerungen von Calcium in die extrazelluläre Matrix wurden durch Färbungen mit Alizarinrot, Calcein und nach von Kossa nachgewiesen. Zusätzlich wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von kleinen Stücken der Konstrukte gemacht.

Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in den statischen Kontrollen zeigten sich unabhängig vom Sponceram[®]-Material (normal bzw. HA-beschichtet) und verliefen während der Kultivierung nahezu parallel (Abbildung 4.42). Im Bioreaktor waren Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in den ersten zwei Kultivierungswochen höher als in den statischen Kontrollen, bei längerer Kultivierungszeit jedoch deutlich niedriger. Besonders in den ersten Tagen war im Bioreaktor der Glukoseverbrauch hoch, stagnierte dann aber nahezu im restlichen Verlauf der Kultivierung. Bei der Betrachtung von Glukoseverbrauch und Laktatproduktion ist zu beachten, dass bei den statischen Kontrollen die beiden Scheiben (normal und HA-beschichtet) einzeln gemessen wurden, während sie im Reaktor zu gleichen Teilen in die Messung eingingen. Bei gleichen Verbrauchsdaten müsste also der Glukoseverbrauch im Reaktor genau der Summe aus den beiden statischen Kontrollen entsprechen. Die Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten deuteten an, dass die Zellen in den statischen Kontrollen deutlich besser gewachsen sind als im Bioreaktor. Die Bedingungen im Reaktor waren also offensichtlich noch nicht optimal eingestellt. Die anfänglich deutlich höheren Raten im Reaktor wiesen darauf hin, dass eine Limitierung vorlag, die mit der durchgeführten Analytik nicht erfasst wurde. Der Zeitpunkt für einen Mediumwechsel wurde anhand der Laktatkonzentration festgelegt (Glukose war in ausreichender Menge verfügbar, auch wenn die Laktatproduktion bereits sehr hoch war). Das geringere Mediumvolumen machte bei den statischen Kontrollen einen häufigeren Mediumwechsel erforderlich. Dabei wurden wahrscheinlich die Limitierungen (wie Verbrauch essentieller Aminosäuren oder Produktion zytotoxischer Metabolite wie Ammonium) behoben, die im Bioreaktor durch selteneren Mediumwechsel weiterhin erhalten blieben.

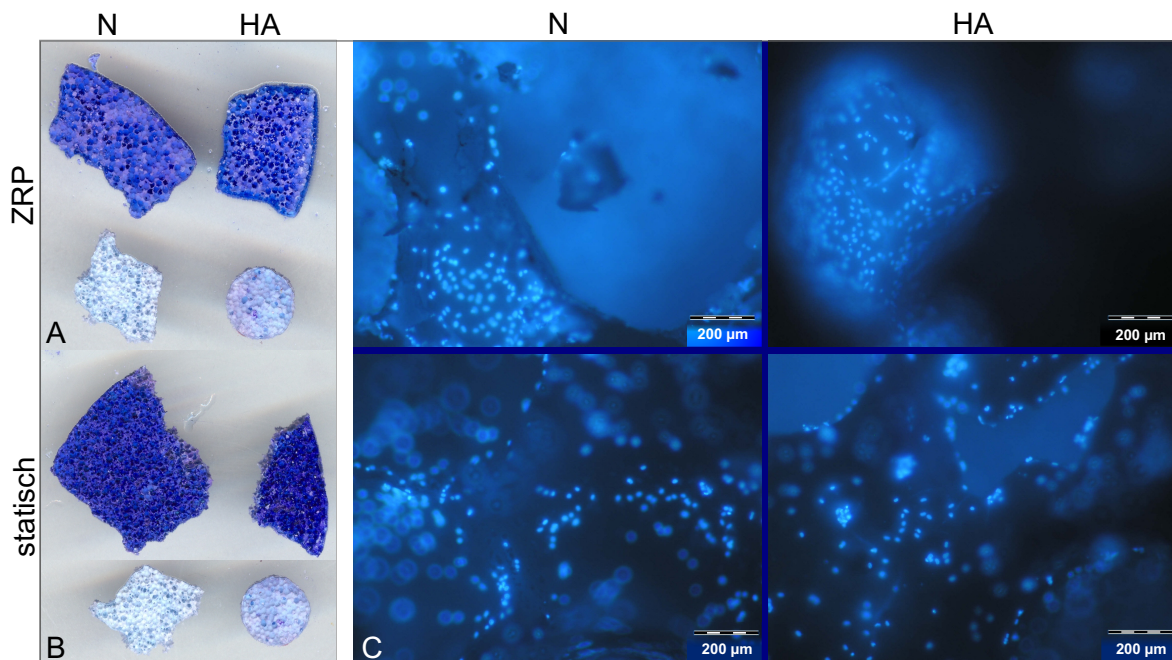


Abbildung 4.43.: Toluidinblau- (A,B) und DAPI-Färbung (C) von SAOS-2-Zellen kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor. A, B: Sponceram[®] (N, links) und Sponceram[®]-HA (rechts) der Z[®] RP- (A) und der statischen Kultivierung (B). Unbesiedelte Materialien jeweils unten. C: Sponceram[®] (links) und Sponceram[®]-HA (rechts) der Z[®] RP- (oben) und der statischen Kultivierung (unten). N: unbeschichtetes Sponceram[®], HA: mit Hydroxylapatit-Beschichtung.

Die Übersichtsfärbung mit Toluidinblau führte zu einer starken Blaufärbung der Konstrukte (Abbildung 4.43). Mikroskopisch waren keine Einzelzellen erkennbar. Die Konstrukte aus der statischen Kultivierung zeigten eine etwas stärkere Blaufärbung als diejenigen aus der Reaktorkultivierung. Diese Beobachtung wurde unterstützt von Glukoseverbrauch und Laktatproduktion, die stärkere Wachstumsraten in den statischen Kontrollen vermuten ließen. Toluidinblau- und DAPI-Färbung zeigten allerdings, dass trotz der suboptimalen Bedingungen im Reaktor, die von Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten nahegelegt wurden, etliche Zellen auf der Keramik wuchsen.

Die Färbungen mit Alizarinrot bzw. nach von Kossa wiesen deutlich Calciumablagerungen auf den Konstrukten nach (Abbildung 4.44). Der Vergleich zwischen statischer und dynamischer Kultivierung im Bioreaktor zeigte bei den Färbungen eine Tendenz zu stärkerer Bildung von Matrix im statischen System (vor allem sichtbar bei Alizarinrot). Diese beiden Färbungen von unbeschichtetem Sponceram[®] und mit Hydroxylapatit beschichtetem Sponceram[®] waren nur bedingt vergleichbar, da die Beschichtung calciumhaltig ist und daher mit angefärbt wurde. Die Quantifizierbarkeit der Calcein-Färbung erlaubte einen direkten Vergleich zwischen unbeschichtetem und mit Hydroxylapatit beschichtetem Sponceram[®], indem die Fluoreszenzintensitäten von unbesiedelten Materialien von den Werten der Konstrukte abgezogen

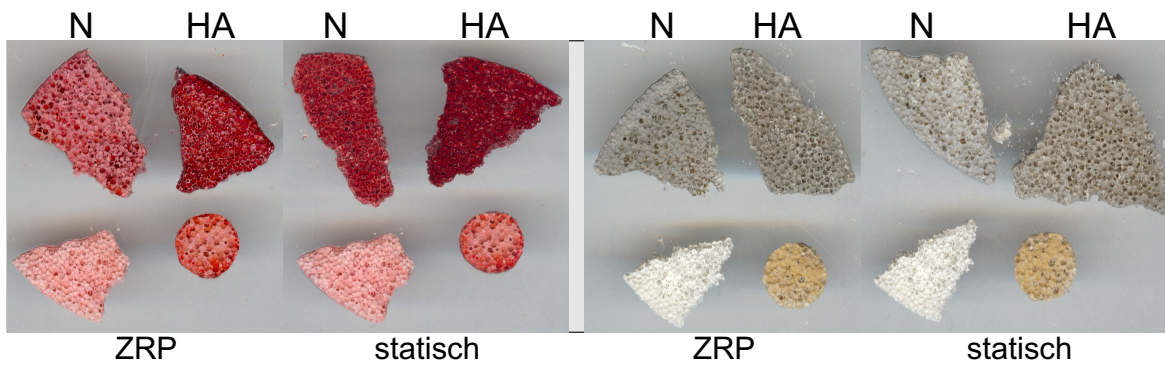


Abbildung 4.44.: Alizarinrot- (**links**) und von-Kossa-Färbung (**rechts**) von SAOS-2-Zellen kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor bzw. nach statischer Kultur. Unter den jeweiligen Proben sind Färbungen der jeweiligen unbesiedelten Matrizes dargestellt. N: unbeschichtetes Sponceram[®], HA: mit Hydroxylapatit-Beschichtung.

wurden. Die Calcein-Färbung wies eine Mineralisierung von dynamisch und statisch kultivierten Sponceram[®]-Konstrukten nach, während Sponceram[®]-HA nur geringfügige Calciumablagerungen aufwies (Abbildung 4.45).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Sponceram[®]-Stücken aus dem Reaktor zeigten auf beiden Materialien (normal und HA-beschichtet) einzelne Zellen, die Ausläufer bildeten, aber keinen dichten Zellrasen oder dicke Schichten extrazellulärer Matrix. Auf Sponceram[®]-HA gruben sich die Zellen regelrecht in die Beschichtung ein (Abbildung 4.46 unten). Auf dem statisch kultivierten normalen Sponceram[®] zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen viele kugelige Gebilde, bei denen es sich offensichtlich um Zellen handelte, die extrazelluläre Matrix in Form von Kugeln ablagerten (Abbildung 4.47 oben). Auf statisch kultiviertem Sponceram[®] wuchsen mehr Zellen als im Bioreaktor. Auf der Hydroxylapatitbeschichtung bildete sich stellenweise ein dichter Zellrasen aus. Die Glukoseverbrauchsdaten hatten bereits auf stärkere Zellproliferation bei statischer Kultivierung hingewiesen, was durch die Elektronenmikroskopie bestätigt wurde. Gewebeartige Strukturen aus dicht aneinanderliegenden Zellen, eingebettet in selbstproduzierte extrazelluläre Matrix, wurden jedoch in statischer Kultur selbst nach fünfwöchiger Kultivierung nicht erreicht.

Die Kultivierung einer humanen Knochenzelllinie (SAOS-2) im Z[®] RP-System über einen Zeitraum von fünf Wochen zeigte, dass ein gelegentlicher Mediumwechsel in Abhängigkeit von der Laktatkonzentration im Kulturmedium keine ausreichende Versorgung von Zellen gewährleistet. Die parallel durchgeführte statische Kultivierung, bei der das Medium ebenfalls bei zu hoher Laktatkonzentration ausgetauscht wurde, führte zu stärkerer Proliferation der Zellen. Dies war wohl auf den häufigeren Mediumwechsel aufgrund des geringeren Kulturvolumens zurückzuführen. Bei der statischen Kultivierung wurden jedoch keine gewebeartigen Zellkonstrukte erzielt, die Zelldichte war relativ gering und es bildete sich kein durchgängiger oder gar vielschichtiger Rasen von Zellen eingelagert in extrazelluläre Matrix.

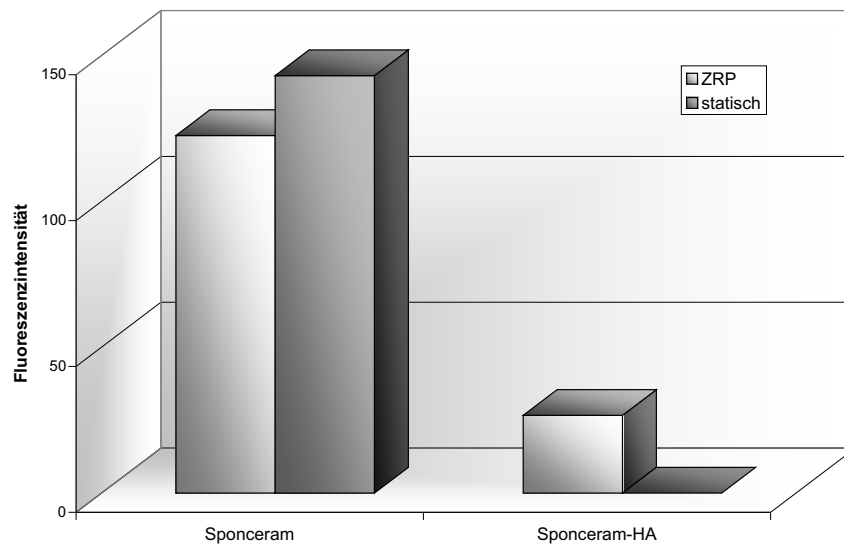


Abbildung 4.45.: Fluoreszenzintensität der Calcein-Färbungen von SAOS-2-Zellen kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor bzw. unter statischen Bedingungen.

Mit mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (adMSCs) wurde eine weitere Kultivierung im Z[®] RP-System durchgeführt. Je zwei Scheiben Sponceram[®] und Sponceram[®]-HA wurden extern mit adMSCs besiedelt. Nach einer Adhäsionsphase über Nacht wurden die Scheiben in den Reaktor eingesetzt. Zwei weitere Scheiben (normal und HA-beschichtet) wurden besiedelt und statisch kultiviert. Bei der Kultivierung im Bioreaktor wurden die Parameter der vorherigen Kultivierung angepasst (pH 7,3, 37° C, Rotation 1 rpm). Als Kultivierungsmedium diente hier osteogenes Differenzierungsmedium, um die Differenzierung der Stammzellen zu Knochenzellen zu induzieren. Im Gegensatz zu der Kultivierung der SAOS-2-Zellen wurde der Reaktor im Perfusionsmodus betrieben. Die Zufuhrate frischen Mediums wurde dem Verbrauch der Zellen angepasst, wobei Glukoseverbrauch und Laktatproduktion maßgebend waren. Der Kopfraum wurde mit Luft begast. Ab einem Sauerstoffpartialdruck unterhalb von 70 % wurde Sauerstoff in den Kopfraum zugeführt. Die pH-Regulierung wurde durch Zugabe von CO₂ durch den *Sparger* direkt ins Medium realisiert, ohne dass mit Base entgegen geregelt wurde.

Die adMSCs wurden über einen Zeitraum von 47 Tagen im Z[®] RP-System kultiviert. Durch regelmäßige Probenahme wurden Glukose- und Laktatkonzentration sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Medium bestimmt. Nach der Kultivierung wurde durch Färbung mit Toluidinblau bzw. DAPI die Zelldichte auf den einzelnen Sponceram[®]-Scheiben verglichen. Calciumablagerungen in der extrazellulären Matrix wurden durch Standard-Färbemethoden (Alizarinrot, von Kossa, Calcein) nachgewiesen. Von kleinen Stücken wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht.

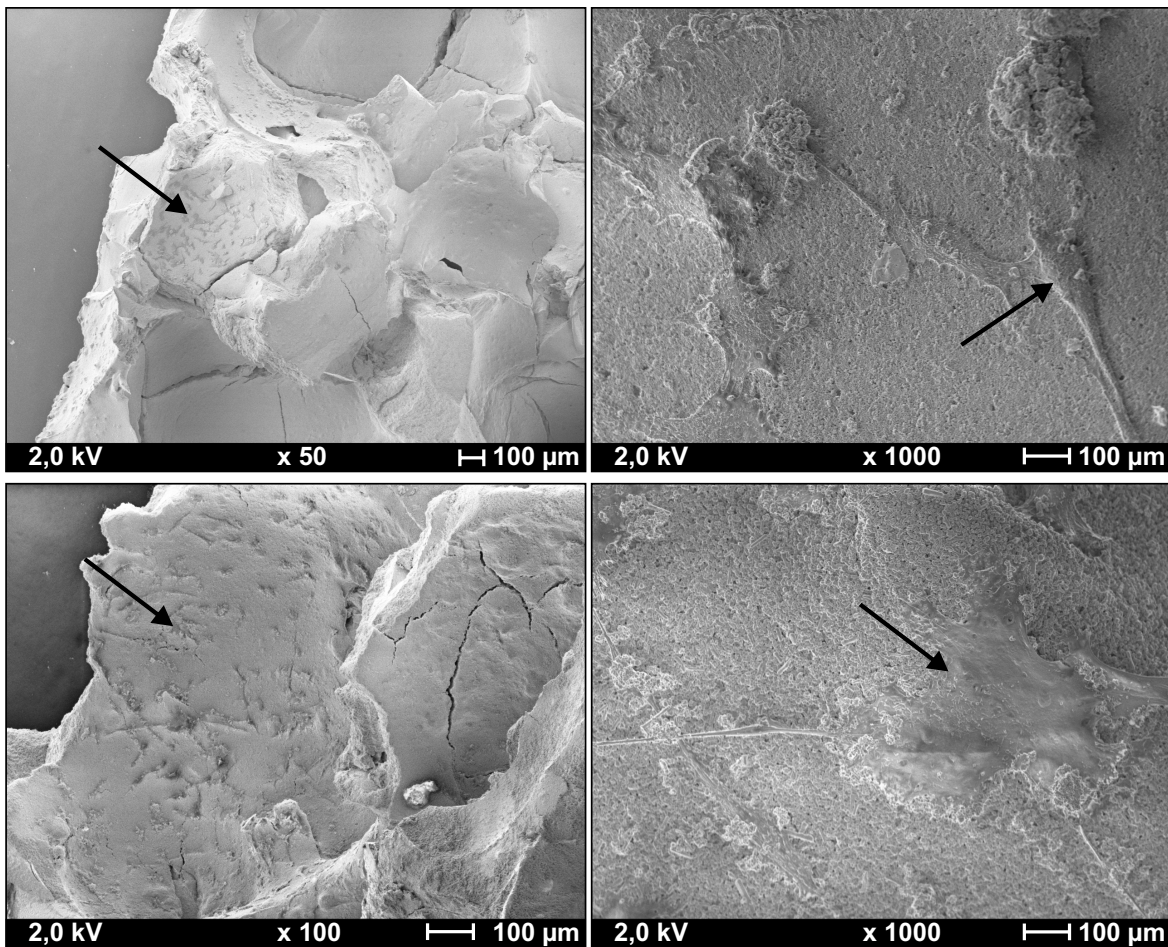


Abbildung 4.46.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SAOS-2 kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor. **Oben:** unbeschichtetes Sponceram[®], **unten:** Sponceram[®]-HA. Die Pfeile kennzeichnen Zellen.

Glukoseverbrauch und Laktatproduktion stiegen während der Kultivierung kontinuierlich an (Abbildung 4.48). Über die Kultivierungszeit von 47 Tagen wurden insgesamt 17 g Glukose verbraucht. Etwa an Tag 40 erreichten Glukoseverbrauch und Laktatproduktion im Bioreaktor ein Plateau und nahmen in den folgenden sieben Tagen nicht weiter zu. Die Kultivierung wurde daher nach 47 Tagen gestoppt. Glukoseverbrauch und Laktatproduktion war zu entnehmen, dass die Zellen stark proliferierten. Besonders der Vergleich mit der vorherigen Kultivierung, bei der der Gesamtverbrauch von Glukose bei etwa 0,7 g lag, verdeutlicht die hohe Proliferationsrate. Die Versorgung der Zellen durch den Perfusionsbetrieb war hier also deutlich besser als bei der Kultivierung der SAOS-2-Zellen mit gelegentlichem Mediumwechsel. Bei den statischen Kontrollen waren Glukoseverbrauch und Laktatproduktion wesentlich niedriger als im Bioreaktor. Über den gesamten Kultivierungszeitraum verbrauchten die statisch kultivierten Zellen auf Sponceram[®] nur 2,4 g Glukose, die Zellen auf der mit Hydroxylapatit beschich-

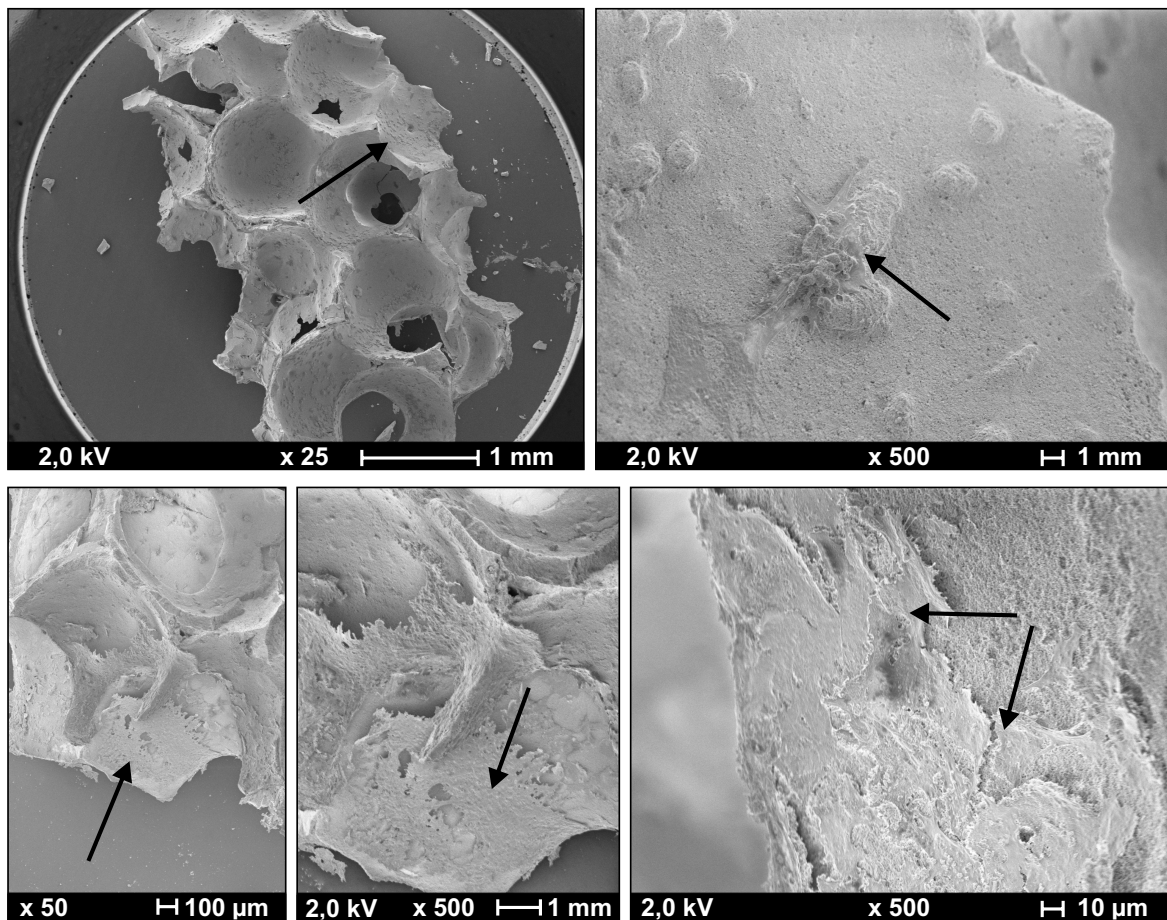


Abbildung 4.47.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von SAOS-2 statisch kultiviert. **Oben:** unbeschichtetes Sponceram[®], **unten:** Sponceram[®]-HA. Die Pfeile kennzeichnen Zellen.

teten Scheibe sogar nur 0,3 g. Obwohl auch auf den statisch kultivierten Scheiben die Zellen merklich proliferierten und zahlreiche Mediumwechsel erforderlich waren, war die Proliferationsrate im Z[®] RP-Bioreaktor weitaus höher, was die überaus gute Versorgung der Zellen mit Nährstoffen verdeutlicht.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Bioreaktor blieb über die gesamte Kultivierung im selben Bereich (Abbildung 4.49), während sie bei den statischen Kontrollen über den gesamten Kultivierungszeitraum nicht nachweisbar war. Unter Berücksichtigung der während der Kultivierung zunehmenden Zellmasse ergab sich eine kontinuierliche Abnahme der Enzymaktivität (Enzymaktivität bezogen auf den Glukoseverbrauch). Es ist bekannt, dass Alkalische Phosphatase, wie andere Knochenmarker auch, nur transient während der Differenzierung gebildet wird. Bei fortschreitender Differenzierung (in der Mineralisierungsphase) wird die Syntheserate von Alkalischer Phosphatase wieder verringert. Die Abnahme der Aktivität von

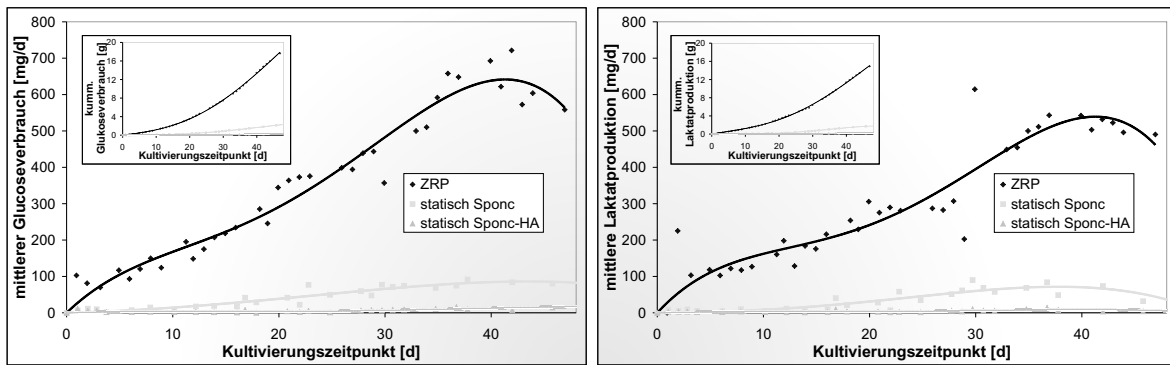


Abbildung 4.48.: Glukoseverbrauch (**links**) und Laktatproduktion (**rechts**) bei der Kultivierung von adMSCs im Z[®] RP-System. Dargestellt sind die mittleren Werte pro Tag bzw. die kumulativen Raten (kleines Diagramm).

