

Kultivierung von humanen Nabelschnurzellen unter dynamischen  
Bedingungen im Bioreaktor mit dem Ziel der osteogenen  
Differenzierung

von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation  
von

M. Sc. Dana Maria Marten  
geboren am 31.03.1978  
in Berlin

2010

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

Korreferentin: PD Dr. Cornelia Kasper  
Institut für Technische Chemie  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 09.07.2010

## Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt habe und alle eventuell herangezogenen Hilfsmittel oder zur Hilfe herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Diese Arbeit oder Inhalte dieser Arbeit wurden noch nicht als andere Prüfungsarbeit verwendet.

Berlin, im Mai 2010

# Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Scheper und Frau PD Dr. Cornelia Kasper für die Möglichkeit, dieses interessante und aktuelle Thema im Rahmen einer Promotion zu bearbeiten. Außerdem danke ich ihnen sehr für die Übernahme der Referate.

Herrn Prof. Dr. Martijn van Griensven möchte ich sehr für sein Angebot danken, als Drittprüfer zu agieren. Da es aufgrund höherer Gewalt leider nicht dazu kam, danke ich insbesondere Herrn Prof. Dr. Jürgen Alves für sein doch recht spontanes Einspringen.

Bei Herrn Prof. Dr. Hoffmeister bedanke ich mich insbesondere und ausdrücklich für die freundliche Aufnahme in den Laboren der Zellwerk GmbH, und dafür, dass ich die praktischen Arbeiten fast gänzlich dort durchführen konnte. Auch allen Mitarbeitern der Zellwerk GmbH danke ich dafür, dass sie immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Bei Dr. Stefanie Röker und bei Stefanie Böhm möchte ich mich für die Anfertigungen der REM-Aufnahmen bedanken (Dank gilt dabei auch dem Institut für Physikalische Chemie der Leibniz Universität Hannover). Außerdem bedanke ich mich für offene Ohren bei Problemen jeglicher Art.

Allen Menschen, die mich bei dem Vorhaben Promotion unterstützt haben, danke ich herzlichst, ohne sie hier namentlich aufzuführen!

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	2
1. Einleitung	3
2. Aufgabenstellung	6
3. Theoretische Grundlagen	8
3.1. Adulte mesenchymale Stammzellen	8
3.1.1. Umbilikale Stammzellen	
3.1.2. Osteogene Differenzierung adulter Stammzellen	
3.2. Hypoxie	15
3.2.1. Definition Hypoxie - Normoxie	
3.2.2. Einfluss auf Zellproliferation und Differenzierung	
3.3. Bioreaktoren	19
3.3.1. für das Tissue Engineering von Knochen	
3.3.2. Z <sup>®</sup> RP- und Z <sup>®</sup> RPD-Bioreaktoren	
4. Praktische Arbeiten	27
4.1. Charakterisierung umbilikaler Zellen	27
4.1.1. Verdopplungszeiten	
4.1.2. Viabilitäts-Assay	
4.1.3. Morphologie	
4.1.4. Durchflusszytometrie	
4.1.5. RT-PCR	
4.2. 3-dimensionale Langzeitkultivierung umbilikaler Zellen	48
4.2.1. Statische Zellkultivierung	49
4.2.1.1. Kultivierung unter Standardbedingungen	
4.2.1.2. Kultivierung mit osteogenen Zusätzen	
4.2.1.3. Kultivierung mit Humanserum	
4.2.2. Dynamische Zellkultivierung im Z <sup>®</sup> RPD-Bioreaktor	65
4.2.2.1. Kultivierung unter Standardbedingungen	
4.2.2.2. Kultivierung mit osteogenen Zusätzen	
4.2.2.3. Kultivierung mit Humanserum	
4.2.2.4. Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen	
4.2.3. Dynamische Zellkultivierung im Z <sup>®</sup> RP-Bioreaktor	92
4.2.3.1. Kultivierung unter Standardbedingungen	
4.2.3.2. Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen	
5. Zusammenfassung und Ausblick	110
Referenzen	113
Anhang	120

# Abbildungsverzeichnis

3.1:	Aufbau der Nabelschnur	11
3.2:	Postulierte Schritte der osteogenen Differenzierung	14
3.3:	verschiedene Bioreaktortypen	21
3.4:	Z <sup>®</sup> RP- und Z <sup>®</sup> RPD-Bioreaktoren	25
4.1:	Populationsverdopplungszeiten von He4-Zellen	29
4.2:	Populationsverdopplungszeiten von He33-Zellen	30
4.3:	Populationsverdopplungszeiten von Ma1-Zellen	31
4.4:	Populationsverdopplungszeiten von Ma2-, Ma3- und Ma4-Zellen	32
4.5:	Populationsverdopplungszeiten von Fs1-Zellen	33
4.6:	Viabilitats-Assays von He4-Zellen	34
4.7:	Viabilitats-Assays der He33-Zellen	35
4.8:	Viabilitats-Assays der Ma1-Zellen	36
4.9:	Viabilitats-Assays für Ma2-, Ma3- und Ma4-Zellen	37
4.10:	Viabilitats-Assays der Fs1-Zellen	39
4.11:	Morphologie der He4-, He33- und Fs1-Zellen	41
4.12:	Morphologie der He18-, He21- und Ma1-Zellen	42
4.13:	Morphologie der Ma1-, Ma2-, Ma3- und Ma4-Zellen	42
4.14:	Durchflusszytometrie nach klassischer Kultivierung der Fs1	44
4.15:	Das verwendete Trägermaterial Sponceram <sup>®</sup>	49
4.16:	Glukose- und Laktatwerte bei statischer Kultivierung mit AlphaF	51
4.17:	Histologische Färbungen nach statischer Kultivierung mit AlphaF	52
4.18:	Durchflusszytometrie nach statischer Kultivierung mit AlphaF	53
4.19:	Glukose- und Laktatwertw bei statischer Kultivierung mit OsteoF	55
4.20:	Histologische Färbungen nach statischer Kultivierung mit OsteoF	56
4.21:	Durchflusszytometrie nach statischer Kultivierung mit OsteoF	57
4.22:	Glukose- und Laktatwerte bei statischer Kultivierung mit AlphaH	59
4.23:	Histologische Färbungen nach statischer Kultivierung mit AlphaH	60
4.24:	Durchflusszytometrie nach statischer Kultivierung mit AlphaH	61
4.25:	Glukose- und Laktatwerte bei Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaF	68
4.26:	Histologische Färbungen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaF	69
4.27:	REM-Aufnahmen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaF	69
4.28:	Durchflusszytometrie nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaF	71

4.29:	Glukose- und Laktatwerte bei Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit OsteoF	73
4.30:	Histologische Färbungen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit OsteoF	74
4.31:	REM-Aufnahmen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit OsteoF	75
4.32:	Durchflusszytometrie nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit OsteoF	76
4.33:	Glukose- und Laktatwerte bei Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaH	78
4.34:	Histologische Färbungen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaH	79
4.35:	DAPI-Färbung nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaH	79
4.36:	REM-Aufnahmen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaH	80
4.37:	Durchflusszytometrie nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit AlphaH	81
4.38:	Glukose- und Laktatwerte bei hypoxischer Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD	84
4.39:	Histologische Färbungen nach hypoxischer Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD	85
4.40:	REM-Aufnahmen nach hypoxischer Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD	86
4.41:	Durchflusszytometrie nach hypoxischer Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD	87
4.42:	Glukose- und Laktatwerte bei Kultivierung im Z <sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen	93
4.43:	Histologische Färbungen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen	94
4.44:	REM-Aufnahmen nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen	95
4.45:	Durchflusszytometrie nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen	96
4.46:	Glukose- und Laktatwerte der hypoxischen Kultivierungen im Z <sup>®</sup> RP (11 bzw. 42 % Sauerstoff)	99
4.47:	Glukose- und Laktatwerte der hypoxischen Kultivierungen im Z <sup>®</sup> RP (2,6 bzw. 4,7 % Sauerstoff)	100
4.48:	Histologische Färbungen nach den hypoxischen Kultivierungen im Z <sup>®</sup> RP	102
4.49:	REM-Aufnahmen nach den hypoxischen Kultivierungen im Z <sup>®</sup> RP	103
4.50:	Durchflusszytometrie nach den hypoxischen Kultivierungen im Z <sup>®</sup> RP	105

## Tabellenverzeichnis

4.1:	Durchflusszytometrie nach zweidimensionaler Zellkultivierung	45
4.2:	RT-PCR nach zweidimensionaler Zellkultivierung	47
4.3:	RT-PCR nach statischer Kultivierung unter Standardbedingungen	54
4.4:	RT-PCR nach statischer Kultivierung mit osteogenen Zusätzen	58
4.5:	RT-PCR nach statischer Kultivierung mit Humanserum	62
4.6:	RT-PCR nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen	72
4.7:	RT-PCR nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit osteogenen Zusätzen	77
4.8:	RT-PCR nach Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD mit Humanserum	82
4.9:	RT-PCR nach hypoxischer Kultivierung im Z <sup>®</sup> RPD	87
4.10:	Äußere Parameter der hypoxischen Kultivierungen im Z <sup>®</sup> RP	97
4.11:	RT-PCR nach den hypoxischen Kultivierungen im Z <sup>®</sup> RP	106



# Abkürzungsverzeichnis

AlphaF / AlphaH	Standardmedium mit FCS bzw. HS
BMP	Knochenmorphogeneseprotein, <i>bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaar, <i>base pair</i>
BSP	Knochensialoprotein, <i>bone sialo protein</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA, <i>complementary DNA</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Col	Kollagen, <i>collagen</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
HS	Humanserum
hUCs	humane Nabelschnurzellen, <i>human umbilicalcord-derived cells</i>
IgG	Immunglobulin G
kDa	kilo Dalton
MeOH	Methanol
MSC	mesenchymale Stromazelle, <i>mesenchymal stromal cell</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaOH	Natronlauge
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OC	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
OsteoF / OsteoH	Osteogenes Differenzierungsmedium mit FCS bzw. HS
PBS	Phosphat-gepufferte Saline, <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
REM	Raster-Elektronen-Mikroskopie
RNA	Ribonucleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion, <i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
Runx-2	<i>runt-related protein transcription factor (cbfa1)</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, <i>sodium dodecyl sulfate</i>

## Zusammenfassung

Die Therapie von Knochendefekten kritischer Größe benötigt in der Regel eine Transplantation von Ersatzgewebe. Da die Verfügbarkeit autologer Transplantate begrenzt ist und die Verwendung allogener oder xenogener Ersatzmaterialien einige Nachteile mit sich bringt und nicht ohne Risiko ist, ist es von entscheidender Bedeutung, reproduzierbare Methoden zur *in vitro* Generierung biologisch funktioneller Knochenersatzkonstrukte zu etablieren. Das *Tissue Engineering* bietet für diesen Zweck die geeigneten Ansätze und Methoden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob humane Zellen, die aus der Nabelschnur (engl.: *umbilical cord*) gewonnen werden, eine geeignete Zellquelle adulter Stammzellen darstellen, um solche knochenartigen Gewebekonstrukte zu generieren. Dazu wurden die Zellen zunächst statisch auf hochporösen, keramischen Zellträgern (Sponceram<sup>®</sup>) und vergleichend dazu in den Z<sup>®</sup> RP- und Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktoren kultiviert. Diese Drehbettbioreaktoren gewährleisteten eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen. Gleichzeitig wurde der Einfluss der Hypoxie auf die dynamische Langzeitkultivierung der umbilikalischen Zellen untersucht. Da in der Zellkultivierung jegliche Sauerstoffgehalte unterhalb von 21 % als hypoxisch angesehen werden, stellt die Hypoxie keinen zwingend negativen Effekt für die Zellen dar, sondern spiegelt vielmehr einen Zustand wieder, der die physiologischen Bedingungen für die Zellen besser imitiert. Der Sauerstoffgehalt in den Geweben und Organen von erwachsenen Menschen liegt durchschnittlich bei nur 3 %. Es hat sich gezeigt, dass die dynamische Kultivierung im Reaktor der statischen dreidimensionalen Kultivierung in vielerlei Hinsicht überlegen ist. So sind die hochdicht gewachsenen, gewebeähnlichen Zellschichten nach den dynamischen Kultivierungen im Bioreaktor generell stärker ausgeprägt als nach statischen Kultivierungen. Auch der Grad der Mineralisierung der von den Zellen selbst generierten extrazellulären Matrix war nach den dynamischen Kultivierungen sichtbar höher und verdeutlicht so die Notwendigkeit einer dynamischen Kultivierung für die Herstellung gewebeähnlicher Konstrukte.

Schlagerworte: humane umbilikalische Zellen, Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktoren, Hypoxie, osteogene Differenzierung

## Abstract

The therapy of critical sized bone defects usually requires the transplantation of bone substitutes. Since the availability of autologous transplants is limited and the use of allogenic or xenogenic tissue substitutes has some drawbacks and is not without risk, it is of crucial importance to establish reproducible methods for the *in vitro* generation of biologically functional bone tissue substitutes. For this purpose, the field of Tissue Engineering offers eligible ideas and approaches.

In this work it was investigated whether human cells, derived from the umbilical cord, represent a suitable cell source for adult stem cells, in order to generate such bone-like tissue constructs. Therefore, the cells were initially cultivated statically on highly porous ceramic cell carriers (Sponceram®) and in addition they were cultivated comparatively in the Z<sup>®</sup> RP- and Z<sup>®</sup> RPD-bioreactors. These rotating bed bioreactors ensure an optimal supply of the cells with nutrients. At the same time the influence of hypoxia on the dynamic long-term cultivation of the umbilical cells was examined. Since in *in vitro* cell cultivation oxygen contents below 21 % are regarded as hypoxic, the hypoxia represents no compellingly negative factor for the cells, but rather reflects a situation, which imitates the physiological conditions for the cells more precisely. The oxygen content in the tissues and organs of adult humans is on the average about only 3 %, with values ranging from 1 % in some regions of the bone marrow and 12 % in the arterial blood.

It could be shown that the dynamic bioreactor cultivation is superior in various regards when compared to the static three-dimensional cultivation. Thus, the high density tissue-like cell layers are generally developed more intense after dynamic bioreactor cultivations than after static cultivations. Also, the degree of mineralization of the extracellular matrix, which is generated by the cells themselves, was clearly higher and points out the necessity of a dynamic cultivation for the generation of constructs that are equivalent to native tissue(s).

Keywords: human umbilical cord-derived cells, Z<sup>®</sup> RP-bioreactors, hypoxia, osteogenic differentiation

# 1 Einleitung

Die Regeneration großer Knochendefekte wird heutzutage noch immer idealerweise durch zu Hilfenahme autologer Transplantate therapiert. Autologe Transplantate werden an anderer Stelle des Körpers des Patienten entnommen und in den Defekt eingesetzt. Dies geht immer mit einer zweiten Operation einher und zusätzlich kann es an der Entnahmestelle des Transplantats zu Komplikationen kommen. Außerdem ist die Verfügbarkeit solcher autologen Transplantate begrenzt. Eine andere Therapiemöglichkeit stellt die Verwendung allogener oder xenogener Transplantate dar. Bei deren Verwendung muss jedoch immer mit einer Abstoßungsreaktion des Körpers gerechnet werden, weshalb hier die zusätzliche Gabe von Immunsuppressiva unumgänglich ist. Xenogenen Transplantaten wohnt zudem die Gefahr der Übertragung von Virusinfektionen inne<sup>8</sup>.

Daher ist es von großer Bedeutung, reproduzierbare Methoden zur Herstellung von bioartifiziellem und funktionellem Knochenersatz zu entwickeln<sup>69</sup>. Dies kann zum einen durch die moderne Methodik des *Tissue Engineering* geschehen oder durch Zelltherapien. Der entscheidende Unterschied dieser Techniken ist, dass beim *Tissue Engineering* ein Grundgerüst zur zellulären Besiedlung zur Verfügung gestellt wird, welches dann komplett in den Defekt eingesetzt wird. Dies ist bei der Anwendung zellulärer Therapien nicht der Fall. Hier werden geeignete Zellen dahingehend vorbehandelt bzw. vorkultiviert, dass sie als Suspension direkt in den Defekt eingespritzt werden und dort ihrer ihnen zugeordneten Funktion nachgehen können. Diese Methode eignet sich natürlich nicht für die Regeneration großer Knochendefekte. In beiden Fällen ist aber die Auswahl der zu verwendenden Zellen von entscheidender Bedeutung.

Stammzellen im Allgemeinen stellen eine gute Wahl dar, da sie eine gewisse Plastizität besitzen, d.h. sie sind in der Lage zu unterschiedlichen Zellen des Organismus zu differenzieren. Des Weiteren besitzen sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ganz im Gegensatz zu somatischen Zellen, die in Kultur nicht besonders lang lebensfähig sind. Dabei müssen es gar nicht die vieldiskutierten embryonalen Stammzellen sein, die zwar das größte Differenzierungspotential besitzen aber eben auch große ethische Bedenken in den Vordergrund rücken. Außerdem wurde im Zusammenhang mit der Transplantation embryonaler Stammzellen immer wieder von Tumorformationen berichtet.

Zellen, die sich trotzdem noch zu verschiedenen Zelltypen differenzieren lassen, finden sich in nahezu jedem Gewebe eines ausgewachsenen Organismus. Zwar besitzen diese adulten Stammzellen ein eingeschränktes Differenzierungspotential im Vergleich zu embryonalen Stammzellen, doch lassen sie sich in der Regel noch zu den verschiedensten Zelltypen differenzieren. Aufgrund der ursprünglichen Keimblattzugehörigkeit unterscheidet man zwischen mesenchymalen, endodermalen und ektodermalen Stammzellen. Zu den ontogenetisch jüngsten adulten, mesenchymalen Stammzellen im biologischen Sinne gehören vor allem die umbilikalen Stammzellen. Einer ihrer entscheidenden Vorteile liegt darin, dass Nabelschnüre in der Regel als Abfall behandelt werden. Demnach ist die Verfügbarkeit umbilikaler Zellen außerordentlich gut. In Kultur zeichnen sich diese Zellen durch vergleichsweise kurze Verdopplungszeiten aus, wenn man andere adulte Stammzellen, wie z.B. mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks, mit in Betracht zieht. Ein Vorteil umbilikaler Stammzellen gegenüber anderen adulten Stammzellen liegt darin, dass sie im Allgemeinen keine oder nur geringe Abstoßungsreaktionen hervorrufen, auch nicht, wenn sie allogene transplantiert werden.

Bei Problemstellungen des *Tissue Engineering* stellt sich zudem die Frage nach einem geeigneten Trägermaterial. Die Wahl des Trägergerüsts ist dabei vor allem abhängig von der späteren Anwendung des Konstruktes, d.h. von den physiologischen Begebenheiten an der Implantationsstelle. So müssen diese Gerüste zwar sowohl für die Knochen- als auch die Knorpelregeneration äußerst stabil sein und großem Druck standhalten können, dennoch muss verständlicherweise das Knorpelgerüst deutlich weicher in der Textur sein als ein Gerüst, das für den Knochenersatz herangezogen werden soll. Um die Oberfläche dieser Gerüste zu maximieren haben sich bisher hochporöse, aber gleichzeitig hochstabile Materialien als tauglich erwiesen und durchgesetzt und es steht zweifelsfrei fest, dass sich solche Materialien vor allem für ein *Tissue Engineering* von Knochengewebe sehr gut eignen. Ein weiterer wichtiger Punkt bei der Wahl eines geeigneten Trägermaterials ist eine eventuell geforderte Resorbierbarkeit. Dies ist ein besonders schwieriger Punkt, da die Abbaugeschwindigkeit des Gerüsts im Idealfall mit der Aufbaugeschwindigkeit des neuen Gewebes korrelieren sollte. Baut sich das Trägermaterial zu schnell ab, so ist das neu gebildete Gewebe möglicherweise noch zu instabil um Belastungen standhalten zu können. Baut es sich zu langsam ab, kann es zu Wucherungen des neu gebildeten Gewebes kommen, da der Proliferationsdrang der Zellen dann in andere Richtungen fortschreitet.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass für die Kultivierung der Zellen auf dem gewählten Trägermaterial eine gewisse Dynamik unabdingbar ist, um funktionellen Gewebeersatz generieren zu können. Diese kann in der Regel nur durch den Einsatz von Bioreaktoren bereitgestellt werden. Der entscheidende Unterschied zwischen dynamischer Kultivierung im Bioreaktor und klassischer statischer Zellkultivierung liegt darin, dass sich in den Bioreaktoren die besiedelten Konstrukte im Medium bewegen (oder sich das Medium um die Konstrukte bewegt), wodurch eine bessere Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet werden kann, da die Transportprozesse nicht mehr rein diffusionskontrolliert ablaufen. So ist es durch den Einsatz von Bioreaktoren möglich geworden, hochdichte Zellkonstrukte zu generieren. Gleichzeitig entstehen durch die Bewegung des Mediums Flüssigkeitsströmungen, die als mechanischer Reiz für die Zellen fungieren können. Dadurch wird eine genauere Imitation der *in vivo* Umgebung für die verwendeten Zellen und so auch der hergestellten Konstrukte unterstützt. Außerdem wird durch den Einsatz von Bioreaktoren eine genauere Kontrolle und Regulierung von äußeren Kultivierungsparametern, wie pH-Wert oder Gaszufuhr, ermöglicht.

## 2 Aufgabenstellung

Ziele dieser Arbeit sind zum einen die (undifferenzierte) Vermehrung humaner Stammzellen und zum anderen die Generierung von bioartifiziellem und funktionellem Knochenersatzgewebe mit den Methoden des *Tissue Engineering*. Den biologischen Anteil dieses Knochenersatzes sollen humane, mesenchymale Stromazellen bilden, die aus der Nabelschnur extrahiert wurden (hUCs, engl.: *human umbilical cord-derived cells*). Sie sollen zunächst vermehrt und anschließend zu Knochen(-vorläufer-)zellen ausdifferenziert werden. Diese Differenzierung soll vor allem durch das gewählte Biomaterial aber auch durch die dynamische Kultivierung in einem Bioreaktor erreicht werden und weniger durch die Optimierung von Medien bzw. ihrer osteoinduktiven Zusätze. Die Effektivität verschiedener osteoinduktiver Mediensupplemente wurde in vorangegangenen Arbeiten am Institut bereits eingehend untersucht.

Die osteogene Differenzierung bzw. der Grad der osteogenen Differenzierung der Zellen soll im Anschluss an die Kultivierungen (Endpunktanalyse) mit gängigen Methoden wie der spezifischen Anfärbung von Zell- und Matrixbestandteilen (histologische Färbungen), der Durchflusszytometrie und der Analyse der Genexpression mittels RT-PCR knochenspezifischer *messenger RNA* (mRNA) analysiert werden.

Den thematischen Schwerpunkt dieser Arbeit bilden die dynamischen Langzeitkultivierungen in einem von der Zellwerk GmbH (Oberkrämer, Deutschland) neu entwickelten Einwegbioreaktor, dem Z<sup>®</sup> RPD, der als Pendant zum bereits kommerzialisierten Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor fungiert. Diese Kultivierungen erfolgen unter Zuhilfenahme einer keramischen Trägersubstanz, deren inhärente Osteoinduktivität ebenfalls analysiert werden soll. Ziel ist es, eine knochenähnliche Gewebestruktur zu generieren, die aus hochdicht gewachsenen Zellen besteht, welche in einer von den Zellen selbst generierten, knochenspezifischen extrazellulären Matrix eingebettet sind. Weiterhin sollen die beiden Reaktorsysteme vergleichend analysiert werden.

Als weiterer Punkt soll der Einfluss der Hypoxie auf die Kultivierungen in den beiden Reaktorsystemen untersucht werden. Da in der klassischen Zellkultivierung mit einem Sauerstoffgehalt von etwa 21 % (Luftsauerstoff) gearbeitet wird, werden alle geringeren Sauerstoffgehalte als hypoxisch definiert. So definiert ist die Hypoxie kein schädigender

Zustand für die Zellen, da sie *in vivo* in einem Milieu mit durchschnittlichen Sauerstoffgehalten von etwa 3 % existieren. Dabei treten regionale Unterschiede auf, die zwischen 1 % für Bereiche des Knochenmarks und 12 % im Falle des arteriellen Bluts liegen. Der hier definierte Begriff der Hypoxie beschreibt also in der Tat einen eher physiologischen Sauerstoffgehalt für Zellen und Gewebe.

Mit dieser Arbeit werden verschiedene Aspekte des *Tissue Engineering* vereint. Unter Verwendung mesenchymaler Stromazellen und eines geeigneten dreidimensionalen Trägermaterials sollen unter dynamischen Kultivierungsbedingungen in einem Bioreaktor gewebeartige Knochenkonstrukte hergestellt werden, wobei die Rotation des Reaktorbettes und seine Perfusion mit Medium das hochdichte Zell- bzw. Gewebewachstum optimieren sollen.



## 3 Theoretische Grundlagen

### 3.1 Adulte mesenchymale Stammzellen

Stammzellen sind, ganz allgemein, die sich selbst regenerierenden Vorläuferzellen der gewebespezifischen Zelltypen aller Körpergewebe. Sie können anhand verschiedener Kriterien klassifiziert werden. Ordnet man sie anhand ihrer (ontogenetischen) Herkunft, so können Stammzellen embryonal, germinal oder somatisch (fötal oder adult) sein. Anhand ihrer Kapazität in andere Zelltypen zu differenzieren, kann man sie als toti-, pluri- oder multipotent klassifizieren. Stammzellen können aber auch entsprechend ihrer in der Embryonalentwicklung begründeten Keimblattzugehörigkeit als meso-, endo- oder ektodermal klassifiziert werden<sup>13</sup>. Stammzellen sind ideale Kandidaten für eine Verwendung in der Regenerativen Medizin, im *Tissue Engineering* sowie für Zellersatztherapien vor allem aufgrund ihrer Regenerationsfähigkeit und Plastizität und ihrer daraus resultierenden Eigenschaft bezüglich der Differenzierung noch nicht terminal auf einen Zelltyp festgelegt zu sein.

Die Gruppe der adulten Stammzellen findet man als undifferenzierte Zellen zwischen den ausdifferenzierten Zellen eines Gewebes oder Organs. Auch sie besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu erneuern<sup>33</sup>. Die Entdeckung adulter Stammzellen geht auf die Arbeiten von Friedenstein et al. zurück. Sie fanden im Knochenmark, neben den bereits bekannten hämatopoetischen Zellen, weitere, adhäsionsabhängige Zellen, die sich *in vitro* rasch vermehren und zudem osteogen differenzieren ließen<sup>26,27</sup>. Seit ihrer ersten Entdeckung haben diese Zellen verschiedenste Namen erhalten. So werden sie heute meist als adulte, mesenchymale Stamm- oder Stromazellen (MSCs) aus diversen Geweben eines ausgewachsenen Organismus isoliert. Etliche Studien zeigen, dass sich solche Zellen unter anderem aus dem Fettgewebe<sup>43,63,67,81</sup>, der Plazenta<sup>28,77</sup>, dem Nabelschnurblut<sup>5,23,30,44</sup> sowie Nabelschnurgewebe<sup>60,64,75</sup>, aber auch aus peripherem Blut<sup>82</sup>, Muskelgewebe oder Gelenkflüssigkeit<sup>63</sup> extrahieren lassen.

Dennoch ist die meist verwendete Quelle zur Gewinnung adulter Stammzellen bis heute das Knochenmark<sup>13</sup>, obwohl in vielen Studien gezeigt werden konnte, dass die Ausbeute an Stammzellen bei Extraktion aus anderen Geweben deutlich höher ist<sup>63</sup>. Schätzungen gehen davon aus, dass nur eine von 10.000 bis 100.000 Zellen des Knochenmarks eine Stammzelle ist<sup>9,10,33</sup>.

Das natürliche Differenzierungspotential adulter Stammzellen scheint vor allem gegenüber embryonalen Stammzellen deutlich limitiert zu sein. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass dieses Potential auf Zelltypen des Gewebes beschränkt ist, aus dem sie selbst stammen, zumindest aber auf Zelltypen, die in der Embryonalentwicklung vom selben Keimblatt abstammen. Zusätzlich zu dieser eingeschränkten Multipotenz können Stammzellen aber scheinbar unter gewissen Umständen und Kultivierungsbedingungen die Keimblattgrenzen überwinden und zu atypischen Zelltypen differenzieren<sup>13, 32, 50</sup>.

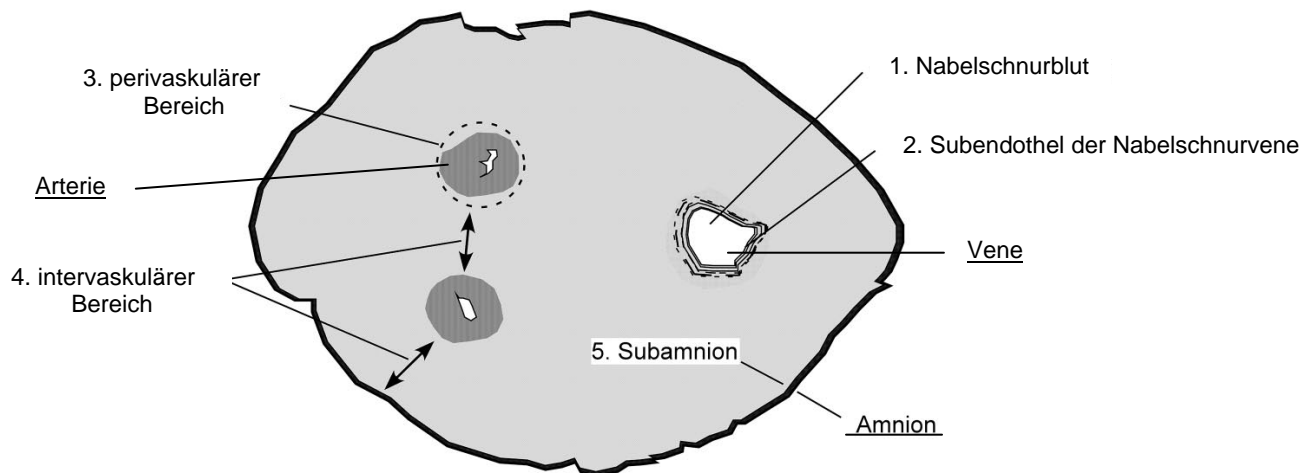
Ein solches Ereignis wird in der Literatur häufig durch das Phänomen einer Transdifferenzierung erklärt und wird gern mit Schlagworten wie „Blut zu Leber“ oder „Knochen zu Hirn“ belegt<sup>6, 32, 41, 54, 57, 70</sup>. Da der Begriff der Transdifferenzierung ursprünglich die Transformation einer terminal differenzierten Zelle (ohne jedes Stammzellpotential) in eine andere beschreibt, was mit dem vollständigen Verlust eines Phänotyps und dem Gewinn eines neuen einhergeht<sup>21</sup>, wird das Vorkommen dieses Phänomens bei adulten Stammzellen in viele Studien angezweifelt und stattdessen eine Zellfusion als möglicher alternativer Mechanismus vorgeschlagen<sup>17, 49, 72, 75</sup>. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen, stark widersprüchlichen Resultate wird eine tatsächliche Transdifferenzierbarkeit von Stammzellen heute intensiv diskutiert.

Neben dem Differenzierungspotential scheint auch die Regenerationsfähigkeit adulter Stammzellen eingeschränkt zu sein. Das Regenerationspotential wird dabei durch die Geschwindigkeit der Populationsverdopplung sowie die maximal mögliche Anzahl an Verdopplungen definiert, bevor die Zellen in eine replikative Seneszenz eintreten. Beides hängt scheinbar vor allem vom ontogenetischen Alter, und damit vom Alter des Spenders der Zellen, ab<sup>10, 73, 79</sup>. So konnten MSCs des Knochenmarks bzw. aus dem Fettgewebe von Kern et al. nur für sieben und acht Passagen kultiviert werden. Das Alter der Spender lag für die Knochenmarksaspirate zwischen 68 und 84 Jahren, für die Aspirate des Fettgewebes zwischen 26 und 57 Jahren<sup>39</sup>. Bruder et al. etwa postulierten einen deutlichen Rückgang der Populationsverdopplungen von hMSCs des Knochenmarks erst ab der zehnten Passage<sup>9</sup>. Das Spenderalter lag in dieser Studie zwischen drei und 28 Jahren. So werden adulte, mesenchymale Stromazellen in der Regel innerhalb der ersten sechs *in vitro* Passagen verwendet<sup>71</sup>.

Trotz der genannten Nachteile, besitzen adulte Stammzellen gegenüber embryonalen natürlich auch einige Vorteile. Diese liegen hauptsächlich in ihrer leichten Verfügbarkeit, die allerdings je nach Gewebequelle variiert. Des Weiteren werden durch ihre Verwendung keine ethischen Diskussionen in den Fokus der öffentlichen Aufmerksamkeit gestellt, wie es bei embryonalen Zellen der Fall ist. Der entscheidendste Vorteil ist aber die Option, sie als autologe Zellquelle für die Verwendung in der Regenerativen Medizin einsetzen zu können. Autologe Zellen haben gegenüber allogenen Zellen generell den Vorteil, dass es bei ihrer Implantation zu geringeren Abstoßungsreaktionen des Organismus kommt, weshalb auf die zusätzliche Gabe von Immunsuppressiva verzichtet werden kann.

### 3.1.1 Umbilikale Stammzellen

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits angesprochen, können auch aus der Nabelschnur mesenchymale Stamm- oder Stromazellen extrahiert werden. Dabei ist die Nabelschnur als Stammzellquelle äußerst interessant, da Nabelschnüre relativ leicht verfügbar sind und in der Regel als Abfall behandelt werden. Dabei wird in jüngster Zeit massiv für eine private Einlagerung umbilikaler Stammzellen (oder des Nabelschnurblutes) geworben, mit dem Hinweis auf eine lebenslange Therapiemöglichkeit mit autologen Stammzellen bei schweren Erkrankungen des Kindes, obwohl diese zum heutigen Zeitpunkt noch nicht gegeben ist. Mesenchymale Stromazellen können prinzipiell aus verschiedenen Bereichen der Nabelschnur isoliert werden. So werden in der Literatur drei deutlich voneinander abgrenzbare Bereiche der Nabelschnur beschrieben, aus denen diese Zellen erfolgreich extrahiert werden konnten (siehe hierzu Abb. 3.1). Zu diesen Bereichen gehören neben dem Nabelschnurblut<sup>5, 23, 30, 44</sup> auch das Subendothel der Nabelschnurvene<sup>14, 60</sup> sowie das interstitielle Bindegewebe der Nabelschnur, das als *Wharton's Jelly* bezeichnet wird<sup>75</sup>. Der Name *Wharton's Jelly* (Wharton'sche Sulze) geht zurück auf den Arzt und Anatom Thomas Wharton (1614 - 1673), der dieses Gewebe bereits 1656 als erster beschrieben hat. Innerhalb des *Wharton's Jelly* werden weiterhin drei unklar voneinander abgegrenzte Bereiche für die Zellextraktion benannt. Dies sind die inter- und perivaskulären Bereiche der Nabelschnur sowie das Subamnion<sup>64, 71</sup>.



**Abb. 3.1:** Aufbau der Nabelschnur; schematische Darstellung der Nabelschnur mit definierten Bereichen für die Extraktion adulter Stammzellen. Die Bereiche 3.-5. gehören zum interstitiellen Bindegewebe, dem *Wharton's Jelly* [adaptiert aus 71].

Die einfachste Methode der Extraktion umbilikaler Stromazellen ist die Durchführung einer Explantatkultur. Dazu wird die Nabelschnur mehrfach mit PBS gespült, um das in Vene und Arterien enthaltene Blut zu entfernen, und anschließend in kleine Stücke von etwa einem halben Quadratzentimeter geschnitten. Diese Explantate werden dann in klassischen Zell- oder Gewebekulturgefäßen kultiviert bis die Zellen aus den Stücken heraus auf die Oberfläche des Zellkulturgefäßes wachsen. Nach Entfernung der Explantate kann man die Zellen gewöhnlich weiter kultivieren. Da solche Zellkulturen meist eine Mischpopulation darstellen, kann durch Bereitstellung eines geeigneten Mediums zur Kultivierung mesenchymaler Stamm- oder Stromazellen, dafür Sorge getragen werden, dass andere enthaltene Zelltypen absterben, weil ihnen spezifische Nährstoffe fehlen.

Andere Methoden sehen eine vorherige Entfernung der Blutgefäße vor und einen anschließenden Verdau der in kleinere Stücke zerschnittenen Nabelschnur bzw. der relevanten Bereiche der Nabelschnur<sup>60, 64, 75</sup>. Natürlich treten auch verschiedene Variationen und Kombinationen der genannten Methoden auf. Aufgrund der großen Varianz in den Methoden der Zellextraktion sowie in der Auswahl der zur Extraktion verwendeten Kompartimente der Nabelschnur, konnte bis heute nicht geklärt werden, und es erfordert noch viele Untersuchungen, ob all diese Zellen überhaupt dieselben Eigenschaften (wie Proliferations- und Differenzierungspotential oder immunologische Eigenschaften) teilen<sup>51, 71, 76</sup>.

Obwohl viele Studien darin übereinstimmen, dass Nabelschnurzellen, wie auch MSCs anderer Quellen, die Adhäsionsmoleküle CD44 und CD105 sowie die mesenchymalen Marker CD73 und CD90 exprimieren, nicht jedoch die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45<sup>64, 71, 77</sup>, gibt es ebenso eine Vielzahl von Berichten, die entweder nicht alle der genannten Marker untersuchten oder, vor allem bezüglich der antigenen Oberflächenmoleküle CD73, CD90 und CD105, unterschiedliche Expressionsraten feststellten<sup>5, 23, 44</sup>.

Weiterhin besitzen Nabelschnurzellen, da sie die ontogenetisch jüngste Gruppe mesenchymaler Stammzellen darstellen, noch keine ausgebildete Immunogenität. Das heißt, dass sie in der Regel keine Immunabwehr hervorrufen und auch nicht zur Bildung von Teratomen führen, wenn sie allogene oder gar xenogene transplantiert werden<sup>33, 76</sup>. Im Hinblick auf Stammzelltherapien oder für Anwendungen des *Tissue Engineering* eröffnen sie dadurch multiple Möglichkeiten für die zellbasierte Geweberegeneration.

### 3.1.2 Osteogene Differenzierung adulter Stammzellen

Adulte Stammzellen besitzen nicht mehr dasselbe Differenzierungspotential wie ontogenetisch jüngere Stammzellen wie etwa embryonale Stammzellen. Dennoch gelten sie noch als multipotent. Multipotenz bezeichnet die Fähigkeit von Stammzellen zu allen Zelltypen zu differenzieren, die aus demselben Keimblatt hervorgehen wie sie selbst. MSCs können also zu allen Zelltypen des Mesoderms ausdifferenzieren. Dazu gehören alle Gewebszelltypen des Stütz- und Bewegungsapparates, wie Knochen, Knorpel, Bänder und Sehnen. Zuletzt gab es Berichte, nach denen auch eine keimblattübergreifende Differenzierung von Stammzellen als möglich erachtet wird. Als grundlegende Mechanismen wurden hierfür eine Transdifferenzierung oder eine Zellfusion vorgeschlagen<sup>17, 41, 49, 54, 70, 72, 75</sup>.

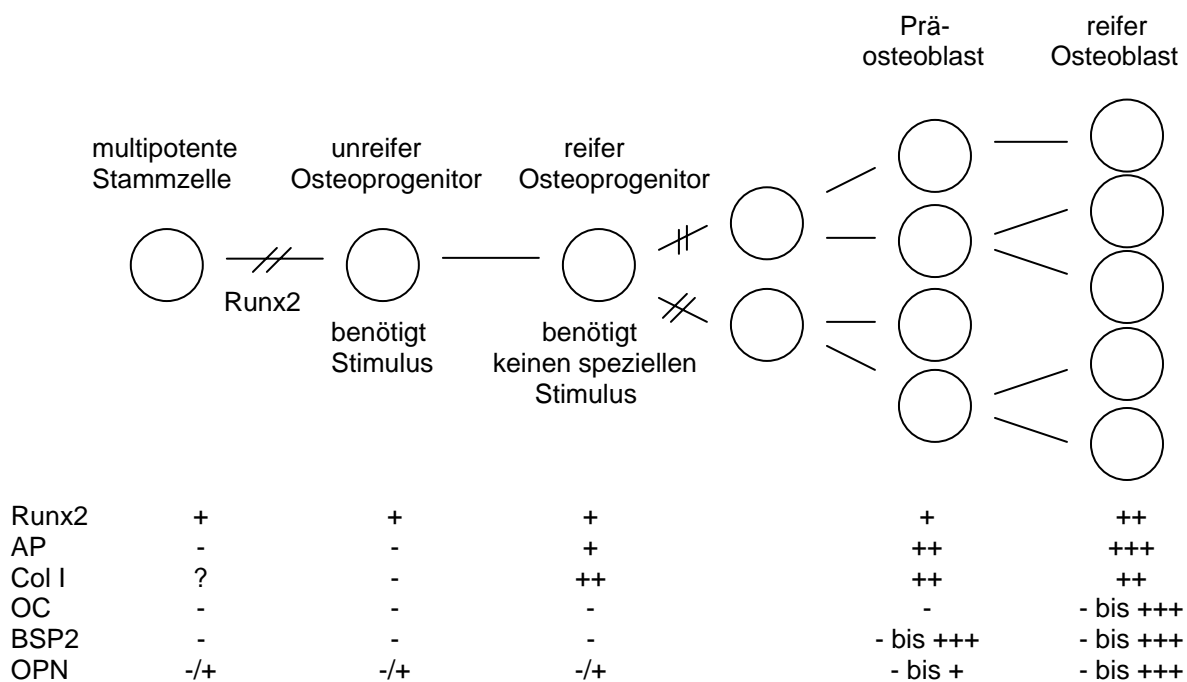
Die *in vitro* Entwicklung mesenchymaler Stammzellen bzw. unreifer Osteoprogenitorzellen hin zu reifen Osteoblasten, die in Knochengewebe eingebettet sind, wird meist in drei Phasen unterteilt. Dies sind eine anfängliche Proliferationsphase auf die eine Phase der Matrixgenerierung und -reifung sowie eine abschließende Phase der Matrixmineralisierung folgen<sup>66</sup>. Owen et al. gingen 1990 noch davon aus, dass die proliferative Phase abgeschlossen sein muss, bevor die Zellen in die Phase der Matrixmaturation eintreten

können<sup>53</sup>. Heute dagegen scheint es wahrscheinlicher, dass die drei postulierten Phasen vielmehr fließend ineinander übergehen. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass sich die Zellen einer Population selten gleichzeitig in derselben Phase der Differenzierung befinden.

Im Verlauf der osteogenen Differenzierung ist die Expression der wichtigsten osteoblastenassoziierten Gene nicht vollständig chronologisch<sup>2,3</sup>. Während der proliferativen Phase werden Gene, die am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, aktiv exprimiert. Dazu gehört z. B. Collagen I (Col I), das etwa 90 % des organischen Anteils der Knochenmatrix ausmacht und dessen mRNA auch während der folgenden Stufen der Osteoblastendifferenzierung weiterhin exprimiert wird<sup>15,66</sup>.

Unmittelbar nachdem die Proliferation abnimmt können Proteine, die mit dem Phänotyp von Knochenzellen assoziiert werden, detektiert werden. Die Expression der Alkalischen Phosphatase (AP) kann dabei um das 10-fache erhöht sein, ist aber abhängig von der Intensität der vorherigen Col I-Akkumulation. Die AP ist ein früher Marker der Phase der Matrixreifung. In stark mineralisierten Kulturen nimmt der Level zellulärer AP-mRNA wieder ab<sup>53,66</sup>.

Mit dem Beginn der Matrixreifung und -mineralisierung werden andere knochenverwandte Gene, wie BSP2 (*Bone Sialo Protein 2*), Osteopontin (OPN) und Osteocalcin (OC) exprimiert. Die OPN-Expression wird zunächst noch während der Periode aktiver Proliferation induziert (mit 25 % des maximalen Levels), nimmt postproliferativ ab, wird dann aber zu Beginn der Mineralisierungsphase erneut induziert und zeigt in ihrem Verlauf die höchsten Expressionslevel. OPN besitzt Bindungsstellen für Calcium, die sowohl für die Proliferation als auch für die Mineralisierung der Knochenmatrix entscheidend sind. OC wird im Gegensatz zu OPN nur postproliferativ und erst während der Mineralisierungsphase exprimiert. Auch OC ist ein Calcium bindendes Protein, seine Reste binden fest an Hydroxylapatit. Die Induktion hoher OC- und OPN-mRNA-Level ist dabei abhängig von einer vorherigen Ablagerung von Mineralien in der extrazellulären Matrix<sup>2,3,45,53,66</sup>. Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression nahezu aller genannten knochenspezifischen Gene reguliert, ist Runx2 (*runt-related protein transcription factor 2*). Er wird bereits sehr früh in der osteogenen Differenzierung exprimiert<sup>20</sup>.



**Abb. 3.2:** Postulierte Schritte der osteogenen Differenzierung multipotenter Stammzellen, die durch *in vitro* und *in vivo* Experimente nachgewiesen wurden. Zusätzlich ist die Expression einiger etablierter Marker angegeben. -: nicht detektierbar; -/+ : detektierbar; +, ++, +++ : unterschiedlich starke Expression; - bis +++ : variable Expression. [adaptiert aus 4]

Bezüglich der Expression der osteoblastären Gene fällt es schwer, die drei postulierten Stadien Proliferation, Matrixaufbau und -reifung sowie Matrixmineralisierung bei der osteogenen Differenzierung von Stammzellen streng voneinander abzugrenzen, da der Mechanismus der osteogenen Differenzierung extrem komplex und bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt ist<sup>3, 34</sup>.

Da differenzierende Stamm- bzw. Progenitorzellpopulationen meist als inhomogene Gruppe vorliegen, in der sich die Zellen in verschiedenen Stadien der osteogenen Differenzierung befinden, ist es teilweise relativ schwierig den Differenzierungsgrad oder -zustand der gesamten Zellpopulation zu bestimmen.

Die osteogene Differenzierung adulter Stammzellen kann *in vitro* durch verschiedene Faktoren induziert werden. Dies sind vor allem biochemische und mechanische Reize. Auf der biochemischen Seite stehen dabei neben natürlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, wie verschiedene Isoformen der BMPs, auch nicht proteinöse, chemische Komponenten wie z. B. das Steroidhormon Dexamethason<sup>80</sup>, das meist in Kombination mit

Vitamin C und  $\beta$ -Glycerolphosphat verwendet wird<sup>9</sup>. Der Vorteil solcher synthetisch hergestellten Chemikalien liegt in ihrer höheren Stabilität und längeren Halbwertszeit, wenn sie sich in Lösung bzw. in Medium befinden. Als mechanische Stimuli zur Induktion der osteogenen Differenzierung werden, in Anlehnung an die Anforderungen, denen die (vor-) differenzierten Zellen *in vivo* ausgesetzt sein werden, vor allem zyklische Dehnung oder Beugung sowie Flüssigkeitsströmungen eingesetzt<sup>34, 78</sup>.

## 3.2 Hypoxie

### 3.2.1 Definition Hypoxie - Normoxie

Als Hypoxie (von gr.: *hypo-* = „unter-“, „weniger-“ und *oxys* = „sauer“) wird im medizinischen Sinne ein herabgesetzter Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut bezeichnet. Im Allgemeinen ist damit eine verminderte bis unzureichende Sauerstoffversorgung der Körpergewebe gemeint. Diese kann örtlich oder allgemein sowie vorübergehend oder chronisch sein<sup>58</sup>. In aller Regel ist die Hypoxie aus medizinischer Sicht ein schädigender Zustand, da sie die unphysiologische, also nicht ausreichende, Versorgung der Gewebe mit Sauerstoff beschreibt. Dabei ist zu beachten, dass ein Sauerstoffgehalt von beispielsweise 8 % im medizinischen Sinne nicht hypoxisch ist, sondern möglicherweise genau dem physiologischen Wert für ein gegebenes Gewebe entspricht und so dessen Normalzustand beschreibt. Der Sauerstoffgehalt in adulten Geweben des Menschen liegt im Durchschnitt bei etwa 3 %<sup>16</sup>.

Wenn man demgegenüber im Zusammenhang mit der *in vitro* Zellkultivierung von hypoxischen Bedingungen spricht, so ist hier im Allgemeinen jeder Sauerstoffgehalt unterhalb von 21 % gemeint<sup>46</sup>. Dieser in der Zellkultur maximale Sauerstoffgehalt von 21 % entspricht dabei einem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) von 100 %, der von der  $pO_2$ -Elektrode gemessen wird. Da in der klassischen Zellkultur in der Regel mit einem Gemisch aus Raumluft und zusätzlich etwa 5 % Kohlendioxid gearbeitet wird, wird hier der Sauerstoffanteil an der Raumluft (21 %) als Referenzwert herangezogen. Die Hypoxie hat so nicht zwingend einen negativen oder schädigenden Einfluss auf die Zellen, da durch niedrigere Sauerstoffgehalte möglicherweise das natürliche Umfeld, und damit die



physiologischen Bedingungen der kultivierten Zellen, besser, das heißt realitätsgetreuer, wiedergegeben wird. Aus diesem Grund muss die Hypoxie für den Bereich der Zellkultivierung durchaus als möglicher positiver Einfluss bewertet werden.

Analog zur Hypoxie ergibt sich die Definition für den Begriff der Normoxie. Die Normoxie beschreibt im Gegensatz zur Hypoxie den Zustand der normalen Versorgung mit Sauerstoff. Medizinisch betrachtet können damit sehr geringe Sauerstoffgehalte gemeint sein, da sie physiologisch sind und nicht zu einer Minderversorgung der Zellen und Gewebe führen. Bezogen auf die *in vitro* Kultivierung von Zellen entsprechen Sauerstoffgehalte von etwa 21 % den normoxischen Bedingungen. Das vollständige Fehlen von Sauerstoff wird sowohl in der Medizin als auch in der Zellkultur als Anoxie (von gr.: *an-* = „nicht“ und *oxys* = „sauer“) bezeichnet.