Alkalischer Phosphatase im Kulturmedium wies also auf eine fortschreitende osteogene Differenzierung der Zellen hin, was jedoch erst nach der abgeschlossenen Kultivierung durch die Färbung von mineralisierter Matrix endgültig nachzuweisen war.

Nachdem die Kultivierung beendet war, wurden die Zellen auf der Sponceram[®]-Scheibe mit Toluidinblau angefärbt. Die Färbung der Scheiben aus dem Reaktor war so intensiv, dass die Scheiben vollständig blau gefärbt wurden (Abbildung 4.50 A, B) und auch mikroskopisch keine Einzelzellen voneinander zu unterscheiden waren (nicht gezeigt). Ein Unterschied zwischen normalem Sponceram[®] und Sponceram[®]-HA war nicht auszumachen. Die DAPI-Färbung der Zellkerne auf dem Sponceram[®]-Gerüst zeigte eine kompakte Zellschicht auf der Sponceram[®]-

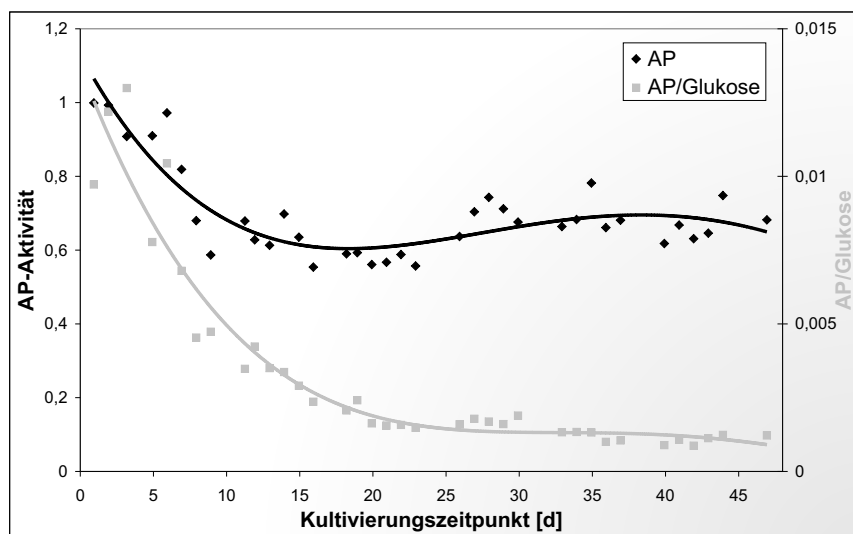


Abbildung 4.49.: Aktivität der Alkalischen Phosphatase von adMSCs kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor.

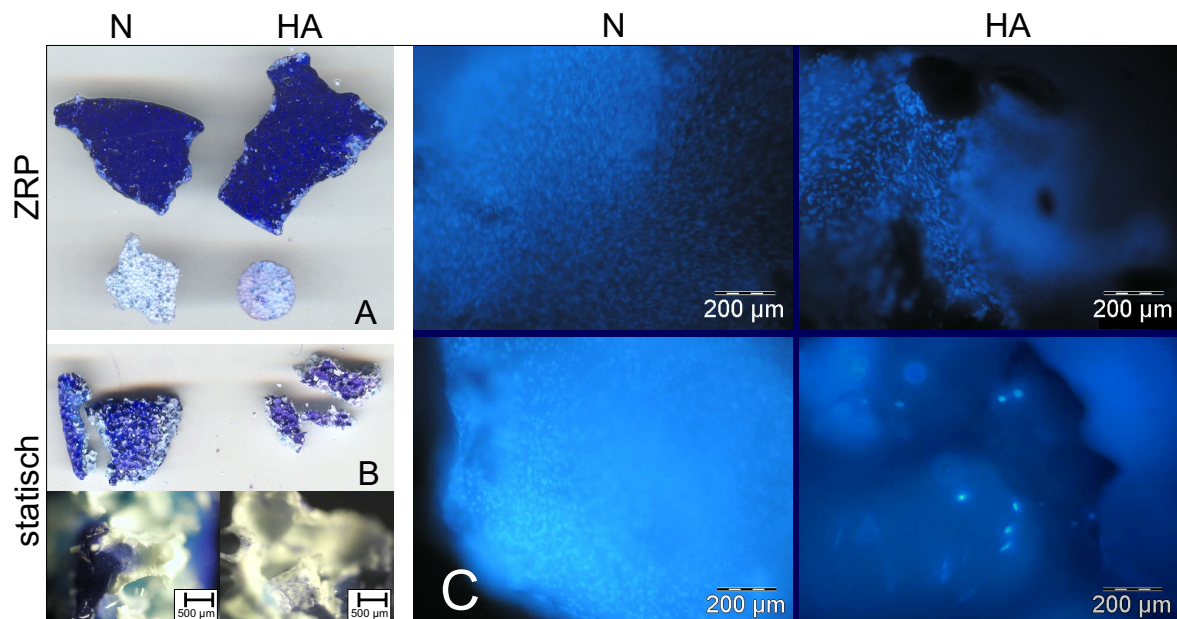


Abbildung 4.50.: Toluidinblau- (A, B) und DAPI-Färbung (C) von adMSCs kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor. A, B: Sponceram[®] (N, links) und Sponceram[®]-HA (rechts) der Z[®] RP- (A) und der statischen Kultivierung (B). Darunter Mikroskopie der beiden statischen Kontrollen. Unbesiedelte Materialien jeweils unten. C: Sponceram[®] (links) und Sponceram[®]-HA (rechts) der Z[®] RP- (oben) und der statischen Kultivierung (unten). N: unbeschichtetes Sponceram[®], HA: mit Hydroxylapatit-Beschichtung.

Oberfläche (Abbildung 4.50 C). Auf Sponceram[®]-HA schien die Zelldichte etwas geringer zu sein (Abbildung 4.50 jeweils rechts). Ein ähnliches Bild ergab sich auch für die statisch kultivierten Scheiben. Bei den intensiv blau gefärbten Scheiben waren bei mikroskopischer Betrachtung auf der Oberfläche keine Einzelzellen zu erkennen. In etwas tiefer gelegenen Poren war die Zelldichte deutlich geringer, so dass einzelne Zellen unterschieden werden konnten. Die Zellen wuchsen also nicht ausschließlich oberflächlich, sondern infiltrierten auch die Poren, wo die Zelldichte allerdings deutlich geringer war. Bei der DAPI-Färbung der statisch kultivierten Scheiben zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen unbeschichtetem Sponceram[®] und Sponceram[®]-HA. Während sich auf Sponceram[®] eine dichte Zellschicht gebildet hatte, wurden auf der Hydroxylapatit-Beschichtung nur wenige einzelne Zellkerne angefärbt. Diese Ergebnisse untermauerten die Werte des Glukoseverbrauchs, der auf Sponceram[®]-HA deutlich geringer war als auf Sponceram[®]. Die Hydroxylapatit-Beschichtung hat sich demzufolge als nicht förderlich für das Wachstum der adMSCs herausgestellt.

Die Färbungen der Konstrukte aus dem Bioreaktor und der statischen Kultivierung mit Alizarinrot und nach von Kossa resultierten in einer deutlich positiven Färbung (Abbildung 4.51), was eine starke Calcifizierung der extrazellulären Matrix belegte. Auf den ersten Blick konnten keine Unterschiede zwischen Sponceram[®] mit und ohne Hydroxylapatit-Beschichtung

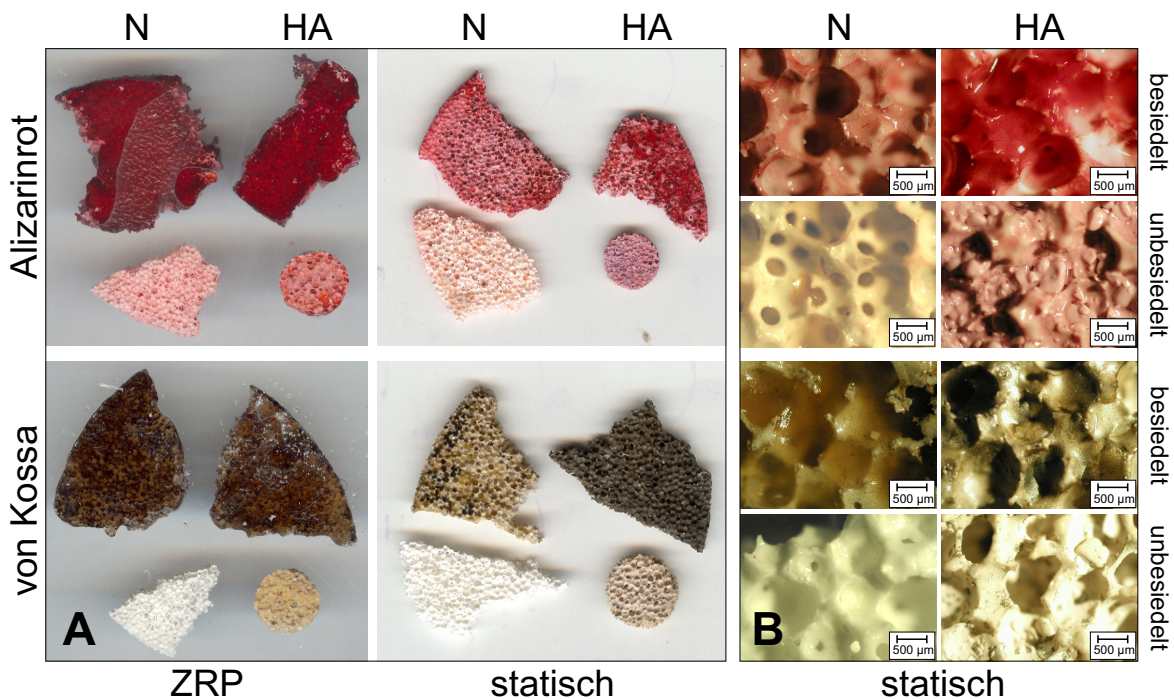


Abbildung 4.51.: Alizarinrot- (oben) und von-Kossa-Färbung (unten) von adMSCs kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor bzw. nach statischer Kultur. Unter den jeweiligen Proben sind Färbungen der jeweiligen unbesiedelten Matrizes dargestellt. **B:** Mikroskopische Aufnahmen der Färbungen der statischen Kontrollen (jeweils oben besiedelt, unten unbesiedelt, links Sponceram[®] (N), rechts Sponceram[®]-HA).

festgestellt werden. Allerdings wird das in Hydroxylapatit enthaltene Calcium bei diesen Reaktionen mit angefärbt, was zu einer höheren Hintergrundfärbung des Sponceram[®]-HA im Vergleich zu normalem Sponceram[®] führt. Bei den statischen Kontrollen erschien die von-Kossa-Färbung auf Hydroxylapatit deutlich stärker als auf unbeschichtetem Sponceram[®]. Auch bei der Alizarinrot-Färbung war ein solcher Trend erkennbar. Die Färbung der Konstrukte mit Calcein und die Messung der Fluoreszenzintensität zeigte bei normalem Sponceram[®] einen mehr als doppelt so hohen Wert als auf dem mit Hydroxylapatit beschichteten Material (Abbildung 4.52). Diese Beobachtung wurde sowohl bei den dynamisch als auch bei den statisch kultivierten Scheiben gemacht. Der in den beiden anderen Matrixfärbungen beobachtete Trend der stärkeren Calcifizierung auf Hydroxylapatit wurde durch die Calcein-Färbung nicht bestätigt. Unter Berücksichtigung der deutlich geringeren Zellzahl auf Hydroxylapatit war das Ausmaß der Calcifizierung auf beiden Materialien etwa im selben Bereich.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Konstrukte aus dem Z[®] RP-Bioreaktor zeigten auf normalem Sponceram[®] eine dicke gewebeähnliche Schicht, die die gesamte Oberfläche der Keramik bedeckte. Einzelne Zellen konnten nicht ausgemacht werden. Das Gewebe infiltrierte auch Mikroporen und überbrückte teilweise Makroporen. Die Gewebeschicht wies faserartige

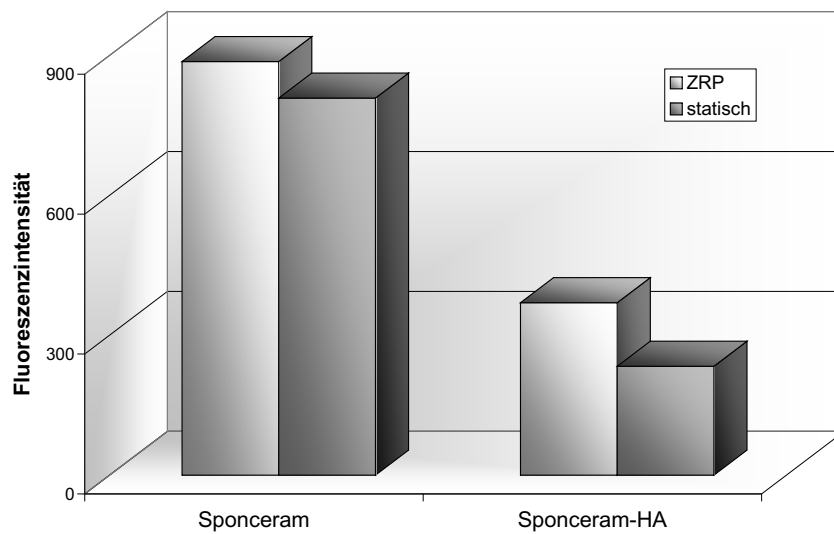


Abbildung 4.52.: Fluoreszenzintensität der Calcein-Färbungen von adMSCs kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor bzw. unter statischen Bedingungen.

Strukturen auf (Abbildung 4.53). An einer Bruchkante konnte die Dicke der Schicht auf über 20 μm abgeschätzt werden (vgl. Abbildung 4.53, oben rechts). Auf Sponceram[®]-HA war die Oberfläche nicht vollständig von Gewebestrukturen bedeckt. Vielmehr waren einzelne Zellen gut sichtbar. Zelluläre Strukturen überbrückten Makroporen und infiltrierte Mikroporen (Pfeile in Abbildung 4.53). Bei der statisch kultivierten Sponceram[®]-Scheibe wurde ebenfalls eine geschlossene Schicht aus Zellen und extrazellulärer Matrix gebildet (Abbildung 4.54). An einigen Stellen zeigten sich auch hier kugelige Gebilde, bei denen es sich wahrscheinlich um Zellen eingebettet in ihre extrazelluläre Matrix handelte. In einem Riss des gebildeten Gewebes waren faserige Strukturen erkennbar, die nach oben durch globuläre Ablagerungen abgeschlossen wurden. Dabei handelte es sich wahrscheinlich um Kollagenfasern, die eine netzartige Matrix bilden und auf die eine mineralische Schicht aufgelagert war. Auf dem mit Hydroxylapatit beschichteten Sponceram[®] war nach statischer Kultivierung keine durchgängige Gewebeschicht abgelagert. Vielmehr zeigten sich einzelne zelluläre Strukturen, die teilweise einzelne Makroporen überbrückten. Bei starker Vergrößerung wurde die beginnende Mineralisierung als globuläre Ablagerungen auf faserartigen Grundstrukturen sichtbar, bei denen es sich wahrscheinlich um Kollagen I handelte.

Bei der Kultivierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (adMSCs) auf Sponceram[®] im Z[®] RP-Bioreaktorsystem wurde das Ziel eines gewebeähnlichen Konstruktes erreicht. Auch bei statischer Kultivierung wurde eine geschlossene dichte Zellschicht mit extrazellulärer Matrix auf Sponceram[®] gebildet. Der Glucoseverbrauch zeigte aber, dass durch die Bioreaktorkultivierung im selben Zeitraum deutlich mehr Biomasse auf-

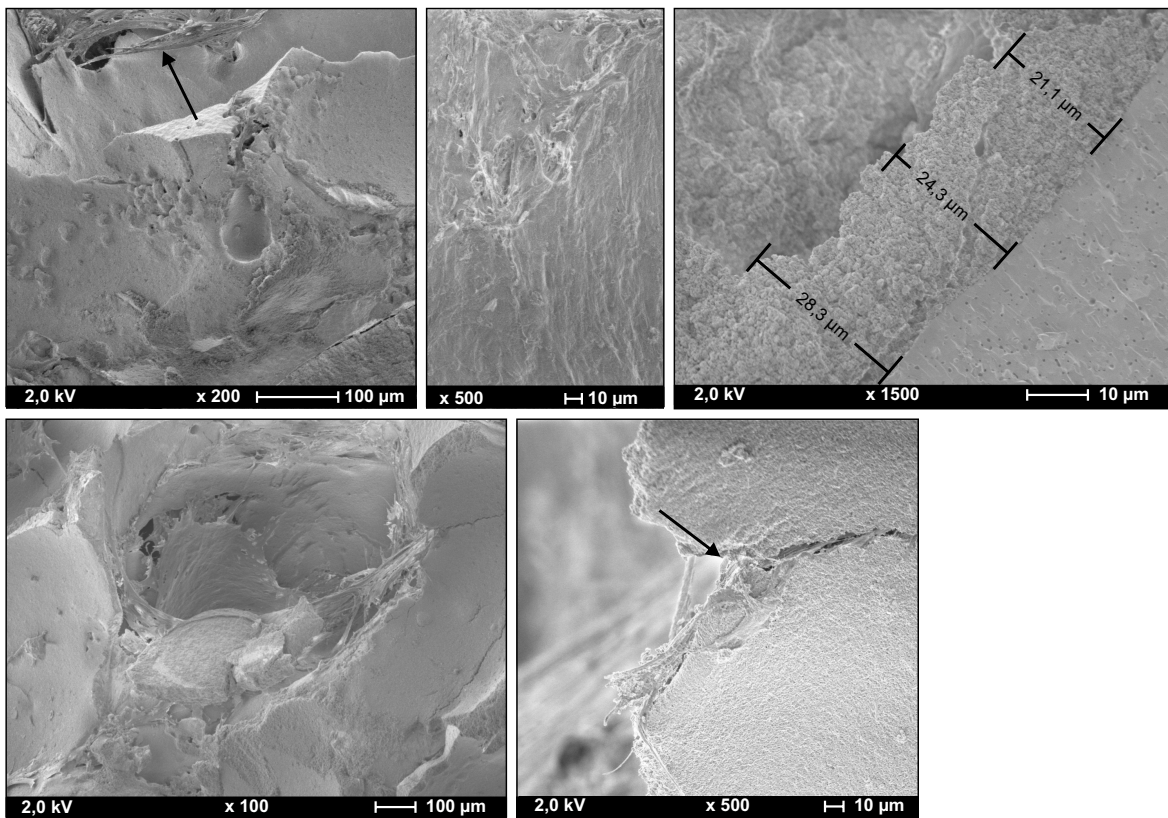


Abbildung 4.53.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von adMSCs kultiviert im Z[®] RP-Bioreaktor. **Oben:** unbeschichtetes Sponceram[®], **unten:** Sponceram[®]-HA. Die Pfeile zeigen auf Poren überbrückende bzw. infiltrierende Zellstrukturen.

gebaut wurde als in statischer Kultur. Auf dem keramischen Gerüst von Sponceram[®] bildete sich eine dicke Schicht, bestehend aus Zellen eingebettet in extrazelluläre Matrix. Während der Kultivierung schritt außerdem die osteogene Differenzierung – ausgelöst durch osteogene Zusätze zum Kulturmedium – voran, was zu einer allmählich sinkenden Aktivität der Alkalischen Phosphatase und vor allem zu einer starken Mineralisierung der extrazellulären Matrix führte.

Überraschenderweise unterschied sich das Zellwachstum auf Sponceram[®] deutlich von dem auf Sponceram[®]-HA. Nur auf Sponceram[®] wurde eine gewebeähnlich dichte Zellschicht beobachtet, auf Sponceram[®]-HA hingegen wuchsen nur einzelne Zellen. Entgegen den Erwartungen zeigte sich die Hydroxylapatit-Beschichtung in diesem Versuch nicht förderlich für das Zellwachstum mesenchymaler Stammzellen. Die anfängliche Untersuchung der Zellviabilität auf kleinen Sponceram[®]-Stückchen hatte solche Ergebnisse nicht angedeutet, sondern gleiche Proliferationsraten auf beiden Materialien gezeigt (Kapitel 4.3.1, Seite 87). Auch bei der vorangegangenen Kultivierung von SAOS-2-Zellen auf Sponceram[®] und Sponceram[®]-HA zeigte

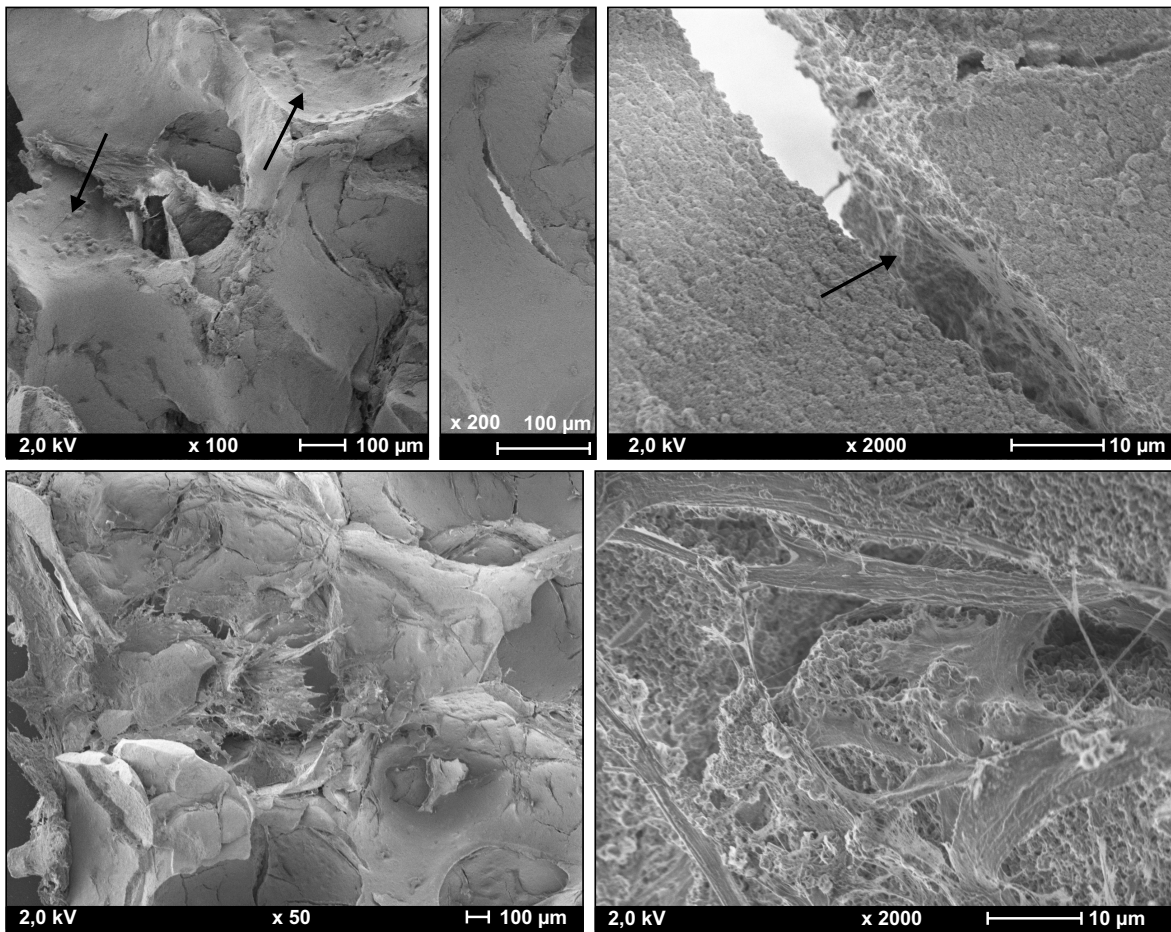


Abbildung 4.54.: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von adMSCs statisch kultiviert. **Oben:** unbeschichtetes Sponceram[®], **unten:** Sponceram[®]-HA. Die Pfeile links oben deuten auf kugelige Gebilde, bei denen es sich wahrscheinlich um in extrazelluläre Matrix eingebettete Zellen handelt. Oben rechts ist die Faserstruktur der extrazellulären Matrix durch einen Pfeil gekennzeichnet.

sich kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Materialien. Es ist also wahrscheinlich, dass ein geringeres Wachstum auf Sponceram[®]-HA auf die verwendeten adMSCs beschränkt ist. Hydroxylapatit wird in der Literatur ausführlich beschrieben und wird im *Tissue Engineering* von Knochen häufig eingesetzt, da es stark osteoinduktiv wirkt^{156,191}. Es ist daher auch möglich, dass die osteogene Differenzierung der Zellen durch die Hydroxylapatit-Beschichtung enorm beschleunigt wird, was zu einer Einstellung der Proliferation führen würde. Die Färbungen der Calcifizierungen waren auf Hydroxylapatit bezogen auf die deutlich geringere Zellzahl mindestens ebenso stark, was diese Hypothese unterstützte. Bei den hier durchgeführten Experimenten war insbesondere die Besiedelung der Hydroxylapatit-Keramik schwierig, was sich zu bereits anfänglich geringeren Raten für Glukoseverbrauch und Laktatproduktion führte. Trotzdem zeigten die Analysen nach der Kultivierung ein Wachstum von Zellen, die über-

dies eine durchaus viable Morphologie aufwiesen. Naheliegend ist also, dass die Beschichtung bestimmte Materialparameter wie die Benetzbarkeit veränderte, so dass der Besiedelungsvorgang (Anhaftung und Infiltration) physikalisch erschwert wird, ohne dass direkter Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation oder Differenzierung genommen wurde. Die Vorexperimente und die Bioreaktorkultivierungen lagen außerdem zeitlich weit auseinander. Für die Kultivierung im Z[®] RP-Reaktor kam eine andere Charge von HA-Scheiben zum Einsatz als für die MTT-Tests im Mikrotiterplatten-Format. Eine chargenbedingte Variation der Sponceram[®]-HA-Eigenschaften war nicht auszuschließen.