#### 3.2.2 Einfluss auf Zellproliferation und Differenzierung

Klassische Zellkultivierungen werden in traditionellen Inkubatoren durchgeführt, die in der Regel mit Raumluft und etwa 5 % Kohlendioxid versorgt werden. Sauerstoffgehalte dieser Größenordnung entsprechen nicht den *in vivo* Bedingungen auf der Gewebeebene. Der Sauerstoffgehalt von arteriellem Blut liegt bei etwa 12 %, der durchschnittliche Gehalt in den Geweben (des adulten Organismus) beträgt nur 3 %, wobei deutliche lokale und regionale Unterschiede auftreten können. Der mittlere Sauerstoffdruck in embryonalen Geweben etwa, liegt noch darunter<sup>16</sup>.

Vor allem auf den Bereich der Zelltherapie und des *Tissue Engineering* haben diese geringen physiologischen Sauerstoffgehalte großen Einfluss. So müssen die unter Standardbedingungen kultivierten und vermehrten Zellen, sobald sie in ein defektes Gewebe transplantiert werden, zunächst an die sauerstoffarmen Bedingungen der Gewebe adaptieren. Dadurch wird ihre Proliferation gehemmt und sie können gar absterben<sup>61</sup>. Eine kurzzeitige Hypoxie (1 % für 2 Tage) während der *in vitro* Vermehrung von humanen mesenchymalen Stammzellen kann unter Umständen dazu beitragen, dass nach erfolgter Transplantation das Anwachsen der Zellen *in vivo* verbessert wird<sup>35</sup>. Aus diesem Grund ist die *in vitro* Nachahmung der *in vivo* Mikroumgebung der verwendeten Stammzellen bezüglich des Sauerstoffgehaltes zu einem wichtigen Ansatz im *Tissue Engineering* geworden, um tatsächlich funktionelle Gewebeersatzkonstrukte herstellen zu können. Zwar

befinden sich Stammzellen im lebenden Organismus häufig in ganz unterschiedlichen Mikroumgebungen, doch scheint der geringe Sauerstoffdruck eine Gemeinsamkeit embryonaler Stammzellen und vieler Typen adulter Stammzellen in frühen Entwicklungsstadien zu sein<sup>46</sup>.

Zellen können sich sehr verschieden verhalten wenn sie *in vitro* unter hypoxischen Bedingungen oder bei normalem Sauerstoffgehalt kultiviert werden. Sowohl morphologisch als auch bezüglich ihrer Verdopplungsgeschwindigkeiten und ihrer Differenzierbarkeit. So beschrieben Grayson et al., dass humane Stammzellen des Knochenmarks bei normoxischer Kultivierung ihr Wachstumsverhalten dahingehend verändern, dass sie sich nicht mehr gleichmäßig über die Oberfläche der Zellkulturplastik vermehren, sondern zunächst sogenannte Zellinseln bilden, aus denen bei Erreichen einer bestimmten Zelldichte die einzelnen Zellen erst wieder herauswachsen. Auch morphologisch unterscheiden sich diese Zellen zunehmend von den bei Hypoxie (2 % O<sub>2</sub>) kultivierten Zellen. So waren z. B. die Zellkerne der normoxischen Knochenmarksstammzellen gegenüber den hypoxischen um 50 % vergrößert<sup>31</sup>. Zur Imitierung der natürlichen Bedingungen *in vitro* kann es für einige Zelltypen demnach entscheidend sein, bei welchen Sauerstoffgehalten sie kultiviert werden. Trotz überzeugender Argumente für die hypoxische Zellkultivierung geht die Meinung über den Einfluss der Hypoxie in der Literatur stark auseinander.

In den meisten der in der Literatur beschriebenen Studien zur Hypoxie in der Zellkultur wurden mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks verwendet. Es wurde aber auch das Verhalten adulter Stammzellen aus dem Fettgewebe oder embryonaler Stammzellen unter hypoxischen Bedingungen untersucht. Der Großteil der Studien geht von einem gesteigerten Proliferationspotential aus, wenn die Zellen unter hypoxischen Bedingungen kultiviert werden<sup>31, 38, 56</sup>. Dies scheint allerdings nicht für embryonale Stammzellen zu gelten, sie werden durch hypoxische Bedingungen offenbar in ihrer Proliferation gehemmt<sup>24, 40</sup>. Da der Begriff Hypoxie in der Zellkultur faktisch alle Sauerstoffgehalte unterhalb von 21 % beschreibt, schwanken auch die in den verschiedenen Studien angewandten Sauerstoffgehalte zum Teil stark, meist aber liegen sie zwischen ein und acht Prozent. Eine Übersicht zu hypoxischen Studien mit embryonalen und mesenchymalen Stammzellen (human und murin) findet sich bei Ma et al.<sup>46</sup>.

Die vielfach beschriebene gesteigerte Proliferation der untersuchten mesenchymalen Stammzellen liegt dabei scheinbar nicht unbedingt in einer schnelleren Zellteilung begründet als viel eher in der Tatsache, dass sich die hypoxischen Stammzellen nach

Erreichen der Konfluenz weiterhin teilen und so mehrfache Zellschichten ausbilden können, wodurch die Zelldichte deutlich erhöht wird. Diese ungebremste Vermehrung bleibt auch nach erneutem Passagieren der Zellen erhalten. Unter normoxischen Bedingungen wird die Zellteilung bei Erreichen der Konfluenz durch inhibitorische Signale weitestgehend eingestellt<sup>31</sup>.

Im Verlauf längerer *in vitro* Kultivierung erreichen primäre Zellen früher oder später ein natürliches Stadium der Seneszenz, das mit morphologischen Veränderungen einhergeht, aber auch die Proliferationsgeschwindigkeit drastisch herabsetzt. Humane MSCs des Knochenmarks, die bei geringen Sauerstoffgehalten von 1 % kultiviert werden, altern hingegen deutlich langsamer und der Zustand der Seneszenz tritt wesentlich später ein. Das bedeutet, es sind mehr Populationsverdopplungen möglich, bevor die Zellen die Vermehrung durch das Erreichen der Seneszenz einstellen<sup>38</sup>.

Große Uneinigkeit herrscht in der Literatur, im Gegensatz zum Einfluss auf das Proliferationsverhalten, über den Einfluss der Hypoxie auf die Differenzierbarkeit der verschiedenen Stammzellen. So wurde z. B. festgestellt, dass eine Hypoxie (1 % O<sub>2</sub>) die chondro- und adipogene Differenzierung von humanen Knochenmarksstammzellen positiv beeinflussen kann und gleichzeitig keinerlei Effekt, weder positiv noch negativ, auf die osteogene Differenzierung hat<sup>38</sup>. Andererseits wurde beschrieben, dass zwar eine kurzzeitige Hypoxie (2 % O<sub>2</sub> für drei bis 24 Stunden) keinerlei Einfluss auf die Osteochondrogenese von humanen MSCs des Knochenmarks oder primären Osteoblasten (Maus) im Vergleich zur Differenzierung unter Normalbedingungen hat, kurzzeitige Anoxie hingegen die Osteochondrogenese vollständig inhibiert<sup>62</sup>. In anderen Studien wiederum wurde festgestellt, dass eine kurzzeitige Hypoxie (1 % O<sub>2</sub> für zwei Tage) das osteogene und adipogene Differenzierungspotential von humanen MSCs deutlich herabsetzen kann<sup>35</sup>. Andere Gruppen fanden gleichzeitig, dass humane Knochenmarksstammzellen auch nach sieben Passagen, sowohl unter hypoxischen (2 % O<sub>2</sub>) als auch unter normoxischen Bedingungen, noch erfolgreich in die osteogene und adipogene Richtung differenziert werden können<sup>31</sup>. Eine Studie mit adulten Stammzellen des Fettgewebes (human) zeigte, dass sowohl die Osteogenese als auch die Chondrogenese bei hypoxisch kultivierten Zellen signifikant unterdrückt war im Vergleich zu normoxischen Zellkulturen. Gleichzeitig zeigten die Fettstammzellen bei Hypoxie während

der chondrogenen Differenzierung eine höhere Proliferationsrate als unter Normbedingungen<sup>47</sup>.

Die große Diskrepanz in der Literatur über den Einfluss der Hypoxie erklärt sich wohl durch unterschiedlichste Stammzellquellen, die sich zudem über viele Artengrenzen hinweg erstrecken, sowie die verschiedenen Methoden der Zellextraktion. Des Weiteren gibt es kaum standardisierte Protokolle, weder zur Kultivierung unter Normalbedingungen noch zur hypoxischen Kultivierung. Die als hypoxisch definierten Sauerstoffgehalte variieren daher beträchtlich. Genauso verschieden wie die Studien selbst angelegt sind (z. B. bezüglich der Auswahl der Stammzellen), sind auch die Protokolle zur Differenzierung der unterschiedlichsten Stammzellen sowie die Methoden zum Nachweis der (multiplen) Differenzierungen.

### 3.3 Bioreaktoren

Bioreaktoren sind in den letzten Jahren bzw. Jahrzehnten zu einem unerlässlichen Hilfsmittel in der langzeitigen Zellkultivierung und -vermehrung geworden. Der entscheidende Vorteil von Kultivierungen im Bioreaktor gegenüber statischen Kultivierungen liegt in ihrer Kontinuität und Dynamik. Erst durch die Entwicklung von Bioreaktoren ist die Durchführung von Langzeitkultivierungen möglich geworden. Sie bieten die Möglichkeit einer ununterbrochenen Kultivierung ohne den wiederholten Stress des Passagierens und die daraus resultierende mögliche Schädigung der Zellen. Des Weiteren sind eine kontinuierliche Fütterung und damit Zuführung notwendiger Nährstoffe sowie ein kontinuierliches Herausführen von gegebenenfalls toxischen Metaboliten möglich. Auch bieten Bioreaktoren die Möglichkeit einer ständigen Überwachung von Kultivierungsparametern wie pH-Wert, Temperatur oder Sauerstoffpartialdruck. Dadurch wird die *in vitro* Herstellung mehrschichtiger Zellkonstrukte ermöglicht.

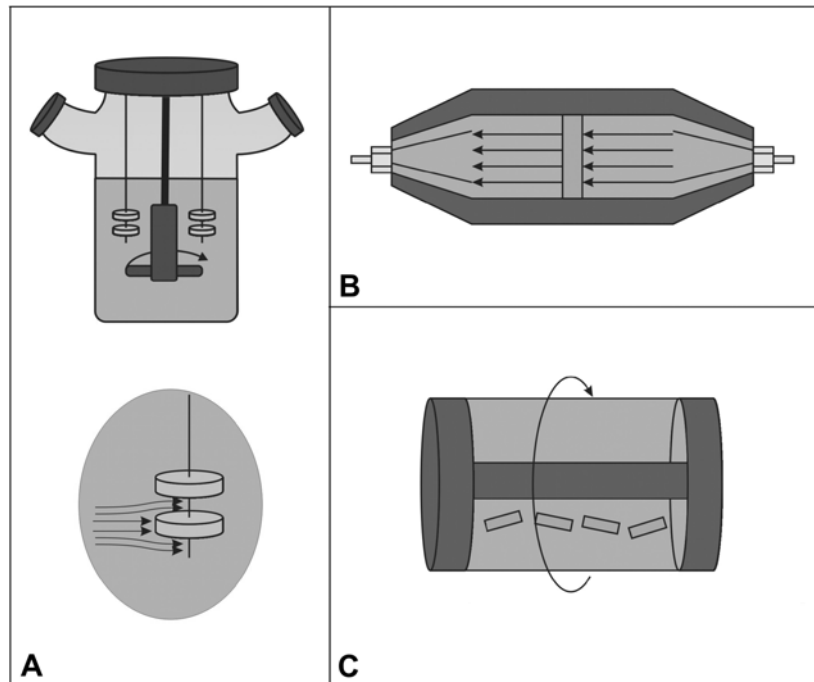
Die ersten und einfachsten entwickelten Bioreaktoren sind die sogenannten Spinnerflaschen. Sie bestehen im Wesentlichen aus einer Glasflasche, an deren Kopf ein

Magnetrührer in das Innere der Flasche reicht. Dieser Reaktor wurde zunächst für Suspensionszellen entworfen, die im Medium suspendiert, von dem Magnetrührer ständig in Bewegung gehalten werden. Um Spinnerflaschen auch für die Kultivierung adhärenter Zellen nutzbar zu machen, kann man entweder das gewünschte Trägermaterial auf Nadeln fixieren oder man greift auf sogenannte *Microcarrier* zurück. Die besiedelten *Microcarrier* werden dann, ganz ähnlich einer Suspensionskultur, durch den magnetischen Rührer in Bewegung gehalten.

Eine ganz andere Entwicklung stellen die Perfusionskammersysteme dar. Diese wurden, anders als die Spinnerflaschen, für die Langzeitkultivierung adhäsionsabhängiger Zellen entwickelt. In der Regel besitzen diese Reaktoren ein festsitzendes Bett (dreidimensionaler Zellträger), der kontinuierlich von Medium durchspült, also perfundiert wird, woher auch der Name dieser Reaktoren abzuleiten ist. Dadurch wird die Nährstoffversorgung der Zellen im Inneren der Konstrukte deutlich verbessert.

Die *rotating wall vessel* Reaktoren (RWVRs) können sowohl zur Kultivierung von Suspensionszellen als auch für adhäsionsabhängige Zellen verwendet werden. Letztere müssen dazu, wie in den Spinnerflaschen, auf *Microcarrier* kultiviert werden. Das Grundgerüst der RWVRs wird durch einen zylindrischen Körper gebildet. Die gleichmäßige Bewegung des Mediums wird durch eine Rotation des horizontal ausgerichteten Zylinders selbst gewährleistet. Durch die horizontale Rotation des Reaktorgefäßes befinden sich die Konstrukte ständig sozusagen im freien Fall. Die Zellen werden also in einer Mikrogravitation kultiviert, wodurch der Scherstress, der auf die Zellen wirkt, minimiert werden kann<sup>25</sup>. Der RWVR wurde zuerst von der NASA vorgestellt. Allerdings besteht bei diesen Reaktoren die Gefahr, dass die besiedelten Konstrukte mit der Reaktorinnenwand kollidieren können, wodurch es zu einem inhomogenen Zellwachstum auf den Zellträgern kommen kann<sup>25</sup>. Die beschriebenen Reaktortypen sind schematisch in Abbildung 3.3 wiedergegeben.

Die RBS (*rotating bed system*) Reaktoren kann man wohl als Hybridentwicklung aus den Perfusionskammersystemen und den RWVRs bezeichnen. Der entscheidende Unterschied zu den RWVRs liegt darin, dass sich hier nicht die Reaktoraußenwand bewegt, sondern das Reaktorbett, auf dem die Zellen adhärent wachsen, selbst. Durch die Rotation kommt es zu einer gleichzeitigen Perfusion des Bettes mit Medium. Auf diese Reaktoren werde ich in den folgenden Abschnitten noch genauer eingehen.



**Abb. 3.3:** Schematische Darstellung verschiedener Bioreaktoren. A: Spinnerflasche; B: Perfusionskammerreaktor; C: *Rotating Wall Vessel* Reaktor (RWVR) [adaptiert aus 48].

Andere Entwicklungen, gerade für den medizinischen Bereich, gehen in Richtung Einwegbioreaktoren. Diese können im Prinzip jedem bereits erwähnten Reaktortyp entsprechen. Die einfachsten Einwegreaktoren sind hierbei die *Bag*-Bioreaktoren, die zuerst in den späten 1990er Jahren entwickelt wurden. Sie bestehen im Prinzip aus einem sterilen Beutel aus unterschiedlichen polymeren Materialien, in dem die Zellen suspendiert oder auf *Microcarriern* kultiviert werden. Eine Bewegung des Beutelinhalts wird dabei durch einen internen Rührer oder durch äußere mechanische Bewegung erreicht (*rocking, shaking, raising, dancing*). Der Vorteil von Einwegreaktoren liegt in ihrer kurzen Aufbauzeit. Außerdem sind weder Sterilisation noch Reinigung nötig und die Gefahr von Kreuzkontaminationen wird minimiert<sup>22</sup>. Für die Herstellung funktionalen Gewebes sind diese Reaktoren allerdings relativ unwichtig, sie werden vor allem zur Herstellung (rekombinanter) Proteine eingesetzt.

### 3.3.1 Bioreaktoren für das *Tissue Engineering*

Der Begriff des *Tissue Engineering* entstand ursprünglich auf einem Biotechnologietreffen, das im Jahr 1987 an der amerikanischen *National Science Foundation* stattfand<sup>51</sup>. Auf dem initialen Treffen zum *Tissue Engineering* wurde dann eine erste Definition des Begriffes formuliert. Demnach vereint das *Tissue Engineering* die Prinzipien und Methoden der technologischen Konstruktion mit denen der (biologischen) Lebenswissenschaften (*Life Sciences*) für die Entwicklung biologischer Substitute mit dem Ziel der Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung von Gewebefunktionen<sup>42, 52</sup>.

Für die Entwicklung von funktionellem Ersatzgewebe sind Bioreaktoren zu einem unerlässlichen Hilfsmittel geworden, nicht nur, weil sie *in vitro* eine Umgebung schaffen, die die *in vivo* Konditionen für das Wachstum von Gewebeersatz imitiert, sondern auch, weil sie eine systematische Untersuchung des Verhaltens lebender Gewebe ermöglichen<sup>11</sup>. Für das *Tissue Engineering*, also die Herstellung und Kultivierung dreidimensionaler Zell- und Gewebekonstrukte, wurden bereits die verschiedensten Bioreaktoren herangezogen. So werden z. B. Perfusionssysteme für die Herstellung von kommerzialisiertem Dermisersatz<sup>55</sup> verwendet und RWVRs wurden herangezogen, um Knorpelgewebe in einem Mikrogravitationsfeld ähnlich dem Umfeld im Weltraum zu generieren<sup>25</sup>.

Es ist anerkannt, dass die Geweberegeneration *in vitro* durch mechanische Kräfte verbessert oder beschleunigt wird. Dabei wird der Scherstress, der durch die Flüssigkeitsströmungen über das kultivierte Konstrukt und in die porösen Strukturen hinein, als wichtigster mechanischer Stimulus angesehen<sup>11</sup>.

Auch für die *in vitro* Generierung von Knochengewebe oder Knochenersatzkonstrukten wurden schon verschiedenste Bioreaktoren herangezogen. In einer vergleichenden Studie untersuchten Sikavitsas et al. den Grad der osteogenen Differenzierung von MSCs der Ratte (Knochenmark). Dazu wurden die Zellen auf porösen PLGA\*-Polymergerüsten angesiedelt und für 21 Tage in Spinnerflaschen und RWVRs sowie konventionell statisch kultiviert. Sie stellten fest, dass die Zellen in den Spinnerflaschen eine beschleunigte Proliferation innerhalb der ersten zwei Wochen, die stärkste AP-Aktivität sowie die höchste OC-Sekretion und Calciumablagerung am Ende der Kultivierung zeigten. Die Zell-Polymer-Konstrukte, die im RWVR kultiviert wurden, zeigten nur eine minimale

---

\* PLGA: *poly(lactic-co-glycolic acid)*

osteogene Differenzierung, die mit einer extrem niedrigen AP-Aktivität im Vergleich zur statischen Kultur, einem vollständigen Fehlen detektierbaren OCs während der 21-tägigen Kultivierung sowie einer äußerst schwachen Calciumablagerung am Ende der Kultivierung einherging<sup>65</sup>. Diese Ergebnisse allerdings widersprechen anderen Berichten zur Kultivierung osteoblastärer Zellen in RWVRs, denn Osteoblasten ähnliche Zellen (SaOS-2) die auf PLGA-Gerüsten angesiedelt wurden, die leichter als Wasser sind, und in einem RWVR kultiviert wurden, zeigten eine erhöhte AP-Aktivität und Mineralienablagerung im Vergleich zur statischen Kontrolle<sup>7, 78</sup>. Durch die Kultivierung von Knochenmarksstammzellen der Ziege auf dreidimensionalen, biphasischen Calciumphosphatgerüsten in einem Perfusionsbioreaktor konnten erstmals klinisch relevante Mengen an Knochengewebe hergestellt werden, dessen Funktionalität durch eine anschließende *in vivo* Knochenbildung im Nacktmausmodell verifiziert werden konnte<sup>36</sup>.

Auch in RBS-Reaktoren konnte für MC3T3-E1-Zellen, primäre Osteoblasten sowie humane Fettstammzellen eine gesteigerte bzw. weiter fortgeschrittene osteogene Differenzierung im Vergleich zu statischen Kultivierungen gezeigt werden. Die Zellen wurden dabei für zwei bis sechs Wochen auf hochporösen, keramischen Zellträgern kultiviert<sup>18, 68</sup>.

Im Hinblick auf die medizinische Verwendung der in Bioreaktoren generierten Knochenersatzkonstrukte gewinnt die Entwicklung und der Einsatz von Einwegbioreaktoren, die die gleichen Funktionalitäten wie die hier genannten Reaktoren aufweisen, immer mehr an Bedeutung.

### 3.3.2 Z<sup>®</sup> RP- und Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktoren

Bei den von der Zellwerk GmbH (Oberkrämer, Deutschland) entwickelten Z<sup>®</sup> RP- und Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktoren handelt es sich um RBS-Bioreaktoren, bei denen das Reaktorbett, also der Träger, auf dem die Zellen adhären, auf einer rotierenden Welle fixiert ist. Die Welle wird dabei berührungslos von außen durch einen Magnetantrieb in Bewegung versetzt. Da im Standardkultivierungsmodus das horizontal ausgerichtete, zylindrische Reaktorgefäß nur zur Hälfte mit Medium gefüllt ist, kommen durch die Rotation des Reaktorbettes die am Zellträger haftenden Zellen abwechselnd mit dem Kultivierungsmedium und dem gasgefüllten Kopfraum des Reaktors in Kontakt. Dadurch



wird eine kontinuierliche und optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen gewährleistet. Für eine stetige Durchmischung im Reaktor zirkuliert ein Teil des Mediums und wird dabei mit frischem Medium angereichert. Als Reaktorbett können prinzipiell alle Biomaterialien eingesetzt werden. Auch die Form des Reaktorbettes ist dabei prinzipiell frei, sofern seine äußere Dimension nicht die Größe des Reaktormantels überschreitet. So kann der Reaktor leicht an verschiedenste Bedürfnisse angepasst werden. Eine ausführliche Charakterisierung des Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktors wurde von Anton et al. durchgeführt<sup>1</sup>.

Der Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor, wie auch die Sponceram<sup>®</sup>-Zellträger, wurde ursprünglich für die langzeitige Kultivierung adhärenter Protein produzierender Säugerzellen entwickelt. Eine Kultivierung mit CHO\*-Zellen beispielsweise ist problemlos über einen Zeitraum von 200 Tagen möglich. Sofern es sich um Proteine handelt, die von den kultivierten Zellen in den Extrazellulärraum sezerniert werden, ist es durch den kontinuierlichen Zu- und Ablauf am Reaktor möglich, diese Proteine auch kontinuierlich aufzureinigen. Durch die weitreichenden Modifikationsmöglichkeiten des Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktors kann er auch für Langzeitkultivierungen mit dem Ziel der Herstellung verschiedenster Gewebe im Rahmen des *Tissue Engineering* herangezogen werden.

Eine neuere Entwicklung stellt der wesentlich kleinere Z<sup>®</sup> RPD Einwegbioreaktor dar, der mit Blick auf eine medizinische Verwendung der generierten Zell-Träger-Konstrukte entworfen wurde. Durch seinen vereinfachten Aufbau lassen sich in ihm gut Testkultivierungen durchführen. Auch für Kultivierungen, die sehr kostenintensive Medien oder Supplemente benötigen, eignet er sich hervorragend, da das Reaktorvolumen gegenüber dem des Z<sup>®</sup> RP stark verringert ist. Als Einwegbioreaktor besteht der Z<sup>®</sup> RPD aus Kunststoff, was zu einer leicht erhöhten Verdunstung im Reaktor führt, da der verwendete Kunststoff nicht vollständig gasdicht ist.

Die Zellträger werden innerhalb des Reaktors mit Zellen besiedelt, wodurch die Gefahr von Kontaminationen gesenkt wird. Zusätzlich befindet sich der Reaktor während der gesamten Kultivierungsdauer in einem GMP\*-konformen *Breeder*, der als sterile Werkbank mit Laminarströmung fungiert und durch den die Kontaminationsgefahr weiter minimiert wird. Der *Breeder* ermöglicht auch eine nahezu kontaminationsfreie Manipulation am Reaktor (z. B. für den Wechsel der Mediumzu- und -ablaufflaschen oder die tägliche Probenahme). Die Beheizung des Reaktors auf die notwendigen 37 °C erfolgt

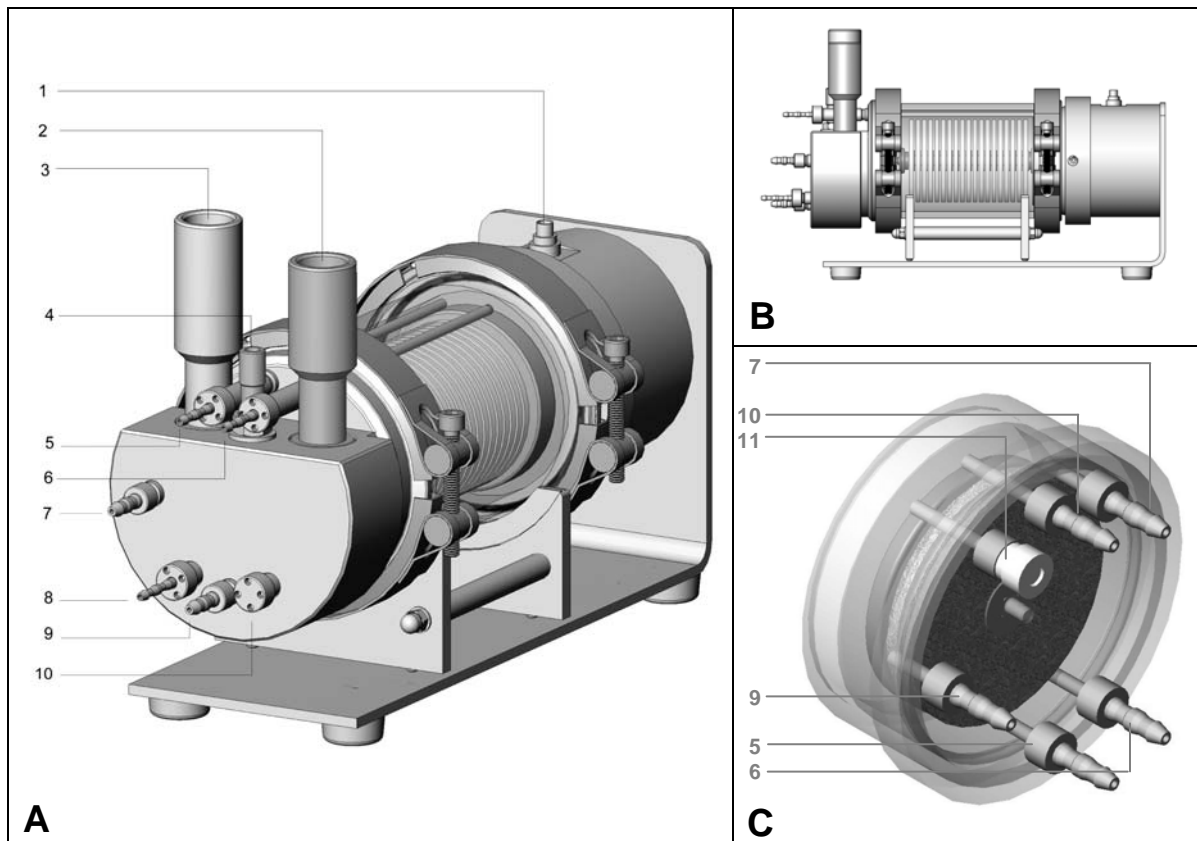
---

\* CHO: *Chinese Hamster Ovary*-Zellen

\* GMP: *good manufacturing practice*

indirekt über die Beheizung des *Breeders*, der zusätzlich mit einer UV-Lampe zur Sterilisation ausgestattet ist.

Die Reaktoren werden mit Elektroden zur pH- und  $pO_2$ -Messung ausgestattet, die sich im Falle des  $Z^{\text{®}}$  RP im Sensordeckel befinden und so direkt in den Reaktorinnenraum führen. Aufgrund seiner geringen Größe sind beim  $Z^{\text{®}}$  RPD die Elektroden außerhalb des Reaktors in sogenannten Messzellen untergebracht. In beiden Fällen werden die Elektroden durch den Umlauf des Mediums (Zirkulation) angeströmt. Die Temperatur des Reaktormediums wird ebenfalls von der pH-Elektrode aufgenommen, sie ist zusätzlich mit einer Pt100-Elektrode ausgestattet.



**Abb. 3.4:**  $Z^{\text{®}}$  RP- und  $Z^{\text{®}}$  RPD-Bioreaktoren; A und B:  $Z^{\text{®}}$  RP-Bioreaktor; C:  $Z^{\text{®}}$  RPD-Bioreaktor; 1. Anschluss Motor an die Steuereinheit, 2. Adapter für pH-Elektrode, 3. Adapter für  $pO_2$ -Elektrode, 4. Adapter für pT100 Temperaturfühler (optional), 5. Medienrohr (Anschluss Zirkulationseinleitung), 6. Mediendüsenrohr (Anschluss Besiedlungsschlauch bzw. Kopfraumbegasung), 7. Anschluss Überlaufschlauch, 8. Anschluss Gaszufuhr Sparger, 9. Anschluss Zirkulationsausgang, 10. Blindstopfen, 11. Septum (Besiedlung und Probenahme).

Der Z<sup>®</sup> RP bietet zwei Begasungsmöglichkeiten. Zum einen kann der Kopfraum des Reaktorgefäßes direkt begast werden, zum anderen kann der Reaktorinhalt über einen *Sparger*, der sich unterhalb der Mediumoberfläche befindet und feine Gasblasen produziert, begast werden. Der Z<sup>®</sup> RPD wird zunächst nur über den Kopfraum begast, er kann jedoch auch so modifiziert werden, dass er, wie der Z<sup>®</sup> RP, einen zweiten Gaseingang über einen *Sparger* erhält. Im Normalfall wird der *Sparger* für die Begasung mit Kohlendioxid zur Regulierung bzw. Stabilisierung des pH-Werts verwendet, da sich das Kohlendioxid durch die feinen Gasbläschen schneller im Medium löst und so der pH-Wert schneller reguliert werden kann. Der Kopfraum wird für eine normoxische Kultivierung mit Luft, für hypoxische Bedingungen mit reinem Stickstoff begast. Obwohl in diesem Falle keinerlei Sauerstoff zugeführt wird ergibt sich keine Anoxie, da das frisch zugeführte Medium noch gelösten Sauerstoff enthält.

## 4 Praktische Arbeiten

Die Verwendung von Stammzellen aus verschiedensten Quellen hat sich in der regenerativen Medizin für die Bereiche des *Tissue Engineering* und der Zelltherapie durchgesetzt. Stammzellen sind für diese Bereiche die geeignete Zellquelle, da sie generell eine hohe Regenerationsfähigkeit und ein mehr oder weniger stark ausgeprägtes Differenzierungspotential besitzen. Seit einigen Jahren liegt der Fokus dabei auf der Verwendung adulter Stammzellen, da diese in der Regel relativ leicht verfügbar sind und durch ihre Verwendung keine ethischen Konflikte oder Bedenken ausgelöst werden, wie es bei der Verwendung embryonaler Stammzellen der Fall ist. So wird bis heute versucht aus immer mehr Geweben oder Organen des menschlichen Organismus adulte, mesenchymale Stammzellen zu extrahieren. Dabei gibt es bezüglich der Dichte des Vorkommens dieser Zellen in den verschiedenen Geweben erhebliche Unterschiede. Mesenchymale Stammzellen eignen sich generell gut, wenn es um die *in vitro* Generierung von Binde- und Stützgeweben bzw. den Geweben des gesamten Bewegungsapparates geht, da sich all diese Gewebe in der Embryonalentwicklung aus dem Mesoderm entwickeln. Aufgrund der verschiedenen Quellen zur Extraktion von MSCs und den teilweise erheblichen Unterschieden in den Methoden der Zellextraktion ist zunächst eine grundlegende Charakterisierung der Zellen erforderlich, da interindividuelle Unterschiede der präparierten Zellen nicht ausgeschlossen werden können.

### 4.1 Charakterisierung umbilikaler Zellen

Die von der Zellwerk GmbH für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Nabelschnurzellen sind anhand unterschiedlicher gängiger Protokolle (z. B. enzymatisch oder durch Explantatkulturen) aus drei verschiedenen Nabelschnüren gewonnen worden. Um einen ersten Eindruck von den verschiedenen Zellen zu bekommen wurden sie zunächst unter morphologischen und populationsdynamischen Gesichtspunkten untersucht. Ausgangspunkt waren jeweils Zellen der frühesten Passage. In der folgenden Übersicht sind alle verwendeten Zellen mit der jeweils zugehörigen kleinsten Passage angegeben. Dabei bezeichnen die Buchstaben (He, Ma, Fs) die verschiedenen Nabelschnüre, die Zahlen

entspringen einer internen Nummerierung der primären Kultivierungsansätze. Eine Übersicht über die verwendeten Medien sowie deren Zusammensetzung befindet sich im Anhang A.1. Diese erste Charakterisierung wurde anhand einfacher Methoden durchgeführt. Es wurden die Populationsverdopplungszeiten für die verschiedenen Zellen bei Kultivierung mit unterschiedlichen Medien berechnet, die Viabilität wurde mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt und es folgte eine morphologische Begutachtung anhand einer Giemsa- bzw. Toluidinblau-Übersichtsfärbung der Zellen.

Übersicht über die verwendeten Zellen:

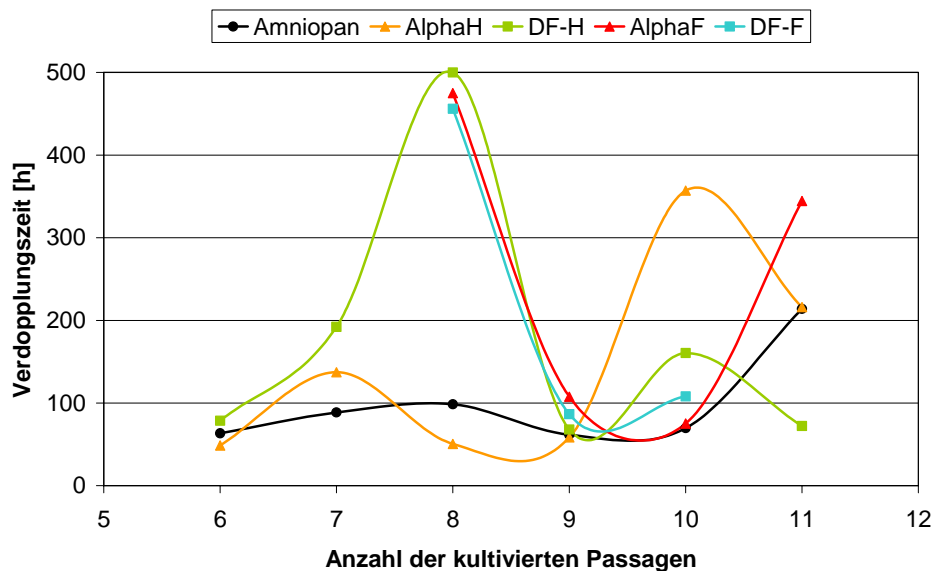
He4 / He18 / He21 / He33	6. Passage
Ma1 / Ma2	4. Passage
Ma3 / Ma4 / Ma5	3. Passage
Fs1	2. Passage

#### 4.1.1 Verdopplungszeiten

Wenn Zellen für biomedizinische Applikationen eingesetzt werden sollen, ist es von entscheidender Bedeutung, dass sie sich *in vitro* einfach und schnell vermehren lassen. Aus diesem Grund wurden die vorliegenden Zellen zunächst bezüglich ihrer Verdopplungszeiten untersucht. Dazu wurden die Zellen in definierter Zahl in klassischen T-Flaschen mit unterschiedlichen Standardmedien kultiviert. Die Formel zur Berechnung der Verdopplungszeiten ist in Anhang A.2 wiedergegeben. Die Verdopplungsgeschwindigkeiten wie auch die Dauer der Kultivierbarkeit von primären Zellen sind vor allem abhängig vom Alter der Zellen. Dieses Alter bezieht sich dabei zum einen auf das Alter des Spenders, zum anderen auf das *in vitro*-Alter der Zellen, das heißt, über wie viele Passage sie bereits kultiviert worden sind<sup>73, 74</sup>.

Alle He-Zellen, lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits in der sechsten Passage vor, wie man der obigen Übersicht entnehmen kann. Sie stellen damit die ältesten verwendeten Zellen dar und haben so die höchste Anzahl an Populationsverdopplungen *in vitro* hinter sich. He4-Zellen konnten dennoch bis zur elften Passage erfolgreich kultiviert werden, wobei die Verdopplungszeiten zum Teil extrem schwankten (Abb. 4.1). Am stabilsten zeigten sich diese Zeiten für die Kultivierung mit Amniopan und lagen für die sechste bis zehnte Passage zwischen 60 und 100 Stunden. Für die anderen gestesteten Medien, AlphaF, DF-F

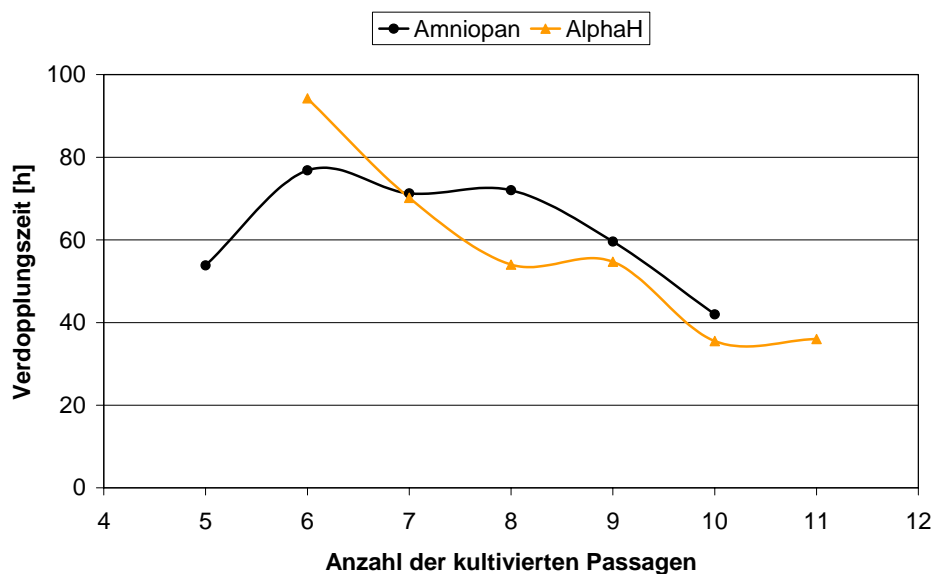
und DF-H, konnten dagegen nur Verdopplungszeiten von teilweise mehr als 250 Stunden berechnet werden. Bei der Kultivierung mit AlphaH wurden für einige wenige Passagen (6, 8 und 9) Verdopplungszeiten von etwa 50 Stunden ermittelt.



**Abb. 4.1:** Populationsverdopplungszeiten von He4-Zellen bei Kultivierung mit verschiedenen Medien. AlphaH/AlphaF: Alpha MEM + HS bzw. FCS; DF-H/DF-F: DMEM/Ham's F-12 + HS/FCS. Die genaue Zusammensetzung der Medien ist in Abschnitt 4.1 bzw. im Anhang A.1 angegeben.

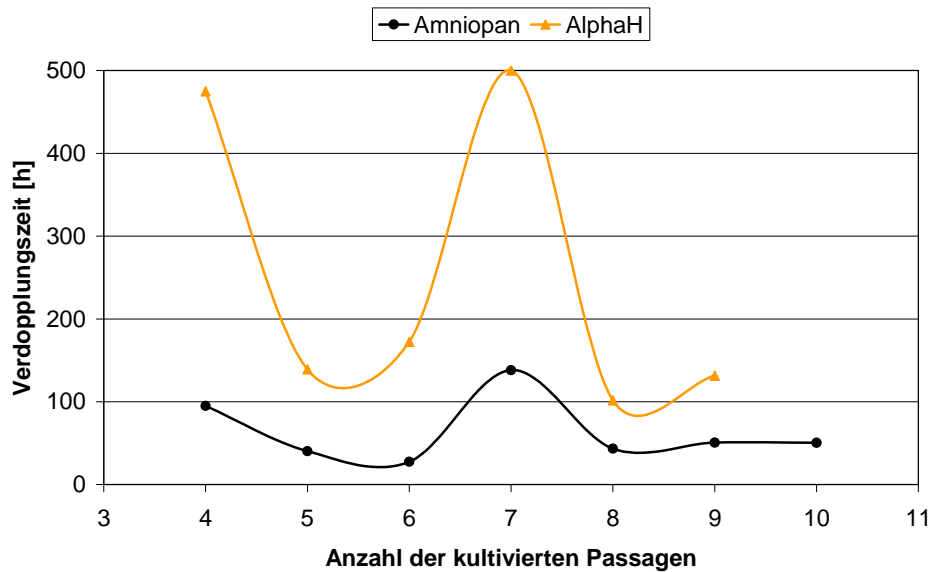
Die He18-Zellen konnten, unabhängig vom gewählten Medium, nicht länger als über drei Passagen in Kultur gehalten werden. Sowohl in DF-F, als auch im speziellen Amniopan-Medium starben die Zellen bereits nach der ersten kultivierten Passage ab, weshalb hier keine aussagekräftigen Verdopplungszeiten berechnet werden konnten. Auch wenn die He18-Zellen mit DF-H oder AlphaF kultiviert wurden, konnten sie ebenso nur über zwei und bei Kultivierung mit AlphaH über drei Passagen erfolgreich vermehrt werden. Im weiteren Verlauf der Kultivierung starben die Zellen auch bei Verwendung dieser Medien ab. He21-Zellen starben nach der Revitalisierung sowohl bei Kultivierung mit Amniopan als auch mit AlphaF oder DF-F bereits nach der ersten kultivierten Passage. Auch mit den Medien, die Humanserum enthalten (AlphaH, DF-H), konnten He21 nur eine Passage länger in Kultur gehalten werden. Wie schon bei den He18 war es auch bei den He21 nicht möglich, verlässliche Verdopplungszeiten zu berechnen.

Die noch ausstehenden He33-Zellen, ließen sich mit Humanserum (AlphaH, DF-H) sowie mit Amniopan erfolgreich bis in die neunte oder zehnte Passage kultivieren (Abb. 4.2). Bei Kultivierung mit FCS-enthaltenden Medien stellten die He33 ihr Wachstum bereits nach zwei kultivierten Passagen ein. Die Verdopplungszeiten konnten aufgrund dessen für diese Kulturen nicht berechnet werden. Auch bei der Verwendung von DF-H erreichten He33 bereits in der dritten kultivierten Passage Verdopplungszeiten von über 300 Stunden. Für die Kultivierung mit Amniopan lagen die Zeiten zwischen 45 und 75 Stunden, wobei sie über den Verlauf der Passagen abnahmen. Für die Kultivierung mit AlphaH wurden zunächst Zeiten von etwa 100 Stunden errechnet, die im Verlauf der Passagen auf unter 40 Stunden in der zehnten und elften Passage fielen. Dies ist erstaunlich, da primäre Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer in eine replikative Seneszenz geraten, die mit stark steigenden Verdopplungszeiten einhergeht<sup>73</sup>. Die hier untersuchten He33-Zellen verhalten sich aber genau entgegengesetzt, sofern sie mit AlphaH oder Amniopan kultiviert werden.



**Abb. 4.2:** Populationsverdopplungszeiten von He33-Zellen bei Kultivierung mit Amniopan bzw. AlphaH (Alpha MEM + HS).

Aus einer weiteren Nabelschnur sind die Ma-Zellen extrahiert worden. Ma1- und Ma2-Zellen lagen in der vierten, Ma3, Ma4 und Ma5 in der dritten Passage vor. Von den Ma-Zellen ließen sich nur Ma1 mit einem anderen Medium als dem speziellen Amniopan in Kultur halten (Abb. 4.3).

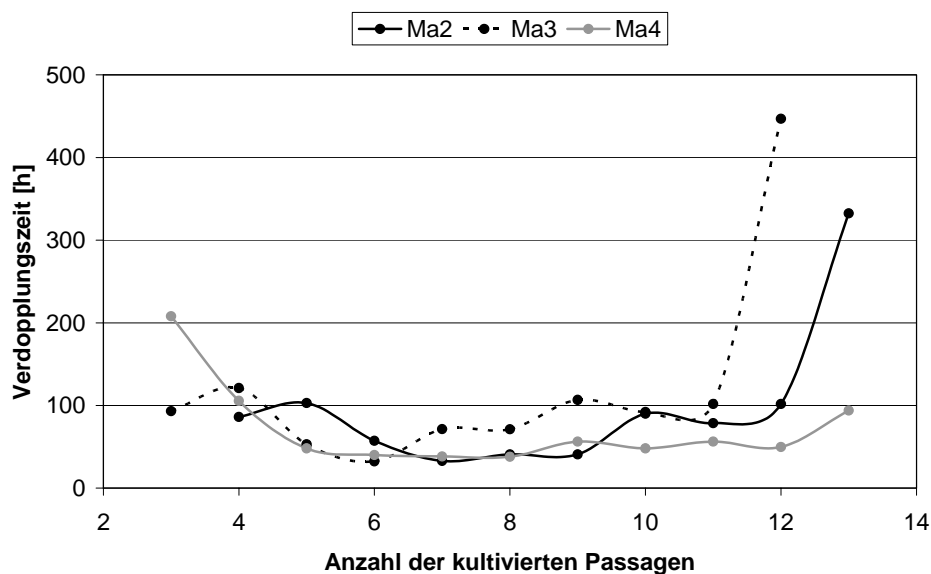


**Abb. 4.3:** Populationsverdopplungszeiten von Ma1-Zellen bei Kultivierung mit Amniopan bzw. AlphaH (Alpha MEM + HS).

Mit AlphaH konnten diese Zellen von der vierten bis zur neunten Passage kultiviert werden, wobei aber Verdopplungszeiten von mindestens 100 Stunden ermittelt wurden. Ma2- bis Ma4-Zellen ließen sich ansonsten erfolgreich über den Verlauf einiger Passagen kultivieren, dies gelang aber lediglich mit dem Spezialmedium Amniopan (Abb. 4.4). Bei Verwendung eines anderen Mediums stellten die Zellen ihre Vermehrung unverzüglich ein und starben ab. Mit Amniopan konnten beispielsweise die Ma4-Zellen über den Zeitraum von elf Passagen kultiviert werden (Passage 3 bis 13). Die Verdopplungszeiten lagen dabei zunächst jenseits von 100 Stunden. Zwischen der fünften und zwölften Passage konnten jedoch Zeiten von etwa 50 Stunden, für die sechste bis achte Passage zwischen 38 und 40 Stunden für eine Populationsverdopplung errechnet werden. Ma2 und Ma3 konnten erfolgreich über neun Passagen in Kultur gehalten werden, bevor sie ihre Vermehrung gänzlich einstellten. Die Zeit für die Verdopplung der Population lag sowohl für Ma2, als auch für Ma3 für die ersten beiden kultivierten Passagen bei etwa 100 Stunden. Für die dritte kultivierte Passage konnten sich beide Zellpopulationen innerhalb von etwa 50 Stunden verdoppeln. Für die folgenden drei Passagen (Passage 7 bis 9) zeigten Ma2-Zellen Verdopplungszeiten etwa 35 Stunden, um anschließend wieder Zeiten von 80 bis 100 Stunden zu erreichen. Ma3-Zellen können sich nur während der sechsten Passage innerhalb kurzer 32 Stunden verdoppeln. Schon ab der folgenden Passage konnten wiederum nur Zeiten von zunächst 70, dann etwa 100 Stunden ermittelt werden. Ma1-Zellen wurden mit Amniopan von der vierten bis zur zehnten Passage kultiviert, wobei die Verdopplungszeit

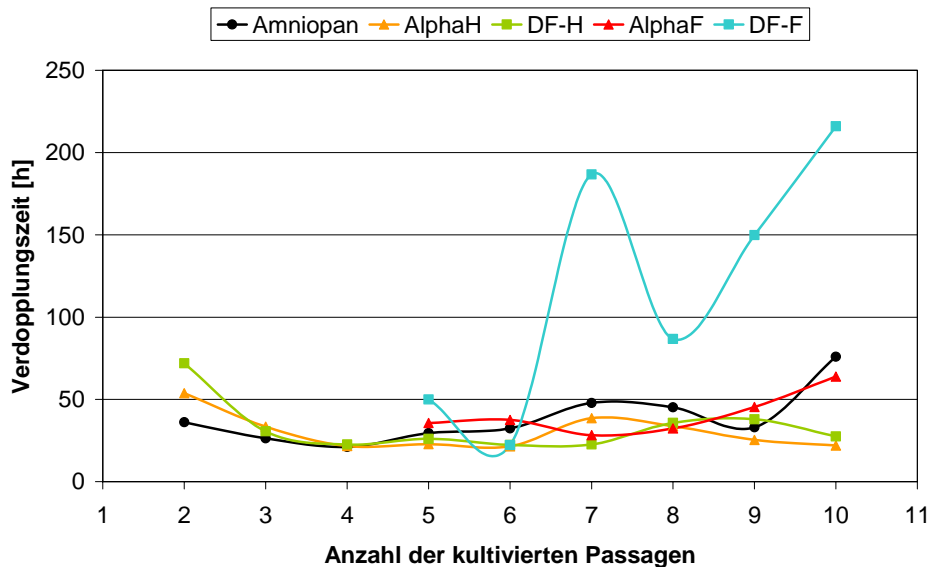


in der sechsten Passage bei vergleichsweise kurzen 27,5 Stunden und auch in der fünften, sowie zwischen der achten und zehnten Passage bei etwa 40 bis 50 Stunden lag (Abb. 4.3). Ma5 konnten mit keinem der eingesetzten Medien *in vitro* kultiviert werden. Auch durch die Verwendung von Amniopan konnte keine Besserung erreicht werden. Ma5-Zellen starben bereits in der dritten Passage nach ihrer Revitalisierung ab.