Im Z[®] RP-Bioreaktor werden die Zellen einem Flüssigkeitsscherstress ausgesetzt, ausgelöst von der Rotation der Scheiben durch das Medium. Flüssigkeitsscherstress ist ein wesentlicher mechanischer Stimulus im Knochen *in vivo* und es ist bekannt, dass diese Scherkräfte die osteogene Differenzierung induzieren können. Wie stark der Einfluss der Flüssigkeitsscherbeanspruchung (im Vergleich zu den Mediumzusätzen) auf die osteogene Differenzierung der adMSCs in diesem Experiment war, kann nicht abgeschätzt werden. Dafür sind weitere Kultivierungen mit Standard-Proliferationsmedium und unterschiedlichen Konzentrationen an osteogenen Zusätzen erforderlich. Sollte die osteogene Differenzierung im Z[®] RP-Bioreaktor nicht spontan initiiert werden, so ist eine biphasische Kultivierungsstrategie möglich, bei der die Zellen zunächst expandiert werden und die Differenzierung erst später durch gezielten Zusatz von osteogenen Stimulantien induziert wird. Da die Proliferationsrate während der Differenzierung sinkt, könnten auf diese Weise im Vergleich zu der hier durchgeführten Kultivierung, bei der die Differenzierung zu Kultivierungsbeginn induziert wurde, höhere Zelldichten in geringerer Zeit erreicht werden.

In dieser Arbeit wurden erstmalig humane mesenchymale Stammzellen im Z[®] RP-Drehbettreaktorsystem kultiviert und zu Knochengewebe differenziert. Das erzielte Konstrukt wies gewebeartige Zelldichten und eine stark calcifizierte extrazelluläre Matrix auf. Die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff war über die gesamte Kultivierungszeit ausreichend. Über eine Kultivierungszeit von 40 Tagen zeigten die Zellen hohe Proliferationsraten, was zu einem dicht bewachsenen Gewebekonstrukt führte, bei dem die Zellen faserige extrazelluläre Matrix absonderten, auf denen Mineralien kristallisierten.

Mit diesem Versuch wurde das Potenzial des Z[®] RP-Bioreaktorsystems für die Herstellung funktionaler Gewebekonstrukte aufgezeigt. Um im Rahmen des *Tissue Engineerings* Implantate mit gewebeähnlicher Struktur zu generieren, erscheint der Einsatz von Bioreaktoren unverzichtbar. Indem diese die Versorgung der Zellen optimieren, bringen sie gegenüber der statischen Kultivierung Konstrukte mit wesentlich überlegener biologischer und mechanischer Qualität hervor.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Tissue Engineering ist eine vielversprechende Forschungsrichtung, die in naher Zukunft neue Lösungen für die Medizin hervorbringen wird. Bei großen Knochendefekten sieht der bisherige chirurgische Standard eine autologe Knochentransplantation vor. Diese weist jedoch wesentliche Nachteile auf, darunter hauptsächlich die limitierte Verfügbarkeit entnehmbaren Knochengewebes. Die alternative allogene Transplantation von Spenderknochen bringt andererseits die Risiken der Immunreaktion und einer Übertragung von Krankheitserregern mit sich. Auf dem Gebiet des *Tissue Engineerings* wird an der Herstellung von Gewebeimplantaten im Labor gearbeitet, indem Zellen autologen Ursprungs auf Trägermaterialien kultiviert werden.

In dieser Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe für die Generierung funktionalen Knochengewebes eingesetzt. Zunächst wurde die osteogene Differenzierbarkeit dieser Zellen, die im Grunde zur Differenzierung in alle mesenchymalen Gewebe befähigt sind, untersucht. Die Analyse der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase, die Färbungen von mineralisierter Matrix und die Untersuchung der Genexpression typischer Knochenmarker mittels RT-PCR und DNA-Chip-Technologie zeigten, dass die osteogene Differenzierung der adMSCs *in vitro* durch gezielte osteogene Zusätze zum Kulturmedium zu induzieren war.

Für die nähere Untersuchung osteogener Differenzierungsvorgänge wurde ein Protein-Chip entwickelt, mit dem in Zukunft die Anwesenheit von Knochenmarkern während einer Kultivierung im Medium qualitativ und quantitativ untersucht werden kann. Die Eignung einer dreidimensional strukturierten Polymethacrylat-Oberfläche für den Einsatz bei der Protein-Chip-Technologie wurde mit einem Testsystem aus Maus-Immunglobulin und Anti-Maus-Immunglobulin nachgewiesen. Anhand zweier beispielhafter Knochenmarker (Kollagen I und Osteopontin) wurde im Folgenden ein Analysesystem im Sandwich-Format aufgebaut. Ein monoklonaler Fänger-Antikörper, der den Analyten aus dem Gemisch an die Oberfläche band, wurde auf der Oberfläche immobilisiert. Die Detektion erfolgte über einen polyklonalen, an Biotin gekoppelten Antikörper. Mittels eines an Streptavidin gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes waren dann alle an der Oberfläche immobilisierten Analyten in einem Schritt detektierbar. Die Praktikabilität des entwickelten Protein-Chips wurde anhand von Osteopontin nachgewiesen, das im Kulturmedium von Knochenzellen detektiert wurde. Für das in dieser Arbeit etablierte System stehen einige Möglichkeiten zur Weiterentwicklung offen. Der

Detektionsantikörper zum Nachweis von Kollagen I neigte zu unspezifischen Bindungen. Der Chip ist weiterhin auf ein größeres Spektrum von Knochenmarkern auszuweiten, so dass eine detaillierte Analyse des osteogenen Zustandes einer Kultur erreicht wird. In Hinblick auf die Quantifizierung ist besonders die reproduzierbare Herstellung der Oberflächen mit konstanten physikochemischen Eigenschaften weiterhin zu optimieren.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der dynamischen Kultivierung mesenchymaler Stammzellen. Dabei kam einerseits eine mechanische Stimulation in Form von zyklischer Dehnung zum Einsatz und andererseits die Kultivierung in einem Drehbettbioreaktor. Für die Applikation der mechanischen Stimulation wurden in der Feinmechanik- und der Elektronikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover zehn Stimulationsmaschinen mit zugehöriger Steuerung und Bedienungssoftware hergestellt. Diese wurden im Folgenden eingesetzt, um mesenchymale Stammzellen aus dem Fettgewebe auf einem dehnbaren (planaren) Silikonsubstrat einer fünfprozentigen zyklischen Dehnung mit einer Frequenz von einem Hertz zu unterziehen. Die Genexpression typischer Knochenmarker – untersucht mit RT-PCR – zeigte sich deutlich abhängig von Dauer und Wiederholung der applizierten Dehnung. Während eine kurzzeitige Stimulation (bis zu einer Stunde) die Expression von Knochenmarkern, also die osteogene Differenzierung, beschleunigte, führte eine längere und / oder wiederholte Stimulation dazu, dass die Zellen sich an die aktive Umgebung gewöhnten. Die Viabilität der Zellen blieb bei allen Versuchen erhalten.

Da die native Umgebung von Zellen keine planare Oberfläche, sondern ein dreidimensionaler Verband aus Zellen und extrazellulärer Matrix ist, wurde die Applikation der mechanischen Stimulation auf eine dreidimensional strukturierte Gerüstsubstanz ausgeweitet. In einem Kollagen-I-Netzwerk (Matristypt[®]) wurden die Knochenvorläuferzellen MG-63 als Modellzelllinie zyklisch gedehnt (5 %, 1 Hz). Diese Zellen reagierten auf die applizierte mechanische Stimulation mit einer mehrphasigen Regulation der Genexpression von Knochenmarkern. Die Expression dieser Markergene wurde sporadisch induziert und wieder vermindert, bis eine optimale Anpassung an die mechanische Aktivität erfolgt war. Auch hier zeigte sich wieder, dass bereits kurzzeitige Stimulation Auswirkungen auf die osteogene Differenzierung hat, während sich die Zellen längerer und wiederholter Stimulation anpassten. Im Hinblick auf die Anpassung der Zellen an die physikalische Aktivität hat sich besonders ein zeitliches Stimulationsmuster mit kontinuierlich steigender Stimulationsdauer, regelmäßig von Pausen unterbrochen, hervorgetan. Die mechanische Stimulation in Form von zyklischer Dehnung hat sich als hervorragende Methode zur Unterstützung der osteogenen Differenzierung erwiesen. Zusätzlich konnten über eine mechanische Stimulation Zellen an eine aktive Umgebung gewöhnt werden, wodurch die mechanische Stabilität eines Gewebekonstruktes entscheidend verbessert wird. Im Rahmen der Dissertation von Daniel Riechers erfolgt eine Weiterentwicklung der Silikon-schalen, so dass in ihnen ein Impedanzsignal messbar war. Mit der elektrischen Zell-Substrat-

Impedanzmessung (*electric cell-substrate impedance sensing*, ECIS) können adhärenente Zellen online beobachtet und charakterisiert werden. Die isolierende Zellmembran beeinflusst den Wechselstromwiderstand (Impedanz), der abfällt, wenn eine Wechselspannung an Elektroden angelegt wird, auf denen Zellen adhären. Damit sind über Änderungen des Impedanzsignals alle zellulären Prozesse beobachtbar, die einen Einfluss auf den Bedeckungsgrad der Elektroden bzw. auf Zell-Zell- und Zell-Substrat-Kontakte haben. Die Adhäsion von Zellen (Anheftung – Spreitung – Zellwachstum), Zellproliferation, Änderungen der Zellmorphologie (z. B. im Rahmen von Differenzierungsprozessen) und die Absonderung von extrazellulärer Matrix sind direkt messbar. Die Impedanzmessung in den Silikonschalen ist insofern eine Herausforderung, als die Dehnung der Schalen auf die Elektroden übertragen werden muss, wozu die Elektroden selbst dehnbar sein müssen. Um das zu erreichen, können die Elektroden als dünne Schicht auf Silikon aufgedampft werden, so dass sich eine durchgängig dehnbare Oberfläche bildet. Neben der Messung des Impedanzsignals können auch andere Sensoren in die Silikonschalen integriert werden. Durch Überwachung des pH-Wertes und des Sauerstoffpartialdrucks im Kulturmedium sind direkte Rückschlüsse auf das Wachstumsverhalten der Zellen möglich.

Eine große Rolle im *Tissue Engineering* spielt auch das Gerüstmaterial. In dieser Arbeit wurde die auf Zirkondioxid basierende Keramik Sponceram[®], die bereits breite Anwendung für Hüftimplantate und als Zahnersatzmaterial findet, als Gerüstmaterial für die Generierung eines funktionalen Knochenkonstruktes eingesetzt. Durch Modifizierung der Oberfläche eines Materials können Signale an Zellen übermittelt werden, ohne dass Zusatzstoffe zum Kulturmedium nötig sind. Eine solche Funktionalisierung wird erreicht, indem bioaktive Moleküle kovalent oder adsorptiv an der Oberfläche immobilisiert werden. Polymere *Spacer*moleküle werden eingesetzt, um einen Aktivitätsverlust der Moleküle bei der Immobilisierung zu verhindern. In dieser Arbeit wurde die Eignung zweier Polymere (Polymethacrylamidoglukose und Poly[Methacrylamidoglukose-co-Vinylpyrrolidon-co-Acrolein]) als *Spacer* bestätigt. Diese zeigten in Verbindung mit den bioaktiven Liganden keinerlei zytotoxische Eigenschaften. Als bioaktive Liganden kamen Poly-L-Lysin und ein RGD-Peptid zur Verbesserung der Zelladhäsion und BMP-2 zur osteogenen Differenzierung zum Einsatz. Die biologische Wirksamkeit von Poly-L-Lysin und von RGD-Peptid wurde in einem Adhäsionsassay nachgewiesen. Während RGD nach Adsorption ohne *Spacer* von den Zellen nicht mehr erkannt wurde, stellte die Kopplung an einen polymeren *Spacer* seine Wirksamkeit wieder her. Die biologische Wirksamkeit von BMP-2 nach der Kopplung und der Immobilisierung wurde in dieser Arbeit noch nicht eingehend untersucht. Seine osteoinduktiven Eigenschaften auf dem Kompositmaterial müssen noch ausführlich untersucht und mit dem Zusatz von BMP-2 zum Kulturmedium verglichen werden. Die Effektivität dieses Systems zur Funktionalisierung von Oberflächen mit bioaktiven Molekülen konnte erfolgreich bestätigt werden.

Die Generierung eines gewebeartigen Knochenkonstruktes wurde durch Kultivierung mesenchymaler Stammzellen in einem Drehbettbioreaktor erreicht. Die Zellen wurden auf Sponceram[®]-Scheiben im Z[®] RP-Bioreaktorsystem 47 Tage lang kultiviert. Über diesen Zeitraum wurden sie hervorragend versorgt und wiesen gegenüber den statischen Kontrollen in der Petrischale deutlich verstärkte Wachstumsraten auf. Die Analysen nach abgeschlossener Kultivierung erwiesen auf den Keramikscheiben eine dicke, geschlossene Gewebeschicht von hochdicht gewachsenen Zellen. Diese waren eingebettet in eine faserige extrazelluläre Matrix, auf der sich mineralische Kristalle abgelagert hatten. Dieses Bioreaktorsystem ist also hervorragend dazu geeignet, funktionale Gewebekonstrukte zu generieren.

Für Knochenkonstrukte mit optimalen biochemischen und biomechanischen Eigenschaften ist eine Kombination von mechanischer Stimulation und Bioreaktorkultivierung anzustreben. Der Drehbettbioreaktor sorgt für die optimale Ernährung des Konstruktes auch bei hoher Zelldichte, während durch eine mechanische Stimulation die Zellen auf eine physikalisch aktive Umgebung vorbereitet werden. Durch verstärkte Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix werden dabei die mechanischen Eigenschaften des gesamten Konstruktes entscheidend verstärkt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Knochengewebe im Labor hergestellt werden kann, indem mesenchymale Stammzellen auf einem keramischen Gerüst unter dynamischen Bedingungen kultiviert werden. Bis zum klinischen Einsatz solcher *in vitro* generierten Gewebekonstrukte besteht allerdings noch Optimierungsbedarf. Insbesondere muss der zeitliche Rahmen von der Gewebeentnahme für die Isolierung der autologen Zellen bis zur Implantation des konstruierten Gewebes möglichst gering gehalten werden. In Hinblick auf die Bedürfnisse des einzelnen Patienten ist der zeitlich mögliche Aufwand gegen die Ansprüche an die Qualität des Gewebes abzuwägen. Dieser Gesichtspunkt könnte entscheidend beeinflusst werden, wenn die aktuellen Untersuchungen der Immunprivilegien mesenchymaler Zellen bestätigt werden. In diesem Fall wären allogene Transplantationen möglich und damit der Aufbau von Zell- und Gewebebanken, die Produkte auf Vorrat herstellen und lagern könnten. Für autologe Konstrukte ist jedoch weiterhin der zeitliche Aspekt ausschlaggebend. Die Kultivierung in einem Bioreaktor bietet hier den Vorteil der optimalen Nährstoffversorgung, was ein maximales Zellwachstum gewährleistet. Zurzeit erfordern Bioreaktoren allerdings bereits beim Animpfen eine hohe Zellzahl. Diese Strategie ist in Hinblick auf eine mögliche Zeitersparnis zu überdenken. Die Zellexpansion für die Bioreaktorkultivierung unter statischen Bedingungen sollte möglichst kurz gehalten werden, da die rein diffusionskontrollierte Nährstoffversorgung die Zellproliferation limitiert. Bei der Verwendung mesenchymaler Stammzellen erscheint eine Kultivierungsstrategie, bei der die Zellen zunächst in undifferenziertem Zustand expandiert werden, um anschließend gezielt zur Differenzierung angeregt zu werden, ideal. In der letzten Kultivierungsphase ist die Applikation einer mechanischen Stimulation – möglichst integriert in den Bioreaktor – förderlich.

Die Zellen erfahren einen zusätzlichen differenzierenden Reiz und werden auf die zukünftige aktive Umgebung vorbereitet. Bei dieser Anpassung wird die extrazelluläre Matrix verstärkt und dadurch die mechanischen Eigenschaften des gesamten Konstruktes entscheidend verbessert.

Die Herstellung von Gewebekonstrukten für den medizinischen Einsatz als Implantat erfordert die Einhaltung von GMP-Richtlinien zur Qualitätssicherung der Produktionsabläufe und -umgebung. Auf diesem Hintergrund ist die vermehrte Einrichtung von Laborräumen, die den GMP-Richtlinien entsprechen, erforderlich. Bioreaktoren erlauben eine strenge Kontrolle einzelner Kultivierungsparameter und gewährleisten die Reproduzierbarkeit der Gewebeherstellung unter kontrollierten Bedingungen. Dies ist für den medizinischen Einsatz unbedingt erforderlich. Das Z[®] RP-Bioreaktorsystem mit dem *Breeder* ist auf die Anforderungen der GMP-Richtlinien bereits eingerichtet.

Das wachsende Verständnis der dem Gewebewachstum zugrunde liegenden zellulären und molekularen Prozesse wird angewandt, um humane Gewebe *in vitro* zu erzeugen und so die Limitierungen transplantierbarer Gewebe und Organe zu überwinden. Erste kommerzielle *Tissue-Engineering*-Produkte sind in Form von Knorpelkonstrukten und künstlicher Haut in den letzten Jahren auf den Markt gekommen. Auch erste Knochenkonstrukte erreichen bereits Marktreife. Eine einheitliche gesetzliche Regelung betreffend die Einstufung der *Tissue-Engineering*-Produkte als Arzneimittel oder Medizinprodukte steht in naher Zukunft an. Bis zum standardisierten Einsatz von *Tissue-Engineering*-Produkten in der Medizin bedarf es jedoch noch einer weitreichenden Optimierung der Herstellungsprozesse und klinischer Studien im kontrollierten experimentellen Umfeld.

Literaturverzeichnis

- [1] **Abarrategi, A., Civantos, A., Ramos, V., Casado, J.V.S. und Lopez-Lacomba, J.L.** (2007) Chitosan Film as rhBMP2 Carrier: Delivery Properties for Bone Tissue Application *Biomacromolecules*.
- [2] **Abousleiman, R.I. und Sikavitsas, V.I.** (2006) Bioreactors for tissues of the musculoskeletal system *AdvExpMedBiol* 585: 243–259.
- [3] **Aggarwal, S. und Pittenger, M.F.** (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses *Blood* 105 (4): 1815–1822.
- [4] **Ahmad, M., McCarthy, M.B. und Gronowicz, G.** (1999) An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials *Biomaterials* 20 (3): 211–220.
- [5] **Albrektsson, T. und Johansson, C.** (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration *EurSpine J* 10 Suppl 2: S96–101.
- [6] **Alexanian, A.R.** (2005) Neural stem cells induce bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to generate neural stem-like cells via juxtacrine and paracrine interactions *ExpCell Res* 310 (2): 383–391.
- [7] **Altman, G.H., Horan, R.L. et al.** (2002) Cell differentiation by mechanical stress *Faseb J* 16 (2): 270–272.
- [8] **Altman, G.H., Lu, H.H. et al.** (2002) Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering *JBiomechEng* 124 (6): 742–749.
- [9] **Alviano, F., Fossati, V. et al.** (2007) Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro *BMCDevBiol* 7 (1): 11.
- [10] **Arinze, T.L., Tran, T., Mcalary, J. und Daculsi, G.** (2005) A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation *Biomaterials* 26 (17): 3631–3638.
- [11] **Arnhold, S., Klein, H. et al.** (2006) Human bone marrow stroma cells display certain neural characteristics and integrate in the subventricular compartment after injection into the liquor system *EurJ Cell Biol* 85 (6): 551–565.
- [12] **Aubin, J.E.** (1998) Bone stem cells *JCell BiochemSuppl* 30-31: 73–82.
- [13] **Bakker, A., Klein-Nulend, J. und Burger, E.** (2004) Shear stress inhibits while disuse promotes osteocyte apoptosis *BiochemBiophysResCommun* 320 (4): 1163–1168.
- [14] **Baksh, D., Song, L. und Tuan, R.S.** (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy *JCell MolMed* 8 (3): 301–316.

- [15] **Bancroft, G.N., Sikavitsas, V.I. et al.** (2002) Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner *ProcNatlAcadSciUSA* 99 (20): 12600–12605.
- [16] **Bartholomew, A., Sturgeon, C. et al.** (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo *ExpHematol* 30 (1): 42–48.
- [17] **Beyth, S., Borovsky, Z. et al.** (2005) Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness *Blood* 105 (5): 2214–2219.
- [18] **Bjornson, C.R., Rietze, R.L., Reynolds, B.A., Magli, M.C. und Vescovi, A.L.** (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo *Science* 283 (5401): 534–537.
- [19] **Blanc, K.L., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E. und Ringden, O.** (2003) Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex *ScandJ Immunol* 57 (1): 11–20.
- [20] **Breitbach, M., Bostani, T. et al.** (2007) Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts *Blood* 110 (4): 1362–1369.
- [21] **Brekke, J.H. und Toth, J.M.** (1998) Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis *J BiomedMaterRes* 43 (4): 380–398.
- [22] **Brekke, J.H. und Toth, J.M.** (1998) Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis *JBiomedMaterRes* 43 (4): 380–398.
- [23] **Briggs, E.P., Walpole, A.R., Wilshaw, P.R., Karlsson, M. und Palsgard, E.** (2004) Formation of highly adherent nano-porous alumina on Ti-based substrates: a novel bone implant coating *JMaterSciMaterMed* 15 (9): 1021–1029.
- [24] **Brighton, C.T., Sennett, B.J. et al.** (1992) The inositol phosphate pathway as a mediator in the proliferative response of rat calvarial bone cells to cyclical biaxial mechanical strain *JOrthopRes* 10 (3): 385–393.
- [25] **Brighton, C.T., Strafford, B. et al.** (1991) The proliferative and synthetic response of isolated calvarial bone cells of rats to cyclic biaxial mechanical strain *JBone Joint Surg Am* 73 (3): 320–331.
- [26] **Bruder, S.P. und Fox, B.S.** (1999) Tissue engineering of bone. Cell based strategies *ClinOrthopRelat Res* (367 Suppl): S68–S83.
- [27] **Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M. und Kadiyala, S.** (1998) The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects *JBone Joint Surg Am* 80 (7): 985–996.
- [28] **Buckwalter, J.A., Glimcher, M.J., Cooper, R.R. und Recker, R.** (1996) Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function *InstrCourse Lect* 45: 387–399.
- [29] **Burg, K.J., Porter, S. und Kellam, J.F.** (2000) Biomaterial developments for bone tissue engineering *Biomaterials* 21 (23): 2347–2359.
- [30] **Burger, E. und Klein-Nulend, J.** (1999) Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network *Faseb J* 13 (Suppl): 101–112.

- [31] **Calabro, A., Oken, M.M., Hascall, V.C. und Masellis, A.M.** (2002) Characterization of hyaluronan synthase expression and hyaluronan synthesis in bone marrow mesenchymal progenitor cells: predominant expression of HAS1 mRNA and up-regulated hyaluronan synthesis in bone marrow cells derived from multiple myeloma patients *Blood* 100 (7): 2578–2585.
- [32] **Campagnoli, C., Roberts, I.A. et al.** (2001) Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow *Blood* 98 (8): 2396–2402.
- [33] **Caplan, A.I.** (1991) Mesenchymal stem cells *JOrthopRes* 9 (5): 641–650.
- [34] **Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. und Middleton, J.** (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing *Stem Cells* 25 (11): 2739–2749.
- [35] **Charras, G.T. und Horton, M.A.** (2002) Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation *BiophysJ* 82 (6): 2970–2981.
- [36] **Chen, H.C. und Hu, Y.C.** (2006) Bioreactors for tissue engineering *BiotechnolLett* 28 (18): 1415–1423.
- [37] **Cho, K.A., Ryu, S.J. et al.** (2004) Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status *J BiolChem* 279 (40): 42270–42278.
- [38] **Chopp, M. und Li, Y.** (2002) Treatment of neural injury with marrow stromal cells *Lancet Neurol* 1 (2): 92–100.
- [39] **Chresand, T., Gillies, R. und Dale, B.** (1988) Optimum fiber spacing in a hollow fiber bioreactor *BiotechnolBioeng* 32: 983–992.
- [40] **Chunmeng, S. und Tianmin, C.** (2004) Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats *TransplantProc* 36 (5): 1578–1581.
- [41] **Ciapetti, G., Ambrosio, L. et al.** (2003) Osteoblast growth and function in porous poly epsilon -caprolactone matrices for bone repair: a preliminary study *Biomaterials* 24 (21): 3815–3824.
- [42] **Cook, S.D.** (1999) Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites *Orthopedics* 22 (7): 669–671.
- [43] **Corcione, A., Benvenuto, F. et al.** (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions *Blood* 107 (1): 367–372.
- [44] **D. F. Ward, J., Salaszyk, R.M. et al.** (2007) Mechanical strain enhances extracellular matrix-induced gene focusing and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through an extracellular-related kinase-dependent pathway *Stem Cells Dev* 16 (3): 467–480.
- [45] **Davisson, T., Kunig, S., Chen, A., Sah, R. und Ratcliffe, A.** (2002) Static and dynamic compression modulate matrix metabolism in tissue engineered cartilage *JOrthopRes* 20 (4): 842–848.
- [46] **Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P. und Roberts, I.** (2006) The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis *Blood Rev* 20 (3): 161–171.

- [47] **DiGirolamo, C.M., Stokes, D. et al.** (1999) 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 *BrJHaematol* 107 (2): 275–281.
- [48] **Duncan, R.L. und Turner, C.H.** (1995) Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain *CalcifTissue Int* 57 (5): 344–358.
- [49] **Erices, A., Conget, P. und Minguell, J.J.** (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood *BrJHaematol* 109 (1): 235–242.
- [50] **Erices, A., Conget, P., Rojas, C. und Minguell, J.J.** (2002) Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells *ExpCell Res* 280 (1): 24–32.
- [51] **Ferrari, G., Angelis, G.C.D. et al.** (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors *Science* 279 (5356): 1528–1530.
- [52] **Fraser, J.K., Wulur, I., Alfonso, Z. und Hedrick, M.H.** (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology *Trends Biotechnol* 24 (4): 150–154.
- [53] **Freed, L.E., Langer, R., Martin, I., Pellis, N.R. und Vunjak-Novakovic, G.** (1997) Tissue engineering of cartilage in space *ProcNatlAcadSciUSA* 94 (25): 13885–13890.
- [54] **Friedenstein, A.J.** (1976) Precursor cells of mechanocytes *Int RevCytol* 47: 327–359.
- [55] **Friedenstein, A.J.** (1995) Marrow stromal fibroblasts *CalcifTissue Int* 56 Suppl 1: S17.
- [56] **Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. und Lalykina, K.S.** (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells *Cell Tissue Kinet* 3 (4): 393–403.
- [57] **Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K. und Gerasimov, U.V.** (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers *Cell Tissue Kinet* 20 (3): 263–272.
- [58] **Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F. und Keiliss-Borok, I.V.** (1974) Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo *Transplantation* 17 (4): 331–340.
- [59] **Friedenstein, A.J., Latzinik, N.W., Grosheva, A.G. und Gorskaya, U.F.** (1982) Marrow microenvironment transfer by heterotopic transplantation of freshly isolated and cultured cells in porous sponges *ExpHematol* 10 (2): 217–227.
- [60] **Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. und Frolova, G.P.** (1968) Heterotopic transplants of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues *Transplantation* 6 (2): 230–247.
- [61] **Friedl, G., Schmidt, H. et al.** (2007) Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro *OsteoarthritisCartilage* 15 (11): 1293–1300.

- [62] **Genetos, D.C., Geist, D.J., Liu, D., Donahue, H.J. und Duncan, R.L.** (2005) Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts *JBone MinerRes* 20 (1): 41–49.
- [63] **Glimcher, M.J.** (2006) Bone: Nature of the Calcium Phosphate Crystals and Cellular, Structural, and Physical Chemical Mechanisms in Their Formation *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 64 (1): 223–282.
- [64] **Griffon, D.J., Sedighi, M.R., Sendemir-Urkmez, A., Stewart, A.A. und Jamison, R.** (2005) Evaluation of vacuum and dynamic cell seeding of polyglycolic acid and chitosan scaffolds for cartilage engineering *AmJVetRes* 66 (4): 599–605.
- [65] **Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N. und Aubin, J.E.** (1988) Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone *JCell Biol* 106 (6): 2139–2151.
- [66] **Grinnemo, K.H., Mansson, A. et al.** (2004) Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium *J Thorac CardiovascSurg* 127 (5): 1293–1300.
- [67] **Haasper, C., Jagodzinski, M. et al.** (2008) Cyclic strain induces FosB and initiates osteogenic differentiation of mesenchymal cells *ExpToxicolPathol*.
- [68] **Hashimoto-Gotoh, T., Ohnishi, H. et al.** (2004) Bone mass increase specific to the female in a line of transgenic mice overexpressing human osteoblast stimulating factor-1 *J Bone MinerMetab* 22 (3): 278–282.
- [69] **Haynesworth, S.E., Baber, M.A. und Caplan, A.I.** (1992) Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies *Bone* 13 (1): 69–80.
- [70] **Helder, M.N., Knippenberg, M., Klein-Nulend, J. und Wuisman, P.I.** (2007) Stem cells from adipose tissue allow challenging new concepts for regenerative medicine *Tissue Eng* 13 (8): 1799–1808.
- [71] **Hermann, A., Gastl, R. et al.** (2004) Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells *J Cell Sci* 117 (Pt 19): 4411–4422.
- [72] **Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J. et al.** (2002) Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery *Proc NatlAcadSciUSA* 99 (4): 2199–2204.
- [73] **Hollinger, J.O., Hart, C.E., Hirsch, S.N., Lynch, S. und Friedlaender, G.E.** (2008) Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications *J Bone Joint SurgAm* 90 Suppl 1: 48–54.
- [74] **Horwitz, E.M., Gordon, P.L. et al.** (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone *ProcNatlAcadSciUSA* 99 (13): 8932–8937.
- [75] **Horwitz, E.M., Prockop, D.J. et al.** (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta *Nat-Med* 5 (3): 309–313.
- [76] **Horwitz, E.M., Prockop, D.J. et al.** (2001) Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta *Blood* 97 (5): 1227–1231.

- [77] **Ignatius, A., Blessing, H. et al.** (2004) [Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices] *Orthopade* 33 (12): 1386–1393.
- [78] **Ignatius, A., Blessing, H. et al.** (2005) Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices *Biomaterials* 26 (3): 311–318.
- [79] **Igura, K., Zhang, X. et al.** (2004) Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta *Cytotherapy* 6 (6): 543–553.
- [80] **Ingber, D.** (1991) Integrins as mechanochemical transducers *Curr Opin Cell Biol* 3 (5): 841–848.
- [81] **Jagodzinski, M., Drescher, M. et al.** (2004) Effects of cyclic longitudinal mechanical strain and dexamethasone on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells *Eur Cell Mater* 7: 35–41.
- [82] **Jain, R.A.** (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices *Biomaterials* 21 (23): 2475–2490.
- [83] **Javazon, E.H., Beggs, K.J. und Flake, A.W.** (2004) Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging *Exp Hematol* 32 (5): 414–425.
- [84] **Jiang, X.X., Zhang, Y. et al.** (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells *Blood* 105 (10): 4120–4126.
- [85] **Jing, Y., Li, L. et al.** (2006) [The effect of mechanical strain on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from rats] *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 23 (3): 542–545.
- [86] **Jorgensen, N.R., Geist, S.T., Civitelli, R. und Steinberg, T.H.** (1997) ATP- and gap junction-dependent intercellular calcium signaling in osteoblastic cells *J Cell Biol* 139 (2): 497–506.
- [87] **Jorgensen, N.R., Henriksen, Z., Sorensen, O.H. und Civitelli, R.** (2004) 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 *Steroids* 69 (4): 219–226.
- [88] **Kaspar, D., Neidlinger-Wilke, C., Holbein, O., Claes, L. und Ignatius, A.** (2003) Mitogens are increased in the systemic circulation during bone callus healing *J Orthop Res* 21 (2): 320–325.
- [89] **Kaspar, D., Seidl, W. et al.** (2002) Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain *J Biomech* 35 (7): 873–880.
- [90] **Keilhoff, G., Goihl, A., Langnase, K., Fansa, H. und Wolf, G.** (2006) Trans-differentiation of mesenchymal stem cells into Schwann cell-like myelinating cells *Eur J Cell Biol* 85 (1): 11–24.
- [91] **Kim, B.S. und Mooney, D.J.** (2000) Scaffolds for engineering smooth muscle under cyclic mechanical strain conditions *J Biomech Eng* 122 (3): 210–215.
- [92] **Knazek, R., Gullino, P., Kohler, P. und Dedrick, R.** (1972) Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro *Science* 178: 65–67.

- [93] **Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. und Yamamoto, S.** (1981) Establishment of a Clonal Osteogenic Cell Line from Newborn Mouse Calvaria *Japan Journal of Oral Biology* 23: 899–901.
- [94] **Koike, M., Shimokawa, H., Kanno, Z., Ohya, K. und Soma, K.** (2005) Effects of mechanical strain on proliferation and differentiation of bone marrow stromal cell line ST2 *JBone MinerMetab* 23 (3): 219–225.
- [95] **Kon, E., Muraglia, A. et al.** (2000) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones *JBiomaterRes* 49 (3): 328–337.
- [96] **Korzhikov, V., Roeker, S., Vlach, E., Kasper, C. und Tennikova, T.** (2008) Synthesis of Multifunctional Polyvinylsaccharide Containing Controllable Amounts of Biospecific Ligands *BioconjugChem.*
- [97] **Krampera, M., Glennie, S. et al.** (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide *Blood* 101 (9): 3722–3729.
- [98] **Langer, R. und Vacanti, J.P.** (1993) Tissue engineering *Science* 260 (5110): 920–926.
- [99] **Lebaron, R.G. und Athanasiou, K.A.** (2000) Extracellular matrix cell adhesion peptides: Functional applications in orthopedic materials *Tissue Engineering* 6 (2): 85–103.
- [100] **Lendeckel, S., Jodicke, A. et al.** (2004) Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report *J CraniomaxillofacSurg* 32 (6): 370–373.
- [101] **Leung, D.Y., Glagov, S. und Mathews, M.B.** (1976) Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro *Science* 191 (4226): 475–477.
- [102] **Li, H., Zhai, W. und Chang, J.** (2008) In vitro biocompatibility assessment of PHBV/Wollastonite composites *J MaterSciMaterMed* 19 (1): 67–73.
- [103] **Li, H., Zhai, W. und Chang, J.** (2008) In vitro biocompatibility assessment of PHBV/Wollastonite composites *J MaterSciMaterMed* 19 (1): 67–73.
- [104] **Li, Y., Ma, T., Kniss, D.A., Lasky, L.C. und Yang, S.T.** (2001) Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices *BiotechnolProg* 17 (5): 935–944.
- [105] **Liedert, A., Kaspar, D., Blakytyn, R., Claes, L. und Ignatius, A.** (2006) Signal transduction pathways involved in mechanotransduction in bone cells *BiochemBiophysRes Commun* 349 (1): 1–5.
- [106] **Locatelli, F., Maccario, R. und Frassoni, F.** (2007) Mesenchymal stromal cells, from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica* 92 (7): 872–877.
- [107] **Lu, J., Moochhala, S. et al.** (2006) Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury *NeurosciLett* 398 (1-2): 12–17.

- [108] **Lu, L., Valenzuela, R.G. und Yaszemski, M.J.** (2000) Articular Cartilage Tissue Engineering *e-biomed: The Journal of Regenerative Medicine* 1 (7): 99–114.
- [109] **MacKenna, D.A., Dolfi, F., Vuori, K. und Ruoslahti, E.** (1998) Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts *JClinInvest* 101 (2): 301–310.
- [110] **Marcacci, M., Kon, E. et al.** (2007) Stem Cells Associated with Macroporous Bioceramics for Long Bone Repair: 6- to 7-Year Outcome of a Pilot Clinical Study *Tissue Engineering* 13 (5): 947–955.
- [111] **Martin, I., Muraglia, A., Campanile, G., Cancedda, R. und Quarto, R.** (1997) Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow *Endocrinology* 138 (10): 4456–4462.
- [112] **Martin, I., Wendt, D. und Heberer, M.** (2004) The role of bioreactors in tissue engineering *Trends Biotechnol* 22 (2): 80–86.
- [113] **Martin, Y. und Vermette, P.** (2005) Bioreactors for tissue mass culture: design, characterization, and recent advances *Biomaterials* 26 (35): 7481–7503.
- [114] **Mauck, R.L., Soltz, M.A. et al.** (2000) Functional tissue engineering of articular cartilage through dynamic loading of chondrocyte-seeded agarose gels *JBiomechEng* 122 (3): 252–260.
- [115] **Mauney, J.R., Sjostrom, S. et al.** (2004) Mechanical Stimulation Promotes Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells on 3-D Partially Demineralized Bone Scaffolds In Vitro *CalcifTissue Int.*
- [116] **Mazzini, L., Mareschi, K. et al.** (2006) Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis *NeurolRes* 28 (5): 523–526.
- [117] **McAllister, T.N., Du, T. und Frangos, J.A.** (2000) Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells *BiochemBiophysResCommun* 270 (2): 643–648.
- [118] **Mikos, A.G., Herring, S.W. et al.** (2006) Engineering complex tissues *Tissue Eng* 12 (12): 3307–3339.
- [119] **Miura, M., Miura, Y. et al.** (2006) Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation *Stem Cells* 24 (4): 1095–1103.
- [120] **Müller, C.W., van Griensven, M. et al.** (2004) Beta-tricalciumphosphate as a synthetic bone graft compromises bone healing in a femur defect of the rat *Cytotherapy* 6 (3): 269.
- [121] **Müller, T. und Sebald, W.** (2007) Wie BMPx (bone morphogenetic proteins) ihre Rezeptoren binden und aktivieren *Biospektrum* 13 (03): 236–240.
- [122] **Mooney, D.J. und Mikos, A.G.** (1999) Growing new organs *SciAm* 280 (4): 60–65.
- [123] **Mörike, Betz und Mergenthaler** *Biologie des Menschen* (Quelle und Meyer Verlag Wiesbaden, 1997).
- [124] **Nakahara, H., Dennis, J.E. et al.** (1991) In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells *ExpCell Res* 195 (2): 492–503.

- [125] **Nauta, A.J. und Fibbe, W.E.** (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells *Blood* 110 (10): 3499–3506.
- [126] **Neidlinger-Wilke, C., Wilke, H.J. und Claes, L.** (1994) Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application *JOrthopRes* 12 (1): 70–78.
- [127] **Ng, K.W., Gummer, P.R. et al.** (1988) Regulation of alkaline phosphatase expression in a neonatal rat clonal calvarial cell strain by retinoic acid *JBone MinerRes* 3 (1): 53–61.
- [128] **Nicola, M.D., Carlo-Stella, C. et al.** (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli *Blood* 99 (10): 3838–3843.
- [129] **Niklason, L.E., Gao, J. et al.** (1999) Functional arteries grown in vitro *Science* 284 (5413): 489–493.
- [130] **Owen, T.A., Aronow, M. et al.** (1990) 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 *J Cell Physiol* 143 (3): 420–430.
- [131] **Park, J.S., Kim, H.Y. et al.** (2005) Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells *MechAgeing Dev* 126 (5): 551–559.
- [132] **Perka, C., Schultz, O. et al.** (2000) Segmental bone repair by tissue-engineered periosteal cell transplants with bioresorbable fleece and fibrin scaffolds in rabbits *Biomaterials* 21 (11): 1145–1153.
- [133] **Petersen, B.E., Bowen, W.C. et al.** (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells *Science* 284 (5417): 1168–1170.
- [134] **Petite, H., Viateau, V. et al.** (2000) Tissue-engineered bone regeneration *NatBiotechnol* 18 (9): 959–963.
- [135] **Piconi, C. und Maccauro, G.** (1999) Zirconia as a ceramic biomaterial *Biomaterials* 20 (1): 1–25.
- [136] **Pittenger, M.F., Mackay, A.M. et al.** (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science* 284 (5411): 143–147.
- [137] **Potter, K., Butler, J.J. et al.** (1998) Cartilage formation in a hollow fiber bioreactor studied by proton magnetic resonance microscopy *Matrix Biol* 17 (7): 513–523.
- [138] **Quarto, R., Mastrogiacomo, M. et al.** (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells *NEnglJMed* 344 (5): 385–386.
- [139] **Rai, B., Teoh, S.H. und Ho, K.H.** (2005) An in vitro evaluation of PCL-TCP composites as delivery systems for platelet-rich plasma *Journal of Controlled Release* 107 (2): 330–342.
- [140] **Raiche, A.T. und Puleo, D.A.** (2004) Cell responses to BMP-2 and IGF-I released with different time-dependent profiles *JBiomed MaterResA* 69 (2): 342–350.

- [141] **Reich, K.M., McAllister, T.N., Gudi, S. und Frangos, J.A.** (1997) Activation of G proteins mediates flow-induced prostaglandin E2 production in osteoblasts *Endocrinology* 138 (3): 1014–1018.
- [142] **Reyes, M., Lund, T. et al.** (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells *Blood* 98 (9): 2615–2625.
- [143] **Reyes, M. und Verfaillie, C.M.** (2001) Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells *AnnNYAcadSci* 938: 231–233.
- [144] **Robling, A.G., Castillo, A.B. und Turner, C.H.** (2006) Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling *AnnuRevBiomedEng* 8: 455–498.
- [145] **Rodan, G.A. und Noda, M.** (1991) Gene expression in osteoblastic cells *Crit RevEukaryotGene Expr* 1 (2): 85–98.
- [146] **Rogers, I. und Casper, R.F.** (2003) Stem cells: you can't tell a cell by its cover *HumReprodUpdate* 9 (1): 25–33.
- [147] **Romanov, Y.A., Svintsitskaya, V.A. und Smirnov, V.N.** (2003) Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord *Stem Cells* 21 (1): 105–110.
- [148] **Rubin, J., Murphy, T.C., Fan, X., Goldschmidt, M. und Taylor, W.R.** (2002) Activation of extracellular signal-regulated kinase is involved in mechanical strain inhibition of RANKL expression in bone stromal cells *JBone MinerRes* 17 (8): 1452–1460.
- [149] **Rubio, D., Garcia-Castro, J. et al.** (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation *Cancer Res* 65 (8): 3035–3039.
- [150] **Sachlos, E., Gotor, D. und Czernuszka, J.T.** (2006) Collagen scaffolds reinforced with biomimetic composite nano-sized carbonate-substituted hydroxyapatite crystals and shaped by rapid prototyping to contain internal microchannels *Tissue Eng* 12 (9): 2479–2487.
- [151] **Saini, S. und Wick, T.M.** (2003) Concentric cylinder bioreactor for production of tissue engineered cartilage: effect of seeding density and hydrodynamic loading on construct development *BiotechnolProg* 19 (2): 510–521.
- [152] **Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K. und Muneta, T.** (2005) Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source *Arthritis Rheum* 52 (8): 2521–2529.
- [153] **Sakai, K., Mohtai, M. und Iwamoto, Y.** (1998) Fluid shear stress increases transforming growth factor beta 1 expression in human osteoblast-like cells: modulation by cation channel blockades *CalcifTissue Int* 63 (6): 515–520.
- [154] **Salgado, A.J., Coutinho, O.P. und Reis, R.L.** (2004) Bone tissue engineering: state of the art and future trends *MacromolBiosci* 4 (8): 743–765.
- [155] **Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L. und Davies, J.E.** (2007) In vivo response to starch-based scaffolds designed for bone tissue engineering applications *J BiomedMaterRes A* 80 (4): 983–989.
- [156] **Shu, R., McMullen, R., Baumann, M.J. und McCabe, L.R.** (2003) Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts *J BiomedMaterRes A* 67 (4): 1196–1204.

- [157] **Si, W., Kang, Q. et al.** (2006) CCN1/Cyr61 is regulated by the canonical Wnt signal and plays an important role in Wnt3A-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells *MolCell Biol* 26 (8): 2955–2964.
- [158] **Sikavitsas, V.I., Bancroft, G.N. und Mikos, A.G.** (2002) Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor *JBiomedMaterRes* 62 (1): 136–148.
- [159] **Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S. und Mikos, A.G.** (2001) Biomaterials and bone mechanotransduction *Biomaterials* 22 (19): 2581–2593.
- [160] **Simmons, C.A., Matlis, S. et al.** (2003) Cyclic strain enhances matrix mineralization by adult human mesenchymal stem cells via the extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) signaling pathway *J Biomech* 36 (8): 1087–1096.
- [161] **Sordi, V., Malosio, M.L. et al.** (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets *Blood* 106 (2): 419–427.
- [162] **Sottile, V., Halleux, C., Bassilana, F., Keller, H. und Seuwen, K.** (2002) Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells *Bone* 30 (5): 699–704.
- [163] **Studený, M., Marini, F.C. et al.** (2002) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors *Cancer Res* 62 (13): 3603–3608.
- [164] **Suck, K., Behr, L. et al.** (2007) Bone tissue generation from a newly developed material (Sponceram) using a rotating bed system bioreactor (Biostat RBS) *J Biomed-MaterRes A* 80 (2): 268–275.
- [165] **Sudres, M., Norol, F. et al.** (2006) Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice *J Immunol* 176 (12): 7761–7767.
- [166] **Sumanasinghe, R.D., Bernacki, S.H. und Lobo, E.G.** (2006) Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen matrices: effect of uniaxial cyclic tensile strain on bone morphogenetic protein (BMP-2) mRNA expression *Tissue Eng* 12 (12): 3459–3465.
- [167] **'t Anker, P.S.I., Noort, W.A. et al.** (2003) Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential *Haematologica* 88 (8): 845–852.
- [168] **'t Anker, P.S.I., Scherjon, S.A. et al.** (2003) Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation *Blood* 102 (4): 1548–1549.
- [169] **Taipale, J. und Keski-Oja, J.** (1997) Growth factors in the extracellular matrix *Faseb J* 11 (1): 51–59.
- [170] **Taupin, P.** (2006) Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system *AnnAcadMedSingapore* 35 (11): 814–820.
- [171] **Termine, J.D., Kleinman, H.K. et al.** (1981) Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen *Cell* 26 (1 Pt 1): 99–105.
- [172] **Triffitt, J.T.** MSCs and Osteoblasts in R.L.G. Bilezikian J. P. und G.A. Rodan (Hg.), *Principles of Bone Biology - Volume I* Kapitel 4, 39–81 (Academic Press, San Diego, 2002) 2 Auflage.

- [173] **Tsutsumi, S., Shimazu, A. et al.** (2001) Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF *BiochemBiophysResCommun* 288 (2): 413–419.
- [174] **Uccelli, A., Pistoia, V. und Moretta, L.** (2007) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol* 28 (5): 219–226.
- [175] **Ugarte, D.A.D., Morizono, K. et al.** (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow *Cells TissuesOrgans* 174 (3): 101–109.
- [176] **Urist, M.R.** (1965) Bone: formation by autoinduction *Science* 150 (698): 893–899.
- [177] **van Griensven, M., Zeichen, J. et al.** (2003) Cyclic mechanical strain induces NO production in human patellar tendon fibroblasts—a possible role for remodelling and pathological transformation *ExpToxicolPathol* 54 (4): 335–338.
- [178] **Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B., Martin, I. und Freed, L.E.** (2002) Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage *Biorheology* 39 (1-2): 259–268.
- [179] **Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B. et al.** (1998) Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering *BiotechnolProg* 14 (2): 193–202.
- [180] **Wakitani, S., Saito, T. und Caplan, A.I.** (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine *Muscle Nerve* 18 (12): 1417–1426.
- [181] **Warburg, O.** (1923) Versuche an überlebendem Carcinomgewebe *BiochemZ* 142: 317–333.
- [182] **Wendt, D., Marsano, A., Jakob, M., Heberer, M. und Martin, I.** (2003) Oscillating perfusion of cell suspensions through three-dimensional scaffolds enhances cell seeding efficiency and uniformity *BiotechnolBioeng* 84 (2): 205–214.
- [183] **Weyts, F.A., Bosmans, B., Niesing, R., van Leeuwen, J.P. und Weinans, H.** (2003) Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation *CalcifTissue Int* 72 (4): 505–512.
- [184] **Wiesmann, A., Buhning, H.J., Mentrup, C. und Wiesmann, H.P.** (2006) Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation *Head FaceMed* 2: 8.
- [185] **Williams, S., Callies, R. und Brindle, K.** (1997) Mapping of oxygen tension and cell distribution in a hollow-fiber bioreactor using magnetic resonance imaging *BiotechnolBioeng* 56: 56–61.
- [186] **Wislet-Gendebien, S., Wautier, F., Leprince, P. und Rogister, B.** (2005) Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin *Brain Res Bull* 68 (1-2): 95–102.
- [187] **Wolbank, S., Peterbauer, A. et al.** (2007) Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue *Tissue Eng* 13 (6): 1173–1183.
- [188] **Yamagoe, S., Kameoka, Y., Hashimoto, K., Mizuno, S. und Suzuki, K.** (1998) Molecular cloning, structural characterization, and chromosomal mapping of the human LECT2 gene *Genomics* 48 (3): 324–329.

- [189] **Yang, S., Leong, K.F., Du, Z. und Chua, C.K.** (2001) The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors *Tissue Eng* 7 (6): 679–689.
- [190] **Yoon, S.T. und Boden, S.D.** (2002) Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies *ClinOrthopRelat Res* (395): 33–43.
- [191] **Yoshikawa, H. und Myoui, A.** (2005) Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics *J Artif Organs* 8 (3): 131–136.
- [192] **You, L., Cowin, S.C., Schaffler, M.B. und Weinbaum, S.** (2001) A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix *J Biomech* 34 (11): 1375–1386.
- [193] **Zappia, E., Casazza, S. et al.** (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy *Blood* 106 (5): 1755–1761.
- [194] **Zhang, H., Ahmad, M. und Gronowicz, G.** (2003) Effects of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials *Biomaterials* 24 (12): 2013–2020.
- [195] **Zhou, Z., Jiang, E.L. et al.** (2005) [Comparative study on various subpopulations in mesenchymal stem cells of adult bone marrow.] *Zhongguo Shi YanXueYeXueZa Zhi* 13 (1): 54–58.
- [196] **Zimmermann, W.H., Schneiderbanger, K. et al.** (2002) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct *CircRes* 90 (2): 223–230.
- [197] **Zuk, P.A., Zhu, M. et al.** (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies *Tissue Eng* 7 (2): 211–228.
- [198] **Zuk, P.A., Zhu, M. et al.** (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells *MolBiolCell* 13 (12): 4279–4295.
- [199] **Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L. et al.** (2000) Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals *Arthritis Res* 2 (6): 477–488.