**Abb. 4.4:** Populationsverdopplungszeiten von Ma2-, Ma3- und Ma4-Zellen bei Kultivierung mit Amniopan. Da diese Zellen nur mit Amniopan kultivierbar waren, sind sie in einer Darstellung zusammengefasst.

Die Fs1-Zellen befanden sich zu Beginn dieser Untersuchungen erst in der zweiten Passage. Sie waren demnach die jüngsten der verwendeten Zellen. Im Gegensatz zu allen zuvor untersuchten Zellen konnten die Fs1 ohne Einschränkungen über mindestens fünf Passagen mit allen getesteten Medien kultiviert werden (Abb. 4.5). Die Verdopplungszeiten lagen dabei stets unterhalb von 75 Stunden, meist sogar unterhalb von 40 Stunden. Einzig bei Kultivierung mit DF-F wurden Zeiten jenseits von 150 Stunden berechnet. Die kürzesten Verdopplungszeiten von etwa 22 Stunden konnten für AlphaH zwischen der vierten und sechsten Passage und für DF-H in der vierten, sechsten und siebten Passage ermittelt werden. Bei Kultivierung mit diesen Medien lagen die Verdopplungszeiten auch für die anderen Passagen teilweise deutlich unterhalb von 40 Stunden. Aber auch mit AlphaF zeigten die Fs1-Zellen kurze Verdopplungszeiten, die erst in der zehnten Passage auf über 50 Stunden anstiegen.



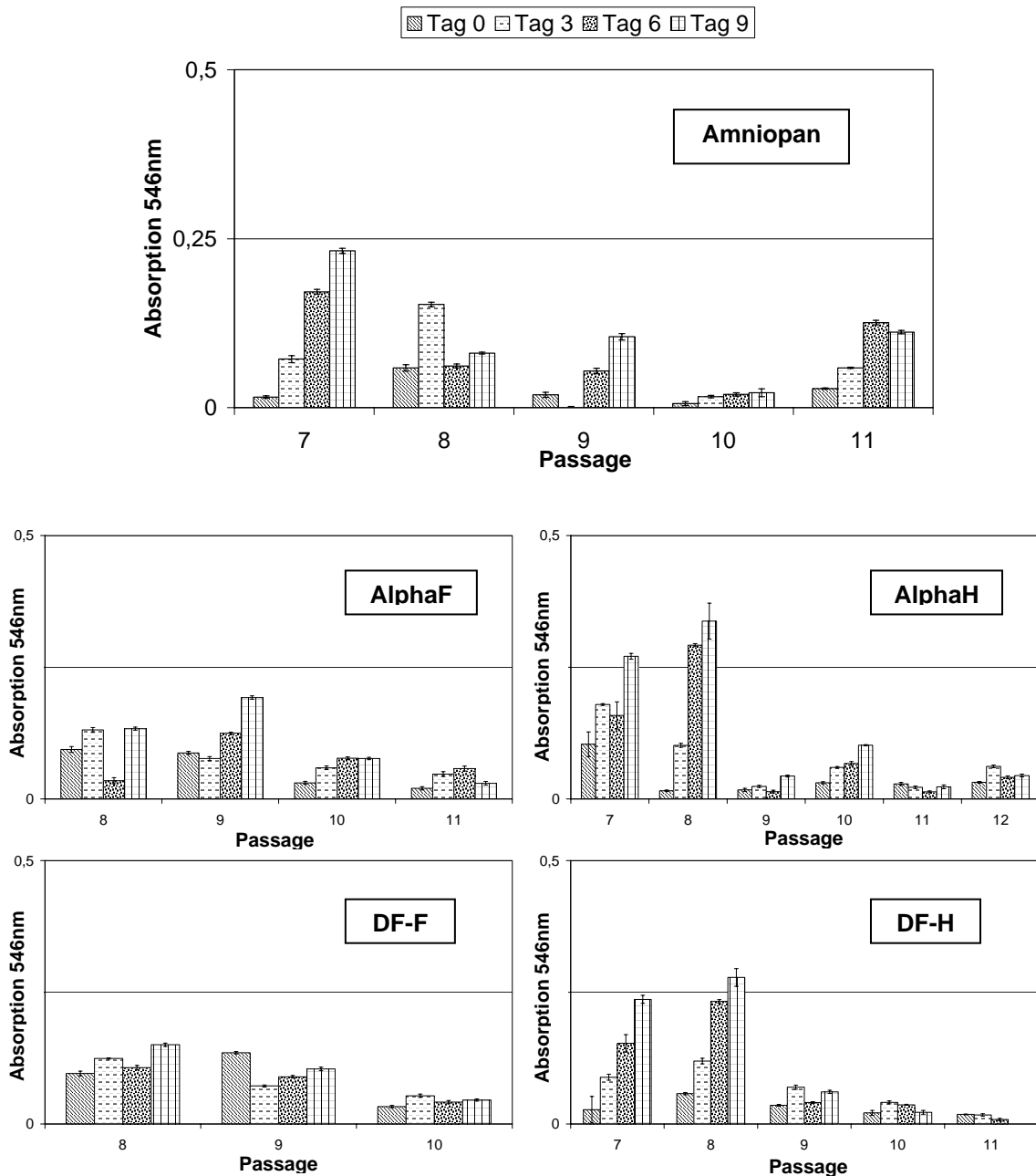
**Abb. 4.5:** Populationsverdopplungszeiten von Fs1-Zellen bei Kultivierung mit verschiedenen Medien. AlphaH/AlphaF: Alpha MEM + HS bzw. FCS; DF-H/DF-F: DMEM/Ham's F-12 + HS/FCS. Die genaue Zusammensetzung der Medien ist in Abschnitt 4.1 sowie im Anhang A.1 angegeben.

### 4.1.2 Viabilitäts-Assay

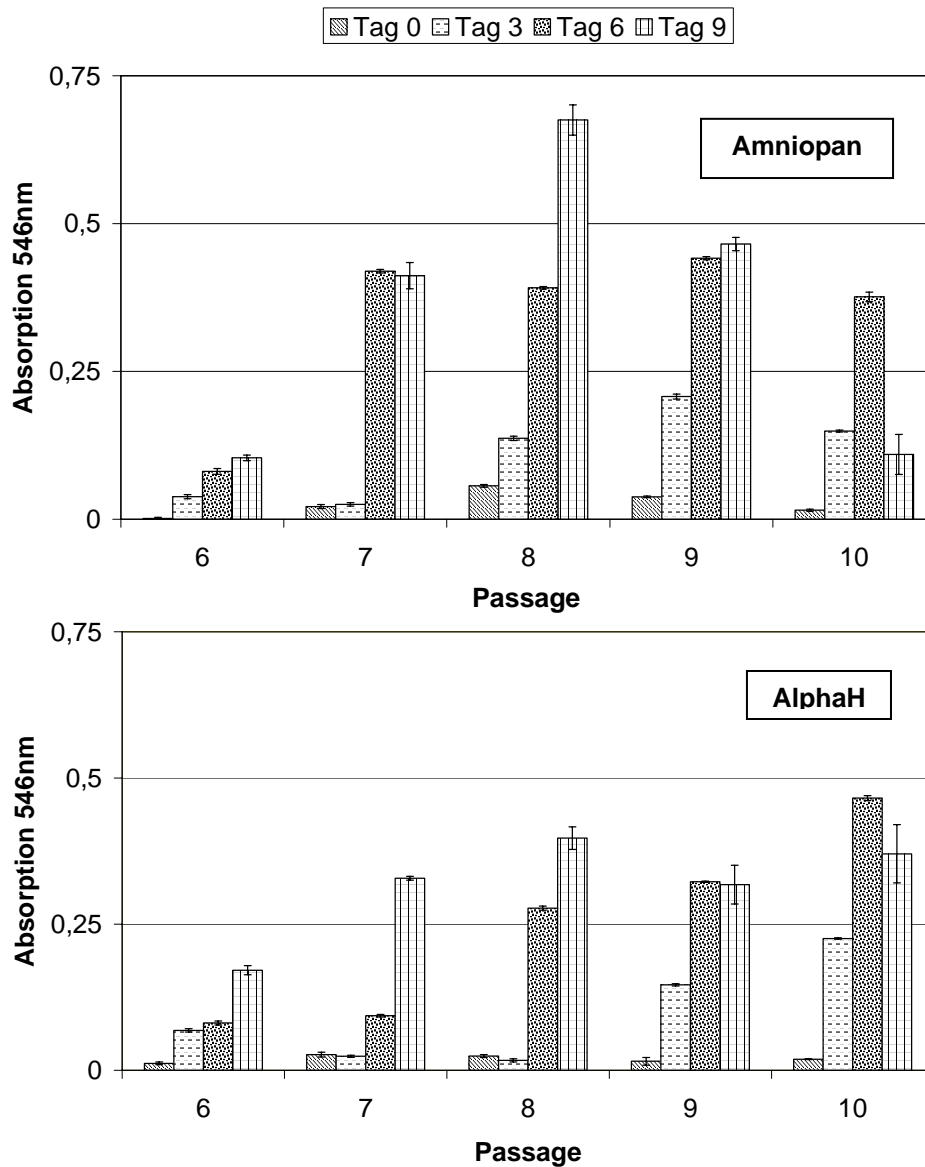
Der Viabilitäts-Assay basiert darauf, dass 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT), ein gelbfarbenes, lösliches Salz, von den intakten Mitochondrien lebender Zellen zu einem kristallinen, blau-schwarzen Formazan-Komplex umgesetzt werden kann. Nachdem diese Kristalle wieder solubilisiert wurden, kann die Farbintensität der entstandenen Lösung photometrisch bestimmt werden. Mit Hilfe des MTT-Assays wird die Viabilität einer Zellpopulation überprüft. Die genaue Durchführung des Assays ist im Anhang A.2 beschrieben.

Wie sich bei der Bestimmung der Populationsverdopplungszeiten bereits zeigte, ließ sich eine Reihe der Zellen zwar über mehrere Passagen kultivieren, allerdings nur mit dem Spezialmedium Amniopan (Ma2, Ma3 und Ma4). Andere Zellen ließen sich zwar mit allen Medien kultivieren, doch gelang dies nur über einige wenige Passagen (He18, He21, Ma5). Für diese Zellen konnte die Viabilität demnach nicht aussagekräftig untersucht werden. Die Ergebnisse der Viabilitäts-Assays sind in den Abbildungen 4.6 bis 4.10 dargestellt. Die Ergebnisse für die He4-Zellen (Abb. 4.6) zeigen, dass ihre Viabilität in der siebten und achten Passage am höchsten war, wenn sie unter Zusatz von Humanserum kultiviert

wurden. Im weiteren Verlauf der Kultivierungen nahm die Viabilität rapide ab. Bei Kultivierung der He4 mit einem der anderen Medien war schon die anfängliche Viabilität sehr gering und nahm auch hier im Verlauf der Passagen noch weiter ab. Für die Kultivierung mit Amniopan zeigte sich in der elften Passage unerwartet ein leichter Anstieg der Viabilität.

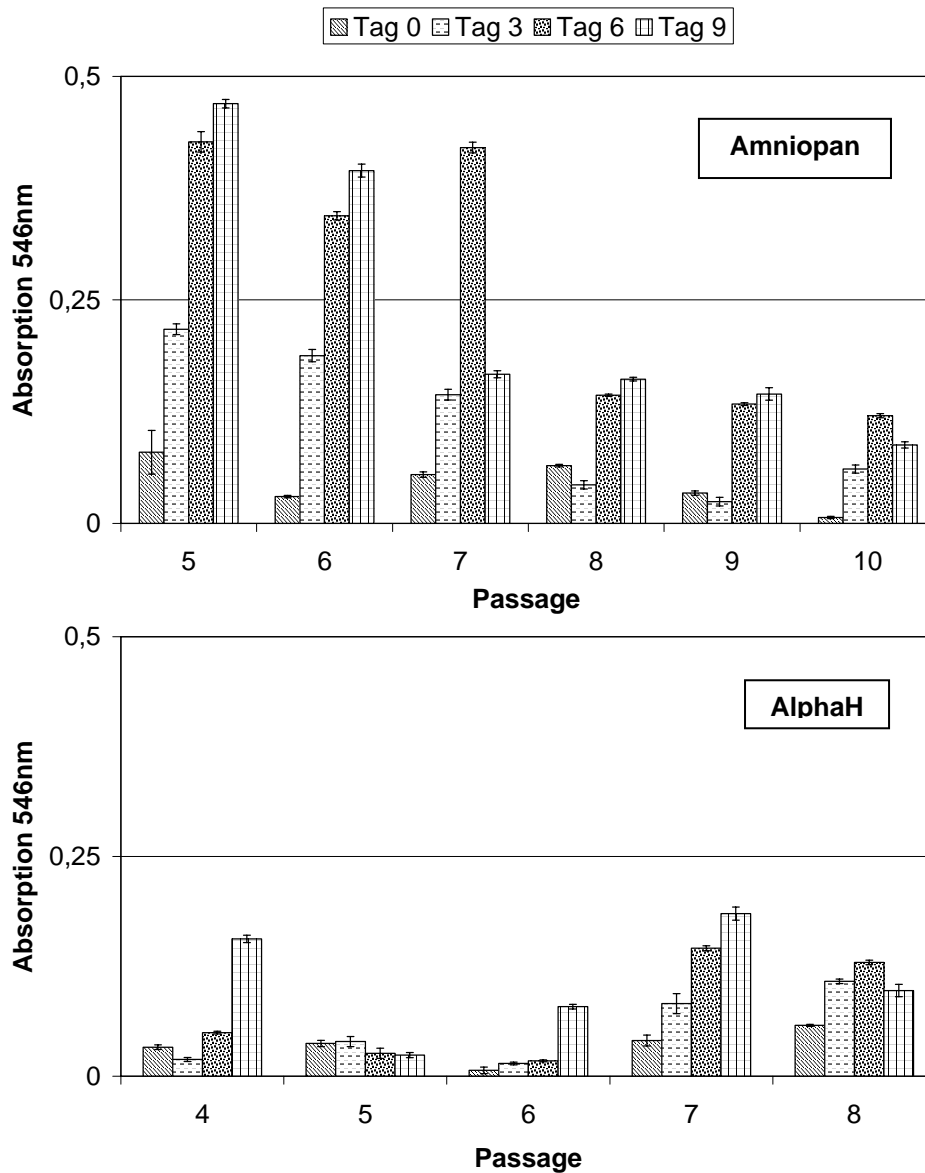


**Abb. 4.6:** Ergebnisse des Viabilitäts-Assays von He4-Zellen. Das verwendete Medium ist im jeweiligen Diagramm angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung, senkrechte Balken zeigen den Standardfehler.



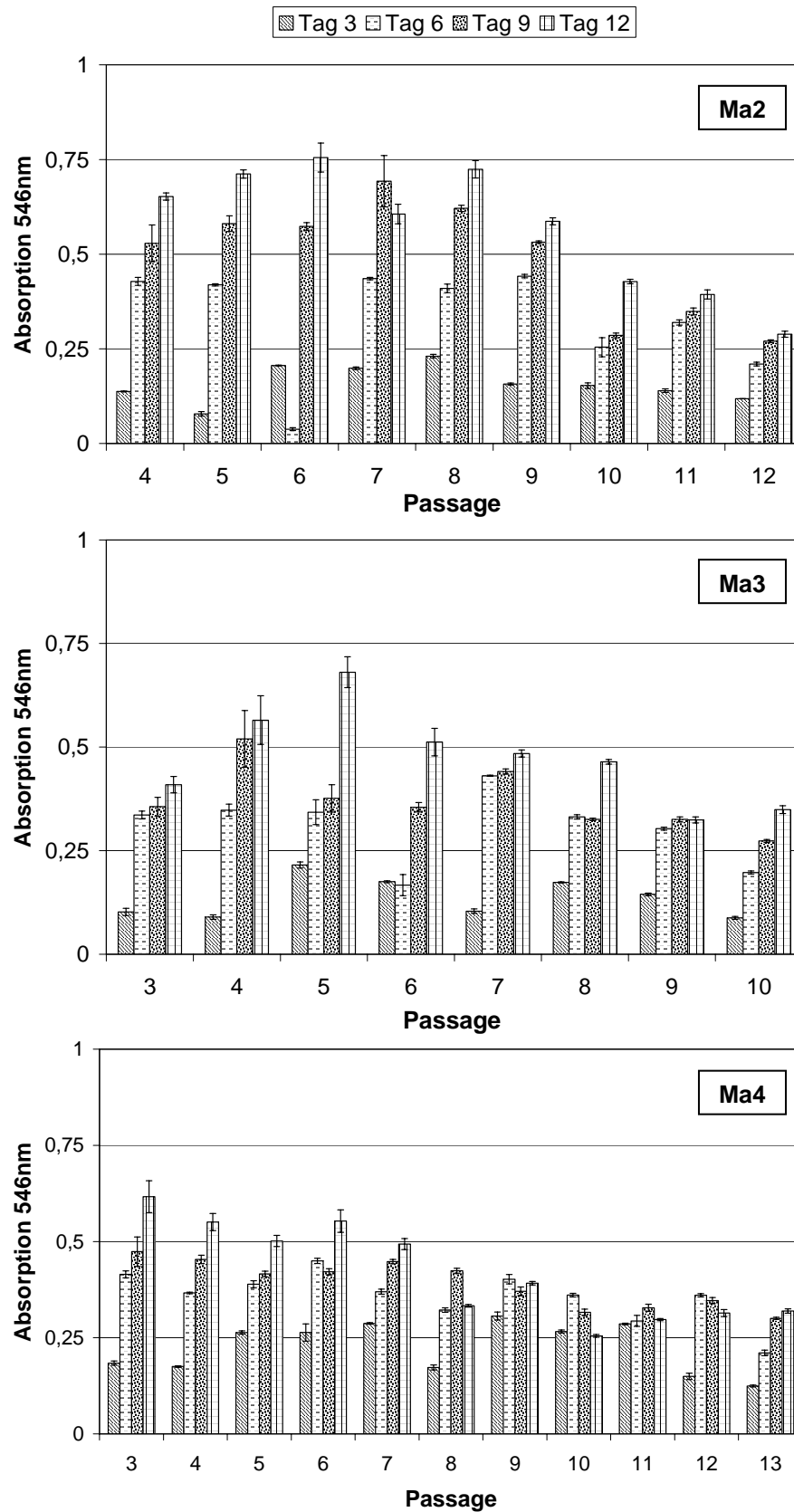
**Abb. 4.7:** Ergebnisse des Viabilitäts-Assays der He33-Zellen bei Kultivierung mit Amniopan bzw. AlphaH. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung, senkrechte Balken zeigen den Standardfehler.

He33-Zellen konnten mit FCS-haltigen Medien nur zwei Passagen lang kultiviert werden. Auch bei Kultivierung mit DF-H konnten die He33 kaum länger in Kultur gehalten werden. Daher sind in Abb. 4.7 nur die Ergebnisse des Viabilitätstests der He33-Zellen der Kultivierungen mit AlphaH und Amniopan exemplarisch dargestellt. Man erkennt, dass die Zellen auch noch in späteren Passagen vergleichsweise hohe Viabilitätswerte erreichen. Diese steigen in der siebten Passage zunächst an und verbleiben auf diesem erhöhten Niveau mindestens bis zur zehnten Passage.



**Abb. 4.8:** Ergebnisse des Viabilitäts-Assays der Ma1-Zellen bei Kultivierung mit Amniopan bzw. AlphaH. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung, senkrechte Balken zeigen den Standardfehler.

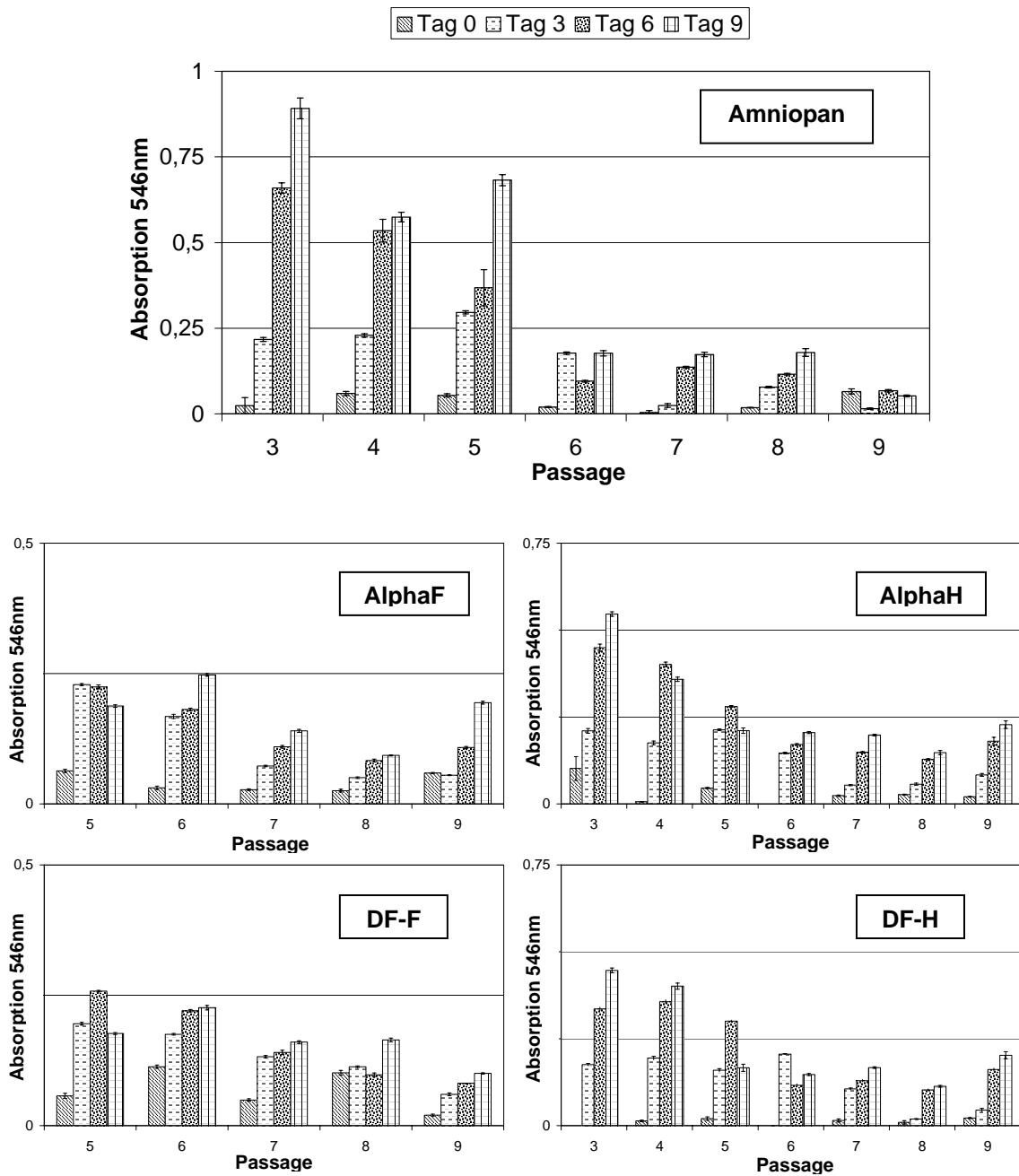
Auch Ma1 konnten nicht mit allen Medien kultiviert werden. Bei Kultivierung der Ma1-Zellen mit AlphaH lieferte der MTT-Test äußerst niedrige Werte und weist dadurch eine sehr geringe Viabilität der Zellen nach. Bei Verwendung von Amniopan zeigen sich die Zellen etwas viabler, was an durchaus höheren Ergebniswerten ablesbar ist. Dies trifft jedoch nur für die ersten drei analysierten Passagen zu (Passage 5 bis 7). Danach nimmt die Viabilität der Ma1 auch bei Kultivierung mit Amniopan rapide ab. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.8 dargestellt.



**Abb. 4.9:** Ergebnisse des Viabilitäts-Assays für Ma2-, Ma3- und Ma4-Zellen bei Kultivierung mit Amniopan. Die jeweils verwendeten Zellen sind im Diagramm angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung, senkrechte Balken zeigen den Standardfehler.

Ma2, Ma3 und Ma4 konnten, wie schon bei der Berechnung der Verdopplungszeiten angeführt, ausschließlich mit Amniopan erfolgreich und über mehrere Passagen kultiviert werden. Die Ergebnisse der MTT-Tests sind in Abb. 4.9 gezeigt. Verglichen mit den Ergebnissen der anderen Zellen, zeigen sich für die Ma2-Zellen aber bei Kultivierung mit Amniopan die höchsten gemessenen Viabilitätswerte aller Zellkulturen und das über den Verlauf von fünf Passagen. Erst mit der neunten Passage sinkt die Viabilität der Zellen langsam aber konstant immer weiter ab. Die Viabilitätswerte von Ma3 und Ma4 bleiben etwas geringer als die von Ma2-Zellen. Die Viabilität der Ma3-Zellen steigt zunächst von der dritten bis zur fünften Passage deutlich an, um in den folgenden Passagen genauso deutlich wieder abzufallen. Ab der zehnten Passage ist und bleibt die Viabilität der Ma3-Zellen dann niedriger als zu Beginn der Kultivierung. Die Viabilität der Ma4-Zellen verhält sich ziemlich analog zu der der Ma2-Zellen. Angefangen mit einer hohen Viabilität in der dritten Passage sinken die Werte ab der siebten Passage langsam ab.

Zwar konnte die Fs1-Zellen mit jedem der verwendeten Medien über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, doch zeigten auch diese Zellen unabhängig vom Medium eine sinkende Viabilität (Abb. 4.10). Der maximale Anfangswert zeigt sich für Fs1-Kulturen, die mit Amniopan kultiviert wurden. Die Maximalwerte für die Kultivierung mit anderen Medien lagen unter denen der Ma2-, Ma3- und Ma4-Kulturen, die mit Amniopan kultiviert wurden. Die Viabilität der Fs1 liegt meist nur für ein oder zwei Passagen auf einem erhöhten Niveau, danach beginnt sie auch für diese Zellen zu sinken. Die größte Viabilität zeigen Zellen, die mit Amniopan kultiviert wurden, gefolgt von den Kulturen, die mit Medien kultiviert wurden, denen Humanserum zugesetzt war. Wie schon an anderer Stelle erwähnt, konnten aufgrund der generell schlechten Kultivierbarkeit sowohl für He18 und He21 als auch für Ma5 keine aussagekräftigen Viabilitätswerte ermittelt werden, da das Wachstum und damit die Vermehrung dieser Zellen außerordentlich schlecht war. Dies traf ausnahmslos für die verwendeten Medien zu. Die für die ersten Passagen ermittelten Viabilitätswerte waren auch sehr gering. Die Tatsache, dass die Viabilität der Zellpopulationen mit steigender Passagenanzahl immer weiter abnimmt, ist bekannt und hängt mit dem Phänomen der replikativen Seneszenz zusammen. Da alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen *in vitro* bereits über mehr oder weniger viele Populationsverdopplungen kultiviert worden sind, ist es verständlich, dass einige Zellen verhältnismäßig schnell alterten und ihre Proliferation schon früh einstellten, wodurch sich auch der Verlust der Viabilität der Zellpopulationen erklärt<sup>73</sup>.



**Abb. 4.10:** Ergebnisse des Viabilitäts-Assays der Fs1-Zellen bei Kultivierung mit den verschiedenen Medien. Das verwendete Medium ist im jeweiligen Diagramm angegeben. Die Achsenbezeichnungen und Legende sind für alle Diagramme gleich. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte einer Vierfachbestimmung, senkrechte Balken zeigen den Standardfehler.



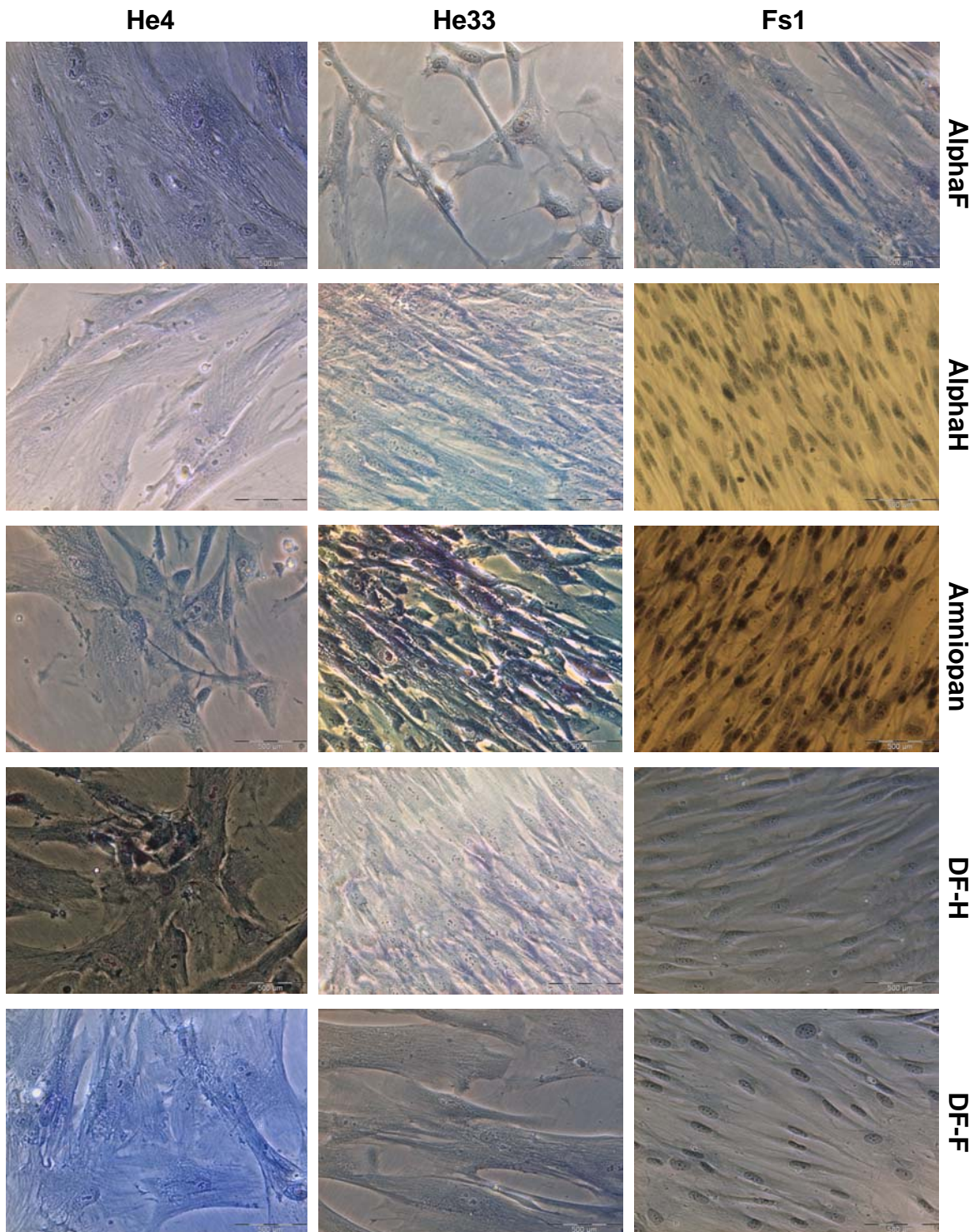
### 4.1.3 Morphologie

Die morphologische Begutachtung und die darauf aufbauende Einordnung der verwendeten Nabelschnurzellen stellten sich als relativ schwierig dar, weil die Morphologie der Zellen unter anderem sehr stark vom Grad der Konfluenz der jeweiligen Zellkultur abhängt. Da einige der untersuchten Zellen selten eine Konfluenz von mehr als 40 oder 50 % erreichten, war eine genaue Beurteilung bezüglich der Morphologie nicht immer eindeutig möglich. Es sollen hier nur exemplarisch mikroskopische Aufnahmen wiedergegeben werden.

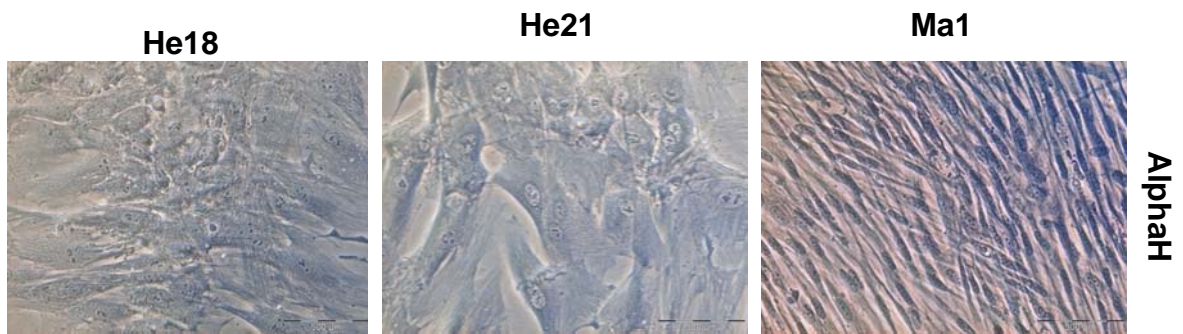
Die He-Zellen zeigten zwar untereinander vergleichbare, jedoch generell sehr unterschiedliche Zellmorphologien. So konnten oft Bereiche ausgemacht werden, in denen die Zellen aufgrund gesteigerter Proliferation relativ unorganisiert übereinander wuchsen. Meist erreichten diese Zellen jedoch kaum eine konfluente Zelldichte, so dass sie ziemlich vereinzelt über die Böden der Petrischalen verteilt waren. Nur für He4 und He33 konnten Zellen mit der so häufig für mesenchymale Stromazellen geforderten fibroblastoiden Morphologie ausgemacht werden (Abb. 4.11), z. B. bei Kultivierung von He4 mit AlphaF oder AlphaH. He33 zeigten fast unabhängig vom verwendeten Medium fibroblastoide Strukturen. He18 und He21 wuchsen größtenteils unstrukturiert über die vorhandene Fläche (Abb. 4.12).

Wie sich durch den Versuch der Berechnung der Verdopplungszeiten bereits zeigte, ließen sich Ma-Zellen nicht besonders gut vermehren. Einzig mit Amniopan konnte eine gute Zellvermehrung erreicht werden. Bei der morphologischen Beurteilung fiel auf, dass sie sich sehr gleichmäßig über die Fläche ausbreiteten und dabei nicht überkonfluent wuchsen (Abb. 4.13). Ma5-Zellen konnten aufgrund der schlechten Kultivierbarkeit morphologisch nicht genauer untersucht werden. Ma1-Zellen konnten zusätzlich zu Amniopan auch mit AlphaH vermehrt werden. Bei Kultivierung mit Amniopan ähnelten sie morphologisch den anderen Ma-Zellen. Wurden Ma1 mit AlphaH kultiviert, so konnten auch hier teilweise überkonfluente Zellkulturen beobachtet werden (Abb. 4.12).

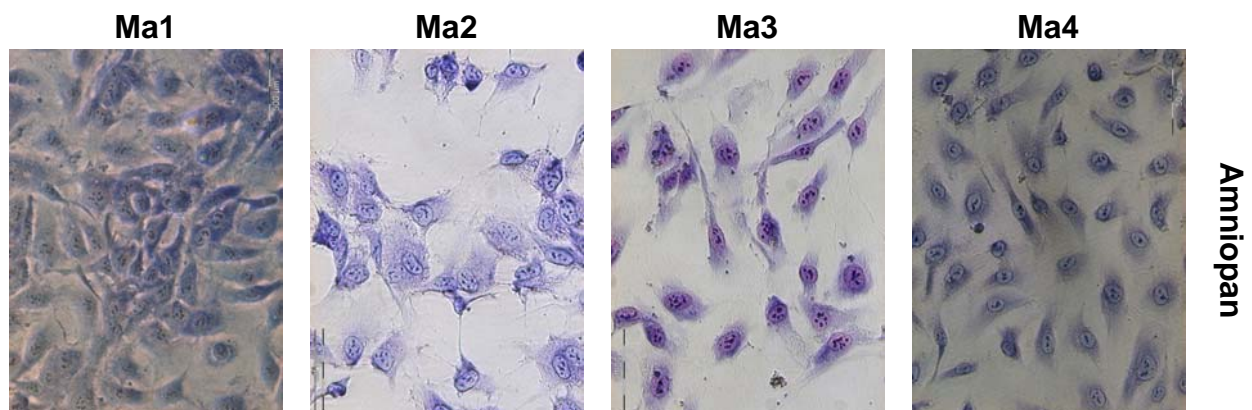
Fs1-Zellen hatten zu jedem Zeitpunkt der morphologischen Begutachtung nahezu Konfluenz erreicht und zeigten sich auch fast ausschließlich mit einer gestreckten, fibroblastoiden Struktur. Dieses Aussehen konnte unabhängig vom verwendeten Medium und der Zellpassage beobachtet werden, was durch die Bilder in Abbildung 4.11 verdeutlicht wird.



**Abb. 4.11:** Exemplarische Ergebnisse der morphologischen Begutachtung der untersuchten Nabelschnurzellen, die sich (zunächst) mit allen verwendeten Medien vermehren ließen. Mikroskopische Aufnahmen wurden bei 20-facher Vergrößerung gemacht. Die Zellen befanden sich in der dritten bis zehnten Passage.



**Abb. 4.12:** Exemplarische Ergebnisse der morphologischen Begutachtung der He18-, He21- und Ma1-Zellen bei Kultivierung mit AlphaH. Mikroskopische Aufnahmen wurden bei 20-facher Vergrößerung gemacht. He-Zellen befanden sich in der sechsten, Ma1 in der vierten Passage.



**Abb. 4.13:** Exemplarische Ergebnisse der morphologischen Begutachtung der Ma-Zellen bei Kultivierung mit Amniopan. Mikroskopische Aufnahmen wurden bei 20-facher Vergrößerung gemacht. Die Zellen befanden sich in der siebten bis zehnten Passage.

Sowohl die Morphologie der verschiedenen Nabelschnurzellen als auch ihr Proliferationsverhalten wichen teilweise erheblich voneinander ab. Auch gab es Zellen, die nur für ein oder zwei Passagen in Kultur gehalten werden konnten und im Folgenden abstarben. Andere Kulturen konnten zwar durchaus über bis zu zehn Passagen erfolgreich kultiviert werden, allerdings nur mit einem oder zwei der verwendeten Medien. Zusätzlich zur generellen Kultivierbarkeit zeigten sich auch hinsichtlich der Verdopplungsgeschwindigkeiten starke Unterschiede. Eine schnelle Vermehrbarkeit der Zellen ist aber eine Voraussetzung für die erfolgreiche Verwendung der Nabelschnurzellen in der klinischen Anwendung.

Morphologisch betrachtet gab es einige Zellpopulationen, die sich zwar flach auf den Zellkulturgefäßen ausbreiteten, jedoch in alle Richtungen und nicht gerichtet, wie es das oft geforderte fibroblastoide Aussehen einer Kultur mesenchymaler Stromazellen verlangt. Aufgrund der herangezogenen Kriterien schienen die Fs1-Zellen insgesamt die besten Voraussetzungen zu besitzen. Die weiteren Methoden zur Charakterisierung der Zellen wurden daher nur auf diesen Zellen angewandt. Auch für die im Anschluss durchgeführten Langzeitkultivierungen wurden Fs1-Zellen verwendet.

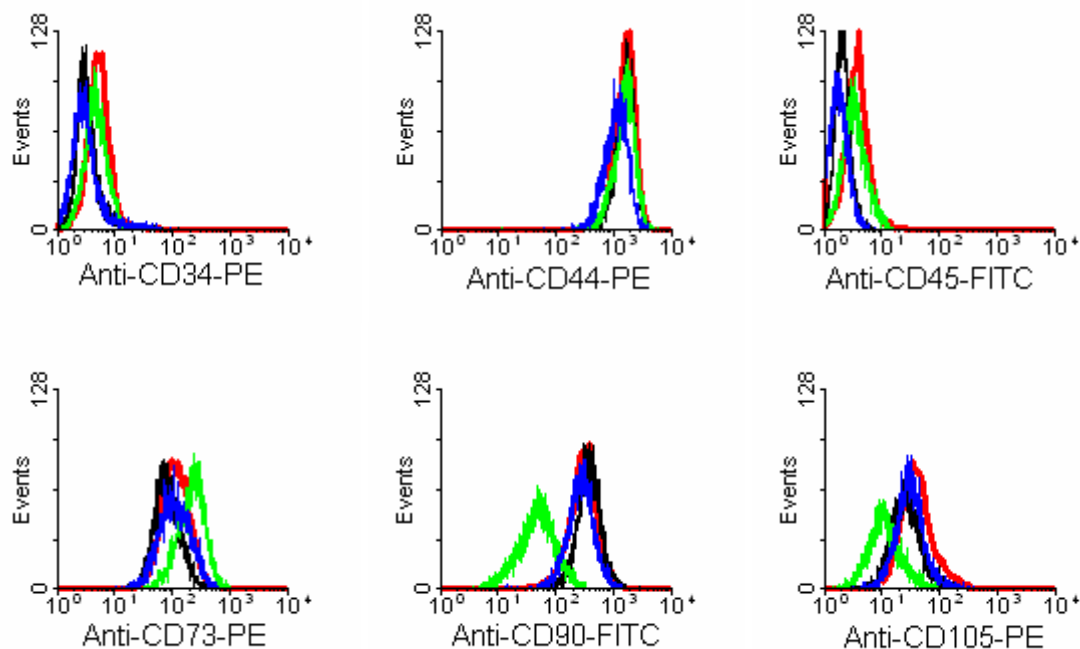
#### 4.1.4 Durchflusszytometrie

Die weitere Charakterisierung der Fs1-Zellen erfolgte zunächst mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Sie ermöglicht die Detektion zellulärer Antigene, die zuvor mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert werden. In dieser Arbeit wird die Expression von Antigenen, die auf den Zelloberflächen präsentiert werden, untersucht. Dabei kommen fluoreszenzmarkierte Antikörper zum Einsatz, die spezifisch gegen die Oberflächenmoleküle CD34, CD44, CD45, CD73, CD90 oder CD105 gerichtet sind. Dabei werden die Marker CD34 und CD45 von hämatopoetischen Zellen exprimiert und sollten daher auf den hier untersuchten Nabelschnurzellen nicht nachweisbar sein. CD34 wird außerdem von primitiven Endothelzellen exprimiert<sup>19</sup>. Das CD44-Protein gehört zur Familie der Adhäsionsmoleküle, die in die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen involviert sind. Der vornehmliche Ligand von CD44 ist das Polysaccharid Hyaluronsäure, ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix. Aber auch Osteopontin oder Collagen gehören zur Gruppe der CD44-Liganden<sup>29</sup>. Die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 werden häufig als positive Marker verwendet, da deren Expression von der ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) als Kriterium für humane, mesenchymale Stromazellen vorgeschlagen wurden<sup>19</sup>. Die Expression dieser Marker nimmt im Verlauf verschiedener Zelldifferenzierungen mehr oder weniger stark ab<sup>12, 37</sup>.

Zu diesem Zweck wurden die Fs1-Zellen über mehrere Passagen mit den schon zuvor verwendeten Medien Amniopan, AlphaF und AlphaH kultiviert. Zusätzlich wurde der Einfluss osteoinduktiver Zusätze auf die Zellen untersucht. Dazu wurden AlphaF und AlphaH mit Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-phosphat und  $\beta$ -Glycerolphosphat supplementiert. Die resultierenden Medien werden entsprechend OsteoF und OsteoH

genannt. Ausgehend von der vierten Passage wurden bei jedem erneuten Umsetzen eine Millionen Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse verwendet. Es war nicht möglich, die Fs1-Zellen mit osteoinduktivem Medium (OsteoF) über einen längeren Zeitraum zu kultivieren, da es zunehmend schwieriger wurde, die Zellen von den Zellkulturgefäßen abzulösen und zu vereinzeln, so dass hier nur Zellen der ersten verwendeten Passage untersucht werden konnten. Auch bei Verwendung von Amniopan konnten die Zellen nur über fünf Passagen zytometrisch beurteilt werden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst und für die erste untersuchte Passage exemplarisch graphisch in Abbildung 4.14 wiedergegeben.

Unabhängig von der Wahl des Mediums oder der Zellpassage, wird der Oberflächenmarker CD44 konsistent von nahezu jeder Zelle exprimiert (99,8 -100 %). Die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 werden ebenso konsequent nicht exprimiert. Lediglich in der jüngsten Passage (P.4) wird CD34 auf solchen Zellen, die unter Zusatz von Humanserum kultiviert wurden sehr schwach, d. h. auf extrem wenigen Zellen, exprimiert (0,4 % für AlphaH bzw. 0,8 % für OsteoH).



**Abb. 4.14:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse nach zweidimensionaler Zellkultivierung. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse der Analyse nach der vierten Passage (bzw. fünften Passage für CD105) bei Kultivierung mit AlphaF (rot), AlphaH (schwarz), Amniopan (grün) oder OsteoH (blau).

**Tab. 4.1:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen der hUCs nach zweidimensionaler Kultivierung. Ausgehend von Passage vier wurde nach jeder Passage (bis P.12, für Amniopan bis P.8) eine Messung durchgeführt. Die Expression von CD105 konnte für alle Medien nur von P.5 bis P.9 untersucht werden. Dargestellt sind die prozentualen Anteile positiver Zellen.

	P. 4	P. 5	P. 6	P. 7	P. 8	P. 9	P. 10	P. 11	P. 12	
Anti-CD34-PE	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	AlphaF
Anti-CD44-PE	100	100	100	100	99,8	99,9	100	100	100	
Anti-CD45-FITC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Anti-CD73-PE	63,0	60,6	63,8	33,7	30,1	40,3	77,8	63,6	80,7	
Anti-CD90-FITC	99,3	99,5	96,7	99,0	99,6	98,5	98,7	99,1	98,6	
Anti-CD105-PE	--	65,2	51,7	67,0	66,5	55,5	--	--	--	
	P. 4	P. 5	P. 6	P. 7	P. 8	P. 9	P. 10	P. 11	P. 12	
Anti-CD34-PE	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	AlphaH
Anti-CD44-PE	100	99,9	100	99,9	100	99,9	100	100	100	
Anti-CD45-FITC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Anti-CD73-PE	79,9	69,8	69,5	40,1	95,4	67,9	85,7	76,0	82,6	
Anti-CD90-FITC	99,8	97,1	99,8	99,8	100	99,8	99,4	99,9	97,8	
Anti-CD105-PE	--	79,9	74,9	65,4	71,6	81,4	--	--	--	
	P. 4	P. 5	P. 6	P. 7	P. 8	P. 9	P. 10	P. 11	P. 12	
Anti-CD34-PE	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	--	--	--	--	Amniopan
Anti-CD44-PE	99,9	100	100	100	99,9	--	--	--	--	
Anti-CD45-FITC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	--	--	--	--	
Anti-CD73-PE	93,8	98,8	86,5	99,5	93,0	--	--	--	--	
Anti-CD90-FITC	42,1	55,9	35,7	48,8	26,1	--	--	--	--	
Anti-CD105-PE	--	6,6	21,4	63,0	22,1	--	--	--	--	
	P. 4	P. 5	P. 6	P. 7	P. 8	P. 9	P. 10	P. 11	P. 12	
Anti-CD34-PE	0,8	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	OsteoH
Anti-CD44-PE	100	100	100	100	100	99,9	100	100	99,9	
Anti-CD45-FITC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Anti-CD73-PE	94,0	91,4	88,7	96,5	88,7	80,5	89,6	97,9	87,9	
Anti-CD90-FITC	99,5	97,4	99,6	100	98,9	98,3	99,0	86,0	94,8	
Anti-CD105-PE	--	90,0	72,5	77,0	87,9	81,6	--	--	--	

Allein die Expression des Markers CD73 verhält sich sowohl bezüglich des verwendeten Mediums als auch im Verlauf der Passagen uneinheitlich. So fällt seine Expression bei Kultivierung mit AlphaF über fünf Passagen von 63 auf 30 % ab. Für AlphaH sinkt seine Expression zunächst von 79,7 % in der vierten Passage auf 40,1 % in der siebten Passage, um dann in der achten Passage wiederum von 95,4 % der Zellen exprimiert zu werden. Mit osteogen differenzierendem Medium OsteoH bleibt die Expressionsrate von CD73 hoch und schwankt zwischen 94 % in der vierten Passage über 91,4 %, 88,7 %, 96,5 % und 88,7 % in der achten Passage. Ähnliche Expressionsraten konnten für die Kultivierung mit Amniopan beobachtet werden. Hier waren zwischen 86,5 und 99,5 % der Zellen CD73-positiv.