Verzeichnis der Anhänge

A. Statistik	132
B. Analyse der osteogenen Differenzierung	133
B.1. Zellkultur	133
B.1.1. Aktivität der Alkalischen Phosphatase	134
B.1.2. PicoGreen- <i>Assay</i>	135
B.1.3. Färbung von mineralisierter extrazellulärer Matrix	135
B.2. RT-PCR	140
B.2.1. RNA-Isolierung	140
B.2.2. cDNA-Synthese für RT-PCR	140
B.2.3. PCR	141
B.3. DNA-Chip	145
B.3.1. DNA-Chip	145
B.4. Protein-Chip	154
B.4.1. Herstellung der Träger für die Protein- <i>Microarrays</i>	154
B.4.2. Protein-Chips mit Maus-Immunglobulin G als Testsystem	155
B.4.3. Protein-Chip zum Nachweis von humanem Osteopontin und Kollagen I	155
C. Mechanische Stimulation	158
C.1. Stimulation mesenchymaler Stammzellen auf einer zweidimensionalen Kultur- oberfläche	159
C.2. Stimulation einer Modellzelllinie in einem dreidimensionalen Kollagennetzwerk	161
D. Kultivierung im Bioreaktor	166
D.1. Zellwachstum auf Sponceram	166
D.2. Oberflächenmodifikation von Sponceram	166
D.3. Kultivierung im Drehbettreaktor	168
Lebenslauf	173
Publikationsliste	174

A. Statistik

Für Ergebnisse aus mehreren Einzelerperimenten wurden Mittelwert und Standardfehler berechnet. Um Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen statistisch zu verifizieren, wurden die Daten auf Normalverteilung und gleiche Varianzen geprüft und im Anschluss ein studentischer t -Test durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als statistisch signifikant gewertet ab $p < 0,05$. Waren die Proben nicht normalverteilt oder wiesen ungleiche Varianzen auf, so wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Bei mehreren voneinander unabhängigen Eingangsgrößen (x_1, x_2, \dots) mit den zugehörigen Fehlern ($\Delta x_1, \Delta x_2, \dots$) wurde der Fehler des aus den Mittelwerten der Eingangsgrößen errechneten Ergebnisses (Δy) anhand der Fehlerfortpflanzung nach Gauß berechnet:

$$\Delta y = \sqrt{\left(\frac{\partial y}{\partial x_1} \cdot \Delta x_1\right)^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_2} \cdot \Delta x_2\right)^2 + \dots} \quad . \quad (\text{A.1})$$

B. Analyse der osteogenen Differenzierung

B.1. Zellkultur

AdMSCs Die mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe (adMSCs) wurden vom Österreichischen Roten Kreuz in Linz bezogen. Insgesamt kamen bei den Versuchen die Zellen von drei weiblichen Spendern zum Einsatz. Beim Österreichischen Roten Kreuz wurden die Zellen vor dem Versand auf ihre Differenzierbarkeit, ihre Oberflächenantigene und ihre Vitalität nach dem Einfrieren/Auftauen getestet. In Tabelle B.1 sind die Informationen über den jeweiligen Spender und die Versuche, für die die jeweiligen Zellen benutzt wurden, zusammengefasst.

MG-63 (ECACC Nr. 86051601) wurden von der Europäischen Sammlung für Zellkulturen (ECACC) bezogen. Es handelt sich um humane Osteoblasten-artige Zellen, die ursprünglich aus einem Osteosarkom isoliert worden sind.

SAOS-2 (ACC 243) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. SAOS-2 sind humane Osteosarkomzellen, die adhärent in einer Monoschicht (*Monolayer*) wachsen und eine Verdopplungszeit von etwa 43 Stunden aufweisen.

Tabelle B.1.: Interne Bezeichnung der unterschiedlichen adMSCs, Geburtsjahr der jeweiligen Spenderin und Versuchsreihen, bei denen die jeweiligen Zellen eingesetzt wurden.

Interne Bezeichnung	Geburtsjahr der Spenderin	Versuchsreihen
huF 35	1955	Voruntersuchungen, DNA-Chip
huF 53	1982	mechanische Stimulation (15 min, 60 min, 2 h), DNA-Chip
huF 68	1983	Z [®] RP-Lauf

MC3T3-E1 (ACC210) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Sie wurden ursprünglich aus dem Schädeldach eines Mäuseembryos isoliert und wachsen adhärent in einem Monolayer mit einer Verdopplungszeit von 2–3 Tagen. MC3T3-E1-Zellen können leicht zu Kollagen-I-produzierenden Osteoblasten differenzieren⁹³.

Die primären MSCs und die Zelllinien MG-63, SAOS-2 und MC3T3-E1 wurden in Zellkulturflaschen bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Feuchtigkeit kultiviert. AdMSCs wurden einmal in drei bis fünf Wochen passagiert, das Medium wurde einmal pro Woche zu 75 % ersetzt. MG-63, SAOS-2 und MC3T3-E1 wurden einmal pro Woche 1 : 10 geteilt, ihr Medium zweimal pro Woche komplett ausgetauscht. Für die Expansion der Zellen wurde Standard-Proliferationsmedium verwendet. Um die Knochenvorläuferzellen MG-63 und MC3T3-E1 bzw. die mesenchymalen Stammzellen gezielt zu Knochenzellen zu differenzieren, wurden Medien mit osteogenen Zusätzen (Differenzierungsmedium und BMP-2-Medium) verwendet.

Standard-Proliferationsmedium (NM)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)

10 % fetales Kälberserum (FCS)

50 U/mL Penicillin

50 µg/mL Streptomycin

Für die adMSCs wurden zusätzlich 2 mM L-Glutamin zugesetzt.

Differenzierungsmedium (DM-10)

Standard-Proliferationsmedium

10 nM Dexamethason

0,3 mM Ascorbinsäure

10 mM β-Glycerolphosphat

BMP-2-Medium (BMP x)

Differenzierungsmedium

x (= 10–50) ng/mL BMP-2

B.1.1. Aktivität der Alkalischen Phosphatase

In einer 96-Loch-Platte wurden pro Vertiefung 5.000 Zellen in 200 µL Medium ausplattiert. Während der folgenden Kultivierung wurde nach Bedarf das Medium gewechselt.

Nach dem entsprechenden Zeitraum der Kultivierung wurde das Medium abgezogen und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Pro Vertiefung wurden 200 µL PBS zugegeben und die Platte

wurde bis zum Test eingefroren. Dadurch wurden die Zellen aufgebrochen, so dass die Alkalische Phosphatase für die Messung zugänglich wurde. Zu je 50 μL der Proben wurden 125 μL p-Nitrophenylphosphat (*Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA*) gegeben, das von der Alkalischen Phosphatase während der folgenden halbstündigen Inkubation bei 37° C zu gelbem Nitrophenol umgesetzt wurde. Die Konzentration dieses Farbstoffs wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 405 nm im Plattenlesegerät bestimmt. Die Extinktion E_{405} wurde auf die Zellzahl normiert, indem sie auf den DNA-Gehalt der Zellen (gemessen mit dem PicoGreen[®]-Assay s.u.) bezogen wurde.

B.1.2. PicoGreen-Assay

Für die Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die Proben 1:5 mit TE-Puffer verdünnt und zu 100 μL der verdünnten Proben wurden 100 μL PicoGreen[®]-Verdünnung (0,5 μL PicoGreen[®] in 99,5 μL TE-Puffer) gegeben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur fünf Minuten im Dunkeln inkubiert und die Fluoreszenzintensität dann im Fluoreszenzlesegerät gemessen (Exzitation: 485 nm, Emission: 539 nm). Um die DNA-Konzentration bestimmen zu können, wurde eine Standardreihe mit DNA aus Heringssperma (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) hergestellt und zusammen mit den Proben gemessen.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 7,4

B.1.3. Färbung von mineralisierter extrazellulärer Matrix

AdMSCs (huF 35) wurden in 24-Loch-Platten für bis zu zwei Wochen mit unterschiedlichen Medien kultiviert: Standard-Proliferationsmedium (NM), osteogenes Differenzierungsmedium mit 10 nM bzw. 1 μM Dexamethason (DM-10 bzw. -1000) und BMP-2-haltigem Differenzierungsmedium mit 10, 20 bzw. 50 ng/mL BMP-2 (BMP 10, BMP 20, BMP 50). Mediumwechsel wurden nach Bedarf durchgeführt.

Von Kossa Bei der Färbung nach von Kossa werden Calcium-Ionen im Gewebe durch Silber-Ionen ersetzt, die dann zu elementarem Silber reduziert werden. Die Schwarzfärbung zeigt damit Stellen im Gewebe mit hohem Calciumgehalt, also besonders die durch Calciumeinlagerung mineralisierte extrazelluläre Matrix, an. Nach 7, 11 bzw. 14 Tagen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für mindestens 30 Minuten mit eiskaltem Ethanol bei -20° C

fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit ddH₂O gewaschen und dann 30 Minuten im Dunkeln mit einer Silbernitratlösung (5 % in ddH₂O) bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Silbernitratlösung wurde durch dreimaliges Waschen mit ddH₂O entfernt. Die in die Matrix eingedrungenen Silber-Ionen wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht zu metallischem Silber reduziert. Der Hintergrund wurde mit Natriumthiosulfat (5 % in ddH₂O) entfärbt (2 min).

Alizarinrot Calcium in der mineralisierten extrazellulären Matrix kann auch mit Alizarinrot angefärbt werden, das einen Chelatkomplex mit Calcium eingeht. Die Proben wurden wie oben beschrieben mit PBS gewaschen, mit Ethanol fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie 15 Minuten mit einer Alizarinrot-Lösung (1 % in 2 % Ethanol) inkubiert wurden. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt.

Geräte

Inkubator (Hera Cell 240)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Lichtmikroskop	Axiophot, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlesegerät	
Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Phasenkontrastmikroskope	Olympus BX, Japan
	Olympus IX 50, Japan
Plattenlesegerät	
Model 680 Microplate Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Sterilwerkbänke	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Integra Bioscience AG, Zürich
Zentrifuge	Kendro Laboratory Products, Osterode

Verbrauchsmaterialien

Flaschenaufsatzfilter (0,22 µm)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Mikrotiterplatten	Sarstedt AG, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Reagiergefäße	Sarstedt AG, Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm)	Sartorius stedim, Göttingen
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht

Chemikalien

Alizarinrot S	Fluka Chemie AG, Seelze
Antibiotika (Penicillin/Streptomycin)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ascorbinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BMP-2	Spende von Prof. Sebald, Universität Würzburg
Dexamethason	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β -Glycerolphosphat	Fluka Chemie AG, Seelze
DMEM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PicoGreen [®]	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
p-Nitrophenylphosphat <i>Alkaline Phos-</i> <i>phatase Yellow (pNPP) Liquid</i> <i>Substrate System for ELISA</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin (HyQ [®])	HyClone, Perbio Science, Bonn

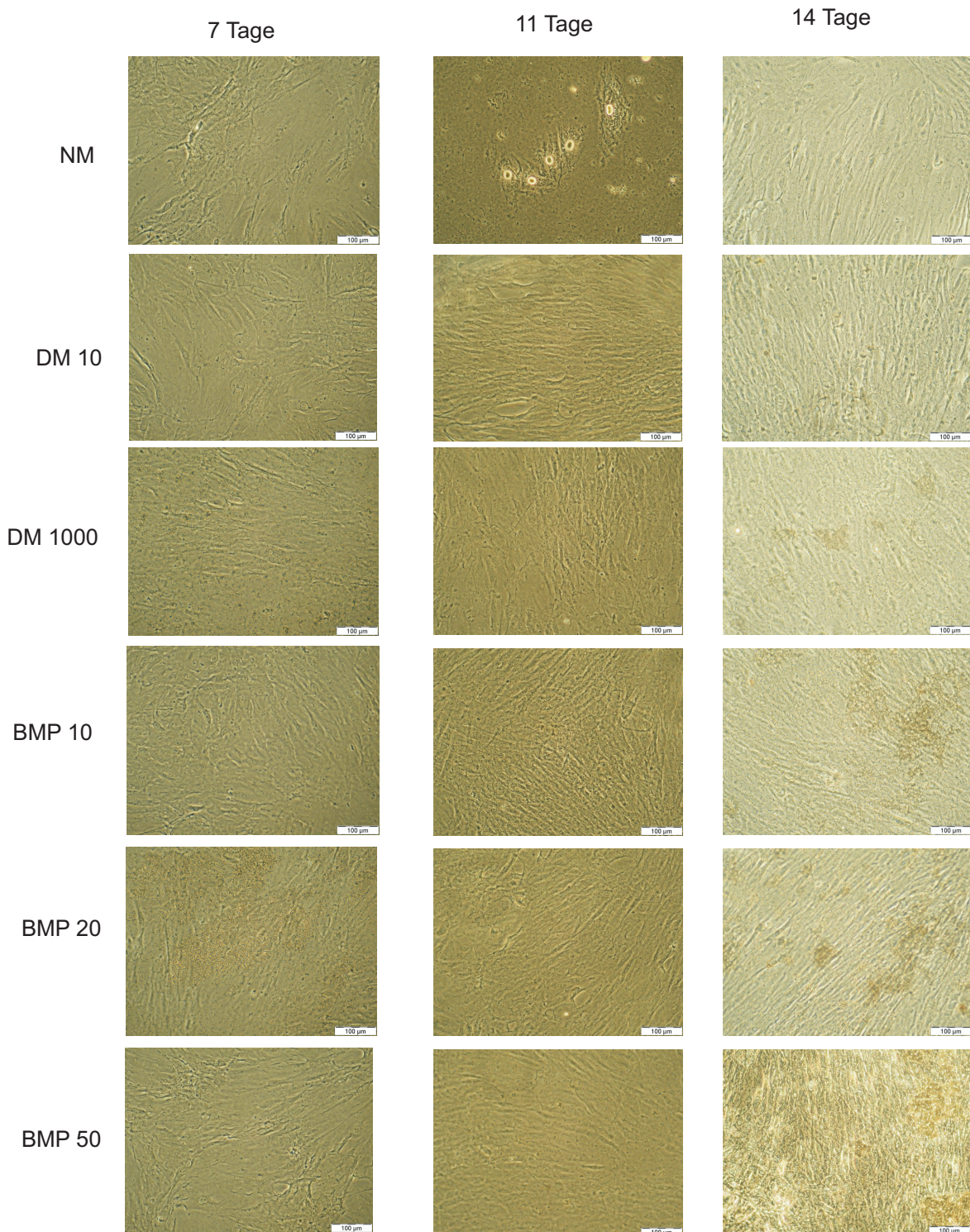


Abbildung B.1.: Färbung mineralisierter extrazellulärer Matrix nach von Kossa nach einer Kultivierungszeit von sieben, elf und vierzehn Tagen. AdMSCs wurden mit Medien unterschiedlicher Zusammensetzung kultiviert: Standard-Proliferationsmedium (NM), osteogene Differenzierungsmedien mit Zusatz von Dexamethason (10 nM: DM-10 bzw. 1 μ M: DM-1000) und unterschiedlichen Konzentrationen BMP-2 (10 ng/mL: BMP-10, 20 ng/mL: BMP-20, 50 ng/mL: BMP-50).

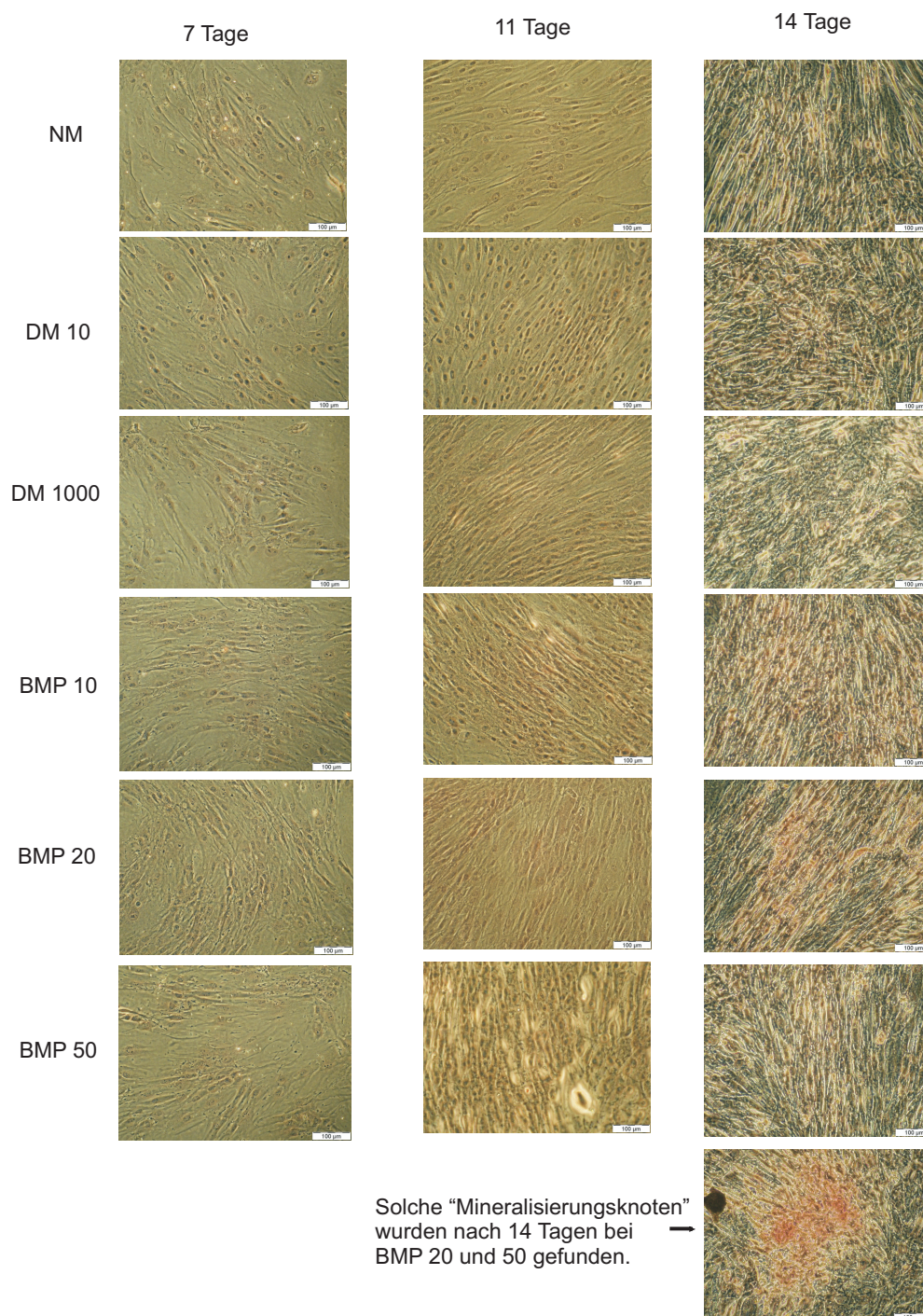


Abbildung B.2.: Färbung mineralisierter extrazellulärer Matrix mit Alizarinrot nach einer Kultivierungszeit von sieben, elf und vierzehn Tagen. AdMSCs wurden mit Medien unterschiedlicher Zusammensetzung kultiviert: Standard-Proliferationsmedium (NM), osteogene Differenzierungsmedien mit Zusatz von Dexamethason (10 nM: DM-10 bzw. 1 μ M: DM-1000) und unterschiedlichen Konzentrationen BMP-2 (10 ng/mL: BMP-10, 20 ng/mL: BMP-20, 50 ng/mL: BMP-50).

B.2. RT-PCR

B.2.1. RNA-Isolierung

Für eine RNA-Isolierung wurden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, mit PBS gewaschen und in 0,5–1 mL Trizol[®] aufgenommen. Bis zur Isolierung der RNA wurden die Proben bei -20° C gelagert. Zur Isolierung der zellulären RNA wurde die Trizol[®]-Zell-Suspension nach dem Auftauen 30 Sekunden lang mit einem Ultraturrax unter Eiskühlung homogenisiert und zur Abtrennung von Zelltrümmern, Membranen, Polysacchariden und hochmolekularer DNA zehn Minuten mit $12.000 \times g$ (bei 4° C) zentrifugiert. Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur zur Dissoziation von Nukleoproteinkomplexen wurden 200 μL Chloroform zugegeben, geschüttelt und erneut zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 15-minütige Zentrifugation mit $12.000 \times g$ (bei 4° C) wurde die Lösung in eine Phenol-Chloroform-Phase, eine Protein- und DNA-haltige Interphase und eine RNA-haltige wässrige Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reagiergefäß überführt und zur RNA-Fällung mit 500 μL Isopropanol versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die ausgefallene RNA mit $12.000 \times g$ bei (4° C) für zehn Minuten abzentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 mL 75%igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (5 min, $12.000 \times g$, 4° C), getrocknet und in DEPC-Wasser (0,1 %, pH 7,5) aufgenommen. Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bestimmt.

B.2.2. cDNA-Synthese für RT-PCR

Um die isolierte RNA in eine PCR einsetzen zu können, wurde sie in eine *copy* DNA (cDNA) umgeschrieben. Indem für die cDNA-Synthese Oligo-dT-*Primer*, die spezifisch an die poly-A-Schwänze der Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) binden, zum Einsatz kamen, wurde nur mRNA in cDNA umgeschrieben. Die in viel höherer Konzentration vorliegenden ribosomalen RNA wurde genauso wenig umgeschrieben wie andere zelluläre RNA. Damit repräsentiert die cDNA alle Gene, die zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung in den Zellen exprimiert worden waren. Für die cDNA-Synthese wurde die RNA nach dem folgenden Pipettierschema zusammen mit Oligo-dT-*Primern* fünf Minuten bei 65° C denaturiert.

2 μg RNA
3 μL Oligo-dT-*Primer* (100 μM)
mit DEPC-Wasser auf 21 μL aufgefüllt.

Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurde die denaturierte RNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase und dem Zusatz von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) 60 Minuten lang

bei 37° C in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65° C gestoppt (5 min).

4 μ L dNTP-Mix (2,5 mM)
 8 μ L 5 \times RT-Puffer
 1 μ L Reverse Transkriptase (200 U/ μ L)
 mit DEPC-Wasser auf 40 μ L aufgefüllt.

B.2.3. PCR

Während der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde die cDNA durch eine Taq-Polymerase unter der Zugabe von dNTPs und *Primern* amplifiziert:

1 μ L cDNA
 10 μ L 5 \times PCR-Puffer
 4 μ L dNTP-Mix (2,5 mM)
 32,75 μ L H₂O
 je 1 μ L *sense* und *antisense Primer*
 0,25 μ L Taq-Polymerase (5 U/ μ L).

Bei der PCR wurden nach einer anfänglichen Denaturierung 35 Zyklen aus jeweils drei Inkubationsschritten zur Denaturierung, *Primerannealing* (bei der *Annealing*-Temperatur T_A) und Verlängerung durchlaufen:

1 Zyklus	95° C	5 min	Denaturierung
35 Zyklen	95° C	30 s	Denaturierung
	T_A	30 s	<i>Annealing</i>
	72° C	30 s	Verlängerung
1 Zyklus	72° C	7 min	Verlängerung

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Bandenstärke im Agarose-Gel wurde densitometrisch (semiquantitativ) bestimmt.

Geräte

Agarose-Gelelektrophorese	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Kamera (DC290 Zoom)	Eastman Kodak Company, Japan
Kamerasoftware (Alpha Digi Doc™)	Alpha Innotech Corporation
PCR-Thermocycler	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Photospektrometer ND1000	Nano Drop Technologies, Wilmington
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraturrax	Ika Labortechnik, Staufen
UV-Tisch	Roth, Karlsruhe
Zentrifuge 5415R (gekühlt)	Eppendorf AG, Hamburg

Verbrauchsmaterialien

Reagiergefäße 1,5 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht
Reagiergefäße 0,1 mL	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Chemikalien

Agarose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
DEPC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Oligo-dT- <i>Primer</i>	Promega, Mannheim
5 × PCR-Puffer (5 × Colorless GoTaq™ Reaction Buffer)	Promega, Mannheim
Primer	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	Promega, Mannheim
5 × RT-Puffer (M-MLV RT 5 × Buffer)	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase (GoTaq™ Hot Start)	Promega, Mannheim
Trizol®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Primer

GAPDH:

sense: 5'-GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT-3'*antisense:* 5'-TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC-3'*Annealing*-Temperatur: 61° C

Produktgröße: 419 bp

Kollagen I:

sense: 5'-GAA AAC ATC CCA GCC AAG AA-3'*antisense:* 5'-CAG GTT GCC AGT CTC CTC AT-3'*Annealing*-Temperatur: 57° C

Produktgröße: 234 bp

Kollagen III:

sense: 5'-CAT CTG GTC ATC CTG GTT CC-3'*antisense:* 5'-CCT TTT CTC CAT TTC GTC CA-3'*Annealing*-Temperatur: 57° C

Produktgröße: 234 bp

*Cbfa-1/Runx2:**sense:* 5'-TCT TCA CAA ATC CTC CCC-3'*antisense:* 5'-TGG ATT AAA AGG ACT TGG TG-3'*Annealing*-Temperatur: 52° C

Produktgröße: 229 bp

BSP2:

sense: 5'-CAT TTT GGG AAT GGC CTG TG-3'*antisense:* 5'-ATT GTC TCC TCC GCT GCT GC-3'*Annealing*-Temperatur: 60° C

Produktgröße: 564 bp

BMP-2:

sense: 5'-GTG TCC CCG CGT GCT TCT TAG-3'*antisense:* 5'-ACT CCT CCG TGG GGA TAG AAC-3'*Annealing*-Temperatur: 60° C

Produktgröße: 479 bp

BMP-4:

sense: 5'-TGA CTC ACC TCC ATC AGA CT-3'

antisense: 5'-GGG ATA CTG GAA TTG ACA GA-3'

Annealing-Temperatur: 48° C

Produktgröße: 394 bp

Osteocalcin:

sense: 5'-AGG CGC TAC CTG TAT CAA T-3'

antisense: 5'-CAG ATT CCT CTT CTG GAG TTT-3'

Annealing-Temperatur: 48° C

Produktgröße: 315 bp

Alkalische Phosphatase:

sense: 5'-GCT GAA CAG GAA CAA CGT GA-3'

antisense: 5'-CCA CCA AAT GTG AAG ACG TG-3'

Annealing-Temperatur: 51° C

Produktgröße: 267 bp

B.3. DNA-Chip

Bei einem DNA-Chip-Experiment ist der Reinheitsgrad der einzusetzenden RNA von großer Bedeutung. Daher wurde die RNA zunächst auf Qualität und Reinheit analysiert.