Die Expression der meisten untersuchten Oberflächenmarker auf Fs1-Zellen ändert sich im Verlauf der Passagen kaum. Selbst Zellen, die mit osteogen differenzierenden Supplementen kultiviert wurden, ändern die Expression ihrer oberflächlichen Antigene im Verlauf der Passagen nur wenig. Dies ist umso interessanter, da z. B. die Expression von CD90 bei einsetzender osteogener Differenzierung rasch herabreguliert wird<sup>12</sup>. Auf der anderen Seite wird eine verminderte Expression des CD105-Antigens mit verschiedensten Zelldifferenzierungen in Zusammenhang gebracht<sup>37</sup>. Da dieser Marker nie von 100 % der untersuchten Zellen präsentiert wurde, müssen die Zellen durch die exzessive *in vitro* Kultivierung bereits vordifferenziert sein. Trotzdem ist wohl der differenzierende Einfluss der Supplemente nicht sehr stark oder aber durch gleichzeitiges Vorhandensein von humanem Serum wird ein differenzierender Einfluss sozusagen unterdrückt. Gleichzeitig konnten aber mit einer parallel durchgeführten histologischen Färbung nach von Kossa deutlich mineralisierte Bereiche in der extrazellulären Matrix der Zellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Die teilweise unterschiedliche Expression der Marker bei Verwendung verschiedener Medien zeigt aber, dass die Zusammensetzung des Mediums einen unter Umständen entscheidenden Einfluss auf den Differenzierungszustand der Zellen haben kann.

#### 4.1.5 RT-PCR

Weiterhin wurden die Fs1-Zellen bezüglich der Expression einiger mit der osteoblastären Entwicklung in Zusammenhang stehender Gene untersucht. Dazu wurde aus Fs1-Zellpellets zunächst die (Gesamt-) RNA isoliert. Die darin enthaltene mRNA (*messenger RNA*) wurde im Folgenden in einer reversen Transkription (RT) in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben, die wiederum das Ausgangsmaterial für die anschließende Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) darstellte. Zur Überprüfung der erfolgreichen Vermehrung sowie zur Sichtbarmachung der cDNA wurden die fertigen Proben in einem 1,5 %igen Agarosegel gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Die Auswertung der generierten Daten erfolgte mit dem Programm AlphaDigiDoc<sup>®</sup> 1000 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA). Die genaue Durchführung ist im Anhang A.5 beschrieben.

**Tab. 4.2:** Ergebnisse der RT-PCR einiger ausgesuchter osteogener Gene. Angegeben ist das Verhältnis der Expressionsstärke bezogen auf den internen Standard GAPDH.

	<b>AlphaF</b>	<b>AlphaH</b>	<b>OsteoF</b>	<b>OsteoH</b>
<b>GAPDH</b>	1	1	1	1
<b>Col I</b>	0,96	2,33	1,27	1,89
<b>Col III</b>	0,58	1,67	0,95	1,56
<b>Runx2</b>	0,21	0,44	0,27	0,44
<b>BSP2</b>	0	0	0	0
<b>OPN</b>	0,25	0,67	0,18	1,11
<b>BMP-2</b>	0	0	0	0
<b>BMP-4</b>	0,15	0,44	0,3	0,67
<b>OC</b>	0,21	0,56	0,16	0,44
<b>AP</b>	0	0,44	0,48	0,44

Es wurden Zellen der neunten Passage untersucht, nachdem sie für drei Passagen mit AlphaF, AlphaH, OsteoF oder OsteoH kultiviert worden waren. Da es für diese Art von Analysen kaum einen externen Standard geben kann, können die Vergleiche für jedes Experiment immer nur auf einen internen Standard (hier Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, GAPDH) bezogen werden. Ein interexperimenteller Vergleich ist daher nur bedingt über den jeweils internen Standard möglich.

Die Ergebnisse der RT-PCRs sind in Tabelle 4.2 angegeben. Sie zeigen, dass bei diesen zweidimensional kultivierten Zellen weder die Expression von BSP2 noch von BMP-2 nachgewiesen werden konnte. Die Expression von Col I war sowohl bei Zellen, die mit osteoinduktivem Medium als auch bei Zellen, die mit AlphaH kultiviert wurden gegenüber der Expression des internen Standards erhöht. Die höchste Expression wurde dabei nicht, wie man vielleicht erwarten könnte, mit osteogenen Medien erreicht, sondern zeigte sich bei der Kultivierung mit AlphaH. Dabei wird die Expression von Col I mit der beginnenden osteogenen Differenzierung in Zusammenhang gebracht. Es wird bereits von unreifen Osteoprogenitorzellen in der Proliferationsphase exprimiert. Diese Expression bleibt dann durchgehend bis zum Erreichen des Stadiums eines reifen Osteoblasten erhalten<sup>3,53</sup>. Auch die Expression von Col III ist bei Zellen, die mit Humanserum kultiviert wurden erhöht. Dies gilt sowohl für Kultivierungen mit OsteoH als auch mit AlphaH. Die mit OsteoH kultivierten Zellen zeigen außerdem eine erhöhte Expression von Osteopontin, dessen Expression in der Entwicklung von Progenitorzellen zu reifen Osteoblasten einen biphasischen Verlauf aufweist. Es wird zunächst noch in der Proliferationsphase synthetisiert und wird dann erst wieder bei einsetzender Mineralisierung der



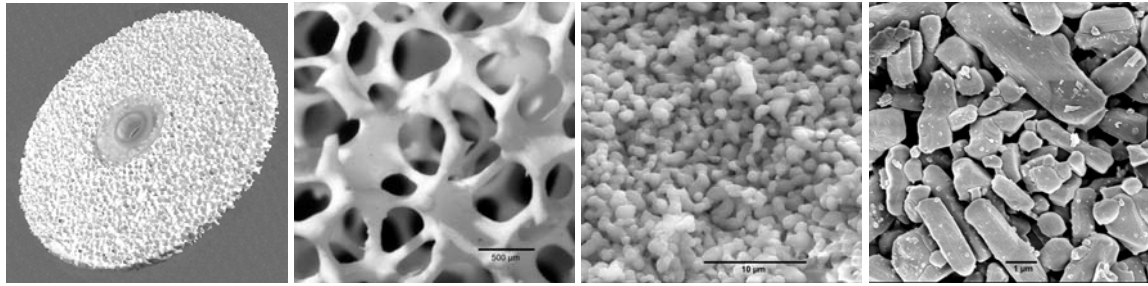
extrazellulären Matrix induziert<sup>3,66</sup>. Zellen, die mit OsteoF kultiviert wurden, zeigen hingegen eine sehr schwache Osteopontinexpression.

Die weiteren untersuchten Genprodukte wurden in geringerer Menge gebildet als die als interner Standard fungierende GAPDH. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass ihre Expression, sollte sie auch gering sein, zumindest detektierbar ist.

Zu beachten ist hierbei, dass alle in die Analyse einbezogenen Genprodukte an der osteoblastären Reifung beteiligt sind. Dennoch werden sie bereits von den hier unter statischen Bedingungen kultivierten Fs1-Zellen gebildet. Auffällig ist außerdem, dass alle in die Untersuchung einbezogenen Gene von Zellen, die mit Humanserum kultiviert wurden, und das zusätzlich unabhängig davon, ob das Medium dabei osteogene Zusätze enthielt oder nicht, verstärkt exprimiert werden, im Vergleich zu den mit FCS kultivierten Zellen. Die Ergebnisse dieser Expressionsanalyse legen die Vermutung nahe, dass die hier untersuchten Fs1-Zellen, nach erfolgter exzessiver *in vitro* Kultivierung möglicherweise schon in Richtung der osteogenen Linie vordifferenziert sind und es sich bei diesen Zellen durchaus schon um Osteoprogenitorzellen handeln könnte. Dies kann natürlich auch nur für einen Teil der Zellpopulation zutreffend sein.

## 4.2 3-dimensionale Langzeitkultivierung umbilikaler Zellen

Um Säugerzellen über einen längeren Zeitraum kultivieren zu können, ohne sie zwischenzeitlich zu Passagieren, sollte man ihnen eine relativ große Oberfläche zur Verfügung stellen, auf der sie adhären und sich vermehren können. Die durch klassische Zellkulturgefäße wie Petrischalen oder T-Flaschen bereitgestellte, zweidimensionale Oberfläche ist schnell mit Zellen überwachsen, was in der Regel zu einer verlangsamten Proliferation der Zellen führt. Es kann auch zum Ablösen eines dicht gewachsenen Zellrasens durch ein Absterben der Zellen kommen, das mit einem Verlust der Adhärenzfähigkeit einhergeht. Aus diesen Gründen ist eine Oberflächenvergrößerung in der langzeitigen Zellkultivierung von entscheidender Bedeutung. Diese wird meist durch Bereitstellung hochporöser, dreidimensionaler Trägermaterialien erreicht.



**Abb. 4.15:** Das in dieser Arbeit verwendete hochporöse Trägermaterial Sponceram<sup>®</sup> in verschiedener Vergrößerung. Der Durchmesser einer kompletten Scheibe beträgt 65 mm, ihre Höhe 3,5 mm (ganz links), die Porengröße liegt zwischen 300 und 600 nm (rechts daneben). In den letzten beiden Ansichten erkennt man gut die Mikroporen und die nanostrukturierte Oberfläche.

Die dreidimensionalen Strukturen imitieren dabei gleichzeitig das natürliche Umfeld der Zellen. Solche Trägermaterialien können prinzipiell verschiedenster Natur sein. So kommen sowohl natürliche (biologische) als auch synthetische Materialien zum Einsatz und vor allem auch Kompositmaterialien, die zumeist aus einem synthetischen Gerüst bestehen, dessen Oberfläche mit natürlichen oder synthetischen Molekülen funktionalisiert wird, um ein primäres Anwachsen der Zellen zu verbessern<sup>59</sup>.

In dieser Arbeit kommt ein hochporöser, keramischer Werkstoff aus Aluminiumoxid zum Einsatz, dessen Oberfläche nicht zusätzlich funktionalisiert wurde (Sponceram<sup>®</sup>, Zellwerk GmbH). Dieser dreidimensionale Zellträger besitzt Makro- und Mikroporen, die eine starke Interkonnektivität aufweisen. Zusätzlich besitzt das keramische Material eine nanostrukturierte Oberfläche, durch die das initiale Anwachsen der Zellen verbessert werden soll. Das verwendete Material ist in Abb. 4.15 gezeigt. Prinzipiell kann auch die Oberfläche dieses Gerüstmaterials zusätzlich funktionalisiert werden. Auch eine nachträgliche vollständige Beschichtung der Trägerscheiben mit natürlichen Proteinen, wie z.B. Collagenen, für eine weiter optimierte Zellanheftung, ist möglich.

#### 4.2.1 Statische Zellkultivierungen

Die statischen, dreidimensionalen Zellkultivierungen wurden unter Standardbedingungen, mit osteogenen Zusätzen und mit Humanserum durchgeführt. Die Standardbedingungen werden dabei durch einen normoxischen Sauerstoffgehalt und die Verwendung des Standardmediums AlphaF (Alpha MEM + 10 % FCS) definiert. Für die Kultivierung mit

osteogenen Zusätzen ist das Standardmedium mit Dexamethason,  $\beta$ -Glycerolphosphat und L-Ascorbinsäure-2-phosphat supplementiert (OsteoF). Der Versuch mit Humanserum verwendet Alpha MEM unter Zusatz von 10 % Humanserum (AlphaH). Auch die letztgenannten Kultivierungen finden unter normoxischen Bedingungen statt. Aus technischen Gründen konnte statisch keine sauerstofflimitierte Kultivierung durchgeführt werden.

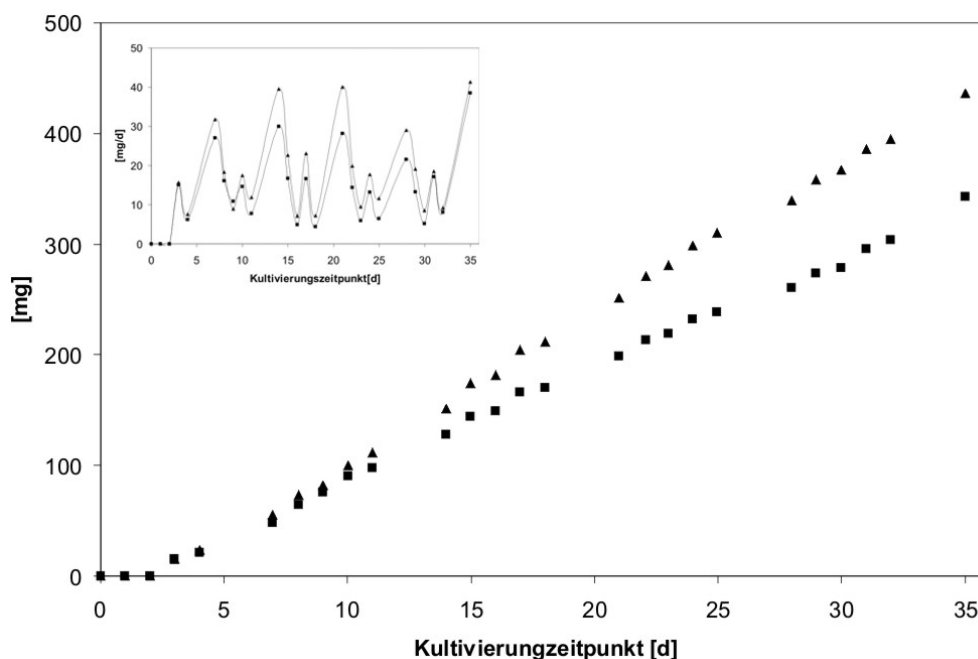
Nach erfolgter Besiedlung der dreidimensionalen Träger mit je fünf Millionen Zellen wurde den Zellen eine Adhärenzzeit von etwa 30 Minuten im Inkubator gewährt, bevor die Petrischalen mit dem entsprechenden Medium gefüllt wurden. Die besiedelten Zellträger wurden anschließend in den Petrischalen über einen Zeitraum von fünf Wochen kultiviert. Anhand einer täglichen Glukosemessung im Medium wurde der Zeitpunkt für einen Mediumwechsel bestimmt. Zu Beginn der Kultivierung funktionierte diese Methode recht gut, und ein etwa alle drei bis vier Tage stattfindender Mediumwechsel genügte aus, um die Zellen hinreichend mit Glukose zu versorgen. Nach einer kritischen Dauer der Kultivierung hatten sich die Zellen aber so stark vermehrt, dass selbst bei täglichem Mediumwechsel die neu zugeführte Glukose am Folgetag bereits vollständig verbraucht war und kaum noch Glukose im Kultivierungsmedium nachgewiesen werden konnte.

Im Anschluss an die Kultivierungen wurde jeweils die Hälfte eines besiedelten Zellträgers zur Zellablösung verwendet. Dabei kam zunächst eine Enzymlösung aus Collagenase des Typs II (100 U/mL) zum Einsatz. Später wurde ein Enzymgemisch aus Collagenase und Hyaluronidase (40 U/mL) verwendet. Die abgelösten Zellen wurden für eine (qualitative) Zellzählung verwendet und im Folgenden für eine durchflusszytometrische Analyse einzelner Oberflächenantigene sowie für eine RT-PCR spezifischer osteogener Genprodukte herangezogen. Die zweite Hälfte des Zellträgers wurde manuell in kleinere Stücke gebrochen, die für unterschiedliche Färbungen benötigt wurden. Es wurden verschiedene histologische Färbungen angefertigt, zum einen, um einen ersten Überblick über die Intensität der zellulären Besiedlung zu erhalten (Toluidinblau- und DAPI-Färbung), zum anderen, um spezifisch eingelagertes Calcium in der von den Zellen gebildeten extrazellulären Matrix nachzuweisen (Alizarinrot- und von Kossa-Färbung).

#### 4.2.1.1 Kultivierung unter Standardbedingungen

Die Daten der Glukose- und Laktatmessungen der unter Standardbedingungen statisch kultivierten Zellen sind in Abb. 4.16 wiedergegeben. Die kultivierten Zellen erreichten nach fünf Wochen einen kumulierten Gesamt-Glukoseverbrauch von 436,41 mg. Der maximale tägliche Verbrauch lag bei 41,36 mg und wurde am letzten Tag der Kultivierung erreicht (Tag 35). Im selben Zeitraum stieg die Laktatproduktion auf kumulierte 342,62 mg. Die mittleren Werte pro Tag, sowohl für den Glukoseverbrauch als auch für die Laktatproduktion, schwankten über den Verlauf der Kultivierung ziemlich stark, was vermutlich der *batchweisen* Fütterung geschuldet ist. Unmittelbar nach einem kompletten Mediumwechsel wurden stets die höchsten Werte für den Glukoseverbrauch und die Laktatproduktion registriert.

Im Anschluss an die Kultivierung wurden verschiedene Färbungen durchgeführt, die in Abbildung 4.17 zu sehen sind. Die Übersichtsfärbungen zeigen deutlich eine vollständige Besiedlung des gesamten Zellträgers, auch innerhalb der Poren. Besonders gut ist dies an der DAPI-Färbung zu erkennen, da hier nur die Zellkerne intakter Zellen angefärbt werden, welche offenbar in großer Zahl vorhanden sind.



**Abb. 4.16:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der statischen Kultivierung unter Standardbedingungen. Dargestellt sind die kumulierten Werte und die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

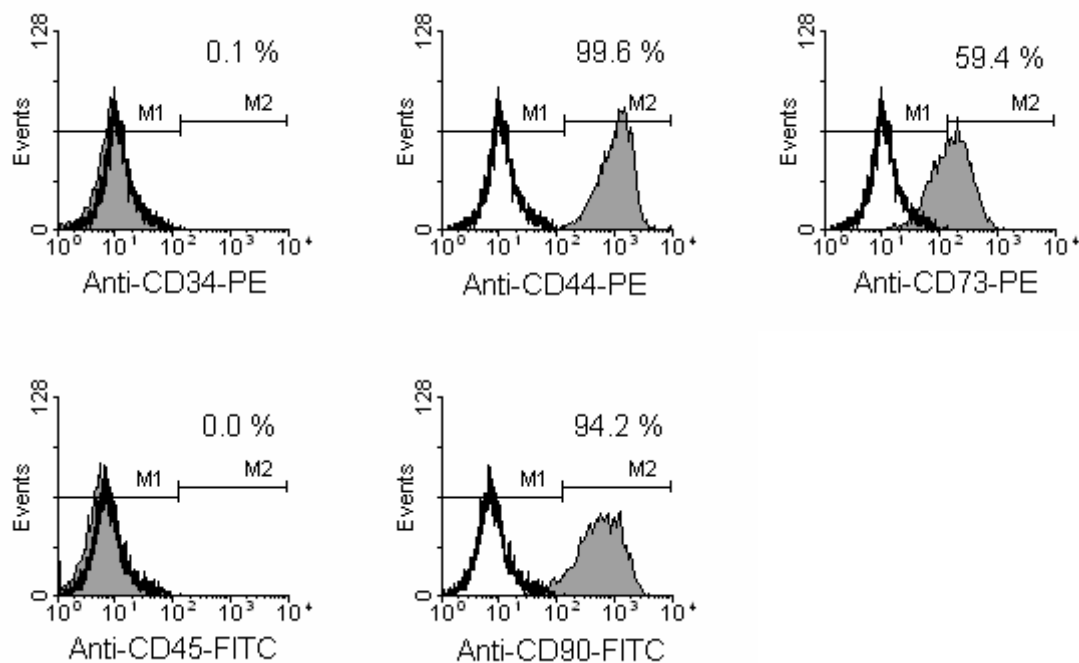


**Abb. 4.17:** Histologische Färbungen im Anschluss an die statische Kultivierung unter Standardbedingungen; von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.

Auch die Alizarinrot- und von Kossa-Färbungen zum spezifischen Calciumnachweis in der extrazellulären Matrix sind eindeutig positiv.

Nach der hier durchgeführten Kultivierung konnten nur gut drei Millionen Zellen von einer halben Trägerscheibe gelöst werden. Es waren dennoch genügend Zellen für die weiteren Analysen vorhanden. Ein Teil der abgelösten Zellen wurde für die durchflusszytometrische Analyse bestimmter Oberflächenmoleküle herangezogen, der andere Teil wurde für eine RT-PCR verwendet. Die Zahl der nach dieser Kultivierung erfolgreich vom Trägermaterial gelösten Zellen ist dabei nicht aussagekräftig und kann nicht zu Vergleichen herangezogen werden, da hier nur das Enzym Collagenase verwendet wurde. Für die Zellablösung nach späteren Kultivierungen wurde dieser Enzymlösung zusätzlich Hyaluronidase zugesetzt, wodurch die erzielten Zellausbeuten deutlich gesteigert werden konnten.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt (Abb. 4.18), dass die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 weiterhin nicht exprimiert werden. Der zur Bestimmung des Differenzierungsstatus der Osteogenese wichtige Oberflächenfaktor CD90 kann nach dieser Kultivierung nur noch auf 94,2 % der Zellen, CD44 dagegen noch auf 99,6 % der Zellen nachgewiesen werden. CD73-positiv sind nach dieser Kultivierung nur 59,4 % der Zellen.



**Abb. 4.18:** Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie nach der statischen Kultivierung unter Standardbedingungen. schwarzer Graph: Isotypkontrolle; grauer, gefüllter Graph: spezifischer Antikörper. Die Prozente geben den Anteil positiv getesteter Zellen wieder.

Die RT-PCR einiger für die osteogene Differenzierung wichtiger Genprodukte zeigt, dass alle untersuchten Genprodukte detektierbar sind (Tab. 4.3). Die Expression von Collagen (I und III) ist sowohl gegenüber dem internen Standard GAPDH als auch gegenüber den unter analogen Bedingungen in zweidimensionaler Umgebung kultivierten Zellen deutlich erhöht. Die weiteren untersuchten Genprodukte werden zwar im Vergleich zur GAPDH schwächer exprimiert, doch zeigen die Zellen im Vergleich zur klassischen, zweidimensionalen Kultivierung eine stärkere Expression aller untersuchten und mit der osteoblastären Entwicklung in Zusammenhang stehenden Produkte.

Runx2 z. B., ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression verschiedener knochenspezifischer Gene reguliert, und daher früh in der osteogenen Differenzierung exprimiert wird<sup>20</sup>. Mit dessen Expression wird auch das Vorhandensein von BMP-2 in Verbindung gebracht, das von Zellen dieser Kultivierung zwar schwach, aber dennoch in nachweisbarer Menge exprimiert wird. Auch OPN wird zunächst während der aktiven Proliferationsphase produziert (ungefähr mit 25 % des maximalen Levels). Im Folgenden nimmt die Expression postproliferativ ab und wird mit der einsetzenden Mineralisierung der EZM erneut induziert. Zu diesem Zeitpunkt werden die höchsten Expressionsraten festgestellt<sup>66</sup>.

**Tab. 4.3:** Ergebnisse der RT-PCR einiger mit der osteoblastären Entwicklung assoziierter Genprodukte für Zellen, die statisch unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis bezogen auf die Expression des internen Standards GAPDH.

GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
1	3,33	2,83	0,75	0,5	0,92	0,33	0,25	0,58	0,75

Aufgrund der durch die RT-PCR nachgewiesene, sehr starke Expression der Collagene kann man davon ausgehen, dass sich die Zellen in einer Phase des aktiven Matrixaufbaus befinden und daher gleichzeitig an einem späten Zeitpunkt der proliferativen Phase angekommen sind. Darauf deutet auch die Expression der Gene für z. B. Runx2, AP oder OPN hin, die mit dem Beginn der Mineralisierungsphase induziert werden und als frühe Marker der Matrixmineralisierung gelten<sup>20, 53, 66</sup>. Die Intensität der AP-Expression ist dabei abhängig von der Intensität der vorherigen Collagenakkumulation<sup>53, 66</sup>, die bei Zellen dieser Kultivierung noch nicht abgeschlossen zu sein scheint. Da die OPN-Expression aber einen biphasischen Verlauf zeigt und so zunächst noch während der Proliferationsphase exprimiert wird, könnten sich die Zellen am Übergang von der Phase der Proliferation zur Phase der Matrixmaturation befinden. Die Detektion des exprimierten OC-Gens hingegen deutet auf einen späteren Zeitpunkt in der osteogenen Differenzierung hin, da dessen Expression erst im späteren Verlauf der Matrixmineralisierung induziert wird.

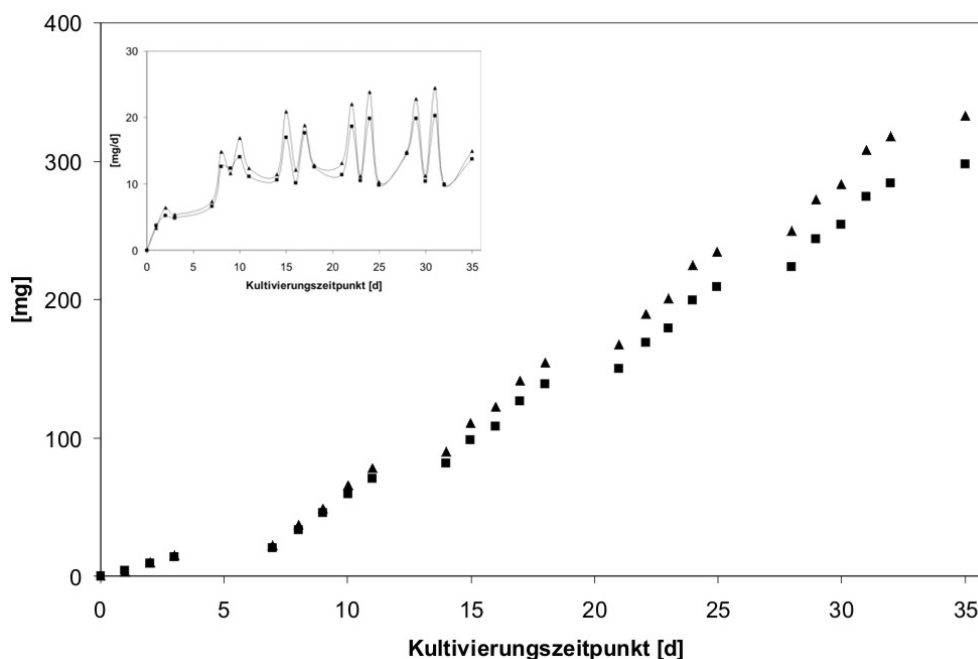
Die Ergebnisse der RT-PCR deuten darauf hin, dass sich zumindest der Großteil der hier kultivierten Fs1-Zellen noch in einer aktiven Proliferationsphase befindet. Denkbar ist vor allem, da es sich bei den meisten Präparationen von Stamm- oder Progenitorzellen um Mischpopulationen handelt, dass nach solchen dreidimensionalen Langzeitkultivierungen ein möglicherweise auch nur geringer Anteil der Zellen bereits weiter vorangeschritten ist auf dem Entwicklungsweg zum reifen Osteoblasten. So wären auch die durchaus niedrigen Expressionsverhältnisse der knochenspezifischen Gene erklärbar.

Schaut man sich den spezifischen Nachweis von Calcium in der extrazellulären Matrix durch die Alizarinrot- und von Kossa-Färbung (Abb. 4.17) sowie die Ergebnisse der zytometrischen Analyse (Abb. 4.19) an, so scheint es, als befänden sich die Zellen nach dieser statischen Langzeitkultivierung bereits in einem weiter fortgeschrittenen Stadium der Osteogenese. Da das verwendete Medium keine differenzierenden Zusätze enthielt und die Zellen ansonsten keinen weiteren neuen Einflüssen ausgesetzt waren, kann dies nur an der hochporösen, dreidimensionalen Struktur des Zellträgers liegen.

#### 4.2.1.2 Kultivierung mit osteogenen Zusätzen

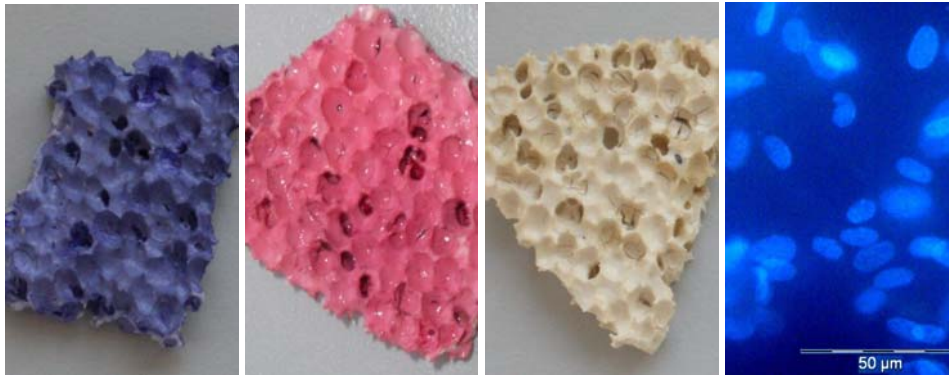
Eine weitere statische Langzeitkultivierung wurde mit den osteoinduktiven Supplementen Dexamethason, L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und  $\beta$ -Glycerolphosphat im Medium durchgeführt. Dies soll einen erhöhten Differenzierungsdruck für die Zellen darstellen, mit dem Ziel, sie stärker in Richtung eines osteogenen Phänotyps zu drängen.

Die Zellen dieser Kultivierung erreichten einen kumulierten Gesamt-Glukoseverbrauch von 332,92 mg nach fünfwöchiger Kultivierung (Abb. 4.19). Damit liegt der Gesamtverbrauch etwas unter dem der vorherigen Kultivierung unter Standardbedingungen, und auch der maximale tägliche Verbrauch dieser Kultivierung lag bei nur 24,47 mg (verglichen mit 41,36 mg in der vorangegangenen Kultivierung). Der Laktatgehalt stieg im selben Zeitraum auf kumulierte 297,72 mg an. Auch in dieser Kultivierung sind die durchschnittlichen täglichen Werte für Glukoseverbrauch und Laktatproduktion schwankend, vermutlich weil wieder nur *batchweise* gefüttert werden konnte. Die mittleren Tageswerte schwanken allerdings nicht so extrem wie in der vorangegangenen Kultivierung. Die höchsten Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten wurden, wie zuvor, jeweils am Tag, der auf einen Mediumwechsel folgte, festgestellt.



**Abb. 4.19:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der statischen Kultivierung mit osteogenen Zusätzen. Dargestellt sind die kumulierten Werte und die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).



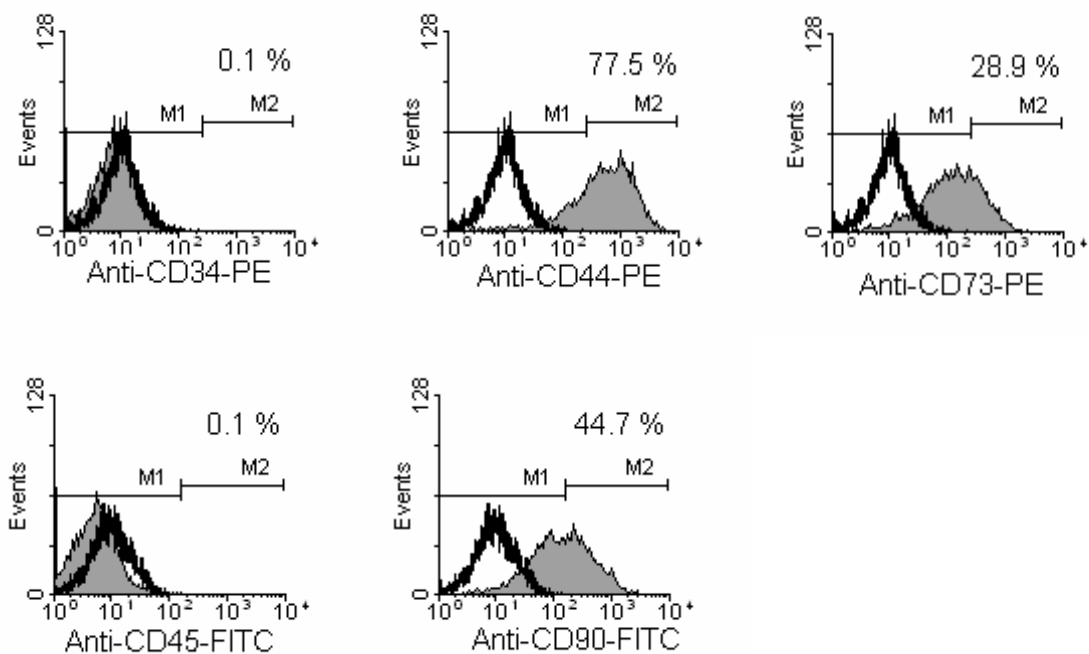


**Abb. 4.20:** Histologische Färbungen im Anschluss an die statische Kultivierung mit dem osteogen differenzierenden Medium OsteoF; von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.

Die Übersichtsfärbung (Toluidinblau, siehe Abb. 4.20) zeigt einen zwar vollständig, jedoch nur schwach besiedelten Zellträger. In der fluoreszenzbasierten DAPI-Übersichtsfärbung kann man dagegen, durch die Anzahl der Zellkerne deutlich erkennbar, sehr dicht besiedelte Bereiche auf dem keramischen Trägermaterial ausmachen. Teilweise befinden sich die Zellkerne in mehreren übereinander liegenden Ebenen, weshalb man sie nicht gleichzeitig fokussieren kann. Die Färbungen zum Nachweis von eingelagertem Calcium in der extrazellulären Matrix sind aber ebenso nur schwach positiv (Abb. 4.20). Aufgrund der Kultivierung mit osteoinduktiven Zusätzen war eine sehr starke Mineralisierung der extrazellulären Matrix erwartet worden.

Im Anschluss an die Kultivierung wurde eine Hälfte der besiedelten Trägerscheibe für die Zellablösung verwendet. Es konnten  $4,1 \times 10^6$  Zellen gezählt werden. Um diesen Wert später vergleichen zu können, muss er auf eine komplette Scheibe hochgerechnet werden. Es kann demnach für eine kultivierte Scheibe eine Zahl von etwa  $8,2 \times 10^6$  Zellen angenommen werden. Dies bedeutet, bezogen auf die Anfangszellzahl von  $5 \times 10^6$ , dass sich die Zellen in der fünfwöchigen Kultivierung um das ungefähr 1,64-fache vermehrt haben. Es muss hier allerdings angemerkt werden, dass die Zellzahlen immer nur zu qualitativen Vergleichen herangezogen werden können, da eine tatsächlich quantitative Ablösung durch die hohe Porosität des Trägermaterials nicht gewährleistet werden kann. Es muss davon ausgegangen werden, dass z. B. Zellen, die tief innerhalb der Poren des Zellträgers gewachsen sind, mit der hier angewandten Methode nicht abgelöst werden konnten.

Es zeigte sich bei der durchflusszytometrischen Analyse (Ergebnisse sind in Abb. 4.21 dargestellt), dass die Zellen nach dieser Kultivierung weiterhin negativ für die hämatopoetischen Antigene (CD34 und CD45) sind. Interessanterweise werden sowohl CD44 als auch CD90 auf einem geringeren Anteil der Zellen exprimiert werden, als sich im Anschluss an die vorherige Kultivierung mit dem Standardmedium AlphaF zeigte. CD90 kann nur auf weniger als der Hälfte aller Zellen nachgewiesen werden (44,7 %), CD44 noch auf 77,5 % aller Zellen. Bei der statischen Kultivierung mit AlphaF waren es noch 94,2 und 99,6 %. Das Antigen CD73 zeigt sich leicht vermehrt, es wird auf 28,9 % der Zellen präsentiert.



**Abb. 4.21:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen nach der statischen Kultivierung mit osteoinduktiven Supplementen. schwarzer Graph: Isotypkontrolle; grauer, gefüllter Graph: spezifischer Antikörper. Die Prozentzahlen entsprechen dem Anteil an Zellen, die den spezifischen Antikörper binden.

Die Expressionsraten der mittels RT-PCR untersuchten Genprodukte liegen nach dieser Kultivierung mit OsteoF ungefähr im selben Bereich wie nach der statischen, dreidimensionalen Kultivierung mit AlphaF (vgl. Tab. 4.3 und 4.4). Die Expression von Col I ist noch einmal leicht gesteigert. Ebenso die Expressionsraten von BSP2, BMP-4, OC und AP. Demgegenüber ist die Expression von Col III, Runx2, OPN und BMP-2 leicht vermindert. Vergleicht man die hier generierten Daten mit den Daten aus der

zweidimensionalen Kultivierung mit osteogenem Medium, so sind die Expression von Col I und Col III etwa um das Dreifache erhöht. Mehr oder weniger leicht erhöht ist auch die Expression von Runx2, OPN, BMP-4, OC und AP. Anders als für die klassisch, zweidimensional kultivierten Zellen, für die noch keine Expression von BSP2 und BMP-2 nachgewiesen werden konnte, ist deren Expression nun detektierbar.

**Tab. 4.4:** Ergebnisse der RT-PCR für Zellen, die statisch mit OsteoF kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis bezogen auf die Expression des internen Standards GAPDH.

GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
1	3,77	2,46	0,69	0,62	0,31	0,31	0,38	0,69	0,77

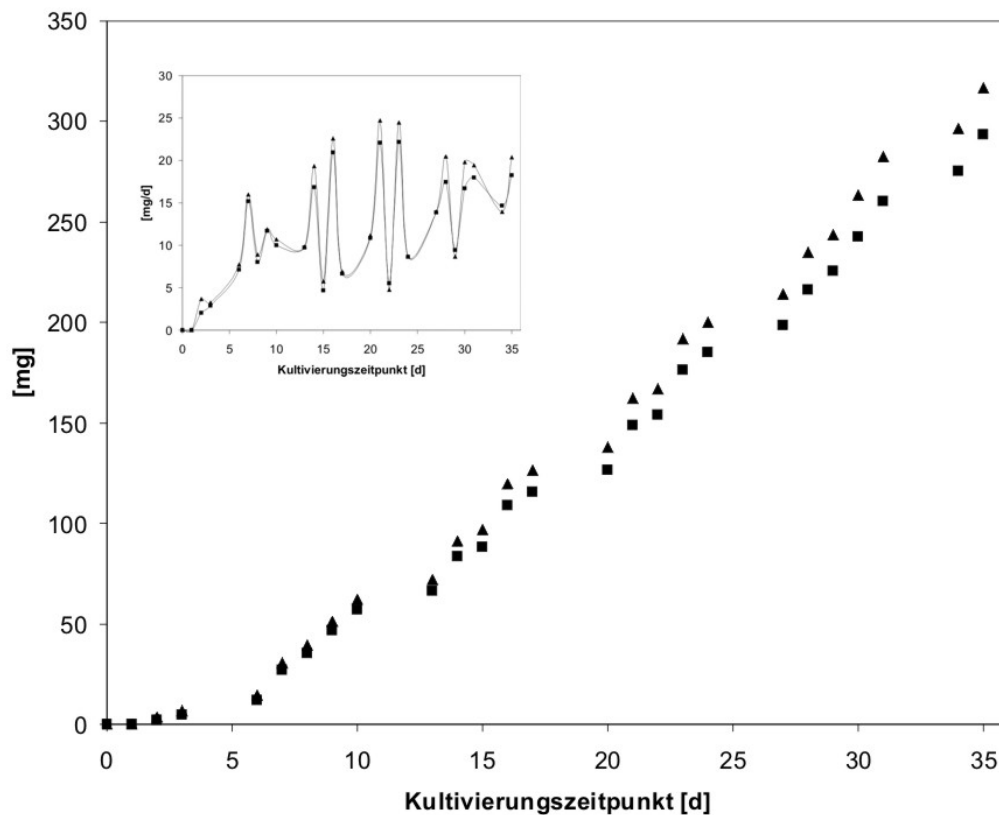
Man kann aus diesen Daten eine möglicherweise weiter vorangeschrittene Differenzierung ableiten, wenn man davon ausgeht, dass die Expression etwa von Runx2 bereits wieder abnimmt und die Zellen eine Phase einsetzender Mineralisierung ihrer EZM erreicht haben<sup>20</sup>.

Die Schwäche der Calciumfärbungen (Abb. 4.20) liegt möglicherweise nicht an einer fehlenden Matrixmineralisierung. Es ist denkbar, dass die Zellen nur schwach proliferierten und daher der gebildete Zellrasen auf dem Zellträger nur sehr dünn war, so dass die Färbungen schwach wirken, da der keramische Zellträger noch durch den Zellrasen durchscheint. Geht man aber davon aus, dass das Oberflächenantigen CD90 im zeitlichen Verlauf der Osteogenese immer seltener auf den Zelloberflächen präsentiert wird, so liegt es nahe anzunehmen, dass Zellen aus dieser Kultivierung bereits weiter in der osteogenen Differenzierung vorangeschritten sind als die Zellen aus der vorherigen Kultivierung mit AlphaF. Dafür spricht auch, dass OPN, dessen Expression postproliferativ zunächst abnimmt, jetzt etwas schwächer, und OC, das verstärkt erst in der Mineralisierungsphase der EZM gebildet wird, jetzt etwas stärker exprimiert wird<sup>53,66</sup>. Dies macht Sinn, wenn man bedenkt, dass die Zellen nun einem weiteren Differenzierungsdruck in Form osteoinduktiver Supplemente ausgesetzt waren.

### 4.2.1.3 Kultivierung mit Humanserum

Um den Einfluss des fötalen Kälberserums auf das Erscheinungsbild der Zellen zu beurteilen, wurde eine weitere statische Kultivierung auf dem keramischen Zellträger durchgeführt, bei der dem Standardmedium anstelle von FCS humanes Serum zugegeben wurde (AlphaH).

Auch unter den genannten Bedingungen wurden die Fs1-Zellen für fünf Wochen kultiviert. Wie in Abb. 4.22 zu erkennen ist, kumulierte sich der Glukoseverbrauch in diesem Zeitraum lediglich auf 317,04 mg. Gleichzeitig stieg die Produktion von Laktat kumuliert auf vergleichbare 293,35 mg. Demnach wurde weniger Glukose verbraucht (und gleichzeitig auch weniger Laktat gebildet) als in beiden vorherigen Ansätzen. Dies widerspricht der Beobachtung aus den zweidimensionalen Kultivierungen. Hier hatte sich ein, bezüglich der Proliferation, positiver Einfluss durch die Verwendung von Humanserum ergeben.



**Abb. 4.22:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der statischen Kultivierung mit Humanserum. Dargestellt sind die kumulierten Werte und die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).



**Abb. 4.23:** Histologische Färbungen im Anschluss an die statische Kultivierung mit AlphaH; von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.

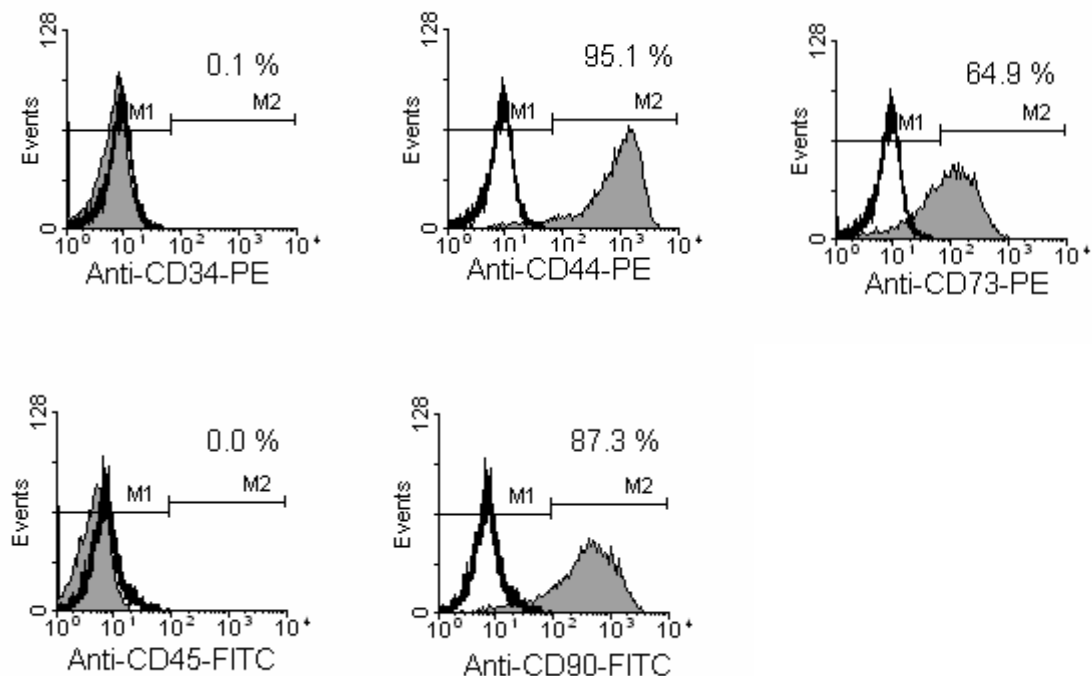
Der Höchstwert für den täglichen Glukoseverbrauch lag für diese Kultivierung mit Humanserum bei 24,71 mg und wurde schon am 21. Tag erreicht. In den ersten zehn Tagen der Kultivierung stieg der tägliche Glucoseverbrauch, und damit auch die zelluläre Proliferation, fast exponentiell an, um im Anschluss mit den für die statischen Versuche typischen täglichen Schwankungen (etwa zwischen 5 und 25 mg) fortzufahren. Analog verhalten sich die Werte zum produzierten Laktat.

Die Übersichtsfärbungen zeigen eine nahezu vollständige Besiedlung des Zellträgers mit Zellen (Abb. 4.23). Einige der offenen Poren der Keramik scheinen hingegen vollständig unbesiedelt zu sein, doch sind die mit Zellen besiedelten Bereiche deutlich stärker gefärbt als in der analogen Kultivierung mit fötalem Kälberserum. Auch die fluoreszenzbasierte DAPI-Färbung weist einen dichten Bewuchs der Trägerkeramik mit Zellen nach. Es konnte auch eine Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch die Detektion von eingelagertem Calcium durch die Alizarinrot- und von Kossa-Färbungen nachgewiesen werden. In Abb. 4.23 kann man anhand der Alizarinrot-Färbung klar eine dichte Matrix erkennen. Andererseits kann man im Gegensatz dazu auch an der Färbung nach von Kossa deutlich sehen, dass einige der offenen Poren gar nicht mit Zellen bewachsen zu sein scheinen.

Auch nach dieser statischen Kultivierung wurden die Zellen von der Hälfte des Zellträgers enzymatisch abgelöst. Die andere Hälfte des Trägers wurde für die genannten Färbungen benötigt. Es konnten  $4,16 \times 10^6$  Zellen gezählt werden. Dies entspricht einem theoretischen Wert von ungefähr  $8,32 \times 10^6$ , und damit einer Vermehrung um das 1,66-fache, für eine Zellablösung von einer kompletten Trägerscheibe. Die ermittelte Zellzahl liegt damit nur unwesentlich über der Zellzahl aus der vorigen Kultivierung mit osteogenen Zusätzen.

Dies ist in sofern verwunderlich und nicht erwartet worden, als die Erfahrungen aus der klassischen, zweidimensionalen Zellkultur in der Regel höhere Wachstumsraten bei Kultivierung mit Humanserum und ohne osteogene Zusätze zeigten. Leider ist die Vergleichbarkeit zur statischen Kultivierung in Standardmedium nicht gegeben, da die Ablösevorschrift noch optimiert worden ist.

Die zytometrische Analyse der Zellen nach dieser Kultivierung zeigt (Abb. 4.24), dass die hämatopoetischen CDs 34 und 45 nicht detektierbar sind. CD73 wird von deutlich mehr Zellen exprimiert als es bei den Zellen der vorangegangenen Kultivierungen mit AlphaF und OsteoF der Fall war. Er konnte auf 64,9 % der untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Anders als in den vorangegangenen Kultivierungen, ist bei Zellen nach dieser Kultivierung die Expression der Oberflächenantigene CD90 und CD44 kaum herunter reguliert. CD90 und CD44 können mit 87,3 bzw. 95,1 % tatsächlich auf einem größeren, bzw. gleichgroßen Anteil der Zellen detektiert werden, als nach der statischen Kultivierung mit AlphaF.



**Abb. 4.24:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung nach der statischen Kultivierung unter Standardbedingungen mit Humanserum. schwarzer Graph: Isotypkontrolle; grauer Graph: spezifischer Antikörper. Angegeben ist der Anteil der für das spezifische Antigen positiver Zellen.

**Tab. 4.5:** Ergebnisse der RT-PCR einiger mit der osteoblastären Entwicklung assoziierter Genprodukte für Zellen, die statisch mit Humanserum kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis bezogen auf die Expression des internen Standards GAPDH.

GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
1	3	0,64	0,36	0	0	0	0	0,48	0,24

Werden die Zellen mit AlphaH dreidimensional kultiviert, ändert sich das Bild, welches die RT-PCR für die Expression einiger relevanter Gene liefert. Zwar wird Col I auch hier stark exprimiert, sowohl im Vergleich zu den anderen statischen, dreidimensionalen Kultivierungen, als auch im Vergleich zur klassischen, zweidimensionalen Zellkultur. Doch ist die Expression aller anderen untersuchten Genprodukte bei den Zellen dieser Kultivierung herabreguliert. So können z. B. BSP2, OPN und die BMPs 2 und 4 überhaupt nicht detektiert werden. Dies war nach zweidimensionaler Zellkultur, wenn auch schwach, zumindest für OPN und BMP-4 noch der Fall. Interessanterweise ist aber auch die Expression von Col III gegenüber der klassischen Zellkultur und gegenüber den anderen statischen, dreidimensionalen Kultivierungen stark herabgesetzt und erreicht nicht mehr die Expressionsrate des internen Standards GAPDH. Auch OC, AP und Runx2 werden äußerst schwach exprimiert. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Zellen nach dieser Kultivierung noch einen vergleichsweise nativen Phänotyp aufweisen.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist es demnach denkbar, dass die Verwendung von Humanserum die Zellen an der Matrixmineralisierung und damit osteogenen Differenzierung hindert und sie stattdessen in einem Zustand der aktiven Proliferation und der exzessiven Matrixgenerierung hält. Diese Annahme passt auch zu der Beobachtung aus der klassischen Zellkultur, dass die umbilikalen Zellen generell eine gesteigerte Vermehrung zeigen, wenn sie mit Humanserum anstelle von FCS kultiviert werden.

Alles in allem scheint es, als wirke die Verwendung von Humanserum bei der langzeitigen Kultivierung der Differenzierung entgegen und gleichzeitig als übe das FCS allein schon einen Differenzierungsdruck auf die Zellen aus.

Vergleicht man die drei statischen Kultivierungen anhand des Glukoseverbrauchs, so erreichte die Kultivierung mit AlphaF den höchsten Gesamtverbrauch im Verlauf der fünf Wochen. Der Gesamtverbrauch an Glukose in den weiteren Kultivierungen erreichte nur knapp drei Viertel dieser Kultivierung unter Standardbedingungen. Da der Glukoseverbrauch als Orientierungsgröße für die Zellvermehrung verwendet wurde, war für die Kultivierung mit Humanserum ein deutlich höherer Verbrauch erwartet worden als für die mit FCS kultivierten Zellen. Denn auch in der statischen zweidimensionalen Zellkultur zeigten Zellen, die mit Humanserum anstelle von FCS kultiviert wurden, ein deutlich schnelleres Wachstum und damit eine gesteigerte Proliferation.

Die aus dem Glukoseverbrauch resultierende Bildung von Laktat verhält sich analog, die Unterschiede sind jedoch nicht so gravierend. Dabei ist das Verhältnis von gebildetem Laktat zur jeweils verbrauchten Glukose für die Kultivierung mit Humanserum am höchsten und liegt nahezu bei eins. Wie an anderer Stelle erwähnt, waren zu späteren Zeitpunkten in diesen Kultivierungen die Zelldichten bereits so hoch, dass selbst bei täglichem Mediumwechsel die neu zugeführte Glukose am Folgetag vollständig verbraucht war. Dies bedeutet natürlich, dass die Zellen in diesen statischen Langzeitkultivierungen ab einer kritischen Zelldichte nicht mehr hinreichend mit Glukose (und anderen Nährstoffen) versorgt werden konnten.

Die Übersichtsfärbungen zeigen für alle statischen, dreidimensionalen Kultivierungen deutlich einen zellulären Bewuchs des kompletten Trägermaterials. Auch der Nachweis von extrazellulärem Calcium ist in allen Fällen positiv. Dabei gibt es klar erkennbare Unterschiede in der Intensität der Färbungen bzw. in der Menge sezernierter extrazellulärer Matrix und ihrer Mineralisierung (vgl. Abb. 4.17, 4.20 und 4.23). Die Bereiche mit der dichtesten Matrix zeigen sich nach der Kultivierung mit Humanserum. Andererseits gibt es nach dieser Kultivierung auch Bereiche auf dem Zellträger, die scheinbar äußerst spärlich, möglicherweise auch gar nicht, besiedelt sind. Die Färbungen der beiden anderen Kultivierung zeigen einen deutlich homogenen Bewuchs des Trägers mit Zellen, wobei es bei der Verwendung des Standardmediums AlphaF zu einer etwas stärkeren Matrixbildung als bei Verwendung des osteogenen Mediums OsteoF gekommen ist. Da der Matrixaufbau bei letztgenannter Kultivierung so schwach ist, ist wohl auch die Intensität der Färbungen zum Mineralisierungsnachweis schwach, denn eine nicht exzessiv aufgebaute Matrix kann natürlich auch nicht stark mineralisieren. Denkbar ist ein zu starker Einfluss osteoinduktiver Faktoren, der die zunächst notwendige Phase der Proliferation und des Matrixaufbaus verhindert.



Die erhaltenen Zellzahlen sind nur bedingt miteinander vergleichbar, da für die Kultivierung mit Standardmedium ein nicht optimiertes Protokoll zur Ablösung verwendet wurde. Die Zellzahlen nach den beiden anderen Kultivierungen sind annähernd gleich. Dies war zwar so nicht erwartet worden, passt aber zu den ermittelten Glukoseverbrauchsraten und den Ergebnissen der histologischen Färbungen. Bei der Kultivierung mit OsteoF erreichte die Zellschicht zwar keine gewebeähnliche Dichte, dafür ist der gesamte Zellträger homogen besiedelt. Im Gegensatz dazu gibt es nach der Kultivierung mit Humanserum zwar durchaus Bereiche, die mit einer dicken, gewebeähnlichen Zellschicht überzogen sind, an vielen anderen Stellen des porösen Träger sind dagegen kaum Zellen nachweisbar.

Die durchflusszytometrische Analyse weist für die Zellen nach allen Kultivierungen aufgrund des Fehlens der Marker CD34 und CD45 nach, dass die hUCs nicht der hämatopoetischen Linie angehören. Die mit OsteoF kultivierten Zellen zeigen im Vergleich der drei Kultivierungen den am weitesten in die osteogene Richtung differenzierten Phänotyp. Dies wird durch den relativen Verlust der Expression von CD90 und CD73 gegenüber den mit AlphaF oder AlphaH kultivierten Zellen untermauert. Für die mit Humanserum kultivierten Zellen liegt deren Expression am höchsten und auch CD44 wird von diesen Zellen am häufigsten exprimiert, was einen relativ nativen Phänotyp der Zellen vermuten lässt.

Die Expressionsanalyse mittels RT-PCR zeigt, dass alle untersuchten Genprodukte von Zellen, die mit AlphaF oder OsteoF kultiviert wurden, in annähernd gleicher Menge exprimiert werden. Der Differenzierungsstatus der Zellen ist also offenbar vergleichbar. Dies ist verwunderlich, da das OsteoF-Medium, neben der dreidimensionalen Keramik, einen zusätzlichen osteoinduktiven Effekt darstellen sollte. Aufgrund dessen war für diese Zellen ein verändertes Bild der Genexpression erwartet worden. Ein anderes Bild zeigten aber vielmehr die Zellen, die mit Humanserum kultiviert wurden. Bei Zellen dieser Kultivierung konnten einige Genprodukte nicht nachgewiesen werden (BSP2, OPN sowie BMP-2 und BMP-4), andere wurden im Vergleich deutlich schwächer bzw. von deutlich weniger Zellen exprimiert (Col III, Runx2, OC und AP). Einzig Col I wurde von den Zellen der Kultivierung mit Humanserum in vergleichbarer Größenordnung exprimiert. Nimmt man dieses Expressionsprofil jedoch als das eines nicht differenzierten Phänotyps an, so passen diese Ergebnisse durchaus zu denen der zytometrischen Analyse.

Bezieht man alle generierten Daten ein, so lässt sich feststellen, dass die mit Humanserum kultivierten Zellen offenbar den nativsten Phänotyp besitzen, gefolgt von den unter Standardbedingungen und den mit osteogenen Zusätzen kultivierten Zellen. Da mit einer PCR immer nur der durchschnittliche Zustand einer gesamten Zellpopulation ermittelt werden kann, zeigt die unter Standardbedingungen kultivierte Population einen ähnlichen Differenzierungsstatus wie die mit osteogenem Medium kultivierte. Der Unterschied liegt vermutlich darin, dass sich unter Standardbedingungen ein Teil der Zellen noch im Stadium der Proliferation und des Matrixaufbaus befindet, wodurch es zu einem exzessiveren EZM-Aufbau kommt. Damit scheint, neben den osteoinduktiven Supplementen, nicht nur das dreidimensionale Trägermaterial einen stärker differenzierten Phänotyp zu induzieren, sondern möglicherweise auch die Verwendung von FCS.

#### 4.2.2 Dynamische Zellkultivierung im Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktor

Bei Erreichen einer kritischen Dichte der Zellschichten stößt eine statische Kultivierung schnell an ihre Grenzen, auch wenn bzw. gerade weil sie auf dreidimensionalen Zellträgern durchgeführt wird. Dies betrifft vor allem die Versorgung der Zellen mit wichtigen Nährstoffen in den tiefer liegenden Schichten, so dass es hier zu einem Absterben der Zellen kommen kann. Auch ist oft die durch *batchweise* Fütterung frisch zugegebene Glukose für eine intensive Proliferation nicht mehr ausreichend. Da die Versorgung der Zellen mit den notwendigen Nährstoffen in statischen Kultivierungen rein diffusionskontrolliert ist, kann es vor allem im Inneren dreidimensionaler Konstrukte zu einer Unterversorgung der Zellen kommen. Gleichzeitig ist auch der Abtransport metabolischer Nebenprodukte, die durch Akkumulation auch toxisch werden können, nicht gewährleistet. Dieser Umstand kann durch den Einsatz von Bioreaktoren umgangen bzw. minimiert werden. Durch die durch den Einsatz von Bioreaktoren zusätzlich erreichten Flüssigkeitsströmungen kommt es neben der Diffusion zusätzlich zu konvektiven Transportprozessen, wodurch eine bessere Zellversorgung erreicht wird.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit dynamische Langzeitkultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD-Einwegbioreaktor und vergleichend dazu im Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor durchgeführt, auf die ich später eingehen werde. Die Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD hatten, wie die statischen Kultivierungen zuvor, eine Dauer von 35 Tagen. Es wurde darauf geachtet, dass alle

Kultivierungen im Bioreaktor mit der gleichen Zellzahl inokuliert wurden. Dies waren pro keramischen Zellträger fünf Millionen Zellen. Da die meisten Kultivierungen im Reaktor mit zwei Trägerscheiben durchgeführt wurden, wurden pro Kultivierung also  $10 \times 10^6$  Zellen benötigt. Die Medienmenge, in der die definierte Anzahl an Zellen suspendiert war, wurde von anfänglich 4 mL kontinuierlich auf 2,5 mL gesenkt, da die bereits befeuchteten Scheiben kaum mehr als diese Menge Flüssigkeit aufnehmen können. Jeder weitere Tropfen Zellsuspension fällt unmittelbar von der Scheibe ab und die darin enthaltenen Zellen sind für die Kultivierung sozusagen verloren.

Die Zellsuspension wird mit Hilfe einer Spritze über ein Septum direkt auf das mit 1 rpm (*rotation per minute*) rotierende Reaktorbett aufgetropft. Nachdem die Zellsuspension vollständig auf die keramischen Träger aufgebracht war, wurde den Zellen bei fortgesetzter Rotation etwa 30 Minuten Zeit gegeben, fest an den Keramikträgern zu adhären. Erst nach Ablauf dieser Anheftungsphase wurde das Kultivierungsmedium langsam zugeführt. Dabei musste verstärkt auf eine stabile und nicht zu stark schwankende Temperatur- sowie pH-Wert-Regelung geachtet werden. Der pH-Wert wird durch eine flexible Zuströmung von Kohlendioxid reguliert und so zwischen 7,0 und 7,4 konstant gehalten. Bei hypoxischen Kultivierungen konnte zu diesem Zeitpunkt noch keine Sauerstofflimitierung gewährleistet werden. Diese kann erst zu Beginn der Kultivierung durch Begasung mit reinem Stickstoff kontinuierlich aufgebaut werden.

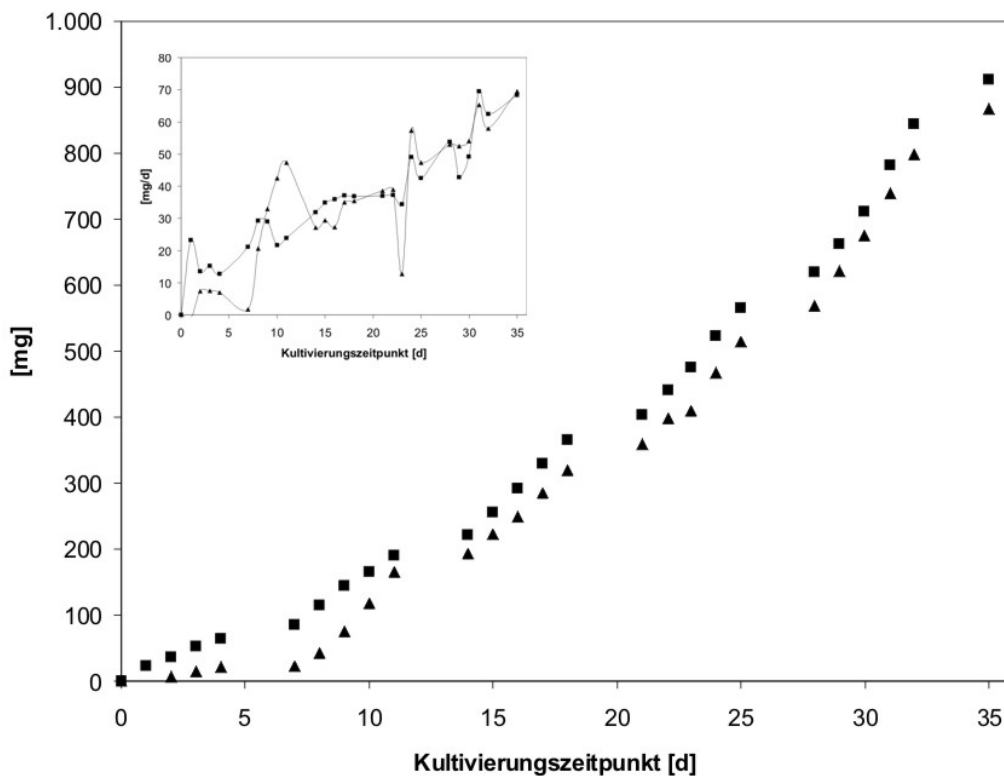
Um eine optimale Durchmischung des Kultivierungsmediums im Bioreaktor zu gewährleisten, zirkuliert ein Teil des Mediums und wird mit frischem Medium angereichert, bevor es zurück in den Reaktor gelangt. Da das Reaktorvolumen (bei halbhohler Füllung) nur etwa 50 mL beträgt, wurde die Zirkulation auf 5 mL/min eingestellt. Die Fütterungsrate wurde bei Bedarf, d. h. bei geringer Glukosekonzentration im Reaktormedium, erhöht.

Eine erste Langzeitkultivierung im Z<sup>®</sup> RPD wurde genutzt, um die Handhabung des Reaktors und die Regulation der Steuerungsparameter zu testen. Des Weiteren wurde diese Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD genutzt, um im Anschluss an die Kultivierung die Zellablösung von den hochporösen, keramischen Trägern zu optimieren. Die Ablösung der Zellen ist notwendig, um die Zellen nach der Kultivierung z.B. durchflusszytometrisch analysieren zu können oder um eine PCR durchführen zu können, um so den Differenzierungsstatus der Zellen bestimmen zu können.

Während der Kultivierung wurde das Wachstum der Zellen anhand des täglich gemessenen Glukosegehaltes im Reaktormedium überwacht. Im Anschluss an die Kultivierungen wurde jeweils eine der besiedelten Scheiben für eine Zellablösung verwendet. Die abgelösten Zellen wurden gezählt und für einen (qualitativen) Vergleich der erreichten Zellzahlen herangezogen. Weiterhin wurde ein Teil dieser abgelösten Zellen einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen, ein weiterer Teil für eine RNA-Extraktion vorbereitet. Die extrahierte RNA wurde in einer RT-PCR typischer osteogener Marker eingesetzt. Die zweite Trägerscheibe wurde manuell in mehrere Stücke zerbrochen, von denen einige histologisch gefärbt und andere für Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) vorbereitet wurden. Als Übersichtsfärbungen wurden wie zuvor die Toluidinblau- sowie die fluoreszenzbasierte DAPI-Färbung eingesetzt. Als erster Nachweis für eine osteogene Differenzierung der Zellen wurden eine Alizarinrot-Färbung und eine Färbung nach von Kossa durchgeführt. Beide Färbungen weisen eine Mineralisierung der extrazellulären Matrix durch eingebaute Calciumionen nach, indem sie diese binden.

#### 4.2.2.1 Kultivierung unter Standardbedingungen

Bereits bei dynamischer Kultivierung unter den definierten Standardbedingungen (Verwendung von Standardmedium AlphaF ohne Sauerstofflimitierung) zeigten die Zellen eine sehr viel stärkere Proliferation als unter statischen Bedingungen, was sich in einem erhöhten Glukoseverbrauch äußerte, wie Abb. 4.25 deutlich zeigt. So war der kumulierte Verbrauch in der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD an Tag 10 zwar erst auf 118,74 mg angewachsen, ähnlich zur statischen Vergleichskultivierung im Inkubator (99,92 mg), im weiteren Verlauf der Kultivierung stieg der Glukoseverbrauch der Zellen im Reaktor jedoch wesentlich schneller an und erreichte zum Ende der Kultivierung, an Tag 35, einen kumulierten Wert von 867,53 mg (Abb. 4.25). Zellen, die unter analogen Bedingungen statisch kultiviert wurden, erreichten nach 35 Tagen nur einen absoluten Glukoseverbrauch von 436,41 mg (Abb. 4.16). Dies entspricht ziemlich genau der Hälfte des Verbrauchs der unter dynamischen Bedingungen im Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktor kultivierten Zellen.



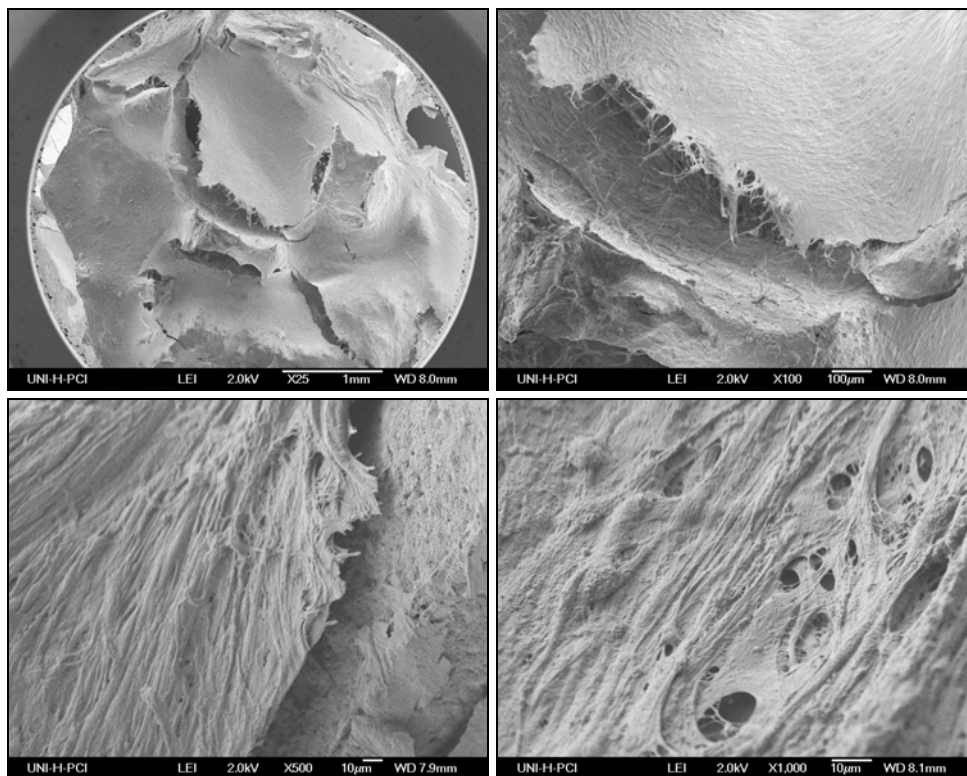
**Abb. 4.25:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen. Dargestellt sind die kumulierten Werte und die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

Die Laktatproduktion stieg bei der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD im selben Zeitraum auf kumulierte 912,24 mg an. Auch hier zeigten die Ergebnisse der statischen Kultivierung deutlich niedrigere Werte. In Abb. 4.25 kann man einen nahezu parallelen Verlauf des (kumulierten) Glukoseverbrauchs und der (kumulierten) Laktatproduktion erkennen. Auffällig ist außerdem, dass in der Anfangsphase der Kultivierung im Reaktor, die mittleren täglichen Raten der Laktatproduktion über den Werten für den Glukoseverbrauch liegen (kleines Diagramm in Abb. 4.25).

Die zur Gewinnung eines ersten Eindrucks der Zelldichte auf dem dreidimensionalen Träger nach der Kultivierung angefertigten, histologischen Färbungen zeigen einen wesentlich dichteren Zellbewuchs als nach allen statischen Kultivierungen, was sich in einer intensiveren Blaufärbung ausdrückt (Abb. 4.26). Auch die DAPI-Färbung zeigt eine so hohe Dichte an Zellkernen, die offenbar in mehreren Ebenen vorliegen, dass kaum noch eine Ebene fokussiert wiedergegeben werden kann. Die hohe Zelldichte lässt sich auch an den Färbungen zum spezifischen Calciumnachweis deutlich erkennen.



**Abb. 4.26:** Histologische Färbungen im Anschluss an die dreidimensionale Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen; von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.



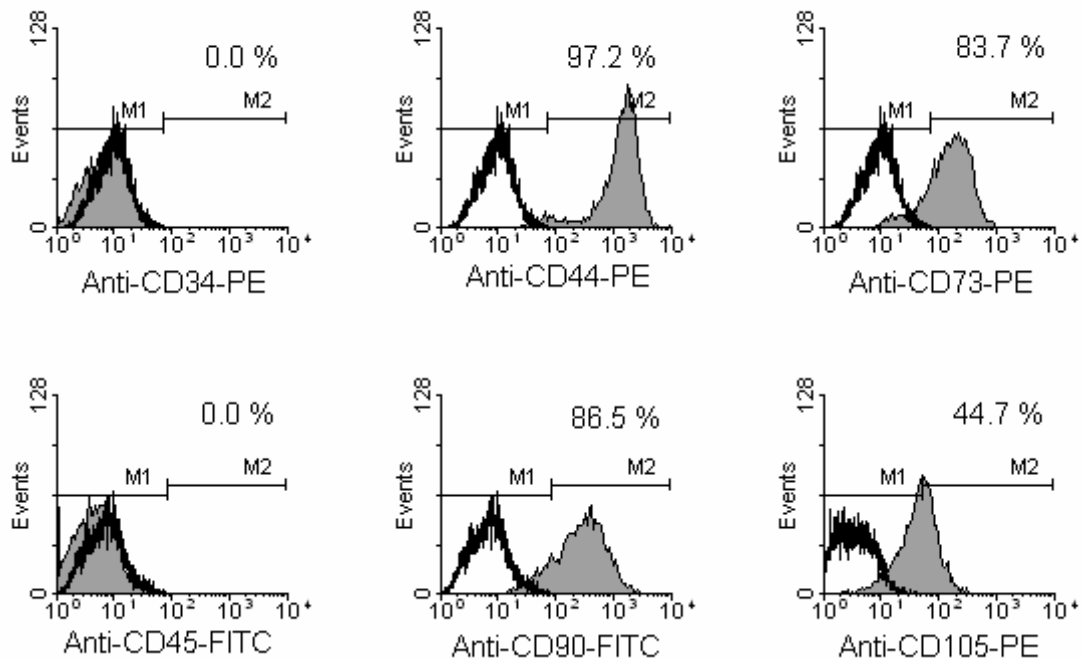
**Abb. 4.27:** Rasterelektronenmikroskopie der besiedelten Trägerkeramik im Anschluss an die Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen. Eine Bruchkante, die vermutlich durch den Wasserentzug bei der Probenvorbereitung verursacht wurde, ist im Bild unten links gut sichtbar.

Man erkennt nicht nur die im Vergleich zur statischen Kultivierung stark erhöhte Zellschicht, sondern zusätzlich auch die viel intensivere Färbung und damit gesteigerte Detektion von eingelagerten Calciumionen in der von den Zellen in hohem Maße gebildeten extrazellulären Matrix. Es sind klar Bereiche mit kompakten Zell-Matrix-Strukturen zu erkennen, die in der von Kossa-Färbung nahezu schwarz erscheinen.

Diese dicht gewachsenen Strukturen sind besonders gut auf den zusätzlich angefertigten REM-Aufnahmen zu erkennen (Abb. 4.27). Die teilweise Ablösung der Zellschichten liegt dabei vermutlich in der Vorbereitung der Proben für die REM-Aufnahmen begründet, da ihnen im Zuge dessen jegliche Feuchtigkeit entzogen wird. Man kann die Bruchkanten zum Teil sehr deutlich erkennen.

Die Zellablösung, die auf diese dynamische Kultivierung unter Standardbedingungen folgte, war erfolgreich und lieferte ganze  $15,85 \times 10^6$  Zellen. Dieser Wert liegt über allen bisher erreichten Zellzahlen. Leider kann kein Vergleich zur statischen Langzeitkultivierung hergestellt werden, da die Ablösevorschriften unterschiedlich waren. Bezogen auf die Ausgangszellzahl ergibt sich eine 3,2-fache Zellvermehrung innerhalb dieser fünföchigen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD. Wie bereits erwähnt, kann die Zellzahl immer nur zu qualitativen Vergleichen herangezogen werden, da man aufgrund der enormen Porosität des Trägermaterials davon ausgehen muss, dass die Zellablösung niemals vollständig sein kann.

Die zytometrische Analyse der Zellen zeigte, dass sie im Anschluss an diese Kultivierung im Bioreaktor, wie auch zuvor, negativ für die hämatopoetischen Oberflächenantigene CD34 und CD45 waren (Abb. 4.28). CD90 und CD44 werden nach der fünföchigen dynamischen Kultivierung nur noch von 86,5 bzw. 97,2 % der untersuchten Zellen exprimiert. Im Vergleich zur statischen Kultivierung unter analogen Bedingungen bedeutet dies eine leichte Verringerung der Expression dieser beiden antigenen Markermoleküle. Unter statischen Bedingungen konnte CD90 noch auf 94,2 % und CD44 auf 99,6 % der Zelloberflächen nachgewiesen werden. CD73 wird bei der jetzigen Analyse noch auf 83,7 % der Zellen detektiert. Der Marker CD105 hingegen, dessen herabregulierte Expression mit verschiedenen Zelldifferenzierungen in Zusammenhang gebracht wird<sup>37</sup>, kann jetzt, nach fünföchiger Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen, nur noch auf 44,7 % der Zelloberflächen detektiert werden.



**Abb. 4.28:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Zellen nach der dynamischen Kultivierung im Z<sup>®</sup>RPD unter Standardbedingungen. schwarzer Graph: Isotypkontrolle; grauer, gefüllter Graph: spezifischer Antikörper.

Die Analyse der Genexpression einiger für die zelluläre Differenzierung zu reifen Osteoblasten wichtigen Gene mit Hilfe der RT-PCR zeigt eine gegenüber dem internen Standard erhöhte Expression der Collagene sowie von Osteopontin (Tab. 4.6). Die Expression von Col I und OPN wird bereits während der hochproliferativen Phase der Osteoblastendifferenzierung induziert. Im Gegensatz zu Col I, das von diesem Zeitpunkt an zum Aufbau der zelleigenen EZM durchgehend synthetisiert wird, wird die Osteopontinproduktion postproliferativ kurzzeitig abgesenkt um dann in der Mineralisierungsphase der EZM erneut erhöht zu werden<sup>3,53,66</sup>. Aufgrund der Tatsache, dass die Collagenexpression im Vergleich zur statischen, dreidimensionalen Kultur geringer und die Expressionrate von OPN gleichzeitig stark erhöht ist, ist es möglich, dass sich die Osteopontinproduktion bereits dem zweiten Peak ihres biphasischen Expressionsverlaufs nähert und so der Großteil der Zellen bereits in die Mineralisierungsphase der EZM eingetreten ist.



**Tab. 4.6:** Ergebnisse der RT-PCR einiger mit der osteoblastären Entwicklung assoziierter Genprodukte für Zellen, die im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis bezogen auf die Expression des internen Standards GAPDH.

GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
1	2,05	1,15	0,4	0,35	1,35	0,35	0,45	0,45	0,3

Die Expression der weiterhin analysierte Gene ist gegenüber der zweidimensionalen Kultivierung erhöht, gegenüber der statischen, dreidimensionalen Kultivierung nur leicht verändert. Dabei werden Runx2, BSP2, OC und AP etwas schwächer, die BMPs 2 und 4 ein wenig stärker exprimiert. Verglichen mit der statischen Kultivierung ist es möglich, dass auch die Expression von Runx2 bereits wieder abgesenkt ist, was gleichzeitig die höheren Expressionsraten der BMPs erklären könnte. Dafür spricht auch der im Vergleich zur statischen Kultur abgesenkte AP-Spiegel, denn der AP-Level steigt im Verlauf der Differenzierung zunächst an und beginnt erst wieder zu sinken, wenn die Matrixmineralisierung fortgeschritten ist<sup>3</sup>.

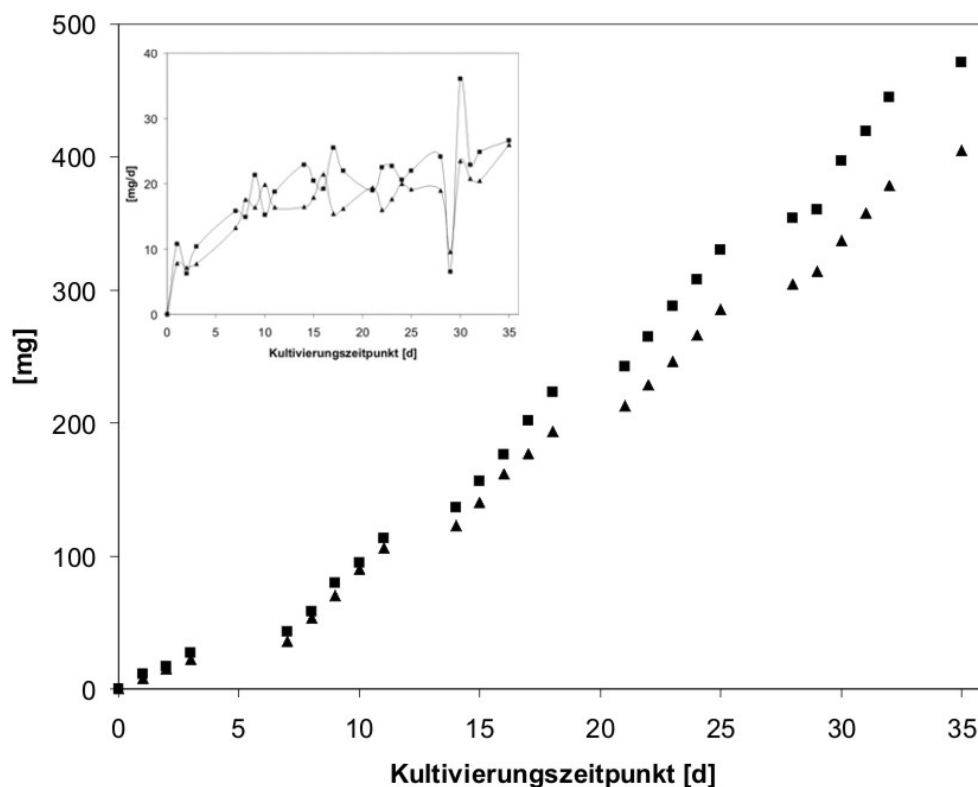
#### 4.2.2.2 Kultivierung mit osteogenen Zusätzen

In einer weiteren Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktor, bei der dem verwendeten Standardmedium osteoinduktive Supplemente zugesetzt wurden (OsteoF), konnten sowohl beim Glukoseverbrauch, als auch bei der Laktatproduktion nicht so gravierende Unterschiede zwischen statischer und dynamischer Kultivierung festgestellt werden wie noch bei den Kultivierungen mit dem Standardmedium AlphaF. Im Gegenteil, die Werte für die statische und die dynamische Kultivierung verliefen über den Zeitraum von 35 Tagen annähernd parallel, wobei die Werte für die dynamische Kultivierung immer leicht über denen der statischen Kultivierung lagen (vergleiche dazu Abb. 4.29 und 4.19). Am Ende der Kultivierung lag die Gesamtmenge an verbrauchter Glukose unter dynamischen Bedingungen mit 404,89 mg aber noch sichtlich über dem Wert von 332,92 mg für die Kultivierung unter statischen Bedingungen.

Die kumulierten Werte zur Menge an produziertem Laktat verlaufen für die Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD parallel zu den Werten des Glukoseverbrauchs. Die letztendliche

Laktatproduktion kumulierte sich auf 471,21 mg und lag damit, wie schon bei der vorangegangenen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD in Standardmedium auffiel, erneut über der Gesamtmenge an verbrauchter Glukose.

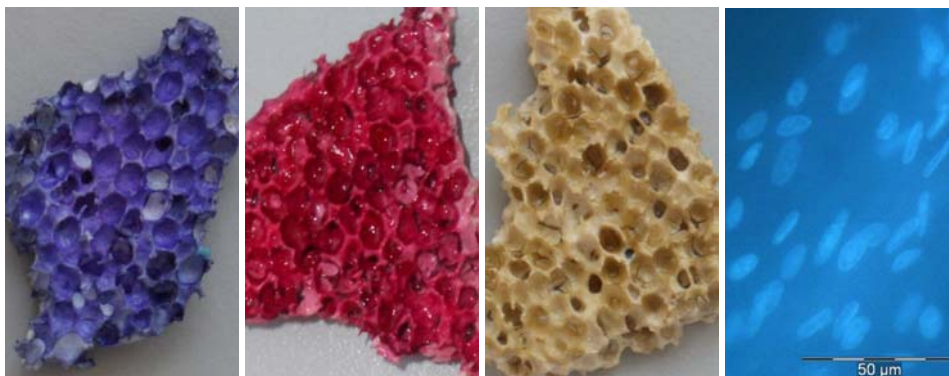
Die Tatsache, dass während dieser dynamischen Kultivierung kaum mehr Glukose verbraucht wurde als unter statischen Bedingungen war zwar so nicht erwartet worden, kann jedoch möglicherweise mit dem zusätzlich differenzierenden Einfluss der dynamischen Bedingungen durch die Kultivierung im Bioreaktor erklärt werden. Möglicherweise war der Differenzierungsdruck, der durch Supplemente und Dynamik induziert wurde, zu stark, um die Zellen zunächst zur Proliferation anzuregen. Möglicherweise hat stattdessen ein Teil der Zellen unverzüglich mit der Differenzierung begonnen und die anfängliche Phase hoher Proliferation übersprungen.



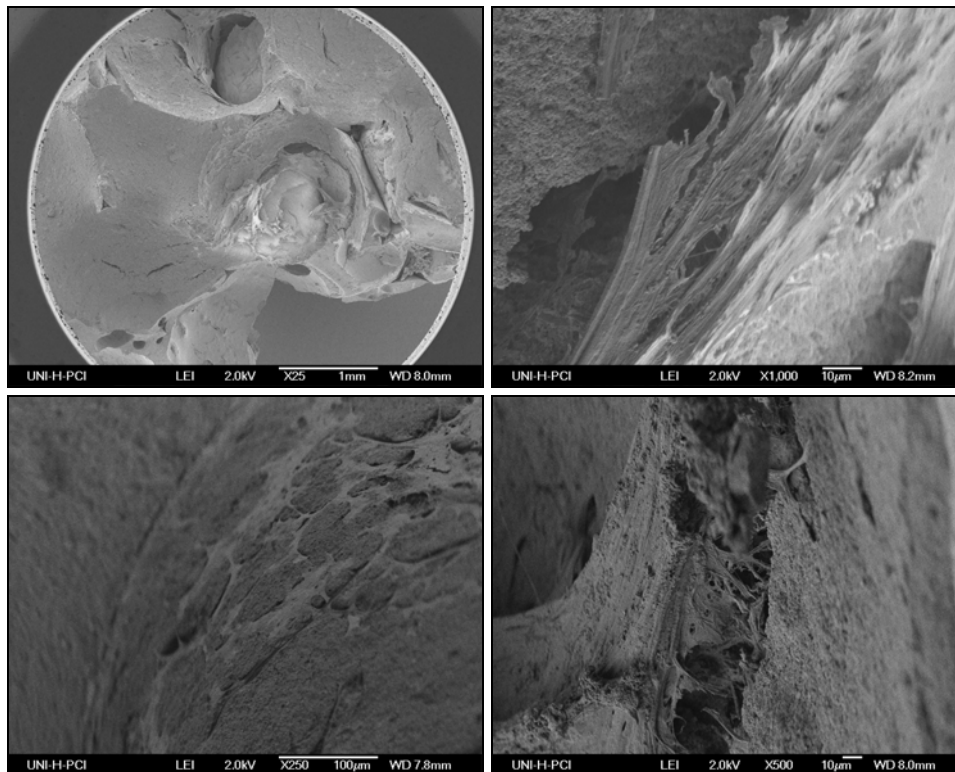
**Abb. 4.29:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit osteogen differenzierendem Medium. Dargestellt sind die kumulierten Werte und die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

Die histologischen Färbungen, die in Abb. 4.30 wiedergegeben sind, zeigen einen zwar vollständigen und prinzipiell auch dichten Zellbewuchs, jedoch gibt es auch offene Poren im Trägermaterial, die von den Zellen nicht besiedelt wurden. Anhand der Toluidinblau-Färbung wird deutlich, dass die Zelldichte unter diesen differenzierenden Bedingungen doch deutlich geringer ist als noch bei der Kultivierung mit Standardmedium. Die Färbungen zum Nachweis der Matrixmineralisierung sind zweifelsfrei positiv, da allerdings die Zelldichte nicht dasselbe Maß wie nach der vorherigen Kultivierung erreichte, ist die Intensität der Färbungen deutlich schwächer. Solche Unterschiede sind immer besonders klar an der Färbung nach von Kossa zu erkennen (vergleiche Abb. 4.30 und Abb. 4.26). Hier sind, anders als zuvor, keine tiefbraunen Bereiche zu erkennen. Bei Betrachtung der DAPI-gefärbten Proben waren die Schwierigkeiten bei der Fokussierung der fluoreszierenden Zellkerne nicht so gravierend, da die Zellen offenbar nicht so vielschichtig wuchsen.

Auch auf den REM-Aufnahmen sieht man gut den teils sehr schwachen zellulären Bewuchs des Zellträgers (Abb. 4.31). An einigen Stellen kann man noch das keramische Material erkennen, über das sich nur vereinzelt Zellen erstrecken.



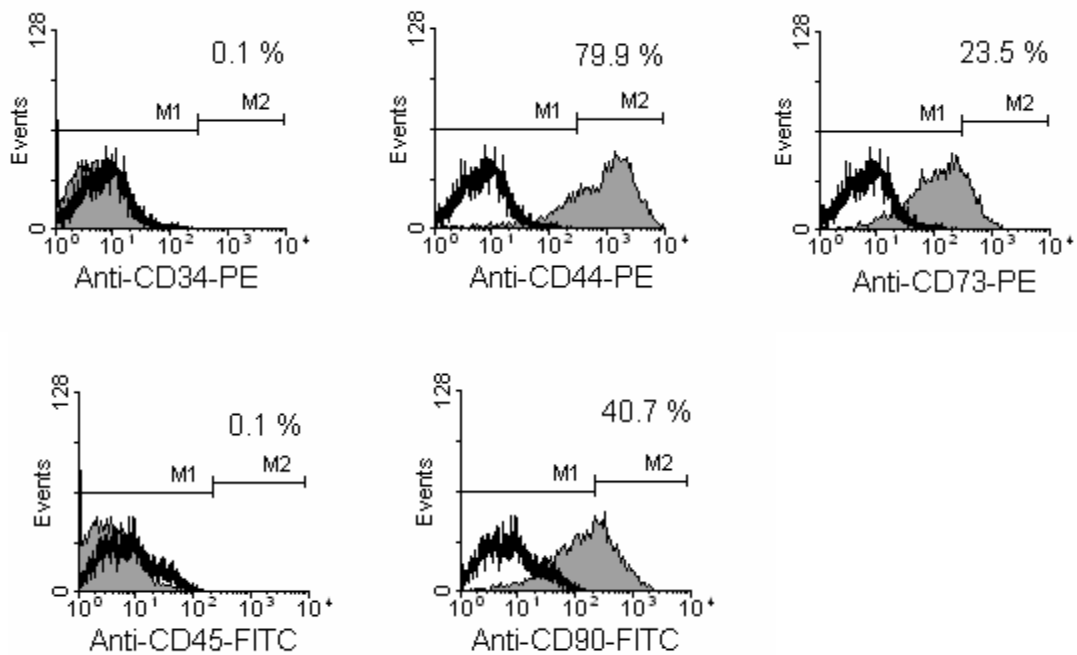
**Abb. 4.30:** Histologische Färbungen im Anschluss an die dreidimensionale Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit osteogen differenzierendem Medium (OsteoF); von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.



**Abb. 4.31:** REM-Aufnahmen des besiedelten Sponceram<sup>®</sup>-Trägers nach der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit osteoinduktiven Supplementen.

Nach dieser Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Zusatz differenzierender Supplemente war es deutlich schwieriger, die Zellen vom Zellträger abzulösen. Es konnten nach der enzymatischen Zellablösung nur  $4,25 \times 10^6$  Zellen gezählt werden. Diese Zahl entspricht nur ungefähr der Hälfte der nach der statischen Kultivierung erhaltenen Zellzahl ( $8,2 \times 10^6$ ). Dies lag vor allem daran, dass sich die Zellen nicht einzeln vom Trägermaterial lösten, sondern vielmehr in Zellklumpen, wodurch sich die Zellen im Anschluss kaum vereinzeln ließen. Wäre die hier ermittelte Zellzahl also tatsächlich quantitativ, würde dies bedeuten, dass über den Zeitraum von fünf Wochen keinerlei Zellvermehrung stattgefunden hätte, und somit die Proliferationsrate unterhalb der natürlichen Apoptoserate der Zellen gelegen haben müsste.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind in Abbildung 4.32 dargestellt. Die Analyse der Zellen nach der dynamischen Kultivierung zeigte kaum Unterschiede zur analogen statischen Langzeitkultivierung. So zeigt sich auch hier ein verschwindend geringer prozentualer Anteil der Zellen von 0,1 positiv für die hämatopoetischen Oberflächenmoleküle CD34 und CD45. Des Weiteren können nur noch 40,7 % der Zellen als positiv für CD90 aber gleichzeitig noch 79,9 % als positiv für CD44 deklariert werden.



**Abb. 4.32:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der Zellen nach der dynamischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Verwendung osteoinduktiver Zusätze. schwarzer Graph: Isotypkontrolle; grauer, gefüllter Graph: spezifischer Antikörper.

In der statischen Parallelkultivierung waren mit 44,7 % noch etwas mehr Zellen positiv für CD90, aber mit 77,5 % etwas weniger Zellen positiv für CD44. Auch die Präsentation von CD73 auf den Zelloberflächen ist mit 23,5 % positiven Zellen ähnlich stark zur statischen Kultivierung (28,9 %).

Im Vergleich zur zweidimensionalen Kultivierung mit osteogenem Medium wurden alle mittels RT-PCR nachgewiesenen Gene verstärkt exprimiert (vgl. Tab. 4.7 und 4.2). Verglichen mit der analogen statischen, dreidimensionalen Kultivierung trifft dies nicht für alle untersuchten Genprodukte zu (vergleiche Tab. 4.4). Einige werden etwa mit derselben Stärke exprimiert, andere weniger stark. Die AP zum Beispiel, konnte bei Zellen, die zweidimensional kultiviert wurden, gar nicht detektiert werden, zeigt aber nach der statischen, dreidimensionalen Kultivierung höhere Raten als jetzt nach der dynamischen Kultivierung, was für eine weiter vorgeschrittene Differenzierung der Zellen spricht, da die AP-Expression erst wieder gesenkt wird, wenn die Matrixmineralisierung fortgeschritten ist<sup>3</sup>. Im Gegensatz dazu steht die in der dynamischen Kultur im Vergleich zur statischen nochmals gesteigerte Produktion der Collagene. Deren hohe Expressionsraten sprechen im Grunde eher für eine anhaltend starke Proliferation und den exzessiven Aufbau extrazellulärer Matrix.

**Tab. 4.7:** Ergebnisse der RT-PCR einiger mit der osteoblastären Entwicklung assoziierter Genprodukte für Zellen, die im Z<sup>®</sup> RPD mit osteogenen Zusätzen kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis bezogen auf die Expression des internen Standards GAPDH.

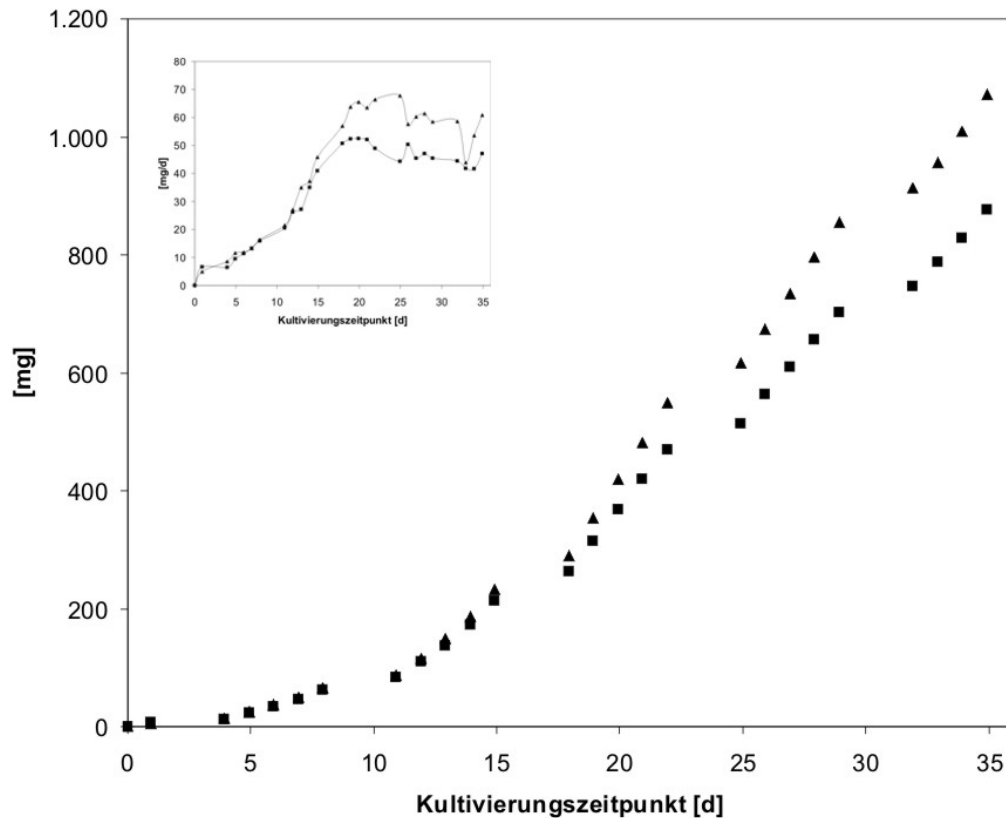
GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
1	4,06	2,65	0,7	0,55	1,64	0,31	0,47	0,86	0,55

Die hohe Expression von OPN kann sowohl der ersten als auch der zweiten Phase seiner biphasischen Expression geschuldet sein, was einen Zustand der Zellen in der Proliferations- oder der Mineralisierungsphase bedeutet. Aufgrund der Stärke der Expression ist aber eher von der zweiten Expressionsphase auszugehen, da es in der ersten Phase nur zu etwa 25 % der maximalen Expressionsrate kommt<sup>53</sup>. Die im Vergleich zur statischen Kultivierung gesteigerte Expression von OC wiederum spricht für das bereits eingetretene Erreichen der Mineralisierungsphase, da OC erst in dieser Phase der Knochenbildung begleitend exprimiert wird und als später Marker der osteogenen Differenzierung gilt<sup>3</sup>.

#### 4.2.2.3 Kultivierung mit Humanserum

Als weitere Vergleichskultivierung unter Standardbedingungen wurde nun das im Standardmedium enthaltene FCS durch Humanserum ersetzt (AlphaH). Dadurch sollte eine Annäherung an die natürlichen Bedingungen geschaffen werden. Tatsächlich bestätigte sich hier, was sich schon in der klassischen zweidimensionalen Zellkultivierung angedeutet hatte. Im Vergleich zur Kultivierung mit FCS vermehrten sich die Zellen bei Verwendung von Humanserum deutlich besser.

Dies wird anhand des Glukoseverbrauchs gleich zu Beginn der Kultivierung deutlich. Bereits nach zweiwöchiger Kultivierung war der kumulierte Glukoseverbrauch der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD doppelt so hoch wie in der statischen Kultivierung mit dem gleichen Medium (vgl. Abb. 4.33 und 4.22). Nach fünf Wochen erreichte sein kumuliertes Maximum 1.071,44 mg. In der hier durchgeführten Kultivierung lagen die Werte zur verbrauchten Glukose über den Werten des produzierten Laktats, wie es auch bei den statischen Kultivierungen der Fall war. Es wurden während der fünf Wochen kumuliert 876,24 mg Laktat gebildet.