RNA-Analyse

Für ein DNA-Chip-Experiment wurde die RNA im *Agilent 2100 Bioanalyzer* mit einem *RNA Nano LabChip*[®] auf Konzentration, Reinheit und Qualität überprüft. Dazu wurde das fluidische System des *LabChip*[®] mit 9 μ L Gel-Farbstoff-Mix gefüllt. 65 μ L *RNA 6000 Nano gel matrix* wurden zentrifugiert (10 min, $1.500 \times g$). Das Farbstoffkonzentrat wurde zehn Sekunden lang gevortext und abzentrifugiert. 1 μ L der Farbstofflösung wurde zum Gel gegeben, vermischt und direkt vor Gebrauch zehn Minuten bei $13.000 \times g$ zentrifugiert. 9 μ L Gel-Farbstoff-Mix wurden in eine der Vertiefungen gegeben und mit der speziellen *Priming Station* in das fluidische System appliziert. Zwei weitere Vertiefungen wurden mit 9 μ L des Gel-Farbstoff-Mixes befüllt. Die übrigen neun Vertiefungen wurden mit 5 μ L *RNA 6000 Nano Marker* und 1 μ L RNA (2 min bei 70°C denaturiert), bzw. dem *RNA 6000 Ladder* (2 min bei 70°C denaturiert) befüllt. Der vollständig befüllte *LabChip*[®] wurde für eine Minute auf einem Vortexer mit einem speziellen *LabChip*[®]-Aufsatz bei 2.400 rpm geschüttelt. Anschließend wurde der *LabChip*[®] in dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* fixiert und gemessen.

B.3.1. DNA-Chip

Für das DNA-Chip-Experiment wurden pro Chip jeweils zwei Proben vorbereitet, die mit unterschiedlichen Farbstoffen (Cyanin 3 bzw. Cyanin 5) markiert wurden. Um jeweils drei Proben untereinander zu vergleichen (Zellen kultiviert in Standard-Proliferationsmedium NM, Differenzierungsmedium DM, bzw. BMP-2-Medium), wurde ein „Loop-Design“ eingesetzt. Dabei wurden pro Chip jeweils zwei unterschiedliche Proben mit verschiedenen Farbstoffen direkt verglichen, so dass pro Experiment drei Chips angesetzt wurden (Standardmedium-*Cy3* + Differenzierungsmedium-*Cy5*; Standardmedium-*Cy5* + BMP-Medium-*Cy3*; Differenzierungsmedium-*Cy3* + BMP-Medium-*Cy5*).

Von der isolierten und analysierten RNA wurde eine cDNA der mRNA hergestellt. Während der reversen Transkription wurden in jeweils eine von zwei direkt zu vergleichende Proben Biotinnukleotide, in die andere Fluoresceinnukleotide in die cDNA eingebaut. Zunächst wurde die RNA zusammen mit den Nukleotiden und *Primern* bei 65°C zehn Minuten lang denaturiert:

6 μg RNA
2 μL Reaktionsmix-Konzentrat
1 μL Biotin- oder Fluoresceinnukleotid
1 μL Oligo-dT-*Primer*
1 μL *Random-Primer*
mit H_2O auf 20 μL aufgefüllt.

Zu den Proben wurde dann die Reverse Transkriptase gegeben. Die reverse Transkription fand bei 42° C zwei Stunden lang statt.

20 μL RNA-Mix von oben
2,5 μL 10 \times RT-Reaktionspuffer
2 μL AMV RT/RNase-Inhibitor-Mix.

Da Fluorescein lichtempfindlich ist, wurden alle folgenden Inkubationsschritte unter Lichtausschluss durchgeführt.

Die cDNA wurde durch eine heiße alkalische Hydrolyse von den RNA-*templates* befreit. Dazu wurden zu den Proben folgende Lösungen gegeben und für 30 Minuten bei 65° C inkubiert:

2,5 μL 0,5 M EDTA (pH 8,0)
2,5 μL 1 N NaOH.

Die Lösung wurde nach dem Abkühlen mit 6,5 μL 1 M Tris-HCl pH 7,5 neutralisiert.

Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mit dem *PCR Purification Kit*. Die cDNA wurde mit 300 μL PBI-Puffer versetzt und auf eine zum Kit gehörende Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation (16.200 \times g, 1 min, Raumtemperatur) wurde der Durchlauf verworfen und die Säule zuerst mit 700 μL 35%igem Guanidinhydrochlorid, dann mit 700 μL PE-Puffer gewaschen (jeweils Zentrifugation 16.200 \times g, 1 min, Raumtemperatur). Die Säule wurde trocken zentrifugiert (16.200 \times g, 1 min, Raumtemperatur) und die cDNA zweimal mit 25 μL EB-Puffer (1:10 verdünnt) eluiert (Zentrifugation bei 16.200 \times g, 1 min, Raumtemperatur).

Die aufgereinigte cDNA wurde in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, in 15 μL Hybridisierungspuffer aufgenommen und bei 95° C 3 Minuten denaturiert. Die beiden jeweils zu vergleichenden Proben wurden vereinigt und mit 3 μL TopBlock versetzt. Die Proben wurden auf den Chip transferiert, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Fixogum versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte auf einem Schüttler über Nacht bei 42° C und 650 rpm.

Die Signale auf den DNA-Chips wurden mit dem *NEN[®] MicromaxTM TSATM Labeling and Detection Kit* verstärkt. Nach der Hybridisierung wurden die Chips nacheinander je fünf Minuten mit Waschpuffer 1, 2 und 3 (s. u.) unter Schütteln und Lichtausschluss gewaschen. Die Oberflächen wurden zehn Minuten mit 300 μL TNB-G geblockt und eine Minute unter Schütteln mit TNT-Puffer (s. u.) gewaschen. An die mit Fluorescein markierten Proben wurde

über einen Anti-Fluorescein-Antikörper Peroxidase gebunden. Dazu wurden die Chips mit 200 μL Anti-Fluorescein-HRP-Konjugat (HRP: *horse raddish peroxidase*, 1% in TNB-G) zehn Minuten inkubiert und dreimal eine Minute unter Schütteln mit TNT-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt reagierte die an die Proben gebundene Peroxidase in einer Radikalreaktion mit Tyramid, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 (*Cy3*) markiert war. Auf diese Weise werden viele Moleküle des Fluoreszenzmarkers an die Probe gebunden, wo zuvor nur ein Fluoresceinmolekül war. Dadurch wird eine deutliche Signalverstärkung erreicht. Die Radikalreaktion erfolgte während einer 10-minütigen Inkubation mit 250 μL Cyanin-3-Tyramid (0,2% in *Ampli Diluent*), woraufhin erneut dreimal mit TNT-Puffer (je 5 min) gewaschen wurde. Zur Inaktivierung überschüssiger Peroxidase wurde zehn Minuten mit 300 μL *HRP Inactivation Solution* (0,3M Natriumacetat in *HRP Inactivation Reagent*) und dreimal eine Minute mit TNT-Puffer gewaschen. Die Signalverstärkungsreaktion wurde dann mit dem an Biotin bindenden Streptavidin und einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff (Cyanin 5, *Cy5*) wiederholt. Dafür wurde zunächst zehn Minuten mit 200 μL *Streptavidin-HRP conjugate solution* inkubiert (1% in TNB-G), dreimal eine Minute mit TNT-Puffer gewaschen und dann mit Cyanin-5-Tyramid (0,2% in *Ampli Diluent*) zehn Minuten inkubiert. Die Chips wurden dann dreimal fünf Minuten mit TNT-Puffer und dann mit $0,05 \times \text{SSC}$ gewaschen. Die in der Zentrifuge getrockneten Chips (1.200 rpm, 2 min) wurden mit dem *GenePixTM4000B* im entsprechenden Kanal (*Cy3*, *Cy5*) ausgelesen.

Von jedem Chip wurden mehrere Scans bei unterschiedlichen Einstellungen für die Laserstärke und die Vorspannung des Fotomultipliers (*gain*) durchgeführt. Sättigungseffekte der Fluoreszenzintensitäten konnten dadurch berücksichtigt werden. Die von dem Softwareprogramm *GenePixPro 6.0* bei der Primärauswertung „geflaggt“ Spots (Spots mit anhand der Form erkennbarer niedriger Güte bzw. Spots von geringer Intensität, bei denen die Hintergrundintensität höher ist als die Signalintensität) wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Mit den Hintergrund-bereinigten Daten wurde eine Normierung durchgeführt. Für die Normierung über die unterschiedlichen Scans wurden die Daten je eines Zustands von den Einzelscans aufsummiert und die Spots durch diese Summe geteilt. Von den übrigen Spots eines Gens wurde nach einem Ausreißertest der Mittelwert gebildet. Um die unterschiedlichen Zustände (NM, DM, BMP) zu vergleichen wurde ein studentischer *t*-Test durchgeführt.

Es wurden drei DNA-Chip-Experimente durchgeführt, bei denen die Zellen (huF 35, huF 53, MG-63) mit unterschiedlichen Medien (Standard-Proliferationsmedium [NM], osteogenes Differenzierungsmedium [DM] und Differenzierungsmedium mit 10 ng bzw. 50 ng BMP-2 [BMP 10 bzw. BMP 50]) für entsprechende Zeiträume kultiviert wurden:

huF 35: NM – DM – BMP 10 75 d
huF 53: NM – DM – BMP 50 23 d
MG-63: NM – DM – BMP 50 8 d .

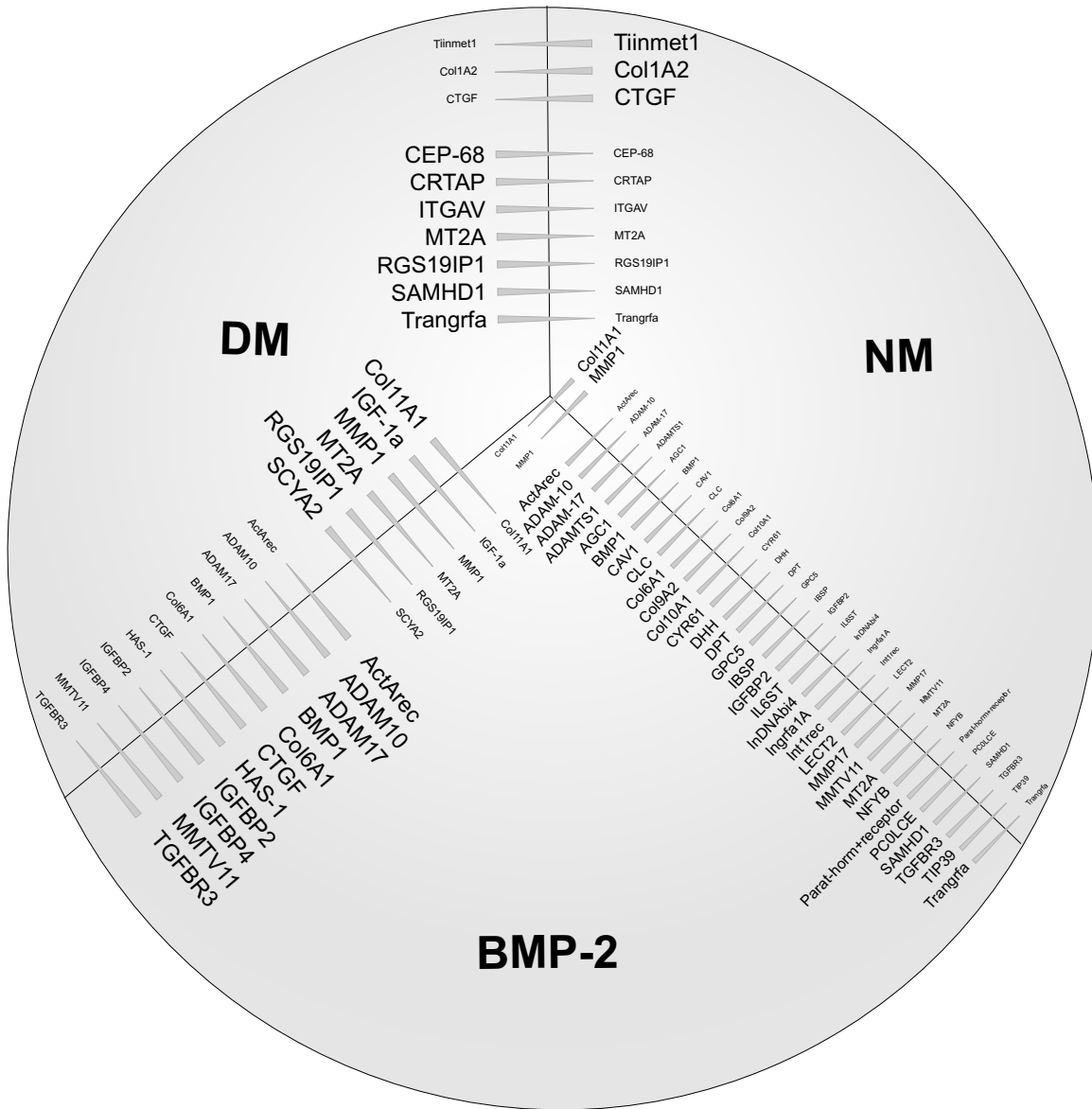


Abbildung B.3.: Gene, die in den adMSCs huF 35 unterschiedlich reguliert waren, nachdem die Zellen mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium ohne osteogene Stimulantien, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt). Die sich verjüngenden Balken geben die Richtung der Regulierung an und weisen mit dem stumpfen End auf das Medium, in dem das betreffende (großgedruckte) Gen hochreguliert war. Die Abkürzungen der Gene sind in Tabelle B.2, Seite 151 aufgelistet.

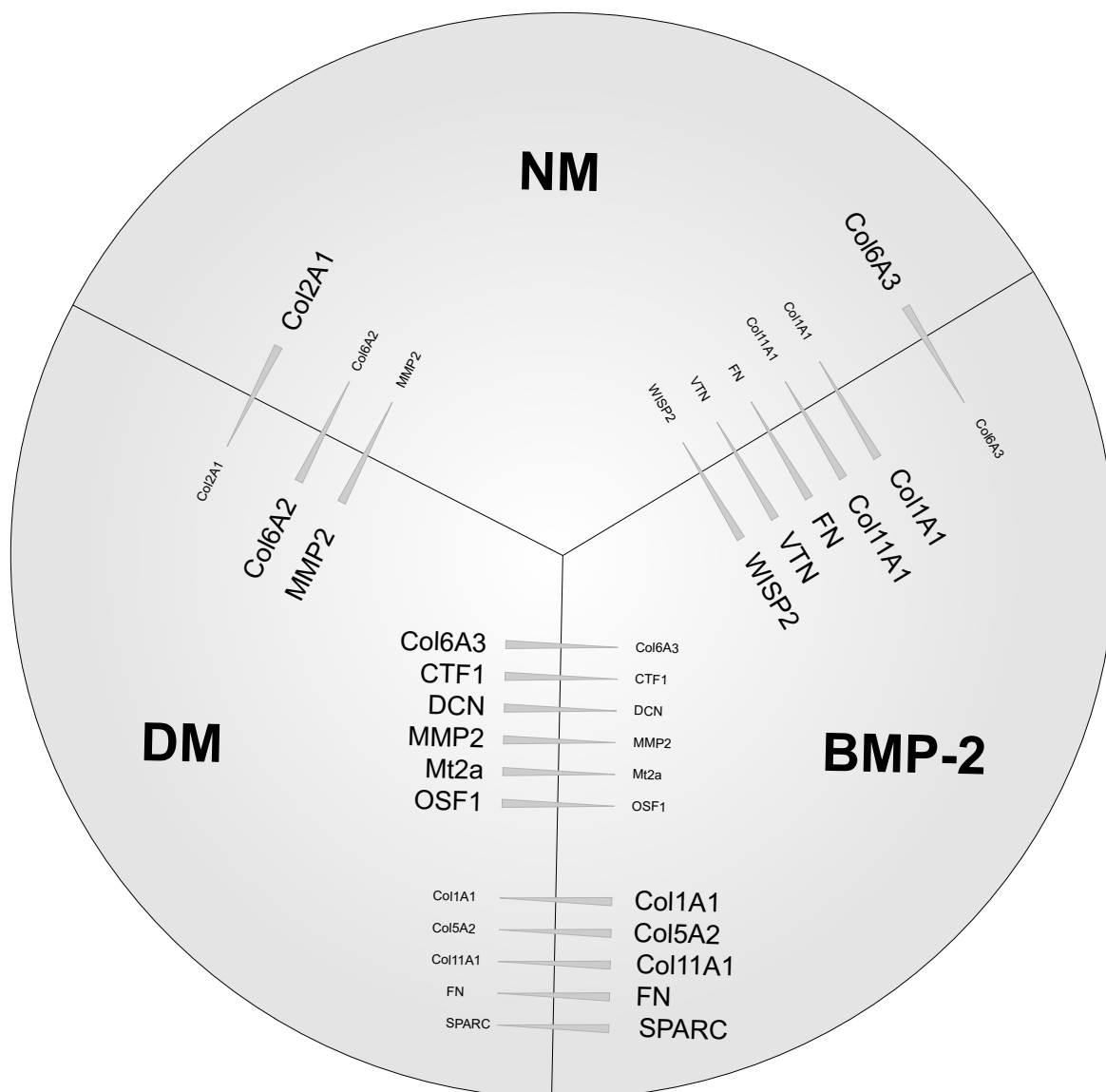


Abbildung B.4.: Gene, die in den adMSCs huF 53 unterschiedlich reguliert waren, nachdem die Zellen mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium ohne osteogene Stimulantien, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt). Die sich verjüngenden Balken geben die Richtung der Regulierung an und weisen mit dem stumpfen End auf das Medium, in dem das betreffende (großgedruckte) Gen hochreguliert war. Die Abkürzungen der Gene sind in Tabelle B.2, Seite 151 aufgelistet.

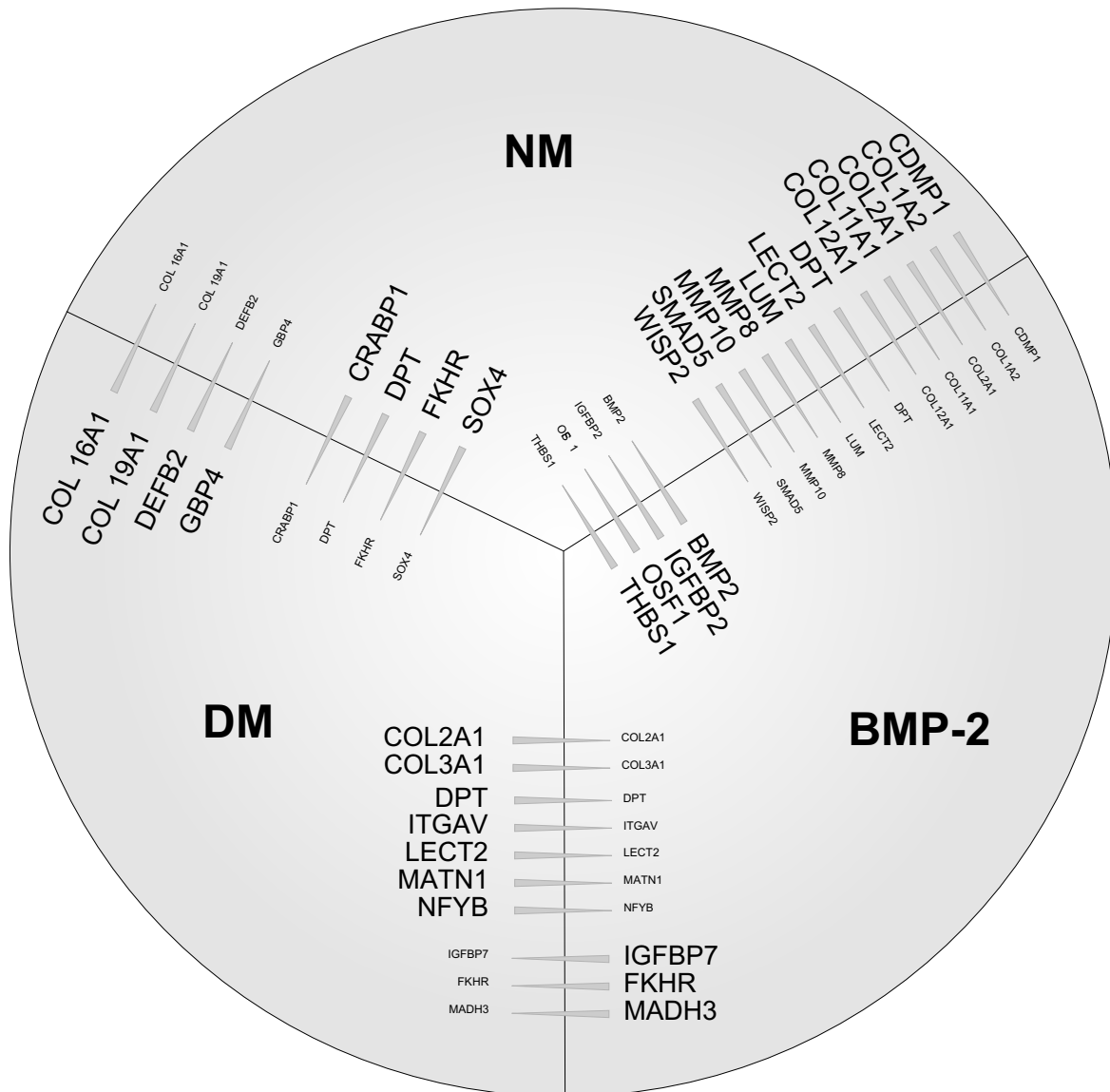


Abbildung B.5.: Gene, die in den MG-63-Zellen unterschiedlich reguliert waren, nachdem die Zellen mit unterschiedlichen Medien kultiviert worden waren (NM: Standard-Proliferationsmedium ohne osteogene Stimulantien, DM: osteogenes Differenzierungsmedium mit Dexamethason, BMP: Differenzierungsmedium zusätzlich mit BMP-2 versetzt). Die sich verjüngenden Balken geben die Richtung der Regulierung an und weisen mit dem stumpfen End auf das Medium, in dem das betreffende (großgedruckte) Gen hochreguliert war. Die Abkürzungen der Gene sind in Tabelle B.2, Seite 151 aufgelistet.

Tabelle B.2.: Verwendete Abkürzungen für Genbezeichnungen in den Abbildungen B.3–B.5.

ADAM-10	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 10</i>
ADAM-17	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain 17</i>
ADAMTS1	ADAM-Metallo-Peptidase mit Thrombospondin-Typ 1-Motiv, 1
AGC1	Aggrecan
BMP1	<i>bone morphogenetic protein-1</i>
BMP2	<i>bone morphogenetic protein-2</i>
CAV1	Caveolin 1
CDMP1	<i>cartilage-derived morphogenetic protein-1</i>
CEP-68	<i>cartilage acidic protein 1</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine factor 1</i>
Col1A2	α 2-Kette von Kollagen I
Col2A1	α 1-Kette von Kollagen II
Col3A1	α 1-Kette von Kollagen III
Col6A1	α 1-Kette von Kollagen VI
Col9A2	α 2-Kette von Kollagen IX
Col10A1	α 1-Kette von Kollagen X
Col11A1	α 1-Kette von Kollagen XI
Col12A1	α 1-Kette von Kollagen XI
Col16A1	α 1-Kette von Kollagen XVI
Col19A1	α 1-Kette von Kollagen XIX
CRABP1	<i>cellular retinoic acid binding protein 1</i>
CRTAP	<i>cartilage associated protein</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CYR61	<i>cysteine-rich, angiogenic inducer, 61</i>
DEFB2	Defensin β 2
DHH	<i>desert hedgehog homolog (Drosophila)</i>
DPT	Dermatopontin
FKHR	<i>forkhead box O1A</i>
GBP4	<i>guanylate binding protein 4</i>
GPC5	Glypikan 5
HAS-1	Hyaluronan-Synthase 1
IBSP	<i>integrin-binding sialoprotein, bone sialoprotein II</i> BSP-2
IGF-1a	<i>insulin-like growth factor 1</i> insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
IGFBP2	<i>insulin-like growth factor binding protein 2</i>
IGFBP4	<i>insulin-like growth factor binding protein 4</i>

IGFBP7	<i>insulin-like growth factor binding protein 7</i>
IL6ST	<i>interleukin 6 signal transducer</i>
ITGAV	Integrin α V
LECT2	<i>leukocyte cell-derived chemotaxin 2</i>
LUM	Lumican
MATN1	Matrilin 1
MMP1	Matrix-Metallo-Peptidase 1
MMP8	Matrix-Metallo-Peptidase 8
MMP10	Matrix-Metallo-Peptidase 10
MMP17	Matrix-Metallo-Peptidase 17
MT2A	Metallothionein 2A
NFYB	<i>nuclear transcription factor γ, β</i>
OSF1	Pleiotrophin
PCOLCE	<i>procollagen C-endopeptidase enhancer protein</i> Prokollagen-C-Endopeptidase-Verstärker-Protein
RGS19IP1	<i>regulator of G-protein signalling 19 interacting protein 1</i>
SAMHD1	<i>SAM domain and HD domain, 1</i>
SCYA2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
SMAD5	<i>SMAD family member 5</i>
SOX4	<i>SRY (sex determining region Y)-box 4</i>
TGFBR3	TGF- β TypIII-Rezeptor
THBS1	Thrombospondin 1
TIP39	<i>Tuberoinfundibular 39 residue protein precursor</i>
WISP2	<i>WNT1 inducible signaling pathway protein 2</i>

Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer

Agilent Technologies, Böblingen

Scanner GenePixTM4000B

Axon Instruments

Vakuumentrifuge

Eppendorf concentrator 5301

Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

Chemikalien

Hybridisierungspuffer	MWG Biotech AG, Ebersberg
<i>PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
TopBlock	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>TSATM Labeling and Detection Kit</i>	PerkinElmer Life Sciences, USA

20 × SSC, pH 7: 175,3 g NaCl
88,3 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat
auf 1 L aufgefüllt.