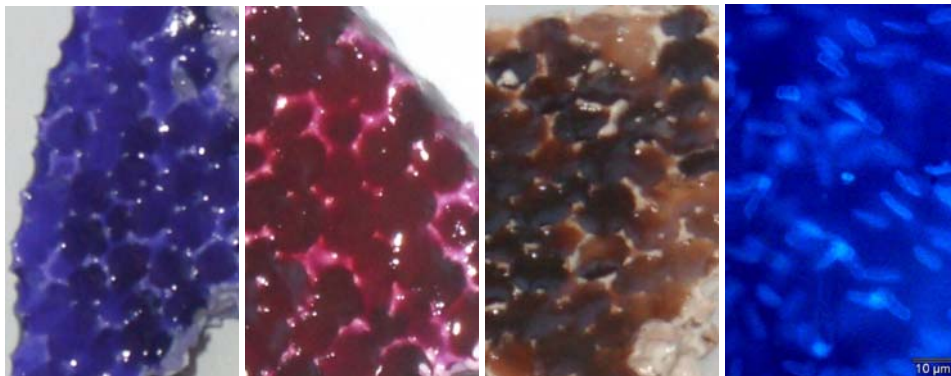


**Abb. 4.33:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit Humanserum. Dargestellt sind die kumulierten Werte sowie die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

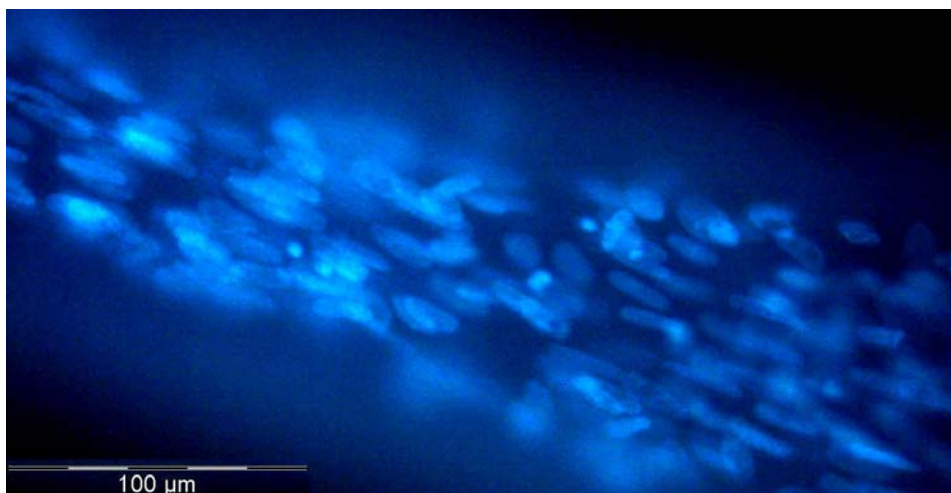
Allein durch den Wechsel von FCS zu Humanserum konnte demnach für die unter dynamischen Bedingungen im Drehbettreaktor kultivierten Zellen der Glukoseverbrauch, der als Maß für die Proliferation herangezogen wurde, um etwa 25 % gesteigert werden (von 867,53 auf 1.071,44 mg). Für die statisch kultivierten Zellen konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Auch nach dieser dynamischen Kultivierung mit Humanserum konnte schon durch die Übersichtsfärbungen eine zusammenhängende und hochdichte, gallertartige Struktur aus Zellen in ihrer selbst gebildeten extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.34). Rein optisch erscheint diese Schicht dicker als nach der zuvor beschriebenen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD. Jetzt sind die offenen Poren vollständig mit Zellen und Matrix angefüllt, so dass das Trägermaterial äußerlich fast plan zu sein scheint. Man kann kaum noch Vertiefungen in der Keramik erkennen. Die DAPI-Färbung bestätigt diesen Eindruck und zeigt deutlich, dass die als gallertartige Masse beschriebene Schicht, Zellen in

unzählbarer Menge enthält. Eine Fokussierung einzelner Zellen war dadurch nicht mehr zu erreichen. In Abb. 4.35 zeigt sich zudem, dass die Zellen offenbar gerichtet wuchsen und ihre Zellkerne dabei gestreckt erscheinen. Der Eindruck des gerichteten Zellwachstums wird auch durch die REM-Aufnahmen unterstützt (Abb. 4.36). Auch hier sind klar orientierte Strukturen auszumachen.



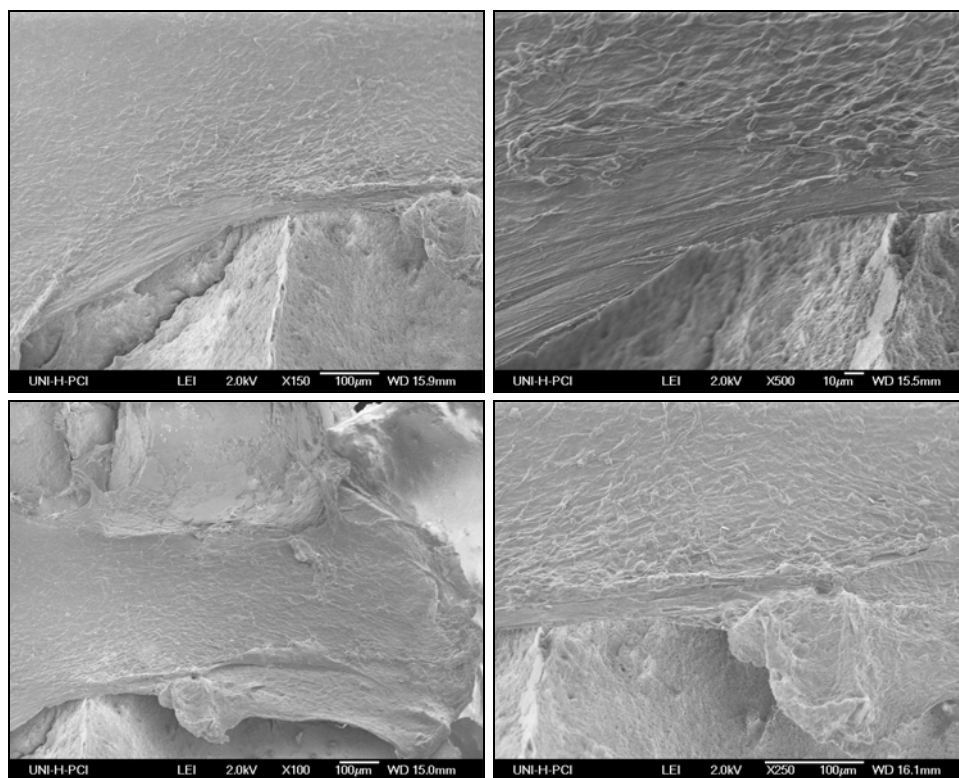
**Abb. 4.34:** Histologische Färbungen im Anschluss an die dreidimensionale Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit Humanserum; von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.



**Abb. 4.35:** DAPI-Färbung im Anschluss an die dynamische Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit Humanserum; die Zellen wachsen gerichtet und zeigen gestreckte Zellkerne.



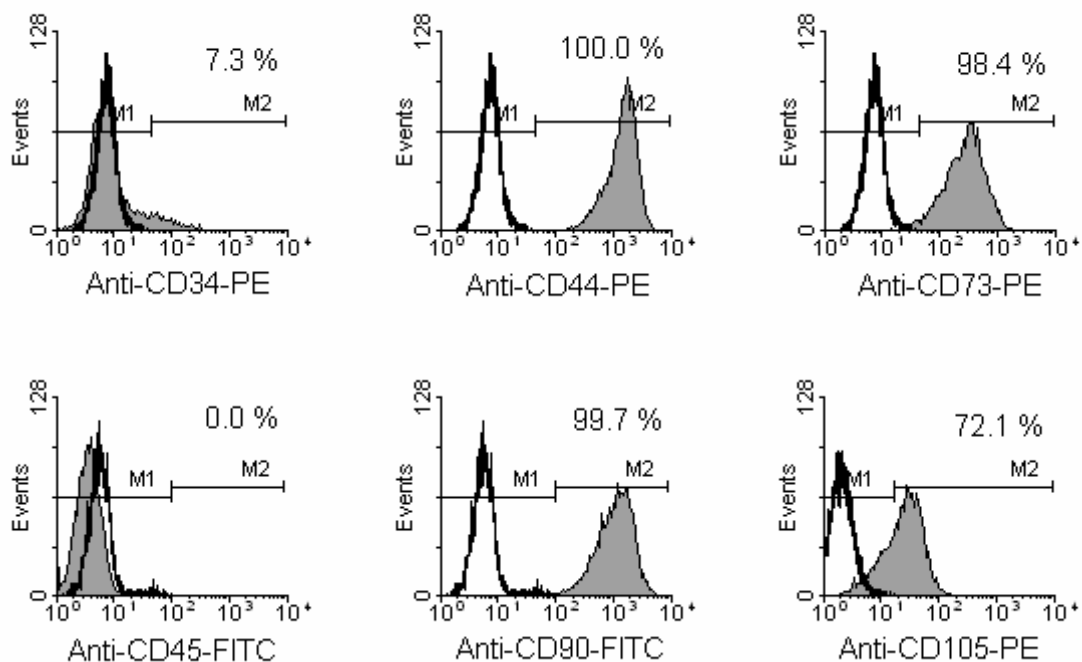
Doch nicht nur eine extrem hohe Zelldichte, sondern eine gleichermaßen extreme Mineralisierung der extrazellulären Matrix kann nach dieser Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD dargestellt werden. Sowohl die Alizarinrot- als auch die von Kossa-Färbung sind so intensiv, dass die Stücke der bewachsenen Keramikscheibe tiefrot bzw. tiefbraun gefärbt sind. Aufgrund dieser hohen Farbintensität kann man davon ausgehen, dass die unter der Zelloberfläche befindlichen Poren in der Keramik vollständig mit Zellen in ihrer extrazellulären Matrix bewachsen sind.



**Abb. 4.36:** REM-Aufnahmen im Anschluss an die Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen mit humanem Serum.

Die ermittelte Zellzahl von  $36,65 \times 10^6$  Zellen lag dann auch deutlich über den bisher erreichten Werten der vorangegangenen statischen und dynamischen Kultivierungen. Bezogen auf die zur Inokulation verwendete Zellzahl von fünf Millionen Zellen bedeutet dies eine Vermehrung um das 7,3-fache. Es darf dabei nicht vergessen werden, dass es sich um rein qualitative Werte handelt, so dass die tatsächlich erreichte Zellzahl wohl noch etwas höher liegen sollte. Nach der analogen statischen Kultur konnten nur  $8,32 \times 10^6$  Zellen gezählt werden. Im Vergleich liegt die Zellzahl hier also um das 4,5-fache höher.

Die dynamische Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit Humanserum ist die erste Kultivierung die Zellen hervorbringt, welche für den hämatopoetischen Marker CD34 positiv sind. Zwar betrifft dies nur verhältnismäßig geringe 7,3 % der Zellen, doch ist dies nicht ohne weiteres erklärbar. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 4.37 zusammengefasst. CD45 ist im Gegensatz zu CD34 weiterhin nicht detektierbar. CD44 und CD90 sind mit 100 bzw. 99,7 % positiver Zellen auf (annähernd) allen Oberflächen der analysierten Zellen vorhanden. CD73 wird auch nach dieser dynamischen Kultivierung auf einem vergleichsweise großen Anteil der Zellen gefunden (98,4 %). Ein ähnlich hoher Wert konnte nur für die Zellen aus der Kultivierung unter Standardbedingungen verzeichnet werden (83,7 %). Auch CD105 wird mit jetzt 72,1 % von deutlich mehr Zellen exprimiert als bei Verwendung von Standardmedium (44,7 % CD105-positive Zellen), weshalb man auf einen weniger differenzierten Phänotyp der Zellen schließen kann.



**Abb. 4.37:** Ergebnisse der Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie im Anschluss an die dynamische Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen mit Humanserum. schwarzer Graph: Isotypkontrolle; grauer Graph: spezifischer Antikörper. Angegeben ist der Prozentsatz positiver getesteter Zellen.

**Tab. 4.8:** Ergebnisse der RT-PCR einiger mit der osteoblastären Entwicklung assoziierter Genprodukte für Zellen, die im Z<sup>®</sup> RPD mit Humanserum kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils das Verhältnis bezogen auf die Expression des internen Standards GAPDH.

GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
1	2,71	1,86	0,46	0	0,25	0,18	0,75	0,57	0,61

Die Expressionsanalyse dieser mit AlphaH dynamisch kultivierten Zellen mit Hilfe der RT-PCR (Ergebnisse in Tab. 4.8) zeigt eine gegenüber dem internen Standard (GAPDH) deutlich erhöhte Expression der Collagene. Eine Expression von BSP2 kann, wie schon nach der analogen statischen Kultivierung, nicht nachgewiesen werden. Die Expression der weiteren untersuchten Genprodukte kann zwar detektiert werden, ist jedoch schwächer als die der GAPDH. Im Vergleich zur statischen, dreidimensionalen Kultivierung wird Col I etwas schwächer, Col III hingegen deutlich stärker exprimiert. Auch Runx2 wird jetzt verstärkt exprimiert, was möglicherweise die Expression weiterer detektierbarer Genprodukte zur Folge hat, da Runx2 als Transkriptionsfaktor an der Expression fast aller osteoblastärer Gene beteiligt ist<sup>20</sup>.

Verglichen mit der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit AlphaF ist die Expression von OPN deutlich herabreguliert, BMP-4, OC und AP scheinen leicht verstärkt exprimiert zu werden. Dies gilt auch für die Expression der untersuchten Collagene. Verglichen mit der statischen Kultivierung unter analogen Bedingungen, nach der weder die Expression von BSP2 noch von OPN oder den BMPs nachgewiesen werden konnte, werden die genannten Gene jetzt von den dynamisch kultivierten Zellen exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass, hervorgerufen durch die dynamischen Bedingungen im Bioreaktor, ein Teil der Zellen bereits in den Prozess der Matrixreifung eingetreten sein könnte. Wie schon an anderer Stelle vermutet, scheint die Verwendung von humanem Serum zu einer Verzögerung der Differenzierung und stattdessen zu einer gesteigerten Proliferation und einem verstärkten Matrixaufbau eines Großteils der Zellen führen.

Zusammenfassend scheinen die mit Humanserum kultivierten Zellen auch nach dreidimensionaler Kultivierung im Bioreaktor einen eher nativen Phänotyp zu besitzen, wenn man diese Ergebnisse mit denen der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen bzw. bei Verwendung osteogener Zusätze vergleicht.

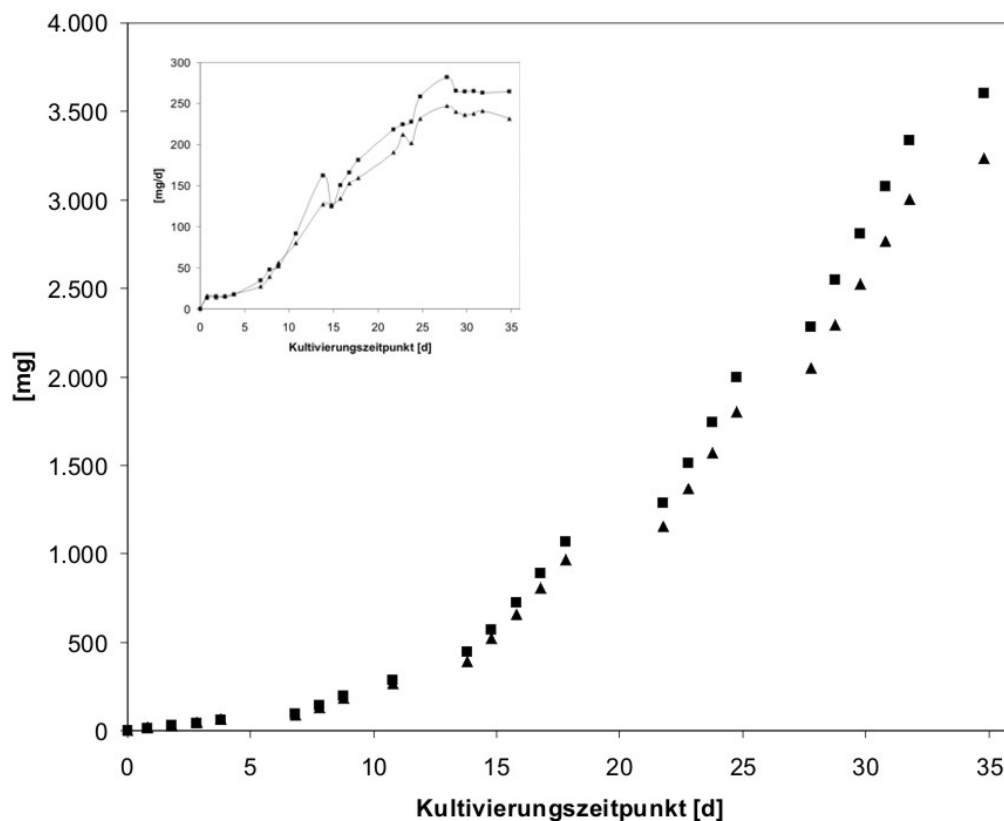
#### 4.2.2.4 Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen

Um wirklich hypoxische, also sauerstofflimitierte Bedingungen im Reaktor gewährleisten zu können, musste zunächst ein Ersatz für die bisher verwendeten Silikonschläuche gefunden werden, da diese nicht hinreichend gasdicht sind. Zu diesem Zweck wurden Schläuche aus Viton<sup>®</sup> eingesetzt, die aus Fluorkautschuk bestehen. Dadurch konnte der Sauerstoffgehalt im Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktor hinreichend limitiert werden.

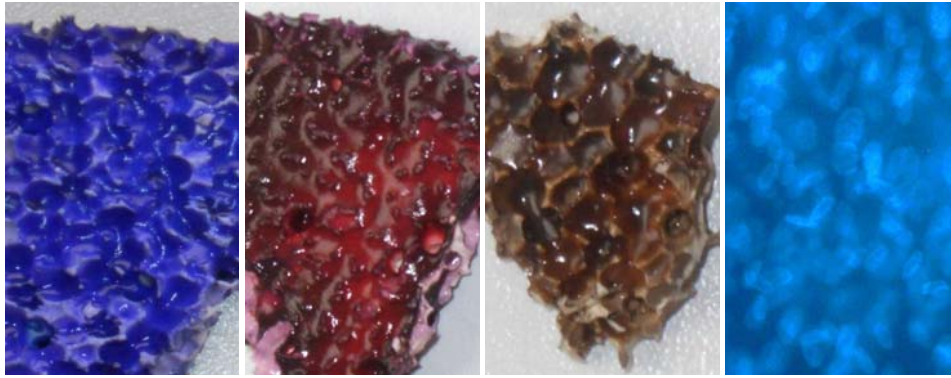
Da sich durch die Verwendung von Humanserum anstelle von FCS eine deutliche Steigerung der zellulären Proliferation erreichen ließ, wurde im Folgenden ein weiterer Ansatz zur besseren Nachbildung der *in vivo* Bedingungen der Zellen verfolgt. Dazu wurde in einer weiteren Kultivierung unter dynamischen Bedingungen wieder auf das AlphaF-Medium zurückgegriffen. Allerdings wurde nun der Sauerstoffgehalt im Bioreaktor reduziert. Dies wurde dadurch erreicht, dass die gleichmäßig zugeführte Luft durch Stickstoff ersetzt wurde. Kohlendioxid wurde auch bei dieser Kultivierung nur zugeführt, um den pH-Wert in den gesetzten Grenzen (7,0 bis 7,4) konstant zu halten. Der gemessene Sauerstoffpartialdruck schwankte zwischen zwei und neun Prozent, im Durchschnitt lag er bei vier Prozent. Dabei ist zu beachten, dass bei der Kalibrierung der Sauerstoffelektrode die Steilheit nicht in reinem Sauerstoff, sondern in wasserdampfgesättigter Luft bestimmt wird. Das bedeutet, dass die gemessenen Werte des Sauerstoffpartialdrucks, die hier als nominelle Werte bezeichnet werden, immer auf den prozentualen Sauerstoffgehalt der Luft (~21 %) zu beziehen sind. Demnach liegen die tatsächlichen Sauerstoffgehalte im Medium deutlich unter den nominell gemessenen. Einem nominell gemessenen pO<sub>2</sub> von fünf Prozent entspricht also ein absoluter Wert im Medium von etwa 1,05 %. Über den Verlauf der Kultivierung schwankte der absolute Sauerstoffgehalt demnach zwischen 0,42 und 1,89 Prozent und lag im Durchschnitt über die 35-tägige Kultivierung bei 0,84 %.

Wie sich zeigte hatte diese Maßnahme einen entscheidenden Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen, was sich in einem extrem gesteigerten Glukoseverbrauch ausdrückte. Am achten Tag der Kultivierung war der kumulierte Glukoseverbrauch bereits doppelt so hoch wie in der normoxischen Kultivierung mit AlphaH und gar dreimal so hoch wie in der Kultivierung unter Standardbedingungen. Der unter Standardbedingungen nach fünf Wochen erreichte (kumulierte) Glukoseverbrauch von 867,53 mg konnte in dieser sauerstofflimitierten Kultivierung bereits nach der halben

Kultivierungsdauer, genauer gesagt zwischen Tag 17 und Tag 18, erreicht werden. Am Ende der 35-tägigen Kultivierung konnte ein Gesamt-Glukoseverbrauch von 3.237,62 mg verzeichnet werden (Abb. 4.38). Dies bedeutet eine 3,7-fache Steigerung gegenüber der Kultivierung unter Standardbedingungen und eine 3-fache Steigerung gegenüber der Kultivierung mit AlphaH, die allein durch eine, zugegebenermaßen extreme, Limitierung des Sauerstoffgehaltes hervorgerufen wurde. Die Laktatproduktion verlief bei dieser hypoxischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD annähernd parallel zum Glukoseverbrauch und erreichte einen kumulierten Endwert von 3.603,70 mg. Aus technischen Gründen konnte keine statische Vergleichskultivierung durchgeführt werden, da eine durchgängig sauerstofflimitierte Kultivierung mit klassischen Inkubatoren und einer klassischen, sterilen Werkbank nicht möglich ist.



**Abb. 4.38:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter hypoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die kumulierten Werte und die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

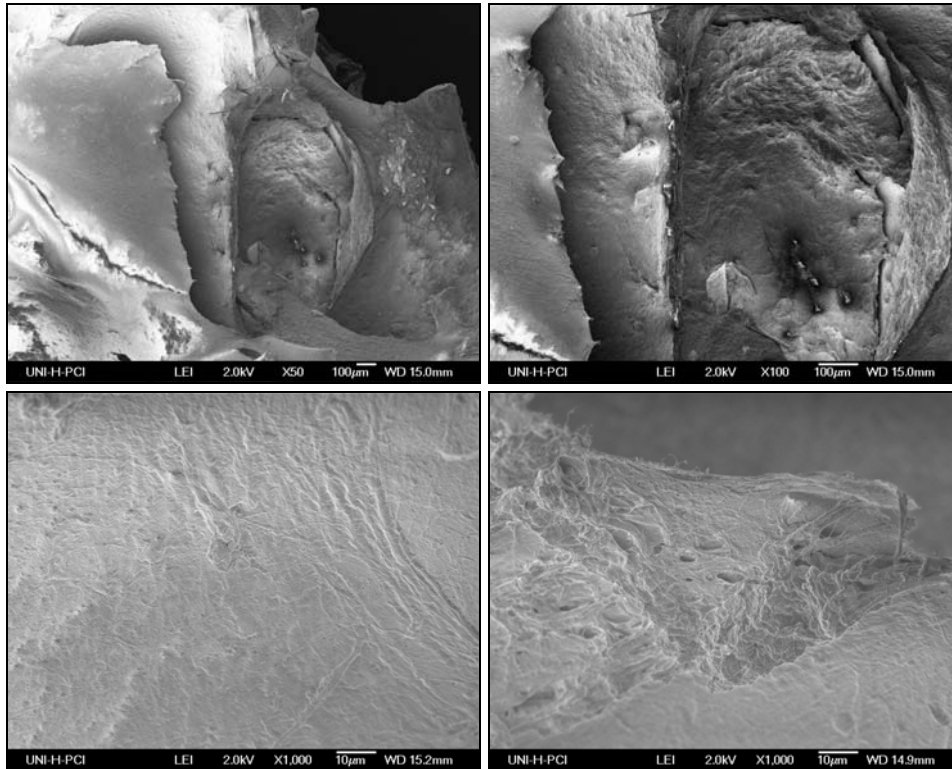


**Abb. 4.39:** Histologische Färbungen im Anschluss an die dreidimensionale Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter hypoxischen Bedingungen; von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.

Nach dieser Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktor konnte, wie in der vorangegangenen Kultivierung mit AlphaH, eine dichte und durchgehende, gewebeähnliche Zell-Matrix-Struktur auf dem Zellträger nachgewiesen werden. Die histologischen Färbungen sind in Abb. 4.39 wiedergegeben. Die Intensität der Übersichtsfärbung mit Toluidinblau erscheint tiefblau. Auch auf dem Bild de mit DAPI gefärbten Stücks kann eine immens hohe Dichte an intakten Zellkernen erkannt werden. Die Zellen scheinen sich in so vielen übereinander liegenden Schichten vermehrt zu haben, dass kaum ein einziger Zellkern fokussierbar war. Die erwähnten, gallertartigen Strukturen aus Zellen in ihrer extrazellulären Matrix lassen sich auch sehr deutlich an den Bildern der Färbungen zum Mineralisierungsnachweis erkennen (Alizarinrot, von Kossa). Zusätzlich zu der hohen Zell- und Matrixdichte kann demnach auch eine fortgeschrittene Mineralisierung der EZM nachgewiesen werden, wie durch die sehr hohe Farbintensität auf diesen Bildern zu sehen ist.

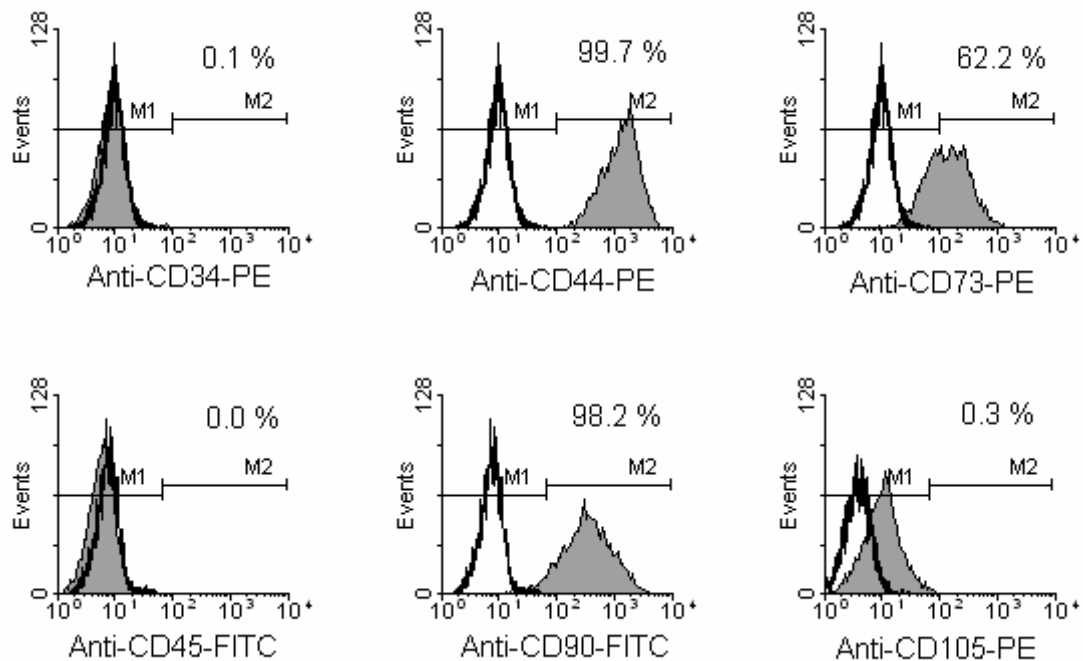
Ebenso wird durch die angefertigten REM-Aufnahmen (Abb. 4.40) der Eindruck eines exzessiven Matrixaufbaus unterstützt. Selbst tief in den Poren kann man kaum noch das keramische Trägermaterial erkennen.

Nach dieser hypoxischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD konnten trotz exzessiven Aufbaus extrazellulärer Matrix von einer keramischen Trägerscheibe, ähnlich wie nach der Kultivierung mit Humanserum, 37 Millionen Zellen gewonnen werden. Das entspricht einer 7,4-fachen Zellvermehrung bezogen auf die inokulierte Zellzahl von fünf Millionen. Gegenüber der dynamischen Kultivierung unter Standardbedingungen, bei der eine Zellzahl von  $15,85 \times 10^6$  ermittelt werden konnte, ist diese Zahl um das 2,3-fache gesteigert.



**Abb. 4.40:** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen, die nach der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD unter hypoxischen Bedingungen angefertigt wurden.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass der Einfluss der Hypoxie unter dynamischen Bedingungen scheinbar keinen besonders großen Einfluss auf die Differenzierung hat (Abb. 4.41). Ein vernachlässigbarer Anteil von 0,1 % der Zellen zeigte sich positiv für CD34. Der zweite hämatopoetische Marker (CD45) konnte nicht detektiert werden. Die Expression der Moleküle CD44 und CD90 ist nicht so stark herabreguliert wie für die Zellen aus den beiden Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD unter Standardbedingungen bzw. mit osteoinduktiven Zusätzen analysiert worden war. Für CD90 sind noch 98,2 und für CD44 gar noch 99,7 % der untersuchten Zellen positiv. CD73 wird jetzt von nur 62,2 % der Zellen exprimiert. Erstaunlicherweise kann der Marker CD105 jetzt kaum mehr detektiert werden (0,3 % positive Zellen). Aus diesem Grund muss man von einer begonnenen Differenzierung nahezu aller Zellen ausgehen.



**Abb. 4.41:** Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Analyse der Zellen nach der hypoxischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD. Schwarzer Graph: Isotypkontrolle; grauer, gefüllter Graph: spezifischer Antikörper.

Die im Z<sup>®</sup> RPD dynamisch unter hypoxischen Bedingungen kultivierten Zellen zeigen ebenfalls eine gegenüber der GAPDH (interner Standard) gesteigerte Expression der Collagene I und III, wie durch eine RT-PCR nachgewiesen werden konnte (Tab. 4.9). Auch im Vergleich zur analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit normaler Begasung (Luft) sind diese Expressionsraten noch erhöht. Gleichzeitig wird aber OPN weniger stark exprimiert. Dennoch liegt die Expression der BMPs und AP, von Runx2 und OC leicht über den für die normoxische Kultivierung ermittelten Werten. Das Expressionsprofil ist am ehesten mit dem der Zellen vergleichbar, die mit Humanserum kultiviert wurden. Im Vergleich werden aber OPN und BMP-2 jetzt verstärkt exprimiert.

**Tab. 4.9:** Ergebnisse der RT-PCR für Zellen, die im Z<sup>®</sup> RPD unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Dargestellt ist das Verhältnis der Expression bezogen auf den internen Standard.

GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
1	2,76	1,48	0,48	0	0,74	0,48	0,63	0,56	0,56



Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass sich die Zellen unmittelbar in einer Phase der Vermehrung und des Matrixaufbaus befinden. Die Tatsache, dass dennoch fast alle als osteogene Marker fungierenden Genprodukte zwar in geringer Menge, aber trotz allem detektiert werden können, kann bedeuten, dass ein kleiner Teil der Zellpopulation im zeitlichen Verlauf der Differenzierung weiter fortgeschritten ist, als der große Rest. Dieser Theorie folgend muss dieser Zellanteil hier größer sein als nach der Kultivierung mit Humanserum. Der Phänotyp der hier kultivierten Zellen scheint demnach nativer zu sein als nach der Kultivierung unter Standardbedingungen bzw. mit osteoinduktiven Zusätzen, gleichzeitig aber stärker osteogen differenziert als nach der Kultivierung mit Humanserum.

Durch die Kultivierung der Zellen in der dynamischen Umgebung eines Bioreaktors konnten die Glukoseverbrauchsdaten, die als Maß für die zelluläre Proliferation herangezogen wurden, zum Teil enorm gesteigert werden. Die größte Steigerung beim (kumulierten) Glukoseverbrauch zeigten dabei die mit AlphaH kultivierten Zellen. Sie zeigten in der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD einen mehr als dreifach gesteigerten Verbrauch gegenüber den statisch kultivierten Zellen. Die absolut höchsten Raten erzielten Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Während dieser dynamischen Kultivierung wurden gut 3,2 g Glukose umgesetzt. Für diese hypoxische Kultivierung fehlt allerdings die Vergleichsmöglichkeit zu einer statischen Kultur, da es technisch bedingt nicht möglich war für eine statische Kultivierung den Sauerstoffgehalt dauerhaft zu senken. Aber auch unter Standardbedingungen konnte durch die Kultivierung im Bioreaktor die Menge an verbrauchter Glukose verdoppelt werden. Einzig die Kultivierung mit osteoinduktiven Zusätzen machte unter dynamischen Bedingungen keinen großen Sprung bezüglich des Glukoseverbrauchs. Zwar konnte dieser gegenüber der statischen Kultivierung auch gesteigert werden, jedoch nur um etwa 30 %.

Ähnlich wie die Werte zum Glukoseverbrauch, änderten sich auch die Werte zum produzierten Laktat. Auffällig ist hierbei, dass, bis auf die Kultivierung mit Humanserum, die letzten Endes kumulierten Laktatwerte stets über den Glukoseverbrauchswerten liegen. Da Laktat nur durch anaerobe Stoffwechselprozesse bei der Energiegewinnung aus Glukose gebildet und akkumuliert wird, kann diese Tatsache nur bedeuten, dass zumindest ein Teil der Zellen in diesen dynamischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD nicht mehr hinreichend mit Sauerstoff versorgt werden konnte. Der Vermehrung der Zellen scheint dies allerdings keinen Abbruch getan zu haben. Interessanterweise hat sich das Verhältnis von produziertem Laktat zu verbrauchter Glukose durch hypoxische Bedingungen nicht

verschlechtert, obwohl man hier aufgrund der gewollten Sauerstofflimitierung von einer im Verhältnis erhöhten Laktatproduktion hätte ausgehen können.

Die histologischen Färbungen zeigen deutlich, dass es nur bei der Kultivierung mit Humanserum bzw. unter hypoxischen Bedingungen zu einem flächendeckenden, exzessiven Aufbau extrazellulärer Matrix gekommen ist (Abb. 4.34 und 4.39). Zwar zeigte sich auch unter Standardbedingungen und bei Verwendung osteoinduktiver Supplemente ein Matrixaufbau, doch war dieser bei weitem nicht so exzessiv und vor allem nicht flächendeckend. Diese Lückenhaftigkeit zeigt sich am deutlichsten bei der Kultivierung mit osteoinduktiven Zusätzen, da es hier offenbar Bereiche auf dem Trägermaterial gibt, die vollständig unbesiedelt blieben (Abb. 4.30). Dennoch ist der Nachweis der Matrixmineralisierung anhand der eingelagerten Calciumionen nach allen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD positiv. Aufgrund einer dichteren extrazellulären Matrix erscheint natürlich die Intensität der Alizarinrot- und von Kossa-Färbungen nach der hypoxischen Kultivierung sowie nach der Kultivierung mit Humanserum deutlich höher als nach den anderen beiden Kultivierungen (Abb. 4.26, 4.30, 4.34 und 4.39). Die angefertigten DAPI-Färbungen weisen anhand der fluoreszierenden Zellkerne einen dichten Bewuchs der Zellträger nach. Dabei war es nur nach der Kultivierung mit osteoinduktiven Zusätzen möglich, überhaupt noch einzelne Kerne zu fokussieren, da es hier nicht zum Aufbau einer gewebeähnlich dichten Zellschicht kam. Aufgrund der extrem hohen Dichte der Zellen nach den weiteren Kultivierungen, die sich dazu noch in vielen übereinander liegenden Schichten vermehrten, war die Fokussierung einzelner Zellen oder Zellebenen kaum noch möglich, was man in den Abbildungen (Abb. 4.26, 4.30, 4.34 und 4.39) gut erkennen kann.

Auch die ermittelten Zellzahlen lagen nach den Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD deutlich über denen, die nach den statischen Kultivierungen ermittelt werden konnten. Einzig die Kultivierung in OsteoF lieferte weniger Zellen als die vergleichbare statische Kultivierung, die Zellzahl lag sogar noch unter der Zahl anfänglich inokulierter Zellen.

Die Kultivierung unter Standardbedingungen erreichte eine 3,2-fache Zellvermehrung bezogen auf die inokulierte Zahl von fünf Millionen Zellen. Diese Steigerungsrate wurde mit einer Vermehrung um das 7,3-fache von der Kultivierung mit Humanserum noch weit übertroffen. Zwar gibt es zur hypoxischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD keine statische Vergleichsmöglichkeit, doch die nach dieser dynamischen Kultivierung ermittelte Zellzahl lag mit  $37 \times 10^6$  noch leicht über der Zahl, die nach der Kultivierung mit AlphaH ermittelt werden konnte ( $36,65 \times 10^6$  Zellen).

Die im Falle der Kultivierung mit osteoinduktiven Zusätzen sehr niedrige Zellzahl kann ursächlich eigentlich nur durch einen für die Zellen zu starken Differenzierungsdruck ausgelöst worden sein, durch den die Zellen von einer anfänglichen hochproliferativen Phase abgehalten wurden und vielmehr direkt in die Differenzierung gezwungen wurden. Denn im Bioreaktor waren die Zellen gegenüber der statischen Kultivierung einem weiteren, möglicherweise differenzierenden, Einfluss in Form der dynamischen Bedingungen ausgesetzt. Zusätzlich darf man nicht außer Acht lassen, dass sich die Zellablösung bzw. die nachträgliche Vereinzelnung der Zellen nach der dynamischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit osteoinduktiven Supplementen etwas schwieriger gestaltete, da sich die Zellen nur in Form relativ großer Zell-Matrix-Aggregate ablösten und schlecht zu vereinzeln waren.

Die Durchflusszytometrie, mit der die kultivierten Zellen hinsichtlich bestimmter antigener Oberflächenmoleküle untersucht wurden, wies nach, dass die verwendeten Zellen nicht entlang der hämatopoetischen Linie differenzierten, da die zellulären Markermoleküle CD34 und CD45, die als typische Oberflächenmarker der hämatopoetischen Linie gelten, nicht exprimiert wurden. Allein die Analyse der Zellen im Anschluss an die dynamische Kultivierung mit Humanserum wies CD34 auf 7,3 % der Zellen nach. Anders verhält es sich mit den Markermoleküle CD90 und CD44. Beide werden offenbar in ihrer Expression aufgrund der jeweiligen Kultivierungsbedingungen stark reguliert. So wird CD90 am stärksten von Zellen exprimiert, die mit Humanserum kultiviert wurden (99,7 %) und wird von Zellen, die mit osteoinduktiven Supplementen kultiviert wurden auf der geringsten Anzahl der Zelloberflächen präsentiert (40,7 %), was einen im Verhältnis stärker in die osteogene Richtung differenzierten Phänotyp vermuten lässt.

Auch CD44 wird verstärkt von den mit Humanserum kultivierten Zellen exprimiert (100 %). Seine Expression nimmt auf Zellen, die hypoxisch (99,7 %), unter Standardbedingungen (97,2 %) und mit osteogenen Zusätzen (79,9 %) kultiviert wurden, immer weiter ab. Ebenso variabel wird CD73 auf den Zelloberflächen präsentiert. Die stärkste Expression zeigt sich dabei wieder auf Zellen, die mit Humanserum kultiviert wurden (98,4 %). Weniger Zellen sind nach der Kultivierung unter Standardbedingungen (83,7 %) und unter hypoxischen Bedingungen (62,2 %) noch positiv für dieses Markermolekül. Deutlich am wenigsten präsentieren Zellen, die unter Zugabe osteoinduktiver Supplemente kultiviert wurden, dieses Oberflächenantigen (23,5 %). Das zelluläre Markermolekül CD105, dessen relativer Verlust in der Expression mit multiplen Differenzierungswegen in Verbindung gebracht wird, wird ebenso am stärksten von den

mit Humanserum kultivierten Zellen exprimiert (72,1 %), gefolgt von Zellen der gleichen Kultivierung mit FCS (44,7 %). Hypoxisch kultivierte hUCs präsentieren dieses Antigen in verschwindend geringer Menge auf ihren Zelloberflächen (0,3 %).

Durch die Verwendung von Humanserum scheinen also CD73 und CD105 vermehrt exprimiert zu werden, ebenso CD44 und CD90. Möglicherweise werden die Zellen durch das Humanserum also in einem weniger differenzierten und so nativeren Zustand gehalten.

Die Analyse der Genexpression einiger für die zelluläre Differenzierung zu reifen Osteoblasten wichtigen Gene mit Hilfe einer RT-PCR zeigte für Zellen unter allen Kultivierungsbedingungen eine gegenüber dem internen Standard GAPDH gesteigerte Expression der Gene für die Collagene des Typs I und III. Am deutlichsten zeigt sich dies unter osteogen differenzierenden Bedingungen, also bei der Kultivierung, die mit osteoinduktiven Zusätzen arbeitete. Zumindest die starke Expression des Col I-Gens deutet dabei auf eine hochproliferative Phase in der Zellentwicklung hin. Allerdings wird dieses Gen im weiteren Verlauf der osteogenen Differenzierung auch weiterhin exprimiert<sup>52, 64</sup>. Das OPN-Gen wird von den unter Standardbedingungen bzw. mit osteoinduktiven Supplementen kultivierten Zellen gegenüber dem internen Standard verstärkt exprimiert. Für Zellen der beiden weiteren Kultivierungen hingegen (mit Humanserum bzw. bei Hypoxie) zeigt sich eine nur schwache Expression. Auch die Osteopontinexpression wird bereits während der proliferativen Phase der Zellen induziert. Postproliferativ wird seine Expression kurzzeitig gesenkt, um in der sich anschließenden Mineralisierungsphase erneut verstärkt induziert zu werden und zwar vermutlich bevor die Gene für BSP2 und OC exprimiert werden<sup>52</sup>. Die Expression des BSP2-Gens hingegen konnte weder für die Kultivierung mit Humanserum noch unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Von Zellen aus den anderen Kultivierungen wurde es immerhin exprimiert, wenn auch nur schwach.

Die Expression der weiteren untersuchten Gene konnte zwar für alle Zellpopulationen nachgewiesen werden, allerdings in geringerem Ausmaß gegenüber dem internen Standard. Im Verhältnis zur GAPDH liegen die Expressionsraten dieser Gene zwischen 0,18 und 0,86. Das OC-Gen beispielsweise wird von den Zellen, die mit OsteoF kultiviert wurden, noch am stärksten exprimiert. Seine Expression ist bei Zellen dieser Kultivierung zwar gegenüber der GAPDH abgesenkt, im Verhältnis zu den unter anderen Bedingungen kultivierten Zellen aber fast doppelt so hoch. Die Expression von OC wird erst in der Mineralisierungsphase der Knochenbildung induziert<sup>3, 53, 66</sup>.

Zellen aus der genannten Kultivierung mit OsteoF zeigen auch die stärkste Expression des Runx2-Gens. Da Runx2 als Transkriptionsfaktor an der Regulation vieler knochenspezifischer Gene beteiligt ist, wird er schon früh während der osteoblastären Entwicklung exprimiert<sup>20</sup>.

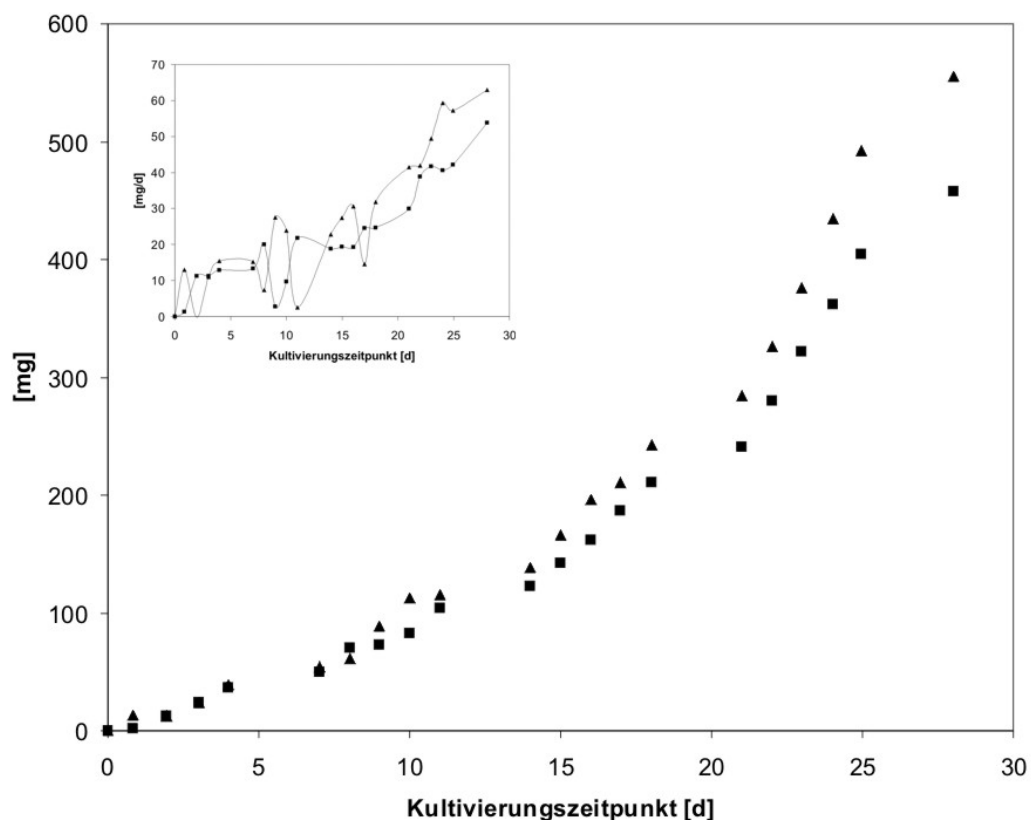
Aufgrund der Tatsache, dass der Level der Expression des AP-Gens bei Zellen aller Kultivierung nicht besonders hoch ist, die histologischen Färbungen aber deutlich eine Mineralisierung der extrazellulären Matrix nachweisen, kommt man zu der Annahme, dass seine Expression bereits wieder gesenkt wurde, da sie im Verlauf der Differenzierung zunächst ansteigt und erst wieder abgesenkt wird, wenn die Matrixmineralisierung fortgeschritten ist<sup>3,53</sup>. Da es sich bei diesen Analysen um sogenannte Endpunktanalysen handelt, ist eine genaue Einordnung in die zeitliche Abfolge der osteoblastären Zellentwicklung schwierig. Des Weiteren sollte man nicht außer Acht lassen, dass eine (RT-) PCR-Analyse immer eine gesamte Zellpopulation betrachtet, in der sich die einzelnen Zellen in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung befinden können.

### 4.2.3 Dynamische Zellkultivierung im Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor

Zusätzlich zu den Kultivierungen im Einwegbioreaktor Z<sup>®</sup> RPD wurden Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen sowie unter hypoxischen Bedingungen mit unterschiedlichen Sauerstoffgehalten durchgeführt. Aufgrund der Erfahrungen im Einwegsystem wurde keine Kultivierung mit osteoinduktiven Supplementen durchgeführt. Auch wurde keine Kultivierung mit Humanserum unter Standardbedingungen durchgeführt. Obwohl der äußere Parameter der Kultivierungsdauer gegenüber den Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD verändert wurde, wurden dieselben statischen Kultivierungen zum Vergleich herangezogen. Der pH-Wert wurde über den Zustrom von Kohlendioxid flexibel geregelt und so im physiologischen Bereich von 7,0 bis 7,4 konstant gehalten. Die Rotation des Reaktorbettes wurde, wie auch bei den Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RPD, auf 1 rpm eingestellt. Aufgrund der jetzt größeren Medienmenge von etwa 250 mL (bei halber Füllhöhe) im Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor wurde die Zirkulationsrate auf etwa 30 mL/min gesteigert, um weiterhin eine hinreichende Durchmischung des Mediums gewährleisten zu können.

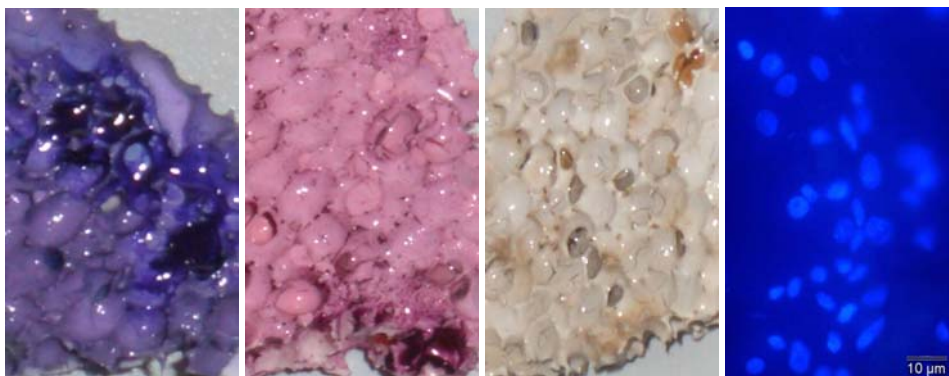
#### 4.2.3.1 Kultivierung unter Standardbedingungen

In dieser Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor konnte nach 28 Tagen ein kumulierter Glukoseverbrauch von 555,32 mg ermittelt werden, wie die Abbildung 4.42 verdeutlicht. Der maximale tägliche Verbrauch von 63 mg wurde am letzten Tag der Kultivierung erreicht. In der täglichen Bilanz gab es nur selten große Abweichungen zum Vortageswert (kleines Diagramm in Abb. 4.42). Der Gesamtverbrauch entspricht ungefähr dem der analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD (vgl. Abschnitt 4.2.2.1). Zwar dauerte die Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD eine Woche länger an, doch konnte bis Tag 28 der Kultivierung ein kumulierter Glukoseverbrauch von 568,25 mg festgestellt werden, was in etwa den hier erreichten 555,32 mg entspricht. Man sollte aber auch festhalten, dass die Produktionsraten vom Laktat in dieser Kultivierung hinter den Glukoseverbrauchsrate zurückbleiben.

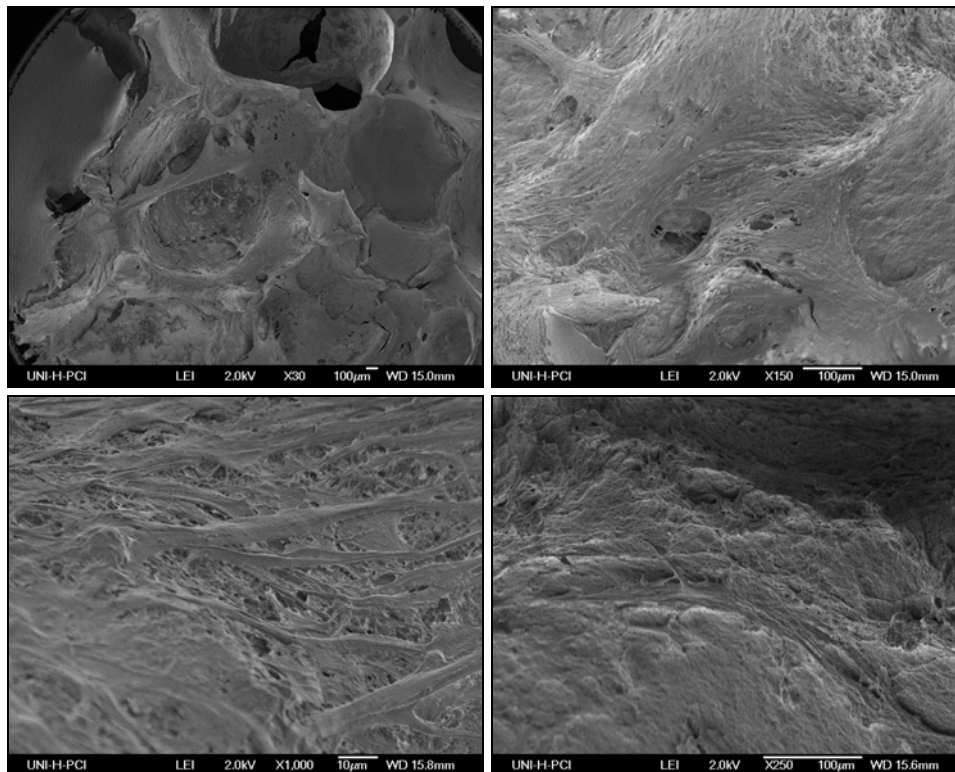


**Abb. 4.42:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) bei der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen. Dargestellt sind die kumulierten Werte und die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

Ogleich sowohl die mittleren täglichen, als auch die kumulierten Glukoseverbrauchs- und Laktatproduktionsraten dieser Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP annähernd mit denen der analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD vergleichbar sind, geben die Ergebnisse der histologischen Färbungen im Vergleich dazu ein ganz anderes Bild ab. Die Färbungen, die einen ersten Eindruck über die Zelldichte und Zellverteilung auf dem Trägermaterial geben sollen, zeigen sehr genau, dass der keramische Träger kaum mit Zellen bewachsen ist (siehe Abb. 4.43). Dieser Eindruck wird auch durch die REM-Aufnahmen bestätigt (Abb. 4.44). zwar finden sich Bereiche mit sehr dichten Zell-Matrix-Strukturen, der größere Bereich des Zellträgers zeigt hingegen eine äußerst schwache Besiedlung. Der schwache zelluläre Bewuchs ist besonders deutlich anhand der fluoreszierenden Zellkerne der DAPI-Färbung zu erkennen. Man sieht, dass diese sich nur äußerst spärlich über den Zellträger verteilen. Natürlich kann man die geringe Zelldichte auch an den Bildern zur Alizarinrot- und von Kossa-Färbungen ablesen. Auch sind die histologischen Färbungen nicht nur im Vergleich zu der analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD, sondern auch im Vergleich zur statischen Kultivierung auffallend weniger intensiv. Dennoch zeigen die wenigen Bereiche des Zellträgers, die dicht mit Zellen bewachsen sind, einen klaren Trend zur Mineralisierung der sie umgebenden extrazellulären Matrix.



**Abb. 4.43:** Histologische Färbungen im Anschluss an die dreidimensionale Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen; von links: Toluidinblau-, Alizarinrot-, von Kossa- und DAPI-Färbung.



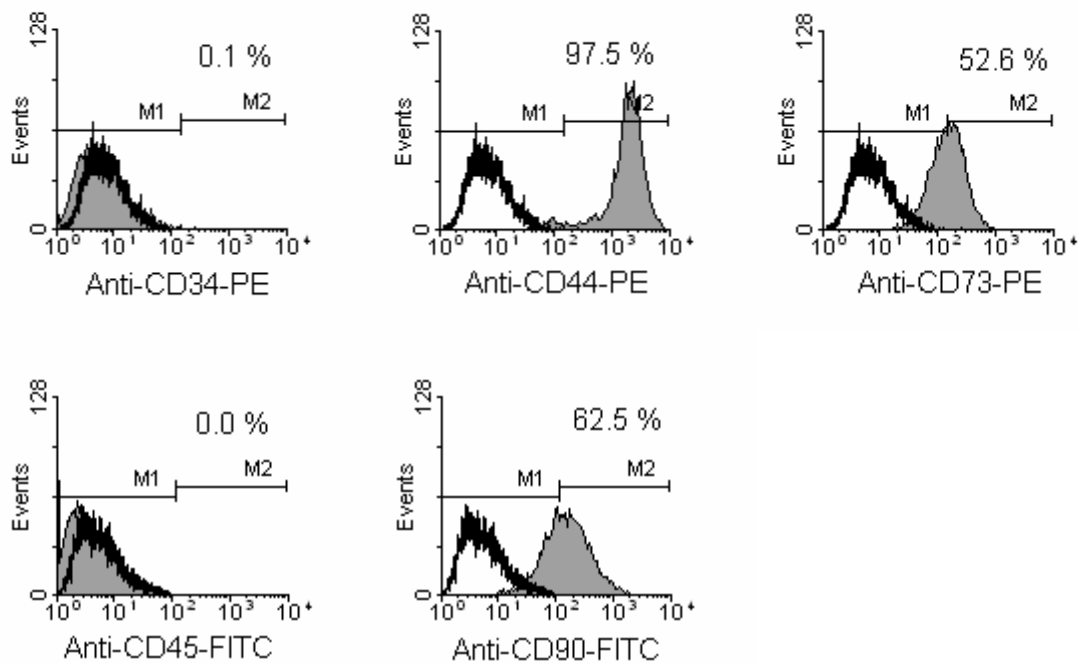
**Abb. 4.44:** REM-Aufnahmen von der besiedelten Trägerkeramik im Anschluss an die Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen.

Auch wenn die täglich gemessenen Glukose- und Laktatwerte dies nicht vermuten ließen, so kann man doch anhand der histologischen Färbungen feststellen, dass die Zellträger nach beendeter Kultivierung wesentlich schwächer mit Zellen besiedelt waren, als während der Kultivierung vermutet worden war. Die Zellausbeute war dann auch mit nur  $4,4 \times 10^6$  gezählten Zellen merklich schlechter. Diese Zahl lag damit noch unter der zur Inokulation verwendeten Zellzahl von fünf Millionen. Eine absolute Zellvermehrung kann also während dieser Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP nicht stattgefunden haben.

Die mittels Durchflusszytometrie zum Nachweis eines hämatopoetischen Phänotyps verwendeten Oberflächenantigene CD34 und CD45 können auch nach dieser Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.45). CD90, als wichtiges Markermolekül für die Bestimmung des zellulären Differenzierungszustands entlang der osteogenen Linie, kann nach dieser Kultivierung auf nur 62,5 % der Zellen nachgewiesen werden. Demnach sollten diese Zellen, im Vergleich zu Zellen aus den anderen statischen und dynamischen Kultivierungen, am weitesten fortgeschritten sein auf dem Weg zum reifen Osteoblasten. Der hier ermittelte prozentuale Wert liegt noch klar unter dem für Zellen aus der analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD festgestellten Wert (86,5 %).



Auch CD73 wird jetzt mit 52,6 % von weniger Zellen exprimiert als nach der analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD, nach der noch 83,7 % der Zellen CD73-positiv waren. Im Anschluss an die analoge statische Kultivierung konnten, ähnlich wie hier, nur 59,4 % CD73-positive Zellen detektiert werden. Anders verhält es sich mit dem CD44-Antigen. Dieses wird jetzt von 97,5 % der Zellen auf ihren Oberflächen präsentiert. Nach der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD taten dies vergleichbare 97,2 % der Zellen. Die statische Kultivierung hingegen lieferte Zellen, die zu 99,6 % positiv für CD44 waren.



**Abb. 4.45:** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der hUCs nach vierwöchiger Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP unter Standardbedingungen. Die Zahlen geben den Prozentsatz positiver Zellen an.

Scheinbar übt also der Z<sup>®</sup> RP im Vergleich zum Z<sup>®</sup> RPD einen stärkeren Differenzierungsdruck auf die Zellen aus. Dies kann möglicherweise durch erhöhte Flüssigkeitsströmungen über die besiedelten Zellträger erklärt werden, da die Fütterungsrate aufgrund des hohen Glukoseverbrauchs erhöht wurde. Auch die Zirkulationsrate wurde gesteigert, um der Volumenvergrößerung Rechnung zu tragen. Durch beide Parameter wird dabei der Flüssigkeitsstrom über die Konstrukte erhöht.

Aufgrund der sehr niedrigen Zellausbeute im Anschluss an diese Kultivierung war es nicht möglich eine RNA-Extraktion mit anschließender RT-PCR durchzuführen.

#### 4.2.3.2 Kultivierungen unter hypoxischen Bedingungen

Im Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor wurden mehrere Kultivierungen unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt, wobei unterschiedlich starke Sauerstofflimitierungen angewendet wurden. Bei den ersten beiden Kultivierungen schwankten die gemessenen Sauerstoffgehalte noch in relativ großen Grenzen (Tab. 4.10, A und B). Für die darauf folgenden hypoxischen Kultivierungen waren die gemessenen Sauerstoffwerte deutlich stabiler (Tab. 4.10, C und D). Eine Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP wurde zwar mit der mehr als doppelten Zellzahl inokuliert, gleichzeitig wurde bei dieser Kultivierung aber auch die doppelte Anzahl Zellträger eingesetzt, so dass sich die anfangs erhöhte Zellzahl beinahe vollständig relativiert (Tab. 4.10, A). Dies gilt natürlich nur bezüglich der durchgeführten Endpunktanalysen, nicht jedoch bezogen auf die täglichen und kumulierten Glukoseverbrauchsraten. In der folgenden Tabelle sind die Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP unter hypoxischen Bedingungen mit ihren leicht variierten äußeren Parameter angegeben. In allen Fällen wurde zur Kultivierung das Standardmedium AlphaF verwendet.

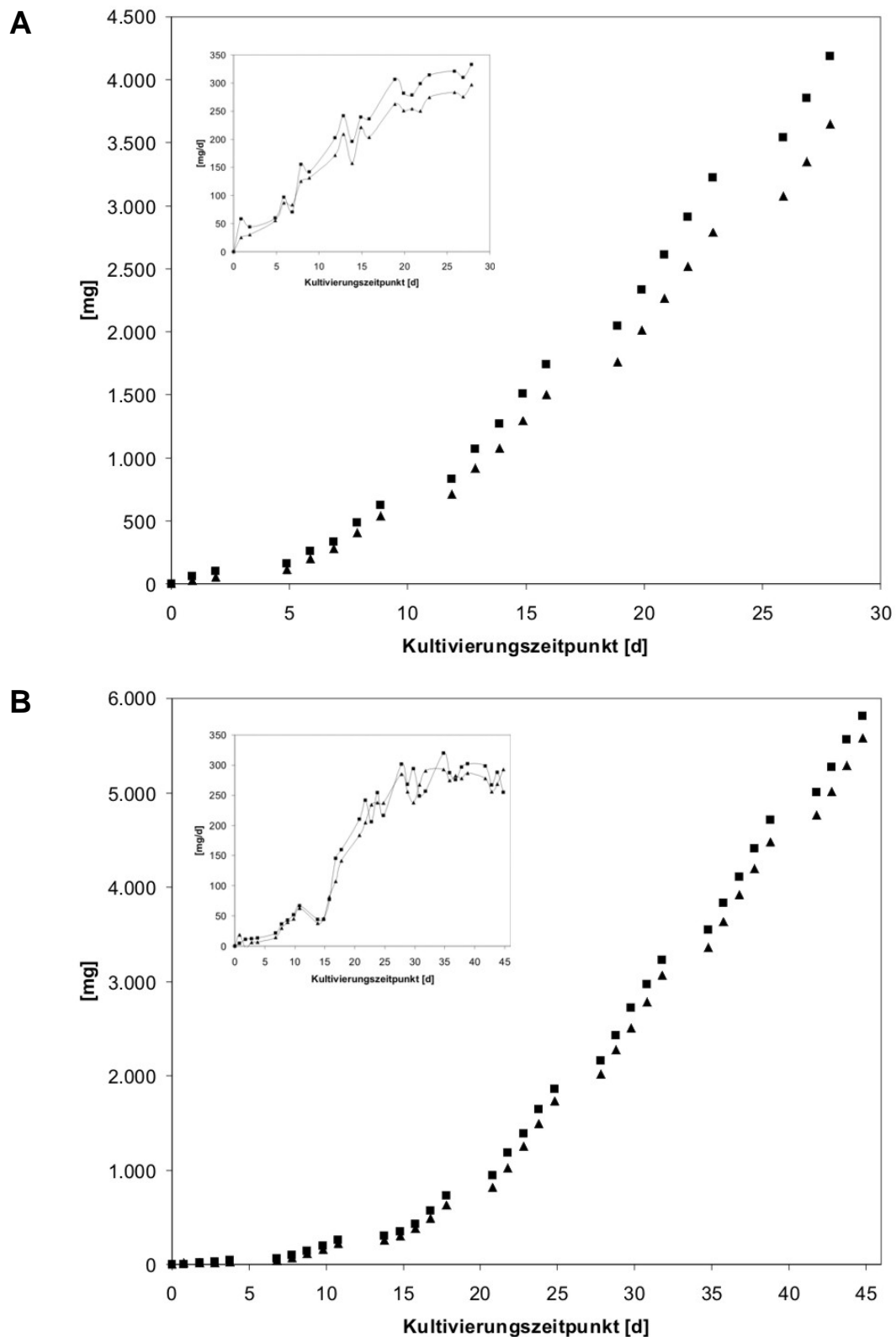
Wie schon bei der hypoxischen Kultivierung im Einwegbioreaktor beziehen sich die hier angegebenen prozentualen Sauerstoffgehalte immer auf den Anteil des Luftsauerstoffs von ungefähr 21 %. So entspricht ein nomineller Wert (Sauerstoffpartialdruck) von 10 % einem tatsächlichen Sauerstoffgehalt von nur 2,1 %, da die Kalibrierung der verwendeten Sauerstoffelektrode nicht in reinem Sauerstoff, sondern in wasserdampfgesättigter Luft stattfindet. Die absoluten Sauerstoffgehalte werden daher im Folgenden zusätzlich in Klammern angegeben.

**Tab. 4.10:** Äußere Parameter der Z<sup>®</sup> RP-Kultivierungen unter hypoxischen Bedingungen.

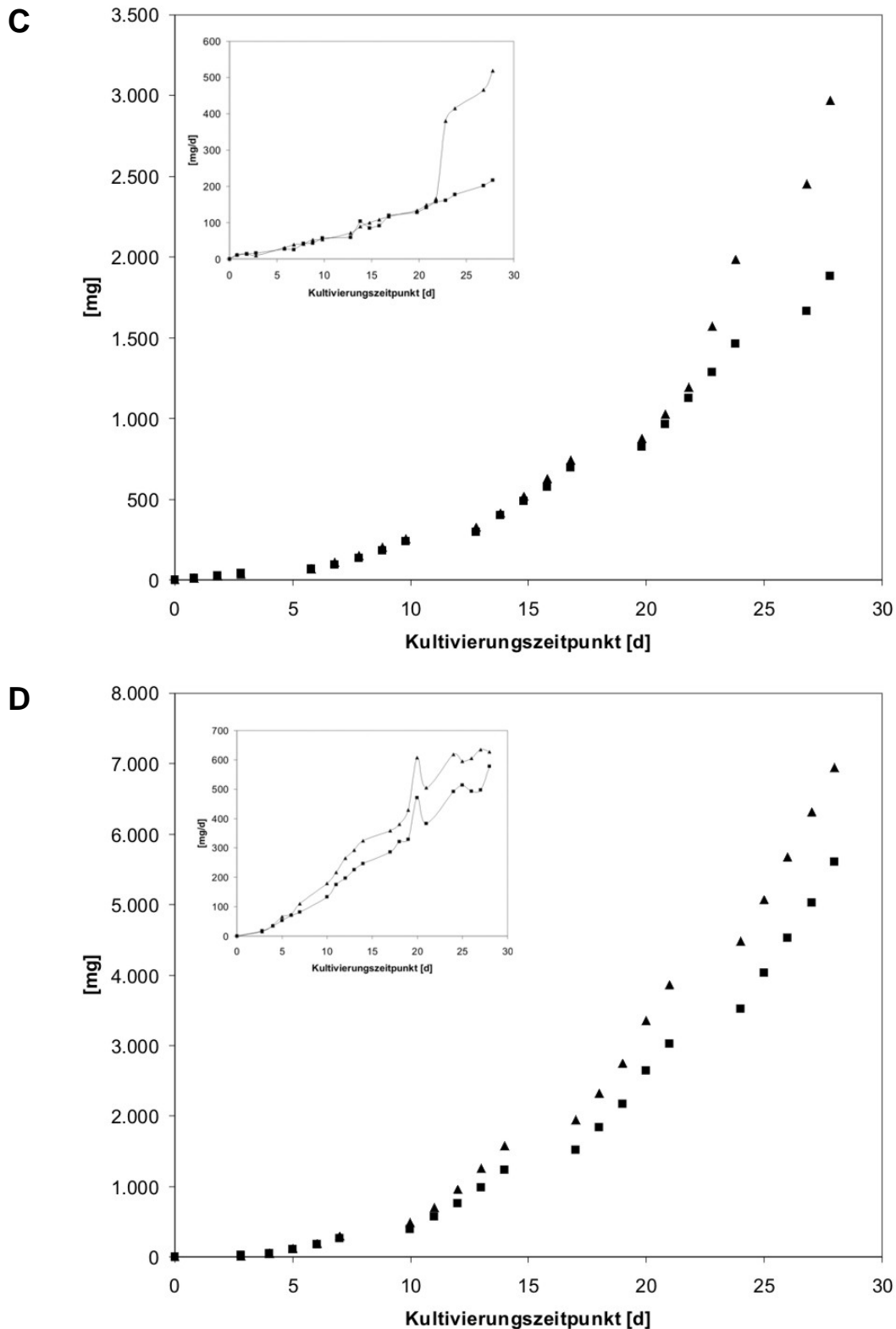
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
Anzahl inokulierter Zellen pro Trägerscheibe [ $\cdot 10^6$ ]	5,875	5	5	5
Kultivierungsdauer [Tage]	28	45	28	28
nomineller O <sub>2</sub> -Gehalt, pO <sub>2</sub> (Schwankungsbreite) [%]	Ø 11 (2-20)	Ø 42 (30-51)	Ø 2,6 (2,1-3,5)	Ø 4,7 (2,0-6,6)
absoluter O <sub>2</sub> -Gehalt (Schwankungsbreite) [%]	Ø 2,31 (0,42-4,2)	Ø 8,82 (6,3-10,71)	Ø 0,55 (0,44-0,74)	Ø 0,99 (0,42-1,39)

Die Daten zum Glukoseverbrauch und zur Produktion von Laktat für die hypoxischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor sind in den folgenden beiden Abbildungen 4.45 und 4.46 graphisch dargestellt. Die erste Kultivierung unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 4.46, A) lieferte einen Gesamt-Glukoseverbrauch von 3.650,23 mg. Der tägliche Maximalwert lag bei 297,25 mg und wurde am letzten Tag erreicht. Dabei sollte man allerdings nicht vergessen, dass diese Kultivierung mit mehr als doppelt so vielen Zellen inokuliert wurde und daher die Werte zum Glukoseverbrauch und zur Laktatproduktion deutlich über denen anderer Kultivierungen liegen sollten. Die Werte sind also nur eingeschränkt für Vergleichszwecke zu verwenden. Der im Medium gemessene pO<sub>2</sub> lag im Durchschnitt bei 11 % (2,31 %) und schwankte dabei zwischen 2 und 20 % (0,42 - 4,2 %). Ähnliches gilt für die folgende Kultivierung (Tab. 4.10, B). Diese wurde zwar wieder mit 5 Millionen Zellen pro Keramikscheibe inokuliert, doch wurde hier die Kultivierungsdauer auf 45 Tage ausgedehnt. So sind die Daten dieser Kultivierung ebenfalls nur bedingt für Vergleichszwecke verwendbar. Nichtsdestotrotz konnte bei dieser Kultivierung ein kumulierter Glukoseverbrauch von 5.578,55 mg erreicht werden (Abb. 4.46, B). Bis Tag 28 kumulierte sich der Glukoseverbrauch immerhin auf 2.016,77 mg. Der maximale tägliche Verbrauchswert lag über die 45 Tage bei 293,01 mg bzw. bei 284,89 mg wenn man nur die ersten 28 Tage der Kultivierung betrachtet. Der Sauerstoffpartialdruck wurde bei etwa 42 % gehalten (8,82 %), schwankte aber dennoch zwischen 30 und 51 % (6,3 - 10,71 %).

Die folgenden beiden dynamischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP unter hypoxischen Bedingungen (Tab. 4.10, C und D) wurden mit je 5 Millionen Zellen pro Trägerscheibe inokuliert und für 28 Tage aufrechterhalten. Der pO<sub>2</sub> im Reaktormedium konnte konstanter gehalten werden und lag bei durchschnittlichen 2,6 % (0,55 %), mit Schwankungen von 2,1 bis 3,5 % (0,44 – 0,74 %) bzw. bei 4,7 % (0,99 %), mit Werten zwischen 2 und 6,6 % (0,42 – 1,39 %). Dennoch wichen sowohl der Glukoseverbrauch als auch die Laktatproduktion stark voneinander ab. Die Kultivierung mit durchschnittlichen 2,6 % (0,55 %) Sauerstoff resultierte in einem kumulierten Glukoseverbrauch von 2.971,07 mg (Abb. 4.47, C), wohingegen die Zellen in der Kultivierung mit durchschnittlichen 4,7 % (0,99 %) Sauerstoff ganze 6.943,97 mg Glukose im Verlauf der 28 Tage verbrauchten (Abb. 4.47, D). Der tägliche Verbrauch stieg in dieser letzten Kultivierung zu einem deutlich früheren Zeitpunkt kontinuierlich an als in der vorherigen Kultivierung (Abb. 4.47, C).



**Abb. 4.46:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) für zwei der unter hypoxischen Bedingungen durchgeführten Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP; **A:** mit einem durchschnittlichen Sauerstoffgehalt von 11 % (2,31 %); **B:** mit einem durchschnittlichen Sauerstoffgehalt von 42 % (8,82 %). Das große Diagramm zeigt die kumulierten Werte, im kleinen Diagramm sind die mittleren Werte pro Tag dargestellt.

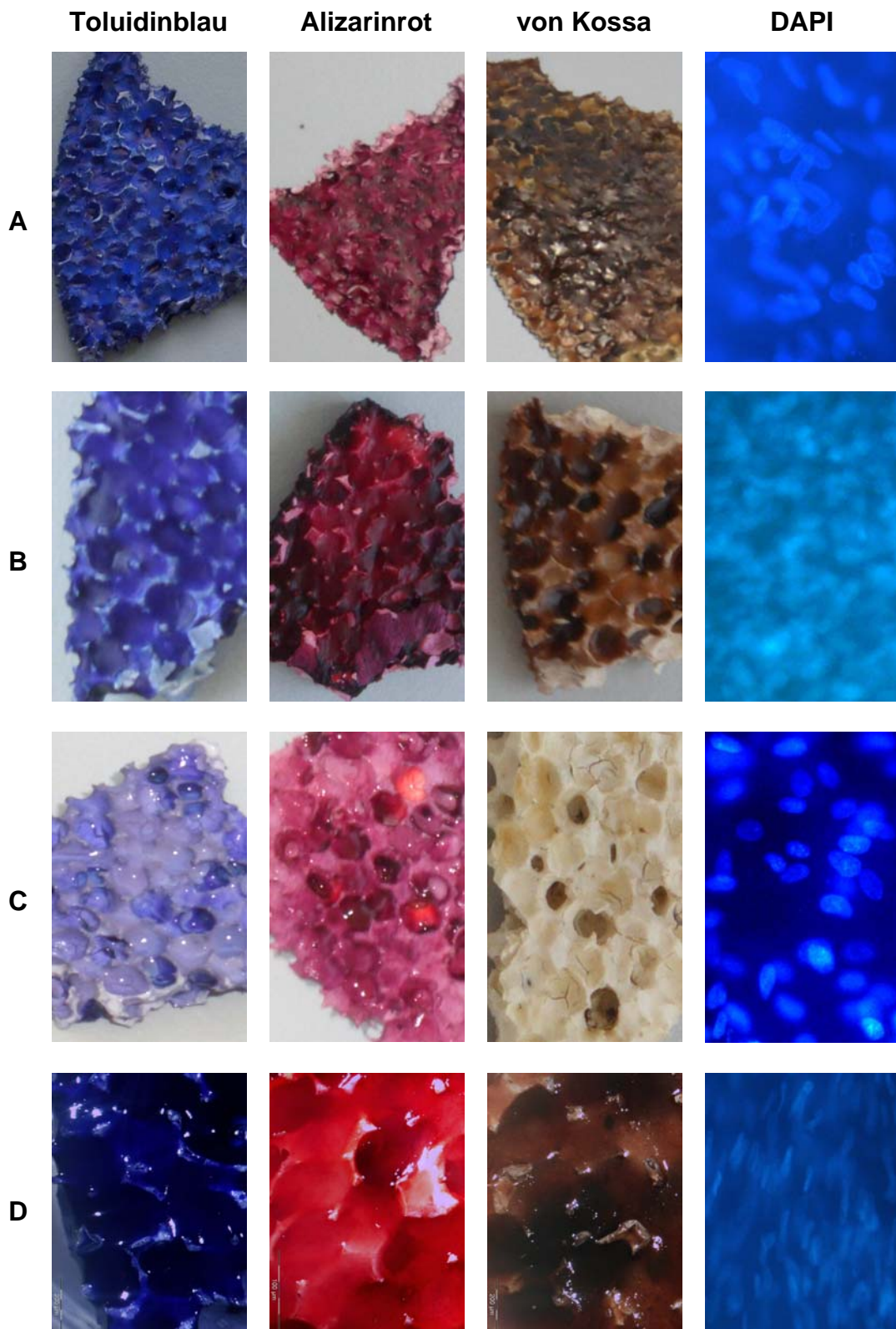


**Abb. 4.47:** Glukoseverbrauch (▲) und Laktatproduktion (■) für zwei weitere unter hypoxischen Bedingungen durchgeführte Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP; **C:** mit einem durchschnittlichen Sauerstoffgehalt von 2,6 % (0,55 %); **D:** mit einem durchschnittlichen Sauerstoffgehalt von 4,7 % (0,99 %). Dargestellt sind die kumulierten Werte sowie die mittleren Werte pro Tag (kleines Diagramm).

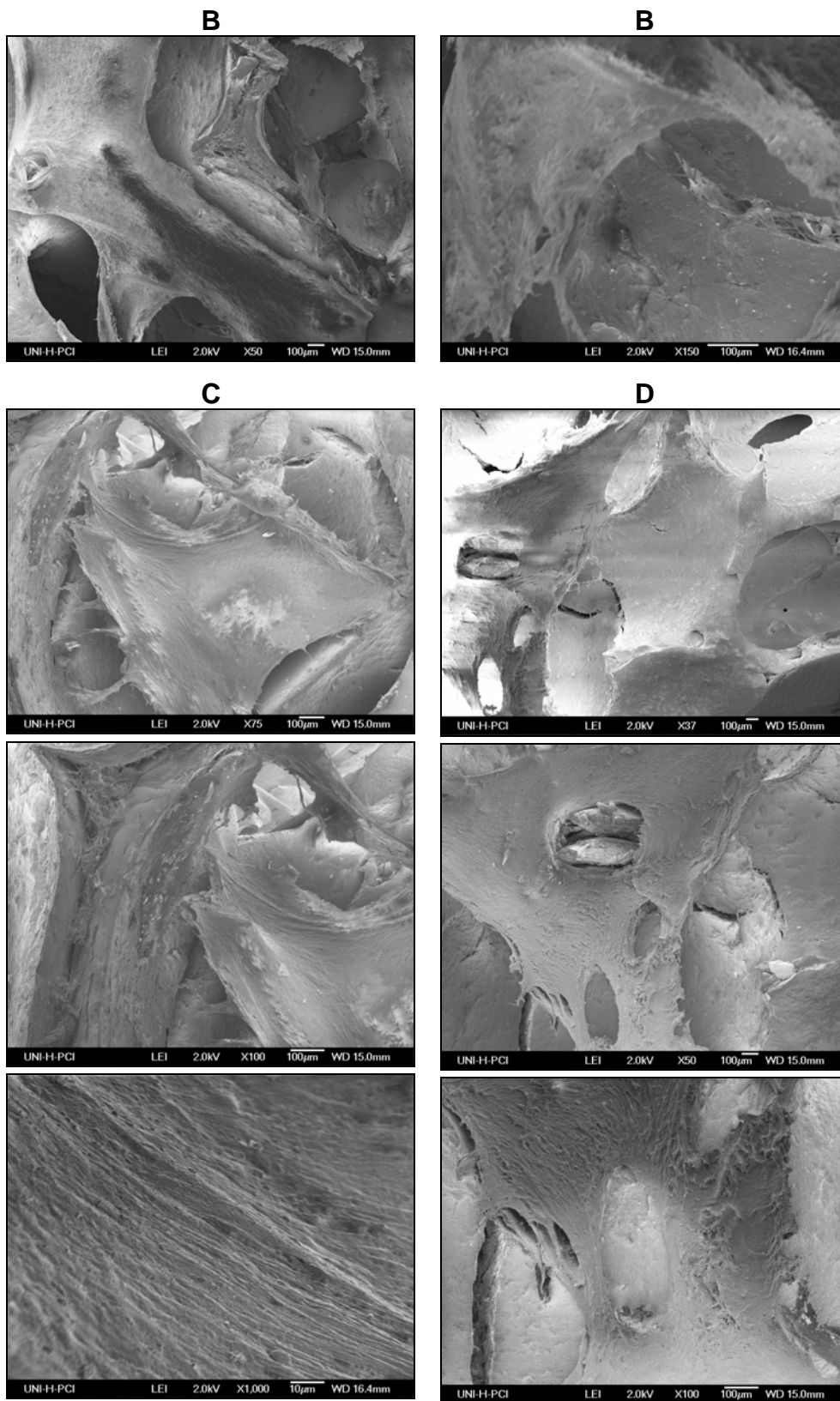
Die im Anschluss an die Kultivierungen jeweils auf kleinen Stücken der besiedelten Keramikscheiben angefertigten Übersichtsfärbungen (Toluidinblau, DAPI; Abb. 4.48) aller vier hypoxischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP zeigen deutlich einen kompletten zellulären Bewuchs des Trägermaterials. Es sind allerdings schon hier Unterschiede in der Intensität der Färbungen zu erkennen. So ist der Träger aus der Kultivierung mit einem durchschnittlichen Sauerstoffgehalt von 2,6 % (0,55 %) zwar vollständig mit Zellen besiedelt (Abb. 4.48, C), was man auch in der Abbildung zur DAPI-Färbung deutlich sehen kann, doch kann man keine dichten Matrixstrukturen erkennen (Toluidinblau). Anders verhält es sich bei den drei weiteren Kultivierungen. Hier kann man klar die schon zuvor erwähnte dichte, gallertartige Matrix erkennen, mit der auch alle offenen Poren des keramischen Trägers gefüllt sind (Abb. 4.48, A, B und D). Auch die Intensität der Färbungen ist hier deutlich höher. Auf den zugehörigen DAPI-Bildern sieht man anhand der gefärbten Zellkerne auch, wie hoch die Zelldichte ist. Es fiel schwer, einzelne Zellebenen zu fokussieren.

Die Färbungen zum spezifischen Nachweis von Calciumionen und damit der Mineralisierung der extrazellulären Matrix sind wiederum in allen Fällen positiv (Alizarinrot, von Kossa; siehe Abb. 4.48). Auch hier kann man deutlich die Unterschiede in der Stärke der extrazellulären Matrix erkennen. Besonders deutlich ist an den Bildern zur Färbung nach von Kossa zu erkennen, dass zum einen die Kultivierung mit der größeren Ausgangszellzahl (Sauerstoff bei durchschnittlich 11 % (2,31 %; Abb. 4.48, A) zum anderen die letzte Kultivierung mit einem limitierten Sauerstoffgehalt von durchschnittlich 4,7 % (0,99 %; Abb. 4.48, D) die dichtesten Zell-Matrix-Strukturen hervorbrachten. In beiden Fällen lassen sich kaum noch Erhöhungen oder Vertiefungen in der hochporösen Trägerkeramik erkennen. Alle Poren sind nahezu vollständig mit Zellen in ihrer selbst generierten Matrix angefüllt.

Die Abbildung 4.49 zeigt REM-Aufnahmen der besiedelten Trägerkeramik im Anschluss an die in Tabelle 4.10 mit B, C und D bezeichneten Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP. Wieder sind die erwähnten hochdicht gewachsenen Zell-Matrix-Strukturen gut zu erkennen, die sich nahezu über das gesamte Trägermaterial erstrecken.



**Abb. 4.48:** Histologische Färbungen im Anschluss an die dreidimensionalen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP unter hypoxischen Bedingungen mit folgenden durchschnittlichen, nominellen (bzw. absoluten) Sauerstoffgehalten: A: 11 % (2,31); B: 42 % (8,82); C: 2,6 % (0,55) und D: 4,7 % (0,99).



**Abb. 4.49:** REM-Aufnahmen von der besiedelten Trägerkeramik im Anschluss an die dynamischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP unter hypoxischen Bedingungen. Die Bezeichnungen entsprechen denen aus Tab. 4.10.

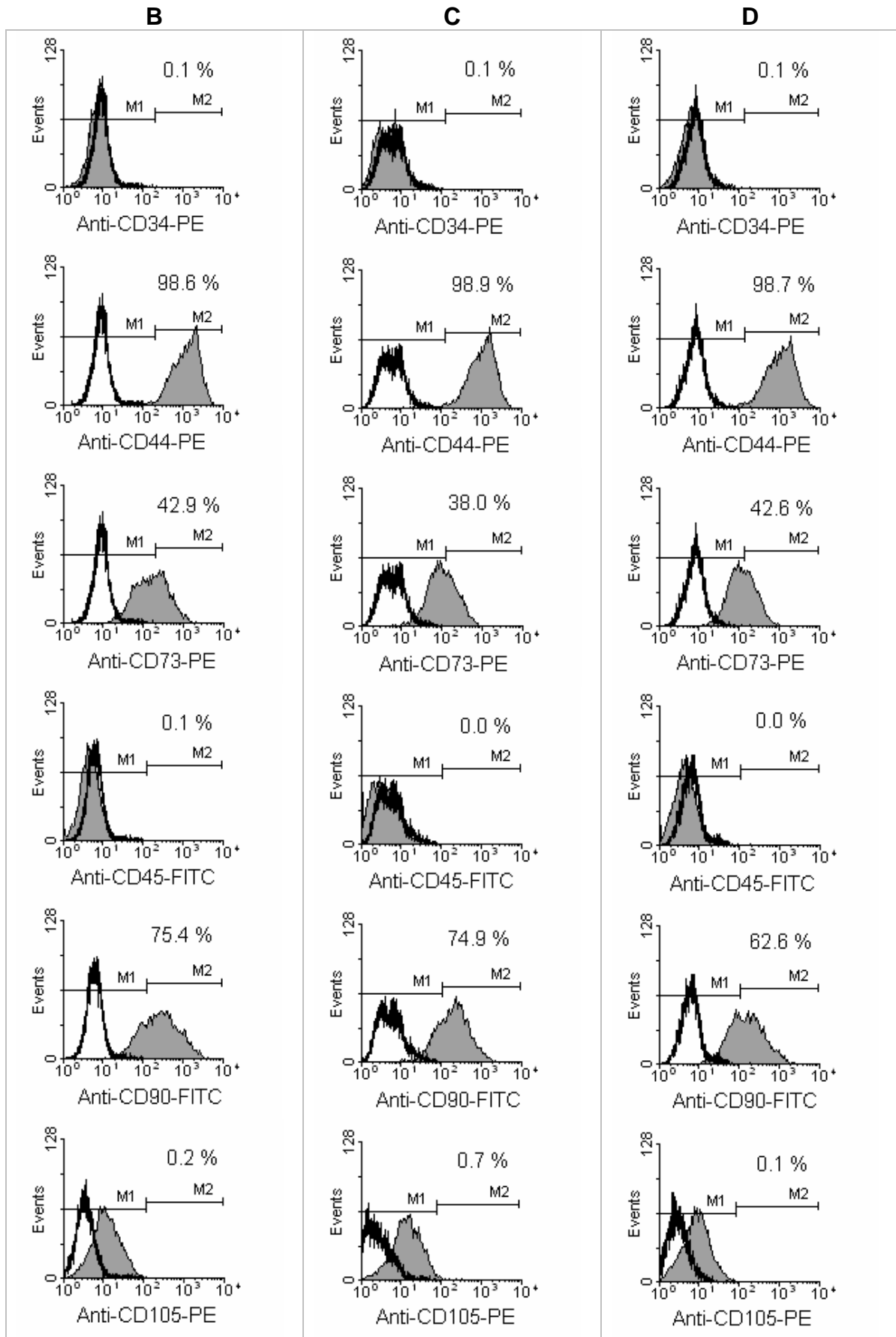


Die Zellzahlen, die durch die verschiedenen Kultivierungen unter hypoxischen Bedingungen erreicht wurden, sind aufgrund der teilweise leicht veränderten Parameter wie Kultivierungsdauer und Inokulationszellzahl nur bedingt miteinander vergleichbar.

Nach der ersten Kultivierung unter den in Tabelle 4.10 (A) angegebenen Bedingungen ließen sich von einer der vier verwendeten Trägerscheiben 23 Millionen Zellen ablösen. Da hier mit etwa  $5,875 \times 10^6$  Zellen pro Keramikscheibe inokuliert wurde, ergibt sich eine 3,9-fache Vermehrung der Zellen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass die Zellen mit einer reinen Collagenase-Lösung und nicht mit einem Gemisch aus Collagenase und Hyaluronidase abgelöst wurden und daher die tatsächliche Zellzahl möglicherweise höher gelegen haben könnte. Dennoch liegt die Zellausbeute noch merklich über der der analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD mit 15,85 Millionen Zellen (vgl. Abschnitt 4.2.2.4).

Die weitaus größte Zellausbeute lieferte mit  $83,7 \times 10^6$  Zellen die folgende Kultivierung (Tab. 4.10, B), die mit einem Sauerstoffgehalt von durchschnittlich 42 % (8,82 %) durchgeführt wurde. Bei einer anfänglichen Zellzahl von 5 Millionen pro Trägerscheibe bedeutet dies eine etwa 16,7-fache Zellvermehrung. Dies war gleichzeitig die Kultivierung mit der geringsten Sauerstofflimitierung. Die Zellen wurden jetzt zwar mit dem Enzymgemisch aus Collagenase und Hyaluronidase abgelöst und die Zellzahl hätte daher besser vergleichbar sein können, doch hatte diese dynamische Kultivierung eine Dauer von insgesamt 45 Tagen. Es wurde also 17 Tage länger kultiviert als bei den anderen drei Vergleichskultivierungen.

Trotzdem war dies nicht die Kultivierung mit dem größten kumulierten Glukoseverbrauch, wie man vielleicht hatte erwarten können. Den lieferte die hypoxische Kultivierung mit etwa 4,7 % (0,99 %) Sauerstoff im Medium (vgl. Abb. 4.46, B und Abb. 4.47, D). Obgleich die folgenden beiden Kultivierung bezüglich der äußeren Parameter gut miteinander vergleichbar waren (siehe Tab. 4.10, C und D), lieferten sie mit 10,65 bzw. 41 Millionen gezählten Zellen extrem unterschiedliche Ausbeuten. Dies entspricht einer 2,1- bzw. 8,2-fachen Zellvermehrung bezogen auf die Ausgangszellzahl. Die geringere Ausbeute lieferte dabei die Kultivierung mit dem durchschnittlich geringeren Sauerstoffgehalt von 2,6 % (0,55 %).



**Abb. 4.50:** Ergebnisse der Zellanlyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie im Anschluss an drei der hypoxischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP (Kultivierungsparameter siehe Tab. 4.10 auf S. 97).

Für die in Tabelle 4.10 mit A bezeichnete hypoxische Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP wurde keine zytometrische Analyse durchgeführt, da nicht genügend Zellen zurückgehalten wurden. Für die Zellen der weiteren hypoxischen Kultivierungen können die hämatopoetischen Markermoleküle CD34 und CD45 nicht detektiert werden (Abb. 4.50). Auch wenn die Kultivierungen C und D (siehe Tab. 4.10) aufgrund der äußeren Bedingungen gut miteinander vergleichbar sein sollten, verhalten sie sich bezüglich der Expression der mittels Durchflusszytometrie nachgewiesenen Oberflächenantigene doch ziemlich unterschiedlich (Abb. 4.50, C und D). So können nach der Kultivierung bei 2,6 % Sauerstoff zwar mehr Zellen nachgewiesen werden, die das zelluläre Oberflächenantigen CD90 tragen (74,9 % gegenüber 62,6 % der Zellen), gleichzeitig gibt es hier aber prozentual weniger Zellen, die CD73-positiv sind (38,0 % gegenüber 42,6 %). Die Zellen aus der Kultivierung bei 42 % Sauerstoff exprimieren diese Moleküle den höheren Werten entsprechend (42,9 % CD73- und 75,4 % CD90-positive Zellen). Das CD44-Antigen wird mit 98,6 bis 98,9 % von den Zellen nach allen hypoxischen Kultivierungen in vergleichbarer Menge exprimiert. Der zu Eingrenzung des Differenzierungszustandes wichtige Oberflächenmarker CD105 wird nach den hypoxischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP kaum noch exprimiert, nur 0,1 bis 0,7 % der Zellen sind jetzt CD105-positiv. Dieses Phänomen war auch schon nach der hypoxischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD beobachtet worden. Es scheint also ein Zusammenhang zwischen Verlust der Expression dieses Antigens und der Hypoxie zu bestehen, da CD105 nach den normoxischen Kultivierungen noch vermehrt detektiert werden konnte. Alles in allem scheinen Variationen im Sauerstoffgehalt bei hypoxischer Kultivierung nur einen relativ kleinen Einfluss auf den Phänotyp der Zellen zu haben.

**Tab. 4.11:** Ergebnisse der RT-PCR für Zellen, die im Z<sup>®</sup> RP unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Angegeben ist das Verhältnis bezogen auf den internen Standard GAPDH.

	GAPDH	Col I	Col III	Runx2	BSP2	OPN	BMP-2	BMP-4	OC	AP
B	1	2,83	1,90	0,66	0	0,17	0,1	0,76	0,17	0,79
C	1	4,59	0,82	0,35	0	0,24	0	0,47	0,35	0
D	1	0,97	0,65	0,19	0	0,41	0,19	0,38	0,19	0,3

Die Analyse der Expression einiger osteoblastärer Gene wurde wiederum durch eine RT-PCR vorgenommen. Für die erste hypoxische Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP bei nominell 11 % Sauerstoff fehlt diese Analyse, da nicht genügend Zellen vorhanden waren.

Für die weiteren hypoxischen Kultivierungen zeigte sich, dass die Expression von Col I gegenüber dem internen Standard GAPDH erhöht oder zumindest gleich stark ist. Am stärksten zeigt sich dies bei Zellen, die mit dem geringsten Sauerstoffgehalt von 2,6 % kultiviert wurden (Tab. 4.11, C). Ganz anders stellt sich die Expression von Col III dar. Sie wird gegenüber dem internen Standard nur bei Zellen, die bei etwa 42 % Sauerstoffgehalt kultiviert wurden, verstärkt exprimiert (Tab. 4.11, B). Die Expression von BSP2 konnte nach keiner der Kultivierungen nachgewiesen werden. Ähnliches gilt für die Expression des BMP-2-Gens. Dessen Produkt konnte in Zellen, die bei einem Sauerstoffgehalt von nominell 2,6 % kultiviert wurden nicht detektiert werden (Tab. 4.11, B). Auch Zellen der weiteren Kultivierungen exprimieren es nur in minimaler Menge. In derselben Kultivierung konnte auch die AP nicht nachgewiesen werden. Ihre Expression wird im Verlauf der Differenzierung verstärkt induziert und erst wieder gesenkt, wenn die Matrixmineralisierung fortgeschritten ist<sup>3,53</sup>. Dieselbe Kultivierung hatte auch kaum extrazelluläre Matrix geliefert, die zwar, zumindest wo vorhanden und wie anhand der Färbungen in Abb. 4.47, C zu erkennen, durchaus Ansätze einer Mineralisierung zeigte. Doch spricht einiges dafür, dass die Expression des AP-Gens noch nicht maximal induziert gewesen sein kann.

Die Expression der anderen untersuchten Gene ist gegenüber dem internen Standard stark vermindert, aber dennoch detektierbar. Da sowohl die Expression von OPN als auch von OC nach allen hypoxischen Kultivierungen nachgewiesen werden kann, muss die OPN-Expression bereits der zweiten Expressionsphase entsprechen, da sie dann vermutlich vor OC und BSP2 induziert wird<sup>53</sup>. BSP2 kann, wie schon erwähnt, im Gegensatz zu OC noch nicht detektiert werden.

Alles in allem scheint eine nur mäßige Sauerstofflimitierung (hier 8,82 % absolut bzw. 42 % nominell) einen entscheidend positiveren Einfluss auf die Differenzierung der verwendeten Nabelschnurzellen entlang der osteogenen Linie auszuüben, als eine extreme Limitierung des Sauerstoffgehaltes auf 2,6 bzw. 4,7 % (0,55 bzw. 0,99 % absolut).

Zusammenfassend betrachtet konnten die Glukoseverbrauchsdaten unter Standardbedingungen im Z<sup>®</sup> RP im Vergleich zum Z<sup>®</sup> RPD nicht gesteigert werden (vgl. Abb. 4.42 und 4.25). Die Dichte der zellulären Besiedlung und die Zellausbeute blieben jetzt sogar noch hinter denen der analogen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD zurück (vgl. Abschnitt 4.2.2.1 und 4.2.3.1). Ähnliches gilt auch für die hypoxischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP-Bioreaktor.

Dabei sind die Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP vor allem aufgrund einer verkürzten Kultivierungsdauer nur bedingt mit denen im Z<sup>®</sup> RPD vergleichbar. Trotz Inokulation mit einer höheren Zellzahl z. B. (Tab. 4.10, B), konnte der (kumulierte) Glukoseverbrauch gegenüber der Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD kaum gesteigert werden.

Die letzte der durchgeführten hypoxischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP (Abschnitt 4.2.3.2, D) ist aber vor allem aufgrund eines ähnlichen Sauerstoffgehaltes von durchschnittlich 4,0 % im Z<sup>®</sup> RPD und 4,7 % im Z<sup>®</sup> RP gut vergleichbar. Dabei lieferte die Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP einen mehr als doppelt so hohen kumulierten Glukoseverbrauch von fast 7 g, obgleich die Kultivierung eine Woche früher als im Z<sup>®</sup> RPD beendet wurde, bei der gut 3,2 g Glukose umgesetzt wurden. Auch die täglichen Verbrauchsdaten lagen mit teilweise mehr als 600 mg etwa doppelt so hoch wie in der hypoxischen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD. Dennoch konnte die Zellausbeute im Vergleich kaum gesteigert werden. Nach der fünfwöchigen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD konnten 37 Millionen Zellen gezählt werden, nach der vierwöchigen Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP gerade 41 Millionen. Dies ist aber durch die kürzere Kultivierungsdauer erklärbar. Die weitaus größte Zellausbeute lieferte die hypoxische Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP mit dem höchsten Sauerstoffgehalt von durchschnittlich 42 % (8,82 %). Dies ist vor allem mit der auf 45 Tage ausgedehnten Kultivierungsdauer zu erklären. Trotzdem wurden in dieser Kultivierung nur etwa 5,5 g Glukose umgesetzt. Dies entspricht nicht der maximal verbrauchten Glukosemenge.

Drei der hypoxischen Kultivierungen im Z<sup>®</sup> RP zeigten einen exzessiven Aufbau extrazellulärer Matrix, was durch die histologischen Färbungen gut sichtbar gemacht werden konnte (Abb. 4.48, A, B, D). Auch konnte eine starke Mineralisierung der Matrix nachgewiesen werden. Die hier fehlende hypoxische Kultivierung benötigte offenbar eine zeitlich ausgedehnte *lag*-Phase zu Beginn der Kultivierung, in der die Zellen sich erst an die neuen Umgebungsbedingungen anpassen müssen. Man kann diesen Effekt schön aus dem Verlauf der täglichen Glukoseverbrauchsraten ablesen (Abb. 4.46, C, kleines Diagramm). Das bedeutet aber auch, dass die Zellen in dieser Kultivierung vermutlich gerade erst mit der Matrixgenerierung begonnen haben, wodurch die Intensität der histologischen Färbungen nicht sehr stark erscheint (Abb. 4.48, C).

Da bei der Anfertigung von REM-Aufnahmen nur ein sehr kleiner Ausschnitt der besiedelten Trägerkeramik festgehalten werden kann, sind diese Aufnahmen für Vergleichszwecke in der Tat nicht sehr aussagekräftig.

Die Durchflusszytometrie weist zum Teil sehr unterschiedliche Expressionsmuster für die Zellen aus den verschiedenen Kultivierungen nach. Eine Gemeinsamkeit besteht darin,

dass der hämatopoetische Oberflächenmarker CD45 auch jetzt von den Zellen nicht präsentiert wird. Anders verhält es sich mit CD34, einem weiteren hämatopoetischen Marker. Dieser kann nach Kultivierung mit Humanserum auf immerhin 7,3 % der Zellen nachgewiesen werden. CD73 und CD90 werden durch die Kultivierung im Z<sup>®</sup> RP offenbar stärker reguliert als durch Kultivierung im Z<sup>®</sup> RPD. CD90 wird von maximal 75,4 % der Zellen exprimiert (hypoxische Bedingungen mit 42 % Sauerstoff). CD73 kann auf maximal 52,6 % der Zellen detektiert werden (unter Standardbedingungen). Anders verhält sich CD44, der zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle gehört. Er wird nach hypoxischer Kultivierung von fast 99 % der Zellen exprimiert. Bei Kultivierung unter Standardbedingungen wird er, ähnlich wie nach der analogen Z<sup>®</sup> RPD-Kultivierung, von 97,5 % der Zellen präsentiert. Die Expression von CD105 wird durch hypoxische Bedingungen fast vollständig unterdrückt.