Waschpuffer 1: 100 mL 20 × SSC
10 mL SDS (10%)
Mit Wasser auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Waschpuffer 2: 50 mL 20 × SSC
Mit Wasser auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

Waschpuffer 3: 5 mL 20 × SSC
Mit Wasser auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

TN-Puffer: 0,1 M TrisHCL
0,15 M NaCl
pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt, mit H₂O
auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

TNB: 100 mL TN-Puffer
0,5 g *blocking reagent*
Bei 60° C gelöst und sterilfiltriert.

TNB-G: x mL TNB
10 % Ziegenserum

TNT-Puffer: 0,1 M TrisHCL
0,15 M NaCl
0,05 % Tween 20
pH-Wert mit NaOH auf 7,5 eingestellt, mit H₂O
auf 1 L aufgefüllt und sterilfiltriert.

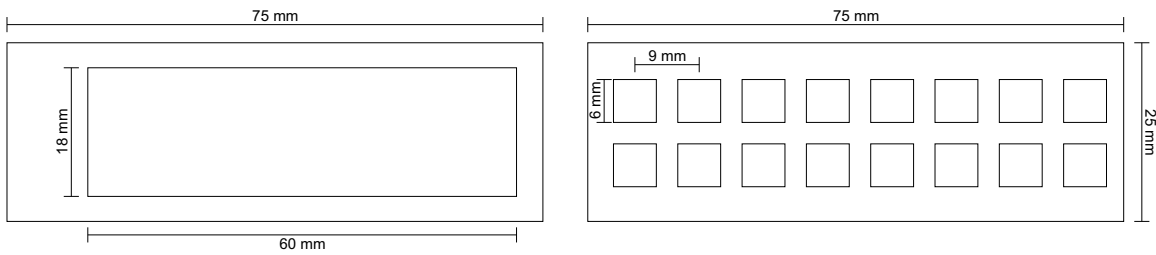


Abbildung B.6.: In Glasobjektträger wurden entweder eine große zentrale Vertiefung oder 16 kleine Vertiefungen gefräst, die später mit Polymer gefüllt wurden.

B.4. Protein-Chip

B.4.1. Herstellung der Träger für die Protein-*Microarrays*

Die Protein-Chips wurden in Zusammenarbeit mit Marina Slabospitskaya während ihres dreimonatigen Gastaufenthaltes am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover entwickelt. In der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover wurden in Objektträger (75 mm × 25 mm) mit einem Diamantfräskopf entweder eine große zentrale Vertiefung (18 mm × 60 mm) oder 16 kleine Vertiefungen (6 mm × 6 mm) der Tiefe 200 μm gefräst (vgl. Abbildung B.6). Die Objektträger wurden eine Stunde lang mit 1 M NaOH gewaschen, gefolgt von fünf Minuten mit 5%iger HCl und fünf bis zehn Minuten mit Wasser. Anschließend wurden sie bei 100° C getrocknet.

Zur Aktivierung wurden die Oberflächen der Vertiefungen 17–20 Stunden lang im Dunkeln mit Methacrylsäure-[3-(trimethylsilyl)-propylester] (15 % in Toluol) inkubiert. Nach dieser Silanierung wurden die Objektträger je dreimal fünf Minuten mit Aceton und Ethanol gewaschen und anschließend bei maximal 40° C getrocknet.

Für die Bildung der Polymerschicht wurden die Vertiefungen gleichmäßig mit Monomerenlösung (s. u.) gefüllt und zur Polymerisierung 30 Minuten lang mit einer UV-Lampe bestrahlt. Mit Alkohol (Isopropanol oder Ethanol) wurde die Polymerisierung gestoppt. Der Objektträger mit der Polymeroberfläche wurde entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder drei Stunden bei 70° C mit Alkohol gewaschen. Danach folgte ein zweistündiger Waschgang mit 50%igem Alkohol und ein zweistündiger Waschgang mit Wasser. Die Objektträger mit der Polymeroberfläche wurden bei Raumtemperatur feucht gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Objektträger zunächst kurz mit Wasser gewaschen und dann 30 Minuten mit PBS inkubiert.

Monomerenlösung:	1,2 mL	Cyclohexanol
	0,48 mL	Glycidylmethacrylat, GMA
	0,32 mL	Ethylenglykoldimethacrylat, EDMA
	8,36 mg	2-Hydroxy-2-methylpropiophenon (Darcour-1173)

B.4.2. Protein-Chips mit Maus-Immunglobulin G als Testsystem

Das System aus Maus-IgG und Anti-Maus-IgG diente als Modellsystem und wurde für die Grundcharakterisierung der Polymeroberfläche des Protein-Chips eingesetzt.

Während des gesamten Versuches wurde darauf geachtet, dass die Polymeroberfläche nicht austrocknete. In einem Kontaktdruckverfahren wurden zehn Punkte (*Spots*) mit jeweils 500 pL Maus-IgG auf die Polymeroberfläche aufgebracht (fünfmal Aufsetzen (*hit*) pro *Spot* mit 100 pL pro *hit*). Für die Immobilisierungsreaktion wurde der Objektträger 17 Stunden bei 37° C feucht inkubiert. Danach folgten drei 40-minütige Waschgänge (200 rpm bei Raumtemperatur) mit PBS, 2 M NaCl und wieder mit PBS. Die Oberfläche wurde mit BSA (1 % in PBS) geblockt (200 rpm bei Raumtemperatur), damit im Folgenden weder Analyt noch Detektionsantikörper kovalente Bindungen mit der Methacrylat-Oberfläche eingehen konnten. Die Oberfläche wurde fünf Minuten mit PBS und zweimal fünf Minuten mit Wasser gewaschen. Die Hybridisierung mit Ziegen-Anti-Maus-IgG gekoppelt an das Fluorophor Alexa Fluor-555 (200 ng/mL in PBS mit 0,2 % TopBlock) erfolgte feucht für 2 Stunden unter Schütteln (300 rpm) in einer speziellen Hybridisierungskammer.

Der Monolith-Chip wurde verglichen mit einem kommerziellen Aldehyd-Chip. Für diesen wurde die Versuchsdurchführung an die Vorgaben des Herstellers angeglichen: Zur Immobilisierung wurde eine Stunde bei 4° C inkubiert und anschließend nur dreimal 5 Minuten (PBS, NaCl, PBS) gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden mit beiden Chips in gleicher Weise durchgeführt.

B.4.3. Protein-Chip zum Nachweis von humanem Osteopontin und Kollagen I

Der Protein-Chip wurde aufgebaut, um über die Detektion von Osteopontin und Kollagen I in Kulturüberständen die osteogene Differenzierung von Zellen beobachten zu können.

Die Fänger-Antikörper für Osteopontin (monoklonales Anti-Osteopontin, 1 mg/mL in PBS) bzw. Kollagen I (monoklonales Anti-Kollagen I, 1 mg/mL in PBS) wurden auf dieselbe Weise immobilisiert wie Maus-IgG (s.o.). Die Oberfläche wurde wie oben gewaschen, geblockt und danach dreimal mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen. Die Inkubation mit Osteopontin bzw. Kollagen I erfolgte für zwei Stunden bei 25° C und 300 rpm. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit 0,05 % Tween 20 in PBS (je fünf Minuten) erfolgte die Inkubation mit dem Detekti-

onsantikörper (polyklonales Biotin-anti-Osteopontin bzw. polyklonales Biotin-anti-Kollagen-I, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS / 0,2% TopBlock) für 30 Minuten bei 25°C und 300 rpm. Wieder wurde die Oberfläche dreimal fünf Minuten mit 0,05% Tween 20 in PBS gewaschen und es folgte die letzte Inkubation mit dem an Streptavidin gekoppelten Cyanin 3 ($1,8 \mu\text{g}/\text{mL}$ in PBS / 0,2% TopBlock) für 30 Minuten bei 25°C und 300 rpm. Nach dem letzten Waschgang (dreimal fünf Minuten mit 0,05% Tween 20 in PBS) wurde der Objektträger getrocknet.

Die Fluoreszenz der einzelnen *Spots* wurde im *GenePixTM4000B* ausgelesen. Alle Chips wurden mit voller Laserleistung aber verschiedenen Einstellungen des Fotomultipliers (*gain*) gescannt. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen *Spots* und die jeweilige Hintergrundintensität wurde mit der Software ImaGene 5.0 (BioDiscovery) aus den digitalen Aufnahmen der Scans bestimmt.

Für die Auswertung wurden von jedem einzelnen Scan Mittelwert (*signal mean*, SM) und Standardabweichung der Fluoreszenzintensität der zehn gleichen *Spots* sowie der zugehörigen Hintergrundintensität (*background mean*, BM) ermittelt. Die Hintergrundintensität wurde von der Fluoreszenzintensität des *Spots* abgezogen und die Standardabweichung der Differenz berechnet. Das Signal-Rausch-Verhältnis (*signal to noise ratio*, SNR) ist der Quotient aus der Differenz von Signalintensität und Hintergrundintensität und der Standardabweichung der Hintergrundintensität:

$$SNR = \frac{SM - BM}{Stabw(BM)} \quad . \quad (\text{B.1})$$

Derjenige Scan, bei dem der Mittelwert des SNR maximal war, wurde zur weiteren Auswertung herangezogen. Zum Vergleich unterschiedlicher Chips wurden immer Scans mit demselben *Gain* verwendet. Bei den 16-Feld-Chips wurde von den Feldern, die mit derselben Analytlösung inkubiert worden waren, die Feld-zu-Feld-Standardabweichung als *coefficient of variation* (CV) berechnet:

$$CV = \frac{Stabw(SM)}{Mittelwert(SM)} \cdot 100\% \quad . \quad (\text{B.2})$$

Geräte

Hybridisierungsöfen

Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Scanner *GenePixTM4000B*

Axon Instruments

Spotter (417TM *Arrayer*)

Affymetrix, MWG Biotech AG, Ebersberg

Verbrauchsmaterialien

Aldehyd-Chips (VSS-25 <i>Silylated Slides</i>)	Cel Associates Inc., USA
Hybridisierungskammern	
<i>ProPlateTM Multi-Array Slide System</i>	Grace Bio-Labs Inc.
<i>SecureSealTM Hybridization Chambers</i>	Grace Bio-Labs Inc.

Chemikalien

Alexa Fluor 555-Ziegen-anti-Maus-IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Anti-Kollagen I (monoklonal)	Dianova GmbH, Hamburg
Anti-Kollagen I-Biotin (polyklonal)	Dianova GmbH, Hamburg
Anti-Osteopontin (monoklonal)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Anti-Osteopontin-Biotin (polyklonal)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Cyanin-3-Streptavidin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylenglykoldimethacrylat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycidylmethacrylat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
2-Hydroxy-2-methylpropiophenon	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kollagen I (human)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Maus-IgG	ZYMED Laboratories Inc., USA
Methacrylsäure-[3-(trimethylsilyl)-propylester]	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Osteopontin (human)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden
TopBlock	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

C. Mechanische Stimulation

Die Silikonschalen für die mechanische Stimulation wurden hergestellt aus einem Zweikomponenten-Silikonkautschuk (Elastosil[®] RT 601), der bei 60–100° C in einer Polyadditionsreaktion vulkanisiert wurde. Dazu wurde der Kautschuk nach Herstellerangaben 9:1 mit dem Vernetzer gemischt und in spezielle Gussformen gefüllt, die von der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover hergestellt worden waren. Die Luftblasen, die durch das Mischen eingetragen worden waren, wurden im Vakuum entfernt. Über Nacht wurde das Silikon ausgehärtet.

Vor Gebrauch wurden die Silikonschalen autoklaviert und drei Tage lang in DMEM ohne weitere Zusätze eingelegt, damit das Silikon während der Kultivierung keine Substanzen mehr ins Medium abgibt. Die Silikonschalen wurden mehrfach verwendet, indem sie nach einer Kultivierung gründlich gereinigt und erneut autoklaviert wurden. Unmittelbar vor der Besiedelung der Schalen wurden die Vertiefungen der Schalen über Nacht mit Standard-Proliferationsmedium gefüllt, so dass Serumproteine wie Adhäsionsfaktoren an die Kulturoberfläche binden konnten.

Die Silikonschalen wurden mit einer semiokklusiven Folie (Tegaderm[™]) verschlossen, die einen Gasaustausch zulässt, für Flüssigkeiten und Bakterien aber undurchlässig ist. Damit ist die Sterilität gewährleistet und die Verdunstung des Mediums wird verhindert, während ein Gasaustausch des Mediums mit der Inkubatoratmosphäre zugelassen wird.

Die Stimulationsapparatur wurde von der Feinmechanikwerkstatt des Instituts für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover in Zusammenarbeit mit der Elektronikwerkstatt hergestellt. Sie besteht aus zehn Einspannvorrichtungen, in denen die Silikonschalen an einer Seite von einer fixen Backe, auf der anderen Seite von einer beweglichen Backe befestigt werden. Die bewegliche Backe wird über eine Welle von einem Schrittmotor bewegt. Die Motoren werden angesteuert von einem computergestützten Steuergerät, das einzelne Schalen unabhängig voneinander oder auch parallel ansteuern kann.

Die Dehnung wurde zyklisch mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Dehnungsstärke von 5 % appliziert, wobei verschiedene Dehnungsprogramme angewandt wurden. Die eingesetzten Stimulationszeiten betragen 15 min, 60 min, 2 h, 4 h und 8 h. Jedes Experiment wurde aus mindestens drei Versuchsreihen zusammengesetzt: bei der ersten Versuchsreihe wurde einmalig für die jeweilige Zeit zyklisch gedehnt. Bei der zweiten wurde dreimal hintereinander für

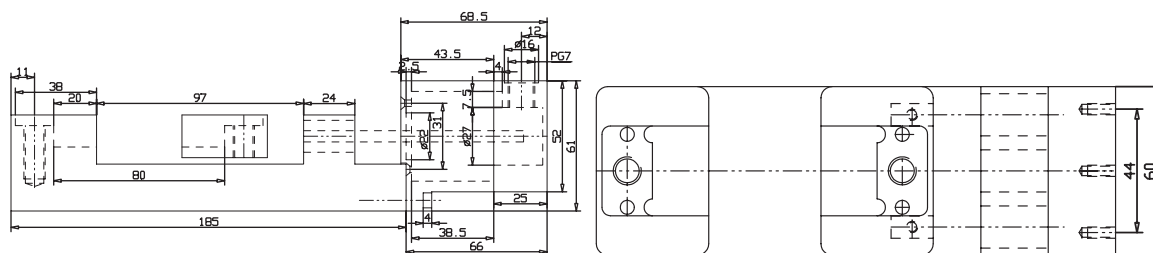


Abbildung C.1.: Technische Zeichnung der Einspannvorrichtung für die mechanische Stimulation. **Links:** Seitenansicht mit Motorblock. **Rechts:** Aufsicht ohne Motorblock.

dieselbe Zeit gedehnt, wobei zwischen den einzelnen Stimulationszeiträumen eine Pause eingelegt wurde, die jeweils doppelt so lang war wie die Stimulationszeit. Die dritte Versuchsreihe diente als statische Kontrolle und die Schalen wurden genauso behandelt wie bei den ersten Versuchsreihen, jedoch ohne dass sie gedehnt wurden. Bei den längeren Versuchen wurde eine zweite statische Kontrolle als vierte Versuchsreihe mitgeführt, die parallel zu der dreimaligen Stimulation durchgeführt wurde. Damit wurde ausgeschlossen, dass die längere Kulturzeit bei den dreimal stimulierten Proben auf die Ergebnisse Einfluss nimmt. Zusätzlich zu diesen Stimulationsprogrammen wurde ein Programm mit kontinuierlich steigender Stimulationszeit appliziert. Dabei wurden alle erwähnten Stimulationszeiten hintereinander appliziert mit entsprechend doppelt so langen Pausen. Dieses Programm begann also mit 15 Minuten Stimulation, gefolgt von 30 Minuten Pause, 60 Minuten Stimulation ... und endet mit einer achtstündigen Stimulation. Jede Versuchsreihe umfasste sechs einzelne Silikonschalen.

C.1. Stimulation mesenchymaler Stammzellen auf einer zweidimensionalen Kulturoberfläche

Eine Woche vor Besiedelung der Schalen wurde das Kulturmedium der Zellen von Standard-Proliferationsmedium zu Differenzierungsmedium gewechselt. Jede Silikonschale wurde mit 200.000–300.000 Zellen in 3 mL Medium besiedelt und kultiviert, bis die Zellen fest adhärirt waren. Das Medium wurde genau 24 Stunden vor Versuchsbeginn gegen Reduktionsmedium mit nur 1 % Serum getauscht. Während der Kultivierung mit einer nur geringen Serumkonzentration gehen die Zellen in die G_0 -Phase des Zellzyklus über, in der die Proliferation aussetzt und DNA- und Proteinsynthese minimal sind. Zu Versuchsbeginn wurde das Reduktionsmedium wieder gegen Differenzierungsmedium getauscht, so dass der Zellzyklus der Zellen von diesem Zeitpunkt an weitgehend synchron verlief. Durch diese Prozedur können versuchsbedingte Effekte der Genexpression und Proteinsynthese optimal beobachtet werden.

Die Zellen wurden mit den unterschiedlichen zeitlichen Programmen zyklisch mit 1 Hz um 5 % gedehnt. Nach Beendigung des Experiments wurden die Zellen in den Silikonschalen mit PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturoberfläche gelöst. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und abzentrifugiert.

MTT-Test Die Viabilität der Zellen nach der mechanischen Stimulation wurde mit Hilfe eines MTT-Tests untersucht. Bei diesem Test wird das gelbe MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) durch Dehydrogenasen in den Mitochondrien lebender Zellen zu einem blauen Formazan verstoffwechselt. Die Konzentration des Formazans (gemessen über seine Absorption gelben Lichtes) dient als Maß für die Viabilität bzw. Proliferation der Zellen.

Für den MTT-Test wurden die Zellen in 750 μL Standard-Proliferationsmedium und 75 μL MTT-Lösung aufgenommen. Von dieser Suspension wurden siebenmal 110 μL in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert und 4 Stunden lang bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Referenz diente Kulturmedium. Die gebildeten Formazankristalle wurden nach Zugabe von SDS-Lösung (10 % in 0,01 N HCl) während einer Inkubation über Nacht aufgelöst. Die Formazankonzentration wurde photometrisch über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm gegen die Referenzwellenlänge von 630 nm im Plattenlesegerät bestimmt.

PCR Die Expression knochenspezifischer Marker nach der mechanischen Stimulation wurde mit Hilfe einer RT-PCR untersucht. Die Zellpelletts aus den einzelnen Silikonschalen des jeweiligen Experimentes wurden in jeweils 500 μL Trizol[®] aufgenommen. Wie oben beschrieben, wurde aus den Zellen jeder einzelnen Schale die Gesamt-RNA isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben (vgl. Abschnitt B.2, Seite 140). Für die PCRs wurde die cDNA der einzelnen Proben aus einer Versuchsreihe gepoolt eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden im Agarose-Gel aufgetrennt und die Stärke der mit Ethidiumbromid gefärbten Banden wurde semidensitometrisch ausgewertet. Die Bandenintensitäten der Knochenmarker wurden bezogen auf die Bandenintensitäten der parallel durchgeführten gepoolten GAPDH-PCR. Die so erhaltenen Daten sind also experimentelle Mittelwerte aus sechs Einzelversuchen, entstanden durch das Poolen der Proben vor der PCR. Um die Varianzen der einzelnen Proben abschätzen zu können, wurde zusätzlich eine GAPDH-PCR mit der cDNA der einzelnen Proben durchgeführt.

AP-Test Für den Aktivitätstest der Alkalischen Phosphatase (AP) wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend in 320 μL PBS aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden sechsmal 50 μL in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte pipettiert. Zusätzlich

wurde als Referenzwert einmal 50 μL PBS in eine Vertiefung der Platte gegeben. Die Proben wurden bis zur Durchführung des Aktivitätstests bei -20°C gelagert.

Durch das Einfrieren der Proben wurden die Zellen aufgebrochen, so dass die Alkalische Phosphatase für die Messung zugänglich wurde. Zu den Proben wurden 125 μL p-Nitrophenylphosphat (*Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA*) gegeben, das von der Alkalischen Phosphatase während der folgenden halbstündigen Inkubation bei 37°C zu dem gelben Nitrophenol umgesetzt wurde. Die Konzentration dieses Farbstoffs wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 405 nm im Plattenlesegerät bestimmt. Die Werte wurden indirekt auf die Zellzahl normiert, indem sie durch die zugehörigen Werte des MTT-Tests geteilt wurden.

C.2. Stimulation einer Modellzelllinie in einem dreidimensionalen Kollagenetzwerk

Die Stimulation von Modellzellen in einer Kollagenmatrix und die dazugehörigen Analysen wurden von Stefanie Böhm im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

Die bisher eingesetzten Silikonschalen wurden so modifiziert, dass Zellen in dem dreidimensionalen Netzwerk eines Kollagengerüsts (Matristypt[®]) gedehnt wurden. Dazu wurden die Silikonschalen zunächst ohne Boden hergestellt. Die oben und unten offenen Schalen wurden auf ein Stück Matristypt[®] passender Größe gesetzt und mit diesem durch flüssiges Silikon verklebt. Nach unten hin wurden die Schalen durch eine separat hergestellte dünne Silikonplatte abgeschlossen.

Die Schalen mit Matristypt[®]-Boden konnten nicht autoklaviert werden, da Kollagen nicht hitzestabil ist. Zur Sterilisierung wurden die Schalen zunächst über Nacht mit UV-Licht bestrahlt und anschließend zwei Stunden mit Isopropanol inkubiert. Durch gründliches Waschen mit PBS wurde das Isopropanol entfernt und die Schalen zwei Tage mit Standard-Proliferationsmedium inkubiert.

Die Matristypt[®]-Oberfläche wurde mit 500.000 MG-63-Zellen in 3 mL Differenzierungsmedium besiedelt. Damit die Zellen nicht nur auf der Oberfläche des Kollagenetzwerks wuchsen, wurden sie bei $300 \times g$ für eine Minute in das Netzwerk einzentrifugiert. Nach sieben Tagen Kultivierung in Differenzierungsmedium auf dem Kollagengerüst, wurde die Serumkonzentration des Mediums (wie oben beschrieben) für 24 Stunden auf 1 % reduziert. Das Reduktionsmedium wurde durch Differenzierungsmedium ersetzt und der Stimulationsversuch durchgeführt.

Nach dem Dehnungsexperiment wurde das Kollagengerüst aus den Schalen entfernt. Je drei kleine Stücke ($5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$) wurden aus dem Matristypt[®] jeder einzelnen Schale herausge-

schnitten und für einen MTT- und einen AP-Test eingesetzt bzw. für die Präparation von Gefrierschnitten in *Neg 50 frozen section medium* bei -80°C eingefroren. Das verbleibende große Stück wurde mit PBS gewaschen und für eine PCR in Trizol[®] eingefroren.

Für den AP-Test wurden die Matristypt[®]-Stücke mit PBS gewaschen, in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte gegeben und eingefroren. Der AP-Test wurde wie oben beschrieben durchgeführt (s. Seite 160). Zur Messung der Absorption wurden die Matristypt[®]-Stücke entfernt. Für den MTT-Test wurden die mit Zellen besiedelten und stimulierten Matristypt[®]-Stücke in die Vertiefungen einer neuen 96-Loch-Platte gegeben. Je $100\ \mu\text{L}$ frisches Medium und $10\ \mu\text{L}$ MTT-Lösung wurden zugegeben und der MTT-Test wie oben beschrieben durchgeführt (s. Seite 160). Zur photometrischen Messung der Formazankonzentration wurden die Matristypt[®]-Stücke entfernt.

Aus den in Trizol[®] aufgenommenen Proben wurde wie oben beschrieben die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und die mRNA in cDNA umgeschrieben (s. Abschnitt B.2, Seite 140). Wie auch bei den Stimulationsversuchen in den unmodifizierten Silikonschalen, wurde die cDNA aller Proben einer Versuchsreihe gepoolt in die PCR eingesetzt.

Die in *Neg 50 frozen section medium* bei -80°C eingefrorenen Proben wurden auf -20°C erwärmt und mit einem Mikrotom wurden $25\ \mu\text{m}$ dünne Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger gebracht und verschiedenen Färbemethoden unterzogen: Immunfluoreszenzfärbung von *Cbfa-1/Runx2* und Alkalischer Phosphatase (AP) sowie Färbung mineralisierter extrazellulärer Matrix mit Alizarinrot und Calcein.