Die durch RT-PCR erhaltenen Ergebnisse zeigen sehr genau, dass es kaum möglich ist, nur anhand dieser Daten, den Differenzierungszustand der Zellen festzustellen, vor allem, weil man als Ergebnis die durchschnittliche Expression der untersuchten Genprodukte der gesamten Zellpopulation erhält. Es ist aber höchstwahrscheinlich, dass einzelne Zellen zum Zeitpunkt der Analyse ganz verschiedene Gene exprimieren. Im Resultat erhält man so eine schwache Expression (fast) aller in die Untersuchung einbezogenen Genprodukte. Zusammengenommen befinden sich die Zellen wohl in der Phase der Matrixmaturation, wobei ein Teil der Zellen scheinbar noch mit dem Matrixaufbau beschäftigt ist (hohe Col I-Expression), andere Zellen sich aber schon aktiv an der Matrixmineralisierung beteiligen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Behandlung größerer Knochendefekte stellt auch heute noch eine große Herausforderung für den Bereich der regenerativen Medizin dar. Zwar besitzt Knochengewebe generell eine gute Selbstheilungskapazität, Defekte kritischer Größe benötigen jedoch eine Unterstützung beim Heilungs- und Wiederherstellungsprozess. Aus diesem Grund werden solche Defekte unter Zuhilfenahme von Transplantaten therapiert. Am besten eignen sich hierfür autologe Transplantate, da sie dem Patienten selbst entnommen werden, wodurch eine Abstoßungsreaktion seines Immunsystems ausgeschlossen werden kann. Der große Nachteil solcher autologen Transplantate liegt vor allem in ihrer begrenzten Verfügbarkeit. Zusätzlich kann es durch die Entnahme gesunden Gewebes an der Explantationsstelle zu Komplikationen wie Infektionen oder einer schlechten Verheilung und Wiederherstellung kommen, die sich in dauerhaften Schmerzen äußern können. Die biologische Alternative zu autologen Transplantaten bilden allogene oder xenogene Transplantate. Bei deren Verwendung muss hingegen immer mit einer Immunabwehrreaktion gerechnet werden, was eine Zusatztherapie mit Immunsuppressiva nötig macht. Des Weiteren kann vor allem bei Verwendung xenogener Transplantate die Übertragung von Virusinfektionen nicht ausgeschlossen werden. Auch der Einsatz von Prothesen ist nicht ideal und kann ebenso zu dauerhaften Problemen und Schmerzen an der Implantationsstelle führen, da auch diese Objekte vom Organismus als Fremdkörper wahrgenommen werden.

Der vergleichsweise noch relativ junge Forschungsbereich des *Tissue Engineering* versucht Mittel und Wege zu finden, all die genannten Nachteile der unterschiedlichen Implantationsvarianten zu eliminieren. Dabei wird ein geeignetes Trägermaterial extracorporal mit Zellen besiedelt und *in vitro* kultiviert, um anschließend als dreidimensionales Konstrukt in den Defekt eingesetzt zu werden. Dabei sollen Biomaterial und Zellen so gewählt werden, dass durch das entwickelte Konstrukt keine Abstoßungsreaktion ausgelöst wird. Gleichzeitig sollten synthetische Anteile ebenso biokompatibel sein und sich im Idealfall mit einer ähnlichen Geschwindigkeit abbauen, wie das neue Gewebe vom Organismus aufgebaut wird.

Den zellulären Anteil solcher Konstrukte bilden im Idealfall autologe Zellen, da sie dieselben Vorteile besitzen wie autologe Transplantate gegenüber anderen Transplantatvarianten. Dies stellt sich aber bei der Verwendung von Zellen als besonders

schwierig dar, da die Dauer der *in vitro* Kultivierung so kurz wie möglich gehalten werden sollte, um einer etwaigen phänotypischen Veränderung der Zellen vorzubeugen.

In dieser Arbeit wurden humane Zellen der Nabelschnur als Zellquelle herangezogen. Da Nabelschnurzellen ontogenetisch betrachtet die jüngsten verfügbaren adulten Stammzellen darstellen, wird häufig davon ausgegangen, und diese Annahme wird von einer Reihe an Studien gestützt, dass sie noch keine voll ausgebildete Immunogenität besitzen und so keine oder eine nur schwache Immunabwehr auslösen. Dadurch erscheint es möglich, hUCs allogent zu implantieren, ohne eine Immunreaktion befürchten zu müssen.

In dieser Arbeit wurde durch eine erste Charakterisierung von Zellpopulationen, die aus verschiedenen Nabelschnüren extrahiert worden waren, gezeigt, dass die allein durch unterschiedliche Extraktionsmethoden bzw. die Verwendung verschiedener Kompartimente zur Zellextraktion gewonnenen Zellpopulationen sich schon morphologisch sowie bezüglich ihrer Verdopplungszeiten bei Kultivierung mit verschiedenen Medien stark unterscheiden können, was die Notwendigkeit der Vereinheitlichung in den Methoden verdeutlicht. Weiterhin konnte durch eine Expressionsanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie bzw. der RT-PCR festgestellt werden, dass die hUCs bereits erste Anzeichen einer einsetzenden Differenzierung zeigten. Dies bedeutet für das Ziel einer osteogenen Differenzierung keinen zwingenden Nachteil, da dieser Differenzierungsweg ab einem bestimmten Zeitpunkt der *in vitro*-Kultivierung dem natürlichen Differenzierungsweg entspricht. Hat man aber einen anderen Weg der zellulären Differenzierung im Sinn, so kann es entscheidend sein, das genaue *in vitro*-Alter der Zellen zu kennen und die Zellen möglichst früh nach ihrer Extraktion zu verwenden.

Durch die statischen Langzeitkultivierungen auf der dreidimensionalen Trägerkeramik wird deutlich, dass zwar durch die Bereitstellung einer stark vergrößerten Oberfläche die Zellvermehrung entscheidend gesteigert werden kann. Auf der anderen Seite zeigt sich aber auch, dass ab einer kritischen Zelldichte auf bzw. in dem Trägermaterial, die Zellen auch bei täglichem Mediumwechsel nicht mehr hinreichend versorgt werden können. Diese Aussage kann durch die hier angewandte Analytik nur für die benötigte Glukose zweifelsfrei festgestellt werden. Vermutlich fehlen den Zellen aber auch andere im Medium enthaltene Nährstoffe. Dennoch zeigen die statisch, dreidimensional kultivierten Zellen bereits stärkere Anzeichen einer Differenzierung, was vor allem an der Herabregulierung der Expression der zellulären Oberflächenantigene CD73 und CD90 festgemacht wird, da diese Moleküle als positive Marker für MSCs gelten.



Für die Langzeitkultivierung adhärenter Zellen scheint eine starke Vergrößerung der Kulturoberfläche unabdingbar. Dies kann am einfachsten durch Verwendung dreidimensionaler Trägermaterialien erreicht werden, da auch der Platzbedarf des Kulturgefäßes in Betracht gezogen werden muss. Auf dreidimensionalen Trägern kann aber vermutlich eine spontane Differenzierung der Zellen nicht ausgeschlossen werden.

Durch die Verwendung der Z<sup>®</sup> RP- und Z<sup>®</sup> RPD-Bioreaktoren für die dreidimensionalen Langzeitkultivierungen konnten sowohl die Zellausbeute als auch der Aufbau extrazellulärer Matrix zum Teil noch einmal entscheidend gesteigert werden. Dies gilt weniger für die Kultivierung mit osteoinduktiven Zusätzen, hier wurden kaum Proteine zum Aufbau der zelleigenen EZM sezerniert. Für alle Kultivierungen, die auf der Trägerkeramik durchgeführt wurden, gilt aber, dass die EZM, auch wenn sie nur schwach ausgebildet war, Anzeichen einer Mineralisierung aufweist, was durch die Ergebnisse der histologischen Färbungen untermauert wird.

Aufgrund der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analysen muss man davon ausgehen, dass die biomechanischen Reize, die durch die dynamischen Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor hervorgerufen werden, einen weiteren differenzierenden Einfluss auf die hUCs haben, da die Expression der mesenchymalen Marker CD90, CD73 und CD105 herabreguliert ist, zum Teil sogar sehr stark, so dass z. B. CD73 teilweise auf nicht einmal mehr der Hälfte der Zellen nachweisbar ist. Besonders stark wird aber offenbar die Expression von CD105 durch hypoxische Kultivierungsbedingungen beeinflusst. Der Marker kann nach hypoxischer Kultivierung im Bioreaktor auf maximal 0,7 % der Zellen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR stellen sich in diesem Sinne als nicht eindeutig und aussagekräftig heraus. Im Unterschied zur Durchflusszytometrie, die auf Einzelzellebene arbeitet, werden bei einer PCR alle Zellen einer Population analysiert. Da sich vor allem bei der *in vitro* Differenzierung die Zellen einer Population in den seltensten Fällen am selben Punkt des Differenzierungsweges befinden, ist eine Aussage über den Grad der Differenzierung meist schwer zu treffen. Es kann immer nur ein durchschnittlicher Phänotyp der gesamten Zellpopulation beschrieben werden.

Diese Tatsache verdeutlicht, dass Analysemethoden, die einzelne Zellen betrachten, immer vorzuziehen sind, da sie solchen Methoden, die eine gesamte Zellpopulation analysieren, zur Eingrenzung des Differenzierungszustandes der Zellen klar überlegen sind.

## Referenzen

- [1] **Anton F, Suck K, Diederichs S, Behr L, Hitzmann B, van Griensven M, Scheper T, Kasper C.** Design and characterization of a rotating bed system bioreactor for tissue engineering applications. *Biotechnol Prog* 2008; 24(1):140-147.
- [2] **Aubin JE, Turksen K.** Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblastic lineage. *Microsc Res Tech* 1996; 33(2):128-140.
- [3] **Aubin JE, Heersche JN.** Osteoprogenitor cell differentiation to mature bone-forming osteoblasts. *Drug Dev Res* 2000; 49(3):206-215.
- [4] **Aubin JE, Triffitt JT.** Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. in Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, eds. *The principles of Bone Biology*, 2<sup>nd</sup> edition, San Diego: Academic Press; 2002:59-82.
- [5] **Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H.** Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; 22(4):625-634.
- [6] **Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL.** Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells. *Science* 1999; 283(5401):534-537.
- [7] **Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT.** Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(2):242-253.
- [8] **Both SK, van der Muijsenberg AJC, van Blitterswijk CA, de Boer J, de Bruijn JD.** A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2007; 13(1):3-9.
- [9] **Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE.** Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64(2):278-294.
- [10] **Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J.** Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25(11):2739-2749.
- [11] **Chen H-C, Hu Y-C.** Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnol Lett* 2006; 28(18):1415-1423.
- [12] **Chen X-D, Qian H-Y, Neff L, Satomura K, Horowitz MC.** Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J Bone Miner Res* 1999; 14(3):362-375.
- [13] **Choumerianou DM, Dimitriou H, Kalmanti M.** Stem cells: promises versus limitations. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(1):53-60.

- [14] **Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD.** Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(9):1179-1183.
- [15] **Cowles EA, DeRome ME, Pastizzo G, Brailey LL, Gronowicz GA.** Mineralization and the expression of matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif Tissue Int* 1998; 62(1):74-82.
- [16] **Csete M.** Oxygen in the cultivation of stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1049:1-8.
- [17] **Dahlke MH, Popp FC, Larsen S, Schlitt HJ, Rasko JE.** Stem cell therapy of the liver - fusion or fiction? *Liver Transpl* 2004; 10(4):471-479.
- [18] **Diederichs S, Röker S, Marten D, Peterbauer A, Scheper T, van Griensven M, Kasper C.** Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z<sup>®</sup> RP platform. *Biotechnol Prog* 2009; 25(6):1762-1771.
- [19] **Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-317.
- [20] **Ducy P.** Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 2000; 219(4):461-471.
- [21] **Eberhard D, Tosh D.** Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(1):33-40.
- [22] **Eibl R, Eibl D.** Disposable bioreactors for cell culture-based bioprocessing. *Achema Worldwide News* 2007; 2:8-10.
- [23] **Erices A, Conget P, Minguell JJ.** Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Hematol* 2000; 109(1):235-242.
- [24] **Ezashi T, Das P, Roberts RM.** Low O<sub>2</sub> tension and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(13):4783-4788.
- [25] **Freed LE, Vunjak-Novakovic G.** Microgravity tissue engineering. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33(5):381-385.
- [26] **Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV.** Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3):381-390.
- [27] **Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP.** Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation* 1968; 6(2):230-247.
- [28] **Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K.** Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22(5):649-658.

- 
- [29] **Goodison S, Urquidi V, Tarin D.** CD44 cell adhesion molecules. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1999; 52(4):189-196.
- [30] **Goodwin HS, Bicknese AR, Chien S-N, Bogucki BD, Oliver DA, Quinn CO, Wall DA.** Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 2001; 7(11):581-588.
- [31] **Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T.** Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2007; 358(3):948-953.
- [32] **Gruh I, Martin U.** Transdifferentiation of stem cells: a critical view. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2009; 114:73-106.
- [33] **Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak J.** Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2007; 11(5):935-944.
- [34] **Heng BC, Cao T, Stanton LW, Robson P, Olsen B.** Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner Res* 2004; 19(9):1379-1394.
- [35] **Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, Prockop DJ.** Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One* 2007; 2(5):e416.
- [36] **Janssen FW, Oostra J, van Oorschot A, van Blitterswijk CA.** A perfusion bioreactor system capable of producing clinically relevant volumes of tissue-engineered bone: *in vivo* bone formation showing proof of concept. *Biomaterials* 2006; 27(3):315-323.
- [37] **Jin HJ, Park SK, Oh W, Yang YS, Kim SW, Choi SJ.** Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 381(4):676-681.
- [38] **Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J.** Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Comm* 2010; 391(3):1471-1476.
- [39] **Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K.** Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5):1294-1301.
- [40] **Kurosawa H, Kimura M, Noda T, Amano Y.** Effect of oxygen on *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* 2006; 101(1):26-30.

- [41] **Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M.** Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6(11):1229–1234.
- [42] **Langer R, Vacanti JP.** Tissue Engineering. *Science* 1993; 260(5110):920-926.
- [43] **Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, Jung JS.** Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14(4-6):311-324.
- [44] **Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH.** Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103(5):1669-1675.
- [45] **Liu F, Malaval L, Aubin JE.** Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J Cell Sci* 2003; 116(9):1787-1796.
- [46] **Ma T, Grayson WL, Fröhlich M, Vunjak-Novakovic G.** Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol Prog* 2009; 25(1):32-42.
- [47] **Malladi P, Xu Y, Chiou M, Giaccia AJ, Longaker MT.** Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290(4):C1139-C1146.
- [48] **Martin I, Wendt D, Heberer M.** The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol* 2004; 22(2):80-86.
- [49] **Menthen A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA, Dabeva MD.** Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells* 2004; 22(6):1049–1061.
- [50] **Minguell JJ, Erices A, Conget P.** Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* 2001; 226(6):507-520.
- [51] **Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, Lavrentieva A, Majore I, Hass R, Kasper C.** Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* Dez 2009 (Online first)
- [52] **Nerem RM.** Cellular Engineering. *Ann Biomed Eng* 1991; 19(5):529-545.
- [53] **Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS.** 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* 1990; 143(3):420-430.

- [54] **Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP.** Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417):1168–1170.
- [55] **Ratcliffe A, Niklason LE.** Bioreactors and bioprocessing for tissue engineering. *Ann NY Acad Sci* 2002; 961:210-215.
- [56] **Ren H, Cao Y, Zhao Q, Li J, Zhou C, Liao L, Jia M, Zhao Q, Cai H, Han ZC, Yang R, Chen G, Zhao RC.** Proliferation and differentiation of bone marrow stromal cells under hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Comm* 2006; 347(1):12-21.
- [57] **Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM.** Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001; 98(9):2615-2625.
- [58] **Roche Lexikon Medizin**, 3. Auflage, Urban & Schwarzenberger, 1993
- [59] **Röker S, Böhm S, Diederichs S, Bode F, Quade A, Korzhikov V, van Griensven M, Tennikova TB, Kasper C.** A study on the influence of biocompatible composites with bioactive ligands toward their effect on cell adhesion and growth for the application in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2009; 91(1):153-162.
- [60] **Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN.** Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21(1):105-110.
- [61] **Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA.** Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2008; 26(8):2173-2182.
- [62] **Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, Giaccia AJ, Longaker MT.** Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004; 279(38):40007-40016.
- [63] **Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T.** Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues - superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52(8):2521-2529.
- [64] **Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE.** Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005; 23(2):220-229.
- [65] **Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG.** Formation of three-dimensional cell-polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res* 2002; 62(1):136-148.

- [66] **Stein GS, Lian JB.** Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationship during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev* 1993; 14(4):424-442.
- [67] **Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH.** Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005; 54(3):132-141.
- [68] **Suck K, Behr L, Fischer M, Hoffmeister H, van Griensven M, Stahl F, Scheper T, Kasper C.** Cultivation of MC3T3-E1 cells on a newly developed material (Sponceram®) using a rotating bed system bioreactor. *J Biomed Mater Res A* 2007; 80(2):268-275.
- [69] **Suh H.** Tissue restoration, tissue engineering and regenerative medicine. *Yonsei Medical Journal* 2000; 41(6):681-684.
- [70] **Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS.** Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32(1):11-16.
- [71] **Troyer DL, Weiss ML.** Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* 2008; 26(3):591-599.
- [72] **Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL.** Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297(5590):2256-2259
- [73] **Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD.** Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS ONE* 2008; 3(5):e2213.
- [74] **Wagner W, Bork S, Horn P, Kronic D, Walenda T, Diehlmann A, Benes V, Blake J, Huber F-X, Eckstein V, Boukamp P, Ho AD.** Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS ONE* 2009; 4(6):e5846.
- [75] **Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, Huang C-C, Wei H-M, Guo Y-J, Fu Y-S, Lai M-C, Chen C-C.** Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004; 22(7):1330-1337.
- [76] **Weiss ML, Troyer DL.** Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* 2006; 2(2):155-162.
- [77] **Yen BL, Huang H-I, Chien C-C, Jui H-Y, Ko B-S, Yao M, Shun C-T, Yen M-L, Lee M-C, Chen Y-C.** Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 2005; 23(1):3-9.

- 
- [78] **Yu X, Botchwey EA, Levine EM, Pollack SR, Laurencin CT.** Bioreactor-based bone tissue engineering: The influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(31):11203-11208.
- [79] **Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, LeBoff MS, Glowacki J.** Age-related intrinsic changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 2008; 7(3):335-343.
- [80] **Zhou Y, Liu Y, Tan J.** Is 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? *Chin Med J* 2006; 119(15):1278-1286.
- [81] **Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH.** Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell* 2002; 13:4279-4295.
- [82] **Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN.** Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2(6):477-488.



# Anhang

<b>A.</b>	<b>Methoden</b>	<b>121</b>
A.1	Zellkultur Zellen Medien Passagieren Kryokonservieren	121
A.2	Zellcharakterisierung Berechnung von Verdopplungszeiten Viabilitäts-Assay (MTT-Test) Morphologische Begutachtung	122
A.3	Histologische Färbungen Toluidinblau DAPI Alizarinrot von Kossa	124
A.4	Durchflusszytometrie	126
A.5	RT-PCR RNA-Extraktion Reverse Transkription PCR Agarose-Gelelektrophorese	127
A.6	Raster-Elektronen-Mikroskopie	131
<b>B.</b>	<b>Materialien</b>	<b>132</b>
B.1	Geräte	132
B.2	Verbrauchsmaterial	133
B.3	Reagenzien und Puffer	133
	<b>Lebenslauf</b>	<b>135</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>136</b>

## A. Methoden

### A.1 Zellkultur

#### Zellen

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Nabelschnurzellen wurden freundlicherweise von der Zellwerk GmbH zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus unterschiedlichen Teilen verschiedener Nabelschnüre nach gängigen Protokollen extrahiert.

#### Medien

AlphaF:	Alpha MEM Eagle + 10 % FCS + 0,5 % Gentamycinsulfat
AlphaH:	Alpha MEM Eagle + 10 % HS + 0,5 % Gentamycinsulfat
DF-F:	DMEM und Ham's F-12 (im Verhältnis 1:1) + 10 % FCS + 0,5 % Gentamycinsulfat
DF-H:	DMEM und Ham's F-12 (im Verhältnis 1:1) + 10 % FCS + 0,5 % Gentamycinsulfat
OsteoF:	AlphaF + 0,3 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat + 10 mM $\beta$ -Glycerolphosphat + 10 nM Dexamethason
OsteoH:	AlphaH + 0,3 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat + 10 mM $\beta$ -Glycerolphosphat + 10 nM Dexamethason
Amniopan:	spezielles Kompletmedium zur Kultivierung (und <i>in vitro</i> Diagnostik) amniotischer Zellen

#### Passagieren

Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80 - 90 % erreicht haben, werden sie passagiert. Dazu wird das jeweilige Medium abgenommen und die Zellkultur einmal mit PBS gespült. Anschließend wird sie mit Accutase (0,5 mL pro 25 cm<sup>2</sup> Fläche) bedeckt und für etwa 3 min. bei 37°C inkubiert. Gegebenenfalls muss die Inkubationszeit verlängert werden. Sobald sich die Zellen von der Zellkulturplastik lösen werden sie in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g in 5 min. pelletiert. Das Pellet wird in PBS resuspendiert und 50  $\mu$ L zur Zellzählung abgenommen. Nachdem die Zellen mit Hilfe

einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gezählt wurden, kann die gewünschte Anzahl Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt, mit dem entsprechenden Medium bedeckt und wieder in den Inkubator verbracht werden.

### **Kryokonservieren**

Für die Kryokonservierung von Zellen werden diese zunächst wie beim Passagieren behandelt. Nach der Zellzählung werden die Zellen abermals pelletiert (5 min., 300 g), anschließend in FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und mL-weise auf die Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen werden dann in eine bei  $-20^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte Kryobox verbracht und für 24 Stunden zunächst bei  $-60^{\circ}\text{C}$  gelagert, um am folgenden Tag in einen mit Flüssigstickstoff gefüllten Kryotank verbracht zu werden. Hier können die Zellkulturen über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

## **A.2 Zellcharakterisierung**

### **Berechnung von Verdopplungszeiten**

Zur Berechnung der Populationsverdopplungszeiten wurden die Zellen in definierter Zellzahl in T-Flaschen mit  $25\text{ cm}^2$  Fläche angesiedelt und bei regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert, bis sie eine Konfluenz von etwa 80 - 90 % erreicht haben. Bei jedem Passagieren wurde dann anhand der gezählten Zellen die Verdopplungszeit nach folgender Formel berechnet:

$$T_d = \ln(2) / \mu \quad ; \text{ mit } \mu = [\ln(x_1) - \ln(x_0)] / [T_1 - T_0]$$

$T_d$  = Populationsverdopplungszeit

$x_0$ : Zellzahl bei Inokulation;  $x_1$ : Zellzahl bei Zellernte

$T_0$  = Zeitpunkt der Inokulation;  $T_1$  = Zeitpunkt der Zellernte

**Viabilitäts-Assay (MTT-Test)**

Zur Überprüfung der Viabilität der verschiedenen Zellen wurde der MTT-Test durchgeführt. Mit diesem Test lässt sich die Stoffwechselaktivität mitochondrialer Dehydrogenasen quantifizieren, wobei die gemessene Signalintensität proportional zur Viabilität der Zellen ist. Die verwendeten Zellen wurden über einen Zeitraum von zehn Tagen mit den genannten Medien in den Vertiefungen von 96-Lochplatten kultiviert. Die Viabilität wurde jeweils an den Tagen 0, 3, 6 und 9 überprüft. Es wurde jeweils eine 4-fach Bestimmung gegen einen Blindwert durchgeführt.

Zur Durchführung des Tests wird das verbrauchte Medium abgenommen. Anschließend werden in jedes der Wells 100 µl frisches Medium sowie 25 µl der MTT-Lösung (2 mg MTT / ml PBS) gegeben. Nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> werden die Zellen mit jeweils 100 µl einer frisch anzusetzenden Solubilisierungslösung aus 1 g SDS in 10 ml 0,01 M HCl versetzt und über Nacht erneut bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, um die zuvor entstandenen Kristalle aufzulösen. Am folgenden Tag wird die Farbintensität der Lösung am Photometer quantifiziert (Messwellenlänge 546 nm). Die Inhalte jedes Wells müssen dazu gründlich durchmischt werden, wobei eine Blasenbildung vermieden werden sollte, bevor die Überstände für die photometrische Messung in neue 96-Lochplatten überführt werden. Zusätzlich werden Wells benötigt, die als Blindwerte fungieren. Diese Wells enthalten keine Zellen, werden ansonsten jedoch genau wie die besiedelten Wells behandelt.

**Morphologische Begutachtung**

Für die morphologische Begutachtung der Zellen werden sie in definierter Zellzahl in Petrischalen mit 35 mm Durchmesser angesiedelt. Bei regelmäßigem Mediumwechsel werden sie jeweils am sechsten Tag der Subkultur morphologisch am Mikroskop begutachtet.

### A.3 Histologische Färbungen

Für die verschiedenen histologischen Färbungen werden die Zellen bzw. die besiedelten Zellträger (Zellkulturgefäße, Sponceram<sup>®</sup>) zunächst zweimal mit PBS gespült und anschließend durch Überschichtung mit 100 %igem Methanol in 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert.

#### **Toluidinblau**

Toluidinblau bindet selektiv an saure Substanzen wie DNA und RNA und fungiert daher als Übersichtsfärbung um die Morphologie der Zellen besser beurteilen zu können (Abschnitt 4.1) bzw. um einen ersten Eindruck der erreichten Zelldichte auf dem Zellträger zu erhalten (Abschnitt 4.2).

Nach der Fixierung der Zellen auf dem Zellträger werden sie erneut zweimal mit PBS gespült. Im Anschluss wird die Toluidinblau-Lösung (0,1 % in dH<sub>2</sub>O) zugegeben. Nach zehn- bis fünfzehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird der Überstand verworfen. Die Zellen werden abschließend mehrmals vorsichtig mit PBS gespült, um den Hintergrund zu entfärben.

#### **DAPI**

Zur Visualisierung einzelner Zellen auf den keramischen Zellträgern werden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. DAPI bindet bevorzugt an doppelsträngige DNA, kann aber auch RNA binden, wobei die Intensität der Fluoreszenz dann aber deutlich geringer ist. Da sich die Emissionsmaxima von DNA- und RNA-gebundenem DAPI hinreichend unterscheiden, kann man mit dieser Färbung die Zellkerne allein darstellen.

Zur Durchführung werden die Zellen im Anschluss an die Fixierung zweimal mit PBS gespült. Anschließend wird die DAPI-Lösung (1 µg/mL PBS) zugegeben, die für etwa 15 Minuten im Dunkeln inkubieren sollte. Danach werden die Zellen bzw. die Zellträger

noch ein- bis zweimal mit PBS gespült, um nicht gebundene Farbstoffreste zu entfernen, bevor sie am Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden können.

Alternativ können Fixierung und Färbung auch in einem Schritt durchgeführt werden. Dazu wird die DAPI-Lösung mit Methanol anstatt mit PBS angesetzt und nur einmal für 15 bis 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

### **Alizarinrot**

Alizarinrot S wird für den Nachweis von Calciumionen in der extrazellulären Matrix verwendet, da es mit diesen einen roten Farbkomplex bildet.

Im Anschluss an die Fixierung wird der Überstand verworfen und die Zellen oder Träger mit der Alizarinrot-Lösung (1 % in 2 %igem Ethanol) überschichtet. Die Lösung inkubiert für etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur und wird dann verworfen. Danach werden die Zellen bzw. Träger solange mit PBS gespült, bis keine Farbwolken mehr von ihnen abgehen.

### **von Kossa**

Die Färbung nach von Kossa wird wie die Alizarinrot-Färbung zum Nachweis von Calciumionen im Gewebe eingesetzt. Diese werden von Silberionen ersetzt, die durch Einwirkung von ultraviolettem Licht zu elementarem Silber reduziert werden, welches sich als brauner bis schwarzer Farbstoff darstellt.

Nachdem die Zellen fixiert wurden, werden sie zweimal mit deionisiertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) gespült. Anschließend werden die Zellen bzw. Träger mit einer Silbernitratlösung (5 % in dH<sub>2</sub>O) bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen bzw. Träger werden erneut zweimal mit dH<sub>2</sub>O gespült. Nachfolgend werden die Zellen bzw. Träger für zwei Minuten mit ultraviolettem Licht bestrahlt und im Anschluss für weitere zwei Minuten bei Raumtemperatur mit einer Natriumthiosulfatl-Lösung (5 % in dH<sub>2</sub>O) inkubiert. Letzteres dient der Fixierung der Färbung.

## A.4 Durchflusszytometrie

Jede Zelle besitzt auf ihrer Oberfläche verschiedenste Antigene, die der interzellulären Erkennung dienen. So besitzen verschiedene Zelltypen verschiedene ‚sets‘ an Oberflächenmolekülen und jeder Zelltyp kann von einem anderen unterschieden werden. Die Durchflusszytometrie ist in den letzten Jahren zu einem der wichtigsten Analyseverfahren im Bereich der Zellkultivierung und -differenzierung geworden. Sie ermöglicht eine Analyse auf Einzelzellebene und steht damit im Gegensatz zu Methoden wie z.B. der PCR, die sich immer nur auf eine gesamte Zellpopulation beziehen können.

Für eine durchflusszytometrische Analyse benötigt man neben einem Durchflusszytometer vor allem verschiedene Antikörper, je nach zu analysierender Zellart. Die spezifischen Antikörper (wie auch die Isotypkontrollen) sind dabei mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die durch den Laserstrahl des Durchflusszytometers angeregt werden, wodurch die Zellen sichtbar und zählbar gemacht werden.

Das FACS Calibur von Beckman & Coulter besitzt einen Laser, der die fluoreszenzmarkierten Proben mit einer Wellenlänge von 488 nm anregt. Zur Detektion der emittierten Fluoreszenz stehen drei Filter mit verschiedenen Wellenlängen zur Verfügung: 530/30 nm (grünes Farbspektrum), 585/42 nm (orange) und 670/LP nm (rot). Dabei werden der 530/30-Filter für FITC-gekoppelte Proben und der 585/42-Filter für PE-gekoppelte Proben benötigt. Der 670/LP-Filter kann im Bedarfsfall für weitere, z.B. PerCP\*-gekoppelte Proben verwendet werden. Es wurden ausschließlich monoparametrische Messungen, also Messungen mit einfach gefärbten Proben, durchgeführt.

Die Zellen werden wie gewöhnlich von dem verwendeten Zellträger abgelöst und zwei Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wird die Zellsuspension auf  $1 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter eingestellt. Pro Messung werden  $1 \times 10^5$  Zellen benötigt und angefärbt, diese sind in 100  $\mu$ L der hergestellten Zellsuspension enthalten. Die benötigten Antikörper werden bis auf ein Volumen von 20  $\mu$ L mit PBS mit 2 % FCS gemischt (PBSF), außerdem wird eine Blindprobe (ohne Antikörper) benötigt. Zu jeder dieser Antikörper-Lösungen werden 100  $\mu$ L der zuvor hergestellten Zellsuspension pipettiert und diese dann für 30 Minuten bei + 4°C im Dunkeln inkubiert.

---

\* PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein, ein wasserlösliches (Carotinoid-) Pigment

Antikörper	Menge [ $\mu\text{L}$ ]	Menge [ $\mu\text{g}$ ]	PBSF [ $\mu\text{L}$ ]
Anti-CD34-PE	2	0,05	18
Anti-CD44-PE	2	0,12	18
Anti-CD45-FITC	2	0,1	18
Anti-CD73-PE	2	0,025	18
Anti-CD90-FITC	1	0,5	19
Anti-CD105-FITC	1	0,1	19
Isotypkontrolle FITC	0,5	0,5	19,5
Isotypkontrolle PE	1,2	0,12	18,8

Während der Inkubationszeit kann das FACSCalibur für die Messungen vorbereitet werden. Zur Auswertung der generierten Daten wurde das Programm WinMDI in der Version 2.9 benutzt.

## A.5 RT-PCR

### RNA-Extraktion

Für die Isolierung der gesamten RNA werden die Zellen wie zuvor beschrieben vom Zellkulturgefäß bzw. Zellträger abgelöst, mit PBS gewaschen und in *RNA tidy G* resuspendiert. Diese Suspension wird bei Bedarf bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Analyse gelagert. Durch das Einfrieren und Auftauen werden die Zellen bereits geöffnet, so dass kein weiterer Zellaufschluss nötig ist. Die folgenden Arbeiten werden auf Eis, also bei etwa  $4^{\circ}\text{C}$ , durchgeführt.

Die Zellen werden (auf Eis) aufgetaut, kurz gevortext und für 10 min. bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, um grobe Zelltrümmer loszuwerden. Der Überstand, der die löslichen Zellbestandteile enthält, wird in ein neues 2 mL-Reagiergefäß überführt und mit 200  $\mu\text{L}$  Chloroform (je eingesetztem Milliliter *RNA tidy G*) versetzt. Nach zwei- bis dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und mehrmaligem Invertieren des Reagiergefäßes wird erneut für 10 min. bei 12.000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Dadurch wird die Lösung in drei Phasen getrennt. Die obere, wässrige Phase enthält alle RNA-Anteile, in der unteren Phase sammeln sich Phenol- und Chloroformreste. An der Grenzschicht beider Phasen, der Interphase, sammeln sich Proteine und die höhermolekulare DNA. Die obere Phase wird vorsichtig in ein neues 1,5 mL-Reagiergefäß überführt und mit mindestens dem doppelten Volumen Isopropanol (reinst) versetzt. Durch die anschließende zwei- bis dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur wird die RNA gefällt und durch abermaliges Zentri-



fugieren (5 min., 12.000 g) wird die gefällte RNA pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 75 %igem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Letztlich wird das RNA-Pellet in 20 µL RNase-freiem Wasser resuspendiert. Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wird mit dem Spektralphotometer NanoDrop 1000 bestimmt.

### Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um die isolierte RNA in einer PCR einsetzen zu können muss sie zunächst in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Dazu wird ein Oligo-dT-*Primer* eingesetzt, der spezifisch an die für mRNA (*messenger RNA*) typischen poly-A-Schwänze bindet. So wird gleichzeitig sichergestellt, dass nur die mRNA gezielt amplifiziert wird und nicht die in viel höherer Konzentration vorliegende ribosomale RNA (rRNA).

Pro Probe werden 2 µg RNA und 3 µL oligo-dT-*Primer* (100 µM) eingesetzt. Der Ansatz wird bis auf 21 µL mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und für 5 min. bei 65 °C inkubiert. Dadurch werden die Sekundärstrukturen der RNA aufgebrochen, so dass der Primer an die RNA binden kann. Nach anschließender Abkühlung bei 4 °C werden jedem Ansatz 4 µL dNTP-Mix (2,5 mM), 8 µL 5-fach RT-Puffer, 1 µL Reverse Transkriptase (200 U/µL) sowie 6 µL RNase-freies Wasser als weitere Komponenten zugegeben. Während der nun folgenden 60-minütigen Inkubation bei 37 °C wird die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wird durch fünfminütiges Erhitzen auf 65 °C gestoppt.

### Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die zuvor in einer reversen Transkription in cDNA umgeschriebene mRNA wird nun unter Verwendung einer Taq-Polymerase, dNTPs und spezifischen *Primern* in der eigentlichen PCR amplifiziert.

Ansatz je Probe und <i>Primer</i> paar:	1 µL	cDNA
	5 µL	10 × PCR-Puffer
	4 µL	dNTP-Mix
	37,75 µL	H <sub>2</sub> O
	je 1 µL	<i>sense</i> und <i>antisense Primer</i>
	0,25 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)

Eine typische PCR beginnt mit einem einmaligen Denaturierungszyklus auf den meist 35 Amplifikationszyklen, bestehend aus den drei Schritten Denaturierung, *Annealing* (bei *primerspezifischer* Temperatur  $T_A$ ) und Verlängerung, folgen und nach denen die PCR mit einem einmaligen Verlängerungszyklus abgeschlossen wird.

PCR-Programm:	1 Zyklus	95 °C	5 min	Denaturierung
	35 Zyklen	95 °C	30 s	Denaturierung
		$T_A$	30 s	Annealing
		72 °C	30 s	Verlängerung
	1 Zyklus	72 °C	7 min	Verlängerung

		Basenfolge [5' → 3']	$T_A$	Produktgröße
GAPDH	<i>sense</i>	GCC ACC CAG AAG ACT GTG GAT	61 °C	419 bp
	<i>antisense</i>	TGG TCC AGG GTT TCT TAC TCC		
Col I	<i>sense</i>	GAA AAC ATC CCA GCC AAG AA	57 °C	234 bp
	<i>antisense</i>	CAG GTT GCC AGT CTC CTC AT		
Col III	<i>sense</i>	CAT CTG GTC ATC CTG GTT CC	57 °C	234 bp
	<i>antisense</i>	CCT TTT CTC CAT TTC GTC CA		
Runx2	<i>sense</i>	TCT TCA CAA ATC CTC CCC	52 °C	229 bp
	<i>antisense</i>	TGG ATT AAA AGG ACT TGG TG		
BSP2	<i>sense</i>	CAT TTT GGG AAT GGC CTG TG	60 °C	564 bp
	<i>antisense</i>	ATT GTC TCC TCC GCT GCT GC		
OPN	<i>sense</i>	CTA GGC ATC ACC TGT GCC ATA CC	60 °C	330 bp
	<i>antisense</i>	CAG TGA CCA GTT CAT CAG ATT CAT C		
BMP-2	<i>sense</i>	GTG TCC CCG CGT GCT TCT TAG	60 °C	479 bp
	<i>antisense</i>	ACT CCT CCG TGG GGA TAG AAC		
BMP-4	<i>sense</i>	TGA CTC ACC TCC ATC AGA CT	48 °C	394 bp
	<i>antisense</i>	GGG ATA CTG GAA TTG ACA GA		
OC	<i>sense</i>	AGG CGC TAC CTG TAT CAA T	48 °C	315 bp
	<i>antisense</i>	CAG ATT CCT CTT CTG GAG TTT		
AP	<i>sense</i>	GCT GAA CAG GAA CAA CGT GA	51 °C	267 bp
	<i>antisense</i>	CCA CCA AAT GTG AAG ACG TG		

### Agarose-Gelelektrophorese

Um die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wird im Anschluss eine Gelelektrophorese in einem 1,5 %igen Agarosegel durchgeführt. Dazu werden 1,5 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) durch kurzes Erhitzen gelöst. Zur Abkühlung wird die Lösung gerührt und es werden 5 µL Ethidiumbromid zugegeben. Die gelöste Agarose wird dann in die Gelkammer gegossen, die zuvor mit einem 24 Zähne zählenden Kamm bestückt wurde, wo sie zunächst zu einem Gel aushärtet. Zur Probenvorbereitung werden je 5 µL der durch die RT-PCR erhaltenen Proben mit 5 µL Ladefarbe vermischt. Nachdem das Agarosegel ausgehärtet ist und die Laufkammer mit TAE-Puffer aufgefüllt wurde, können die vorbereiteten Proben vorsichtig in die Taschen des Gels pipettiert werden. Zusätzlich wird eine Tasche mit 5 µL eines 1:1-Gemisches aus Marker und Ladefarbe gefüllt. Durch die Ladefarbe werden die Proben beschwert und sinken auf den Grund der Taschen herab, wodurch ein Auslaufen der Probentaschen verhindert wird.

Nach Kopplung der Elektroden wird eine Spannung von 65 V angelegt und die Proben in etwa 45 min. entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Dabei bindet das zuvor in das Gel gegebene Ethidiumbromid an die DNA, wodurch die Proben im Gel im Anschluss an die Elektrophorese unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden können. Je mehr DNA in einer Probe vorhanden ist, desto mehr Ethidiumbromid wird gebunden und desto intensiver leuchtet die Probe unter dem UV-Licht. Die Auswertung und die Normalisierung der Bandenintensitäten auf den internen Standard GAPDH erfolgt mit dem Programm DigiDoc<sup>®</sup> 1000.

TAE-Puffer (50-fach):      242 g    Tris-Base  
                                 57,1 mL    Essigsäure (konz.)  
                                 100 mL    0,5 M EDTA (pH: 8,0)  
                                 mit dH<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen

## A.6 Raster-Elektronen-Mikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) werden Objekte mit Hilfe von Elektronenstrahlen vergrößert abgebildet. Zur Vorbereitung werden die kleinen Stücke der besiedelten Spoceram<sup>®</sup>-Träger zunächst zweimal mit PBS gespült und im Anschluss mit Karnovsky-Puffer überschichtet mit dem sie für 24 h bei 4 °C inkubiert werden. Danach werden sie ein- bis zweimal mit Cacodylatpuffer (0,2 M in dH<sub>2</sub>O, pH 7,3) gespült, in dem sie im Anschluss bei 4 °C gelagert werden können.

Um die besiedelten Träger mit dem Rasterelektronenmikroskop betrachten zu können müssen die Proben vollständig entwässert werden. Dies wird durch Überschichtung und jeweils 15-minütiger Inkubation mit Aceton/Wasser-Gemischen steigender Acetonkonzentration (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) erreicht. Die Überschichtung mit reinem Aceton wird zweimal wiederholt. Abschließend werden die Proben bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Die Aufnahmen wurden von Stefanie Röker und Stefanie Böhm an einem JEOL JSM-6700F Rasterelektronenmikroskop (Physikalische Chemie, Leibniz Universität Hannover) bei einer Beschleunigungsspannung von 2kV angefertigt.

Karnovsky-Puffer:

5 mg	CaCl <sub>2</sub>
10 mL	Cacodylatpuffer
20 µL	Glutaraldehyd (50 %)
2,48 mL	dH <sub>2</sub> O

## B. Materialien

### B.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Autoklav (V75)	Systec, Wettenberg
Bioreaktoren (Z <sup>®</sup> RP und Z <sup>®</sup> RPD)	Zellwerk GmbH, Oberkrämer
DigiDoc <sup>®</sup> 1000	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
Digitalkameras	Olympus Europa GmbH, Hamburg (DP50) CASIO Europe GmbH, Norderstedt (Exilim) Eastman Kodak Company, Japan (DC290 Zoom)
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Beckman & Coulter Inc., Brea, USA
Fluoreszenzmikroskop (BX-61 mit U-RFL-T)	Olympus Europa GmbH, Norderstedt
Inkubator (HeraCell)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inversmikroskop (Wilovert S)	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
PCR-Thermocycler	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Phasenkontrastmikroskop (BX-61 mit BX-UCR)	Olympus Europa GmbH, Norderstedt
Photospektrometer (ND1000)	Nano Drop Technologies, Wilmington, USA
Pipetten (Reference)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe (Pipetus <sup>®</sup> -Akku)	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt
Plattenlesegerät (Jupiter)	Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Österreich
Rasterelektronenmikroskop (JSM-6700F)	Jeol Ltd., Tokyo, Japan
Reinstwasseranlage	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Sterilbänke (HeraSafe)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermomixer (Comfort)	Eppendorf AG, Hamburg
UV-Tische	Carl Roth GmbH, Karlsruhe biostep GmbH, Jahnsdorf (UVE-20ME)
Zählkammer (Fuchs-Rosenthal)	Brand GmbH + Co KG, Wertheim
Zentrifugen	Heraeus Holding GmbH, Hanau (Megafuge 3.0 R) Eppendorf AG, Hamburg (5415R und 5415D)
YSI 2700 Select Analyzer (Biochemischer Analysator)	Yellow Springs Instruments Inc., Yellow Springs, USA

## B.2 Verbrauchsmaterial

### Material

Einmalhandschuhe (Kolibri)  
 Serologische Pipetten (5, 10 und 25 ml)  
 Kanülen  
 Kryoröhrchen (1,2 ml)  
 Mikrotiterplatten (6, 24 und 96 Wells)  
 Petrischalen (35 und 100 mm)  
 Pipettenspitzen (bis 10, 100 und 1.000 µl)  
 Reagiergefäße (0,1 mL)  
 Reagiergefäße (1,5 und 2 ml)  
 Reagiergefäße (15 und 50 ml)  
 Sponceram<sup>®</sup>  
 Spritzen (5, 10, 20 und 50 ml)  
 Sterilfilter 0,1 µm (Spritzenvorsatzfilter)  
 Zellkulturflaschen (25, 75 und 150 cm<sup>2</sup>)

### Hersteller

Igefa Handels GmbH & Co. KG,  
 Ahrensfelde  
 TPP AG, Trasadingen, Schweiz  
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
 TPP AG, Trasadingen, Schweiz  
 TPP AG, Trasadingen, Schweiz  
 TPP AG, Trasadingen, Schweiz  
 Brand GmbH + Co KG, Wertheim  
 Thermo Fisher Scientific, Dreieich  
 Carl Roth GmbH, Karlsruhe  
 TPP AG, Trasadingen, Schweiz  
 Zellwerk GmbH, Oberkrämer  
 B. Braun Melsungen AG, Melsungen  
 Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne  
 Cedex, Frankreich  
 TPP AG, Trasadingen, Schweiz

## B.3 Reagenzien

### Reagenz

10 × PCR-Puffer C  
 5 × RT-Puffer (M-MLV RT 5 × Buffer)  
 Accutase  
 Aceton  
 Agarose  
 Alizarinrot S  
 Alpha MEM Eagle  
 Amniopan  
 Antikörper  
 Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat  
 (Cacodylat)  
 Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)  
 Collagenase  
 DAPI  
 Dexamethason

### Hersteller

OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG,  
 Bremen  
 Promega GmbH, Mannheim  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim  
 VWR International GmbH, Darmstadt  
 Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe  
 Fluka Chemie AG, Seelze  
 PAN-Biotech GmbH, Aidenbach  
 PAN-Biotech GmbH, Aidenbach  
 EXBIO Praha s.a., Vestec, Tschechien  
 (CD34, CD44, CD45, Isotypkontrollen);  
 BD Biosciences, San Jose, Kalifornien,  
 USA (CD73, CD90);  
 R&D Systems, Minneapolis, USA (CD105)  
 Merck KGaA, Darmstadt  
 Merck KGaA, Darmstadt  
 PAA Laboratories, Paschingen, Österreich  
 Merck KGaA, Darmstadt  
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

---

DMEM	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTPs	Eppendorf AG, Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
Gase (Luft, O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> )	Linde AG, Pullach
Gentamycinsulfat	Biochrom AG, Berlin
Glutaraldehyd	Amersham Pharmacia Biotech AG, Uppsala, Schweden
Ham's F-12	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Humanserum	Transfusionsmedizin, Medizinische Hochschule Hannover
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
MTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Fluka Chemie AG, Seelze
Oligo-dT- <i>Primer</i>	Promega GmbH, Mannheim
PBS	PAA Laboratories, Paschingen, Österreich
<i>Primer</i>	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	Promega, Mannheim
RNA tidy G	AppliChem GmbH, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Silbernitrat-Lösung	Fluka Chemie AG, Seelze
Taq-Polymerase (omniTaq OLS <sup>®</sup> )	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen
Toluidinblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β-Glycerophosphat	Alfa Aesar GmbH & Co. KG, Karlsruhe

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Dana Maria Marten  
Geburtsdatum, -ort 31.03.1978, Berlin

### Schulbildung

1984 – 1990 Gotzkowsky-Grundschule, Berlin-Tiergarten  
1990 – 1994 Menzel-Oberschule (Gymnasium), Berlin-Tiergarten  
1994 – 1998 Bertha-von-Suttner-Oberschule (Gymnasium), Berlin-Reinickendorf  
Abschluss: Abitur

### Studium

2000 – 2004 Studium der Bioinformatik, Freie Universität Berlin  
Abschluss: Bachelor of Science  
2004 – 2006 Studium der Life Sciences, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität  
Hannover  
Abschluss: Master of Science  
2007 – 2010 Promotion am Institut für Technische Chemie, Gottfried Wilhelm  
Leibniz Universität Hannover

11/2006 – 03/2007 Wissenschaftliche Mitarbeit im Labor der Klinik für Plastische,  
Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Medizinische Hochschule  
Hannover  
05/2007 – 04/2009 Wissenschaftliche Mitarbeit bei der Zellwerk GmbH, Oberkrämer  
05/2009 – 03/2010 Wissenschaftliche Mitarbeit am Institut für Technische Chemie,  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover



## Publikationen

"3D- Zellkultivierung im Z<sup>®</sup> RP-System"

Dana Marten, Kirstin Suck, Solvig Diederichs, Stefanie Röker, Martijn van Griensven, Christian Leschke, Hans Hoffmeister, Cornelia Kasper  
Chem. Ing. Tech., 2008, 80, 1803-8, Wiley VCH

"Dynamic cultivation of human mesenchymal stem cells in a rotating bed bioreactor system based on the Z<sup>®</sup> RP platform"

Solvig Diederichs, Stefanie Röker, Dana Marten, Anja Peterbauer, Thomas Scheper, Martijn van Griensven, Cornelia Kasper  
Biotechnol. Prog., 25(6):1762-1771, 2009

"Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: Primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications"

Pierre Moretti, Tim Hatlapatka, Dana Marten, Antonina Lavrentieva, Ingrida Majore, Ralf Hass, Cornelia Kasper  
Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Dez 2009 (Online first)

"3-dimensional, dynamic cultivations of human umbilical cord-derived cells"

Dana Maria Marten, Stefanie Röker, Stefanie Böhm, Hans Hoffmeister, Cornelia Kasper  
ESACT Proceedings 2009 (im Druck)