Immunhistologische Färbung Die Herstellung der Dünnschnitte und die immunhistologischen Färbungen wurden in den Laboratorien der Plastischen Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

Bei der Immunfluoreszenz wird die Spezifität der Antigen-Antikörper-Bindung ausgenutzt, um Proteine in einem histologischen Präparat mit einem Fluoreszenzfarbstoff anzufärben. Die hohe Spezifität der Antikörper und die Sensitivität der Fluoreszenzfarbstoffe machen eine Detektion von geringsten Proteinmengen möglich.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst auf den Objektträgern mit Paraformaldehyd fixiert (30 min). Die Proben wurden dreimal mit deionisiertem Wasser (dH_2O) gewaschen und dann mit 0,1%igem Triton-X 100 demaskiert. Nach erneutem Waschen (dreimal mit dH_2O) wurden sie 30 Minuten lang mit 2% FCS in PBS geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper im Folgenden zu verhindern. Die Proben wurden eine Stunde lang mit monoklonalem Maus-anti-human-AP und polyklonalem Kaninchen-anti-human-*Cbfa-1/Runx2* bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und danach dreimal mit dH_2O gewaschen. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern (anti-Maus gekoppelt an Alexa Fluor-488 bzw. anti-Kaninchen gekoppelt an Alexa Fluor-680) wurde 30 Minuten lang durchgeführt. Die Proben wurden gewaschen

(dreimal mit dH₂O), getrocknet und, mit Vectorshield versehen, mit einem Deckgläschen abgedeckt. In Vectorshield ist der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) enthalten, der die Zellkerne anfärbt. Die Färbungen wurden unter dem Mikroskop bei 305 nm (DAPI-Färbung), 488 nm (AP-Färbung) und 680 nm (*Cbfa-1/Runx2*-Färbung) fotografiert.

Alizarinrot / Calcein-Doppelfärbung Die Gefrierschnitte der auf Matristypt[®] stimulierten Zellen wurden zunächst mit Alizarinrot und dann Calcein gefärbt. Alizarinrot bildet mit Calcium einen roten und Calcein einen grün fluoreszierenden Chelatkomplex.

Die Gefrierschnitte wurden mit PBS gewaschen und 30 Minuten mit eiskaltem Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen und 15 Minuten in einer Alizarinrot-Lösung (1 % Alizarinrot in 2 % Ethanol) gefärbt. Zur Entfärbung des Hintergrundes wurde mehrfach mit PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Gefrierschnitte unter Lichtausschluss mit Calcein-Lösung (5 µg/mL in dH₂O) über Nacht inkubiert. Der Hintergrund wurde durch Waschen mit PBS entfärbt. Jeweils dieselben Bildausschnitte der gefärbten Schnitte wurden im Phasenkontrastmikroskop für die Alizarinrot-Färbung bzw. im Fluoreszenzmikroskop (Exzitationswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm) für die Calcein-Färbung fotografiert.

Geräte

Plattenlesegerät

Model 680 Microplate Reader

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Mikrotom HM 560

Microm, Walldorf

Zentrifuge 5415R

Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf

Verbrauchsmaterialien

Mikrotiterplatten

Sarstedt AG, Nümbrecht

TegadermTM

3 M Health Care, Neuss

Zellschaber

Sarstedt AG, Nümbrecht

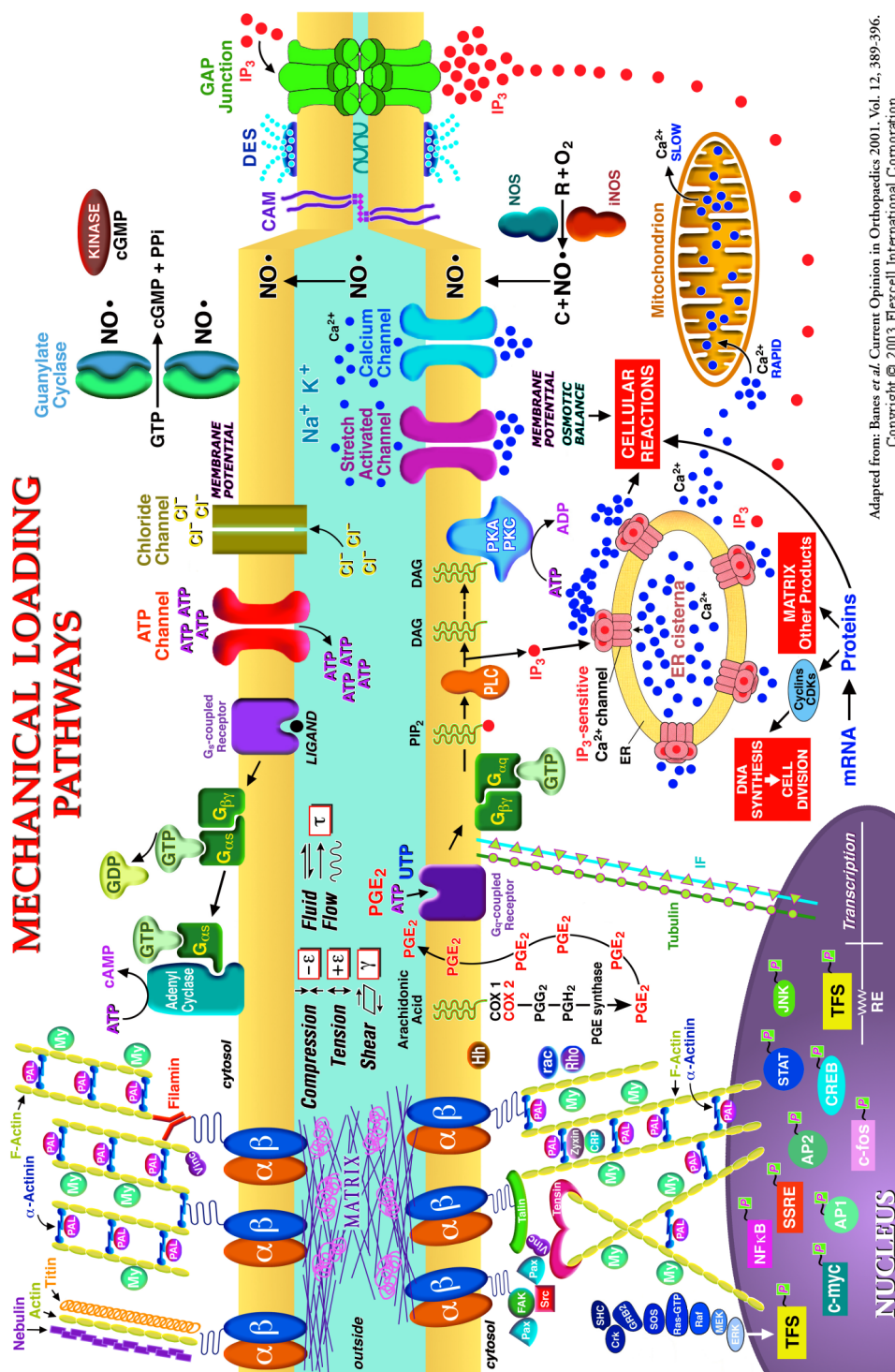
Chemikalien

Alizarinrot S

Fluka Chemie AG, Seelze

Antikörper

Alexa-488-Anti-Maus	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Alexa-680-Anti-Kaninchen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Kaninchen-anti-human- <i>Cbfa-1/Runx2</i>	Abcam PLC, Cambridge
Maus-anti-human-AP	Abcam PLC, Cambridge
Calcein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Elastosil [®] RT 601 A,B	Wacker Chemie AG, Riemerling
Matristypt [®]	Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, Billerbeck
MTT	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Neg 50 frozen section medium</i>	Richard-Allan Scientific, Kalamzoo MI
p-Nitrophenylphosphat <i>Alkaline Phos-</i> <i>phatase Yellow (pNPP) Liquid</i> <i>Substrate System for ELISA</i>	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Roti [®] Histokit	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Vectorshield	Vector Laboratories, Burlingame



Adapted from: Banes *et al.* Current Opinion in Orthopaedics 2001, Vol. 12, 389-396.
Copyright © 2003 Flexcell International Corporation

Abbildung C.2.: Mechanismen der Mechanotransduktion. Dargestellt sind die Signale, die ausgehend von den Integrinen in den Fokalkontakten über das Zytoskelett die Genexpression im Kern beeinflusst wird. Prostaglandin E $_2$ wird ausgeschüttet und aktiviert autokrin über G-Proteine den Inositolphosphat-Signaltransduktionsweg. Dieser sorgt für die Ausschüttung von Calcium-Ionen aus zellinternen Speichern (Endoplasmatisches Retikulum, ER) und aktiviert die Proteinkinase A und C (PKA, PKC). Stickstoffmonoxid wird gebildet, das autokrine Effekte hat.

D. Kultivierung im Bioreaktor

D.1. Zellwachstum auf Sponceram

Das Wachstum von Zellen auf einer Matrix wurde mit Hilfe eines MTT-Tests untersucht. Für den MTT-Test wurden die Zellen auf kleinen Stückchen (etwa 3 mm Durchmesser) der jeweiligen Gerüstsubstanz kultiviert. 15.000 Zellen in 80 μL Standard-Proliferationsmedium wurden in einer 96-Loch-Platte auf ein Stück der Gerüstsubstanz gegeben und 30 Minuten im Inkubator mit 350 rpm geschüttelt. Die besiedelten Konstrukte wurden in eine neue 96-Loch-Platte überführt und mit 200 μL Medium für die entsprechende Zeit kultiviert. Falls nötig wurde in diesem Zeitraum ein Mediumwechsel durchgeführt.

Für den MTT-Test wurden die Gerüstsubstanzstücke in eine neue 96-Loch-Platte überführt und der Test wurde wie oben beschrieben durchgeführt (s. Abschnitt C.1, Seite 160). Als Negativkontrolle wurde bei jedem Versuch ein unbesiedeltes Stück Gerüstsubstanz mitkultiviert.

D.2. Oberflächenmodifikation von Sponceram

Die Modifikation der Sponceram[®]-Oberfläche wurde in Zusammenarbeit mit Victor Korzhikov während seines halbjährigen Gastaufenthaltes im Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Seine Arbeiten wurden von Stefanie Röker im Rahmen ihrer Doktorarbeit und Franziska Bode in ihrer Diplomarbeit im Institut für Technische Chemie weitergeführt.

Für die Oberflächenmodifikation wurde Sponcerm[®] 30–90 in kleine Stücke (Durchmesser ca. 3 mm, 15–20 mg) zerteilt. Für die Untersuchung der Zytotoxizität der Polymere und ihrer Derivate wurden diese in verschiedenen Konzentrationen zum Kulturmedium zugefügt und ein MTT-Test wie oben beschrieben durchgeführt.

Adsorption an Sponceram Um Adhäsion und osteogene Differenzierung von Zellen auf Sponceram[®] zu unterstützen, wurden bioaktive Moleküle (RGD-Peptid, Poly-L-Lysin, BMP-2) über einen *Polymerspacer* (Polymethacrylamidoglukose, pMAG, und Poly[Methacrylamidoglukose-co-Vinylpyrrolidon-co-Acrolein], pMVA) an die Sponceram[®]-Oberfläche

adsorbiert. Für die Adsorption wurden sterile Sponceram[®]-Stücke (Durchmesser ca. 3 mm bzw. 15–20 mg) über Nacht mit einer sterilen Lösung des Polymers oder Konjugats (1 mg/mL) langsam rotiert (2 rpm). Anschließend wurden die Komposite zweimal mit PBS gewaschen und dann zwei Stunden mit Standard-Proliferationsmedium inkubiert (37° C, 5 % CO₂). Das Medium wurde abgenommen und in einer 96-Loch-Platte wurden auf jedes Komposit-Stück 20.000 Zellen in 80 µL Medium gegeben. Um eine homogene Verteilung der Zellen auf der Keramikoberfläche zu erreichen, wurde die Platte 30 Minuten lang im Inkubator geschüttelt (350 rpm). Anschließend wurden jeweils 150 µL Medium zugefügt und die Zellen bis zum MTT-Test kultiviert, wobei falls nötig ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

Adhäsionsstudie Um den Einfluss des RGD-Peptids und von Poly-L-Lysin, gebunden an den *Polymerspacer*, auf die Adhäsion von Zellen zu untersuchen, wurden die Konjugate (wie oben beschrieben) an kleine Sponceram[®]-(30–90)-Scheiben (Durchmesser 1 cm) adsorbiert. Diese Komposite wurden mit 50.000 Zellen für eine Kurzzeitstudie (bis zu 3 Tage) bzw. mit 20.000 Zellen für eine Langzeitstudie (bis zu 14 Tage) besiedelt. Dazu wurden die Sponceram[®]-Scheiben mit Silikonringen (Durchmesser innen: 1 cm, außen: 1,5 cm) umgeben und in Vertiefungen einer 24-Loch-Platte eingepasst. Die Silikonringe verhinderten, dass die Zellsuspension beim Besiedeln an der Scheibe vorbei auf den Plattenboden lief. Die Zellen wurden 30 Minuten inkubiert, dann wurden die Vertiefungen der Platte mit Medium aufgefüllt und die Zellen bis zum jeweiligen Messzeitpunkt kultiviert.

Die auf den Kompositen adhären Zellen wurden mit DAPI angefärbt. 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die Kerne von Zellen anfärbt. Dazu wurden die Scheiben dreimal mit PBS gewaschen und mindestens 30 Minuten mit eiskaltem Ethanol fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Scheiben 15 Minuten mit DAPI-Lösung (2 µL Stammlösung in 1 mL Färbepuffer) unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen, um den Hintergrund zu entfärben, und anschließend wurden die Zellkerne bei mikroskopischer Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop (Exzitation: 360 nm, Emission: 460 nm) fotografiert. Zusätzlich wurde die Fluoreszenzintensität der Proben mit dem Fluoreszenzlesegerät quantifiziert.

DAPI-Stammlösung

0,5 mg/mL DAPI
in H₂O

DAPI-Färbelösung

100 mM Tris pH 7
150 mM NaCl
1 mM CaCl₂
0,5 mM MgCl₂
0,1 % Nonidet-P 40

D.3. Kultivierung im Drehbettreaktor

Die Kultivierungen im Z[®]RP-Bioreaktor erfolgten in Zusammenarbeit mit Stefanie Röker, wobei die Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen bei der Zellwerk GmbH in Oberkrämer durchgeführt wurde.

Zur Vorbereitung der Kultivierung wurde der Z[®]RP-Bioreaktor mitsamt allen Schlauchverbindungen, Medium- und Überlaufflasche und Temperatursonde (pT-100) autoklaviert (60 min). Die Sauerstoffelektrode wurde separat autoklaviert (30 min), an die Steuereinheit angeschlossen und im GMP-*Breeder* in den sterilen Reaktor eingebaut. Nach der Äquilibrierungszeit der Sauerstoffelektrode von acht Stunden wurde sie in luftgesättigtem PBS kalibriert. Die pH-Elektrode wurde kalibriert und anschließend 30 Minuten mit 70%igem Isopropanol sterilisiert. Die Elektrode wurde mit sterilem PBS gespült und im GMP-*Breeder* in den sterilen Reaktor eingebaut.

Die Besiedelung der Sponceram[®]-Scheiben erfolgte außerhalb des Reaktors. Auf die trockenen, sterilen Scheiben wurden in Petrischalen 2 mL einer Zellsuspension aufgebracht (10–15·10⁶ Zellen pro Scheibe) und die Scheiben zur Adhäsion der Zellen 30 Minuten bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Petrischalen wurden mit 20 mL Medium aufgefüllt und über Nacht inkubiert.

Im GMP-*Breeder* oder einer großen Sterilwerkbank wurden die Scheiben in den Bioreaktor eingesetzt. Die Scheiben wurden dabei so platziert, dass sie möglichst weit vom *Sparger* entfernt waren, da die Schaumbildung durch CO₂-Zufuhr über den *Sparger* schädlich ist für Zellen. Andererseits musste auch vermieden werden, dass eine Scheibe direkt unter dem Austritt des zirkulierenden Mediums zu liegen kam, was sich in unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zwischen verschiedenen Scheiben auswirken würde. Aus der Mediumflasche wurde über den Ablaufstutzen eine definierte Menge Medium zugepumpt, bis der Bioreaktor halb gefüllt war. Die Rotation der Scheiben wurde auf 1 rpm eingestellt. Die Temperaturregulierung, die die Mediumtemperatur über Beheizung des GMP-*Breeders* einstellt, wurde gestartet. Die pH-Regulierung wurde auf einen Sollwert von pH 7,3 eingestellt, wobei die Regelung des pH-Wertes über Zugabe von CO₂ durch den *Sparger* gesteuert wurde. Eine Gegenregelung durch Zugabe von Base wurde nicht durchgeführt. In den Kopfraum des Reaktors wurden konstant 10 mL/min Luft eingeleitet. Über den Kontakt mit dem Kopfraum und über frisches Medium, das während der Kultivierung zugeleitet wurde, gelangte kontinuierlich Sauerstoff in das System. Der Sauerstoffpartialdruck im Medium wurde über die pO₂-Elektrode permanent überwacht. Die Regulierung des Sauerstoffgehalts im Medium wurde so eingestellt, dass unterhalb eines Partialdrucks von 70 % Sauerstoff in den Kopfraum zugeführt wurde.

Als Vergleich erfolgte parallel zum Reaktorlauf eine statische Kultivierung in Petrischalen im Inkubator, bei der nach Bedarf das Medium gewechselt wurde.

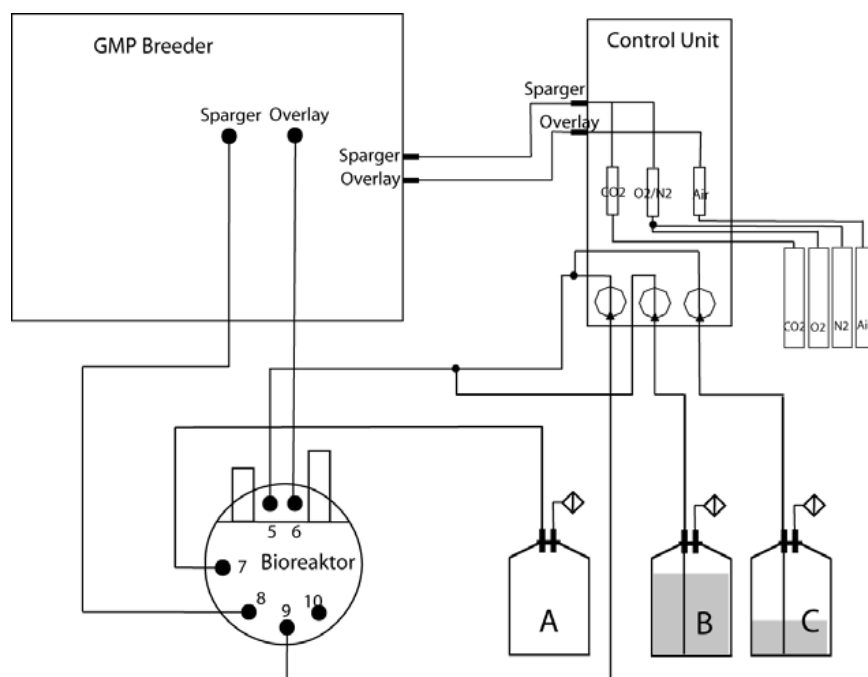


Abbildung D.1.: Aufbauskitze des Z[®] RP-Bioreaktors mit GMP-Breeder, Kontrolleinheit und Reservoirflaschen (A: Überlaufmedium, B: Mediumreservoir, C: Basenreservoir (hier nicht verwendet)). Quelle: Z[®] RP-Handbuch.

Während der Kultivierung wurde über ein Septum aus der Mediumzirkulation täglich Probe gezogen (100 μ L), in dem mit dem YSI Glukose- und Laktatgehalt bestimmt wurden. Über Zufuhr von frischem Medium wurde der Laktatgehalt permanent unterhalb einer Konzentration von 1,7 mg/mL gehalten. Da das verwendete Medium (DMEM) einen relativ hohen Glukosegehalt von 4 mg/mL hatte, war Glukose während der Kultivierung nie limitierend. Vielmehr war immer der Laktatgehalt für die Zufuhr von frischem Medium ausschlaggebend. 50 μ L Probe wurden für einen Aktivitätstest der Alkalischen Phosphatase eingefroren (Durchführung s. Abschnitt B.1.1, Seite 134).

Nach beendeter Kultivierung wurden die Scheiben dem Reaktor entnommen und für die verschiedenen Analysen präpariert.

REM Für rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurde ein kleines Stück jeder Scheibe (Reaktorkultivierung und statische Kontrolle) dreimal mit PBS gewaschen und über Nacht mit Karnovsky-Puffer bei 4° C fixiert. Die Proben wurden mit Cacodylatpuffer (0,2 M in ddH₂O, pH 7,3) gewaschen und darin bis auf Weiteres im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Stücke mit PBS gewaschen und dann schrittweise entwässert, indem sie bei Raumtemperatur jeweils 15 Minuten lang in Acetonlösungen steigender Konzentration (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) durchgegangen wurden.

50 %, 70 %, 90 %, 100 %) inkubiert wurden. Der letzte Schritt mit 100 % Aceton wurde zweimal wiederholt, bevor die Proben im Exsikkator getrocknet wurden. Die Aufnahmen wurden von Yvonne Stark mit einem JEOL JSM-6700F Rasterelektronenmikroskop (Physikalische Chemie, Leibniz Universität Hannover) gemacht.

Karnovsky-Puffer:	5 mg	CaCl ₂
	10 mL	Cacodylatpuffer
	20 μ L	Glutaraldehyd (50 %)
	2,48 mL	ddH ₂ O

DAPI Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurden die Kerne der Zellen auf einem kleinen Sponceram[®]-Stück wie oben beschrieben (Abschnitt D.2, Seite 167) angefärbt.

Toluidinblau Mit Toluidinblau wurden die Zellen auf dem Sponceram[®] angefärbt, um einen Eindruck zu bekommen von der Zelldichte auf der Gerüstsubstanz. Wie für die DAPI-Färbung wurden die Proben zunächst gewaschen und fixiert. Die fixierten Proben wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und dann 10 Minuten lang mit einer Toluidinblaulösung (0,1 % in ddH₂O) inkubiert. Der Hintergrund wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfärbt. Einzelne Zellen wurden bei mikroskopischer Betrachtung fotografiert.

Von Kossa / Alizarinrot Die Proben wurden zunächst wie oben beschrieben gewaschen und fixiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben eine Färbung nach von Kossa bzw. mit Alizarinrot durchgeführt (s. Abschnitt B.1.3, Seite 135).

Calcein Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an Calcium bindet. Die Proben wurden mit PBS gewaschen, mit Ethanol fixiert und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation unter Lichtausschluss mit Calcein-Lösung (5 μ g/mL in ddH₂O) über Nacht. Unspezifisch gebundener Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfärbt. Die Färbung des calcifizierten Gewebes wurde im Fluoreszenzmikroskop (Exzitationswellenlänge: 485 nm Emissionswellenlänge: 535 nm) fotografiert und im Fluoreszenzlesegerät quantifiziert.

Geräte

Fluoreszenzmikroskop	Olympus IX 50, Japan
Fluoreszenzlesegerät	
Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
YSI 2700 <i>Select</i>	Yellow Springs Instruments Inc., USA
Z [®] RP-Bioreaktorsystem	Zellwerk GmbH, Oberkrämer

Verbrauchsmaterialien

24-Loch-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht
Sponceram [®]	Spende von der Zellwerk GmbH, Oberkrämer

Chemikalien

Alizarinrot S	Fluka Chemie AG, Seelze
BMP-2	Spende von Prof. Sebald, Universität Würzburg
Cacodylat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calcein	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAPI	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glutaraldehyd (50 %)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nonidet-P 40	Fluka Chemie AG, Seelze
Poly-L-Lysin, pLL	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Toluidinblau	Fluka Chemie AG, Seelze

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Solvig Diederichs
Geburtsdatum	11.06.1979
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1986-1990	Oberschule Hermann Matern, Dresden
1990-1992	Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium, Kulmbach
1992-1994	Walram-Gymnasium, Menden, Sauerland
1994-1999	Gymnasium Berenbostel, Garbsen, Abschluss Abitur

Studium

1999-2004	Studium der Biochemie, Universität Hannover
2005-2008	Doktorand im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover

Publikationsliste

Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z[®] RP platform.

S. Diederichs, S. Röker, A. Peterbauer, T. Scheper, M. van Griensven, C. Kasper
Eingereicht bei Tissue Engineering.

Accelerated growth of preosteoblastic cells on ultrafine grained titanium.

Y. Estrin, C. Kasper, **S. Diederichs**, R. Lapovok.

Zur Publikation angenommen beim Journal of Biomedical Materials Research Part A.

Water-soluble aldehyde bearing polymers of 2-deoxy-2-methacrylamido-D-glucose for bone tissue engineering.

V. Korzhikov, **S. Diederichs**, O. Nazarova, E. Vlakh, C. Kasper, E. Panarin, T. Tennikova.
Angenommen beim Journal of Applied Polymer Science; vorab bereits elektronisch publiziert.

Effects of repetitive and short time strain in human bone marrow stromal cells.

S. Diederichs, F. Freiberger, M. van Griensven.

J Biomed Mater Res A. 2008 Apr 2; vorab bereits elektronisch publiziert.

Characterization of a special designed rotating bed system (RBS) bioreactor for tissue engineering application.

F. Anton, K. Suck, L. Behr, **S. Diederichs**, B. Hitzmann, M. van Griensven, C. Kasper, H. Hoffmeister, T. Scheper.

Biotechnol.Prog. 24, 140-147, 2008

Cultivating cells of different origin for 3d bone constructs considering physiological conditions.
K. Suck, C. Kasper, C. Hildebrandt, **S. Diederichs**, M. Fischer, T. Scheper, M. van Griensven.

Buchkapitel in Cell Technology for Cell Products, Verlag Springer Niederlande, 2007.

Mechanical strain of bone marrow stromal cells induces proliferation and differentiation into osteoblast-like cells.

M. van Griensven, **S. Diederichs**, C. Kasper.

Buchkapitel in Topics in Tissue Engineering Volume 2, 2006.

http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol2/cover.html